

**Vergleichende Untersuchungen  
der suprachiasmatischen Nuclei von  
rhythmischen und arrhythmischen  
Dsungarischen Zwerghamstern  
(*Phodopus sungorus*).**

Vom Fachbereich Biologie der Universität Hannover  
zur Erlangung des Grades

Doktorin der Naturwissenschaften  
Dr. rer. nat.

genehmigte Dissertation

von

Frauke Perl

geboren am 28. Juni 1971 in Celle

Hannover 2005

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

Korreferent: Prof. Dr. Wilfried Meyer  
Institut für Anatomie, Tierärztliche Hochschule Hannover

Tag der Promotion: 25. November 2004

**Und Gott sprach:  
Es werden Lichte  
an der Feste des Himmels,  
die da scheiden Tag und Nacht  
und geben Zeichen, Zeiten,  
Tage und Jahre  
und seien Lichte  
an der Feste des Himmels,  
dass sie scheinen auf die Erde.[...]**

**1. Mose 1, 14-15**

# Zusammenfassung

Der Dsungarische Zwerghamster, *Phodopus sungorus*, ist ein extrem saisonales Nagetier und reagiert daher sensibel auf Veränderungen der Photoperiode. Diese ausgeprägte Fixierung auf photische Reize macht ihn außerordentlich anfällig für Störungen in diesem Bereich. Unter Laborbedingungen kann daher durch gezielte Lichtpulse in der Dunkelphase arrhythmisches Verhalten hervorgerufen werden, das sich im Verschwinden verschiedener circadianer Rhythmen widerspiegelt – so auch das des Lokomotionsverhaltens. Neben der lichtinduzierten lokomotorischen Arrhythmie findet man bei *Phodopus* auch die altersbedingte, spontan auftretende lokomotorische Arrhythmie. Um mögliche Ursachen für das arrhythmische Verhalten festzustellen, wurden folgende Aspekte an vier verschiedenen Versuchsgruppen (jung rhythmisch, jung arrhythmisch, alt rhythmisch, alt arrhythmisch) vergleichend untersucht:

1. Lokomotorische Aktivität
2. Lichtbeeinflusste Proteine der inneren Uhr (pCREB, cFOS, PER1 und PER2 sowie NMDA-R1)
3. Histologie der Retina
4. Melanopsin- Immunreaktivität in retinalen Ganglienzellen

In dieser Studie wird erstmals gezeigt, dass spontane altersbedingte Arrhythmie und lichtinduzierte Arrhythmie nicht die gleichen Ursachen haben: Während im Alter offenbar eine verringerte Kopplung der peripheren Oszillatoren mit dem SCN der Grund für lokomotorisch arrhythmisches Verhalten ist, liegen die Ursachen bei der lichtinduzierten Arrhythmie im Input zum SCN oder in der Verschaltung innerhalb des SCN.

Außerdem konnte gezeigt werden, dass altersbedingte Veränderungen sukzessiv voranschreiten und nicht gleichzeitig auftreten müssen.

Schließlich gibt diese Studie erste Hinweise darauf, dass es bei alten Tieren zu einem Defizit an Melanopsin in den Ganglienzellen der Retina kommen kann und dass dies möglicherweise Auswirkungen auf die Entwicklung von Arrhythmie im Alter hat.

Schlagworte: Arrhythmie, *Phodopus sungorus*, Uhrengene

## Abstract

The Dsungarian hamster, *Phodopus sungorus*, is a highly seasonal rodent and therefore reacts extremely sensitive to changes in photoperiod. The pronounced reliance on photic input makes these animals most susceptible to light disturbances. By using defined light pulses under controlled laboratory conditions it is possible to abolish circadian rhythms and to evoke arrhythmic behaviour such as arrhythmic locomotion. Besides the light-induced arrhythmic behaviour there also occurs spontaneous age-related locomotive arrhythmia in *Phodopus*.

In order to detect possible causes for the described types of locomotive arrhythmia the following aspects were investigated comparatively in four distinct groups of animals (young rhythmic, young arrhythmic, old rhythmic, old arrhythmic):

1. Locomotor activity
2. Light-controlled proteins of the master-clock (pCREB, cFOS, PER1 and PER2 as well as NMDA-R1)
3. Histology of the retina
4. Melanopsin-immunoreactivity in retinal ganglion cells

This study shows the first time, that spontaneous and light-induced arrhythmic behaviour have different causal origins (or sources): Whereas in old-age arrhythmia the coupling of the peripheral oscillators to the SCN seems to be weakened, the reasons for light-induced arrhythmia has to be searched for upstream of, or in the SCN itself.

Furthermore this investigation suggests that age-related changes in the circadian system do not occur simultaneously but gradually.

Finally the study provides first evidence, that retinal ganglion cells in some aged animals may display a melanopsin deficiency and that this lack of melanopsin possibly affects the development of arrhythmia in old-age.

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

# Inhaltsverzeichnis

<b>1 EINLEITUNG .....</b>	<b>1</b>
1.1 CIRCADIANE RHYTHMEN.....	1
1.2 NUCLEUS SUPRACHIASMATICUS, DIE „INNERE UHR“ DER SÄUGETIERE .....	2
1.2.1 Neuroanatomie .....	3
1.2.2 Afferenzen.....	4
1.2.3 Efferenzen.....	6
1.2.4 Molekulare Grundlagen .....	7
1.3 DER EINFLUSS VON LICHT AUF DIE MECHANISMEN DER INNEREN UHR .....	10
1.4 „ARRHYTHMISCHER“ LOKOMOTORISCHER OUTPUT .....	13
1.5 FRAGESTELLUNG.....	14
<b>2 MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>16</b>
2.1 VERSUCHSTIERE UND HALTUNGSBEDINGUNGEN.....	16
2.2 AKTIVITÄT .....	17
2.2.1 Aktivitätsaufzeichnung .....	17
2.2.2 Applikation von Lichtpulsen.....	17
2.2.3 Auswertung und Statistik.....	18
2.3 IMMUNHISTOCHEMIE .....	20
2.3.1 Immunhistochemie an Gewebeschnitten .....	20
2.3.1.1 Gewebeentnahme .....	20
2.3.1.2 Gewebeaufbereitung.....	21
2.3.1.3 Färbeprotokolle .....	22
2.3.1.4 Auswertung .....	24
2.3.1.5 Statistik.....	28
2.3.1.6 Histologische Färbemethode .....	28
2.3.2 Gel-Elektrophorese und Western-Blot .....	29
2.3.2.1 Gewebegewinnung und –aufbereitung.....	29
2.3.2.2 SDS-PAGE Gel-Elektrophorese .....	30
2.3.2.3 Western-Blot .....	30
2.3.2.4 Immundetektion der Proteine .....	30
2.4 REVERSE-TRANSCRIPTASE-POLYMERASE-CHAIN-REACTION (RT-PCR).....	31
2.4.1 Extraktion und Isolierung der RNA.....	31
2.4.2 RT-PCR .....	32
2.4.3 Elektrophorese .....	32
<b>3 ERGEBNISSE .....</b>	<b>33</b>
3.1 AKTIVITÄT .....	33
3.1.1 Aktogramme .....	33
3.1.2 Nachtaktivität .....	37
3.1.3 Aktivitätsbeginn (Onset) und –ende (Offset) .....	38
3.1.4 Fragmentierung der Aktivität.....	38
3.2 IMMUNHISTOCHEMIE AM SCN VON <i>PHODOPUS SUNGORUS</i> .....	40
3.2.1 Zeitliche Verteilung.....	40
3.2.1.1 mPER1 .....	40
3.2.1.2 mPER2 .....	41
3.2.1.3 pCREB .....	60

3.2.1.4 cFOS .....	76
3.2.1.5 Glutamatrezeptor NMDA-R1 (=NR1) .....	95
3.2.2 <i>Räumliche Verteilung</i> .....	101
3.2.2.1 mPER2 .....	101
3.2.2.2 cFOS .....	108
3.3 HISTOLOGIE UND IMMUNHISTOCHEMIE AN DER RETINA VON <i>PHODOPUS SUNGORUS</i> .....	115
3.3.1 <i>Histologische Untersuchungen</i> .....	116
3.3.2 <i>Immunhistochemische Untersuchungen</i> .....	116
<b>4 DISKUSSION .....</b>	<b>121</b>
4.1 TIERMODELL .....	121
4.2 AKTIVITÄT .....	121
4.3 IMMUNHISTOCHEMIE .....	125
4.3.1 <i>Zeitliche Verteilung</i> .....	125
4.3.1.1 Period-Gene <i>mPer1</i> und <i>mPer2</i> und ihre Translationsprodukte .....	125
4.3.1.2 pCREB .....	129
4.3.1.3 cFOS .....	131
4.3.1.4 Glutamatrezeptor NMDA-R1 (= NR1) .....	134
4.3.2 <i>Räumliche Verteilung der untersuchten Proteine im SCN</i> .....	137
4.3.2.1 mPER2 .....	137
4.3.2.2 cFOS .....	138
4.3.2.3 Vergleich mPER2 und cFOS .....	139
4.4 MELANOPSIN IN DER RETINA.....	140
4.5 WIE PASST DAS ALLES ZUSAMMEN?! .....	142
4.6 AUSBLICK .....	143
<b>5 LITERATUR .....</b>	<b>146</b>
<b>6 ANHANG .....</b>	<b>160</b>
6.1 ANHANG A - ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	160
6.2 ANHANG B - MITTELWERTE DER GEZÄHLTEN IMMUNREAKTIVEN ZELLEN .....	163
6.3 ANHANG C - MATERIAL.....	167
<b>7 DANKSAGUNG .....</b>	<b>178</b>





# 1 Einleitung

Eine Vielzahl von Rhythmen beeinflussen das Leben von Organismen; sie haben sehr verschiedene Periodenlängen von wenigen Millisekunden bis hin zu mehreren Jahren (z.B. Aschoff 1981; Begon *et al.* 1991; Gorman 1995; Hoffmann 1973; Steinlechner *et al.* 1987). Ubiquitär für das Leben schlechthin scheint jedoch der durch die Erdrotation verursachte Tag-Nacht-Wechsel zu sein. Dieser Tagesrhythmus ist grundlegend und prägend für das Leben der meisten Organismen. So laufen sehr viele physiologische Prozesse und Verhaltensweisen tagesperiodisch ab und sind an den Wechsel der Beleuchtungsverhältnisse angepasst. Dies stellte in der Evolution offenbar einen Selektionsvorteil dar, durch den die Organismen ihr Leben bestmöglich organisieren (Cloudsley-Thompson 1960; Roenneberg und Mellow 2002a, 2002b). Die Anpassung an den Zeitgeber Licht (Aschoff 1951) geschieht jedoch nicht passiv, sondern wird durch eine innere Uhr gesteuert (Pittendrigh 1981); diese gewährleistet eine optimale zeitliche Synchronisation des Organismus an seine sich periodisch verändernde Umwelt. Die Tagesperiodik der Organismen ist jedoch nicht auf den externen Zeitgeber angewiesen: Unter gleichbleibenden Bedingungen (im sogenannten Freilauf) generiert die innere Uhr autark eine Periodenlänge ( $\tau$ ) von ungefähr 24 Stunden. Man spricht deshalb von einem circadianen (circa: ungefähr, dies: Tag) Rhythmus.

## 1.1 Circadiane Rhythmen

Damit ein Rhythmus als circadian betrachtet wird, müssen verschiedene Bedingungen erfüllt sein (Aschoff 1960):

- (1) Die Periodenlänge ( $\tau$ ) muss stabil sein und ungefähr 24 Stunden betragen.
- (2) Die Periodenlänge ( $\tau$ ) muss unter gleichbleibenden Bedingungen persistieren, d.h. sie muss einen endogen generierten Freilauf zeigen.
- (3) Der Rhythmus muss temperaturkompensiert sein, d.h. der  $Q_{10}$  sollte etwa 1 betragen.
- (4) Die Periodenlänge ( $\tau$ ) muss sich durch externe Zeitgeber synchronisieren lassen (Aschoff 1951). Bei diesen externen Zeitgebern kann es sich um die verschiedensten Umweltreize handeln. So wird unter anderem sowohl von Synchronisation an Temperaturänderungen (Hoffmann 1968; Laemle und Ottenweller 1999) als auch an Nahrungsverfügbarkeit (Challet *et al.* 1998) und einer Geräuschkulisse (Menaker und Eskin 1966) berichtet; außerdem gibt es soziale Komponenten, die als Zeitgeber

fungieren (Goel und Lee 1997; Levine *et al.* 2002; Rajaratnam und Redman 1999). Der wichtigste und allumfassendste Zeitgeber ist jedoch die bereits erwähnte Photoperiode (Pittendrigh und Daan 1976).

## **1.2 *Nucleus suprachiasmaticus*, die „innere Uhr“ der Säugetiere**

Nahezu alle Organismen besitzen eine innere Uhr, die es ihnen ermöglicht, aktiv und vorausschauend auf die periodischen Veränderungen in ihrer Umwelt zu reagieren. Die Tatsache, dass Säugetiere eine solche innere Uhr besitzen müssen, ist seit langem bekannt; bis in die 70er Jahre des letzten Jahrhunderts gab es jedoch kaum konkrete Hinweise darauf, wo diese Uhr anatomisch lokalisiert ist. Durch *Tracing*-Studien und Läsionsexperimente konnte 1972 schließlich der *Nucleus suprachiasmaticus* (SCN) - ein kleines, bilateral angelegtes, hypothalamisches Kerngebiet, das über dem *Chiasma opticum* (Co) an der Basis des dritten Ventrikels liegt - lokalisiert werden (Abb.1; Moore und Eichler 1972, Stephan und Zucker 1972). Durch Zerstörung dieses Kerngebiets werden fast alle circadianen Rhythmen vernichtet (Moore und Eichler 1972, Rusak und Zucker 1979; Stephan und Zucker 1972). Gestützt werden diese Untersuchungsergebnisse durch Reimplantations-Experimente: Intaktes SCN-Gewebe wurde in ein Tier mit lädiertem SCN implantiert und stellte die circadiane Rhythmizität mit der Periodenlänge und Phasenlage des Spendertieres wieder her (Drucker-Colin *et al.* 1984; Ralph *et al.* 1990; Ralph 1991; Sakawi *et al.* 1984). Auch *in vitro* generiert der SCN weiterhin circadiane Rhythmen (Green und Gillette 1982; Groos und Hendricks 1982; Shibata *et al.* 1982; Shibata und Moore 1993; Yamaguchi *et al.* 2003) und sogar auf Einzelzellebene (dissoziierte SCN-Neurone) lässt sich *in vitro* ein persistierender circadianer Rhythmus nachweisen – z.B. bei der Entladungsfrequenz (Welsh *et al.* 1995) oder bei der AVP-Synthese (Murakami *et al.* 1991). Der Synchronisierungsmechanismus der Entladungsfrequenz der einzelnen Neurone ist noch nicht erschöpfend geklärt. Es gibt jedoch Hinweise, dass Neuropeptide eine wesentliche Rolle spielen könnten (Colwell *et al.* 2003; Cutler *et al.* 2003; Yamaguchi *et al.* 2003); außerdem scheint der Neurotransmitter GABA auf die Synchronisation der Neurone maßgeblich einzuwirken (Liu und Reppert 2000; Strecker *et al.* 1997).

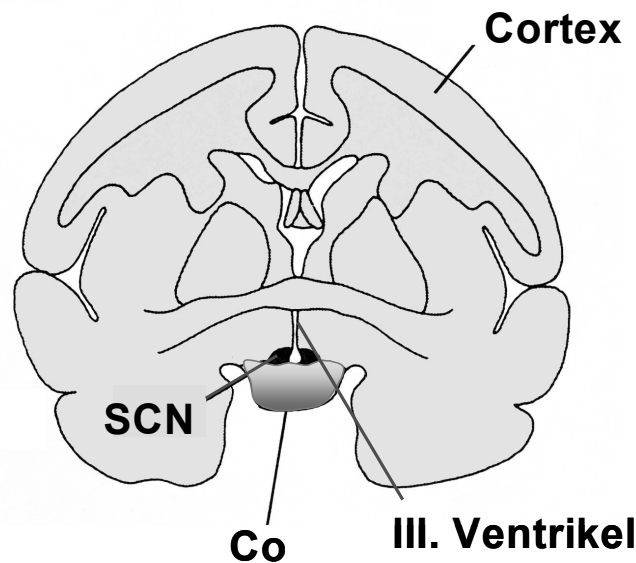


Abb.1: Darstellung der Lage des *Nucleus suprachiasmaticus* an einem schematischen coronalen Hirnschnitt. Co: *Chiasma opticum*, SCN: *Nucleus suprachiasmaticus* (aus Purves *et al.* 1995, S. 1047).

### 1.2.1 Neuroanatomie

Der SCN besteht bei Nagern aus etwa 8.000 bis 10.000 meist sehr kleinen Neuronen (Card 1999; Moore *et al.* 2002; van den Pol und Tsujimoto 1985; van den Pol 1991). Läsionsstudien postulierten, dass auch eine sehr geringe Anzahl an beliebigen SCN-Zellen ausreichen, um die Rhythmik des SCN aufrecht zu erhalten und implizierten eine homogene Struktur (Davis und Gorski 1988; Harrington *et al.* 1993; Rusak 1977). Aktuellere neuroanatomische Untersuchungen zur internen Organisation des SCN haben jedoch gezeigt, dass er aus mehreren voneinander abgrenzbaren Untereinheiten besteht. Klassisch wird er, angelehnt an den *Nucleus accumbens*, in zwei Bereiche unterteilt (Abb. 2): Einen dorso-medialen („shell“) und einen ventro-lateralen („core“) Bereich (Leak *et al.* 1999; Meredith *et al.* 1993). Hierbei wurde der Aspekt funktioneller Einheiten in den Vordergrund gestellt: Zum einen wurden die Muster der neuronalen Afferenzen und Efferenzen, zum anderen die Morphologie der Zellen und schließlich auch neurochemische Eigenschaften zur Abgrenzung der beiden Bereiche herangezogen (Abb.2-4; Moore 1996; Romijn *et al.* 1997; zur Übersicht: van den Pol 1991). Auch neue Studien an Mäusen und Hamstern zeigen, dass es mindestens zwei funktionelle Bereiche im SCN gibt: Im *core*-Bereich des SCNs gibt es Calbindin (CalB) positive Neurone, die interessanterweise keine circadiane Rhythmik aufweisen, jedoch lichtinduzierte Period

(Per) -Gene exprimieren und notwendig für die lokomotorische Rhythmisierung sind (LeSauter und Silver 1999). In der *shell*-Region hingegen wird von bestimmten Neuronen ein endogener Rhythmus der Per-Gene generiert (Hamada *et al.* 2001; Karatsoreos *et al.* 2004; Kriegsfeld *et al.* 2004).

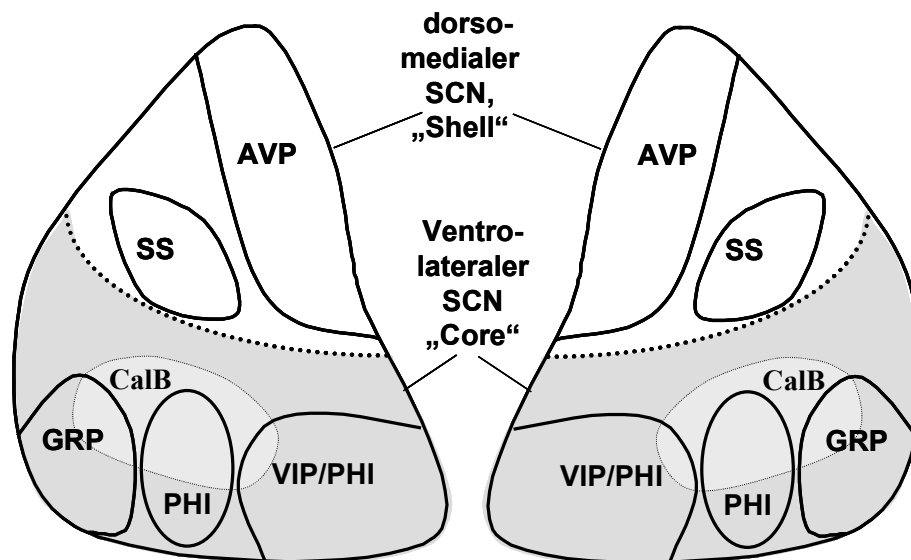


Abb.2: Klassische Einteilung des *Nucleus suprachiasmaticus* in „core“ und „shell“ mit den für die Regionen spezifischen Neurotransmittern AVP: Adenosin Vasopressin; SS: Somatostatin; GRP: *gastrin releasing peptide*; VIP: *vasactive intestinal polypeptide*; PHI: *peptide histidin isoleucin*; CalB: Calbindin. (Verändert nach Romijn *et al.* 1996).

### 1.2.2 Afferenzen

Bei Säugetieren ist das afferente System des SCN - ebenso wie das efferente - weitläufig und soll hier nur in der vereinfachten Form dargestellt werden (Abb.3; zur Übersicht: Card 1999). Die am besten charakterisierten Projektionen zum SCN sind die, die von der Retina der Lateralaugen ausgehen und via retinohypothalamischem Trakt (RHT) monosynaptisch auf den SCN verschaltet werden. Der RHT ist eine Untereinheit des *Nervus opticus*; wird er durchtrennt, können die endogenen Rhythmen nicht mehr mit der photischen Umwelt synchronisiert werden (Johnson *et al.* 1988a). Der RHT projiziert auf den ventro-lateralen, retinorezipienten Bereich des SCN (Johnson *et al.* 1988b; Moore und Lenn 1972). Wenn eine Reizung des *Nervus opticus* stattgefunden hat, dann wird dort aus den Terminalen des RHT die exzitatorische Aminosäure Glutamat freigesetzt (Cahill und Menaker 1989; Castel *et al.* 1993; Liou *et al.* 1986; van den Pol 1991; zur Übersicht: Piggins und Rusak 1999). Neben

Glutamat kann auch *pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide* (PACAP) im RHT nachgewiesen werden (Hannibal *et al.* 1997), das in den retinalen Ganglienzellen mit Glutamat co-lokalisiert ist (Hannibal *et al.* 2000). Die Rolle von Substanz P im RHT wird widersprüchlich diskutiert (Hannibal und Fahrenkrug 2002; Kim *et al.* 1999; Kim *et al.* 2001).

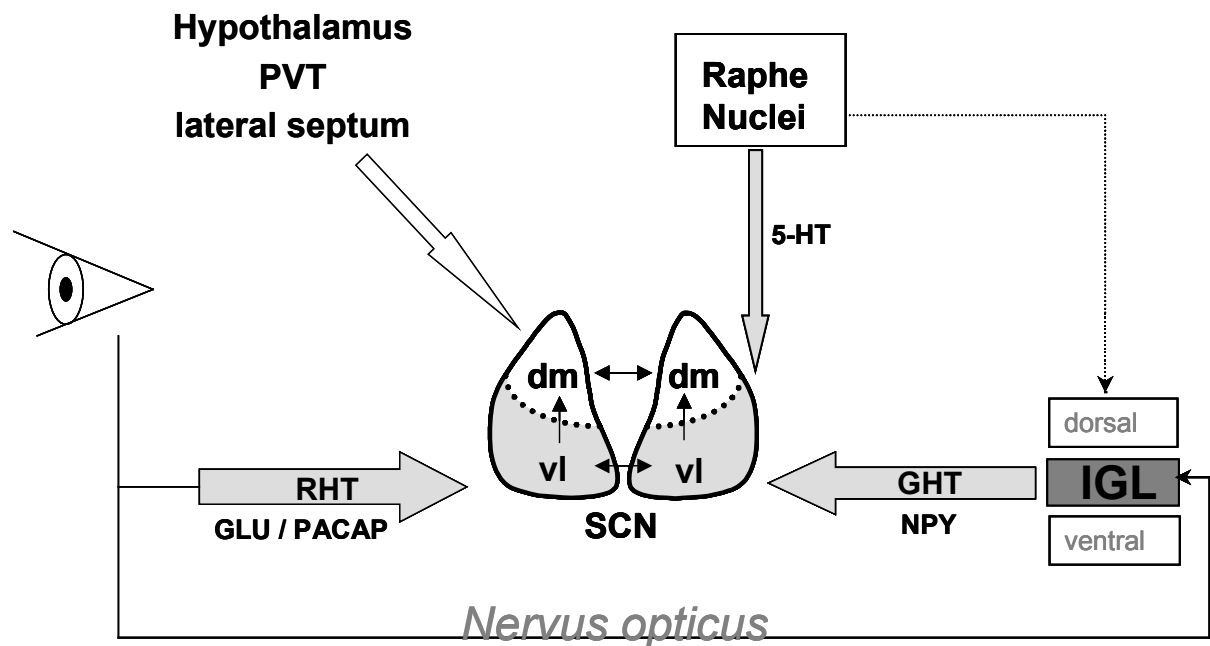


Abb.3: Schematische Darstellung der wichtigsten suprachiasmatischen Afferenzen des SCN. GHT: geniculohypothalamischer Trakt; IGL: *intergeniculate leaflet*; PVT: *paraventricular thalamic nucleus*; RHT: retinohypothalamischer Trakt; dm: dorso-medial; vl: ventro-lateral; NPY: Neuropeptid Y; 5-HT: Serotonin; GLU: Glutamat. (verändert nach Card 1999).

Weitere afferente Verbindungen zum SCN kommen vom *intergeniculate leaflet* (IGL). Diese Zellschicht des LGN (*Lateral geniculate nucleus*) hat ebenso wie der SCN einen direkten retinalen Eingang, der z.T. aus den selben retinalen Ganglienzellen entspringt, die auch den SCN ervieren (Pickard 1985; Treep *et al.* 1995; Morin *et al.* 2003); die Lichtinformation wird hier polysynaptisch auf das IGL übertragen und vermittelt über den geniculohypothalamischen Trakt (GHT) indirekte photische Signale an den SCN (Moore 1992). Die Terminalen des GHT enthalten überwiegend den Neurotransmitter Y (NPY) (Swanson *et al.* 1974; Harrington *et al.* 1985) und enden im ventro-lateralen SCN, wo sie mit dem Eingangsbereich des RHT überlappen (Stopa *et al.* 1995). Im IGN findet offenbar eine

Integration von photischen mit non-photischen Signalen statt, um so eine regulierende bzw. modulierende Funktion auf den SCN auszuüben.

Schließlich entspringt ein drittes afferentes System des SCN von den *Raphe* Nuclei; von dort wird ein serotonerges Signal in den ventralen Bereich des SCN geleitet und überlappt dort teilweise mit der retinorezipienten Region (Bosler und Beaudet 1985; Card und Moore 1984). Außerdem wird auch ein indirekter Input der *Raphe* Nuclei diskutiert, der über den IGL zum SCN geleitet wird (Meyer-Bernstein und Morin 1996). Die non-photische Information des medialen *Raphe* Nucleus (Jacobs und Azmitia 1992; Hay-Schmidt *et al.* 2003) wird als Modulator der photischen Informationen im SCN betrachtet (Morin und Blanchard 1992).

Zusammenfassend vermittelt der RHT ausschließlich photische Informationen, während der GHT integrierte Informationen von Licht und Aktivität weiterleitet und die *Raphe*-Kerne ausschließlich non-photische Informationen übertragen. Neben diesen drei „Hauptafferenzen“ gibt es noch eine Reihe weiterer afferente Projektionen; so z.B. von verschiedenen hypothalamischen Strukturen, dem thalamischen *Nucleus paraventricularis* (PVT) oder dem *lateral septum* (LS) (zur Übersicht: Card 1999).

Innerhalb des SCN können contralaterale Projektionen von „core“ zu „core“ bzw. von „shell“ zu „shell“ und ipsilaterale Projektionen von „core“ zu „shell“, jedoch nicht von „shell“ zu „core“ festgestellt werden (Leak *et al.* 1999). Diese Projektionen gewinnen an Bedeutung, wenn man die funktionelle Heterogenität des SCN betrachtet (vgl. „Neuroanatomie“)

### 1.2.3 Efferenzen

Auch wenn die Efferenzen des SCN anatomisch relativ gut untersucht sind (Watts 1991; zur Übersicht: Card 1999; Kalsbeek und Buijs 2002), so gibt es über die Funktion dieser Projektionen bisher nur unzulängliche Informationen (Piggins und Rusak 1999). Die meisten Efferenzen die vom SCN ausgehen projizieren ipsilateral in eine begrenzte Region des angrenzenden Hypothalamus, aber auch in extra-hypothalamische Bereiche (Abb.4; Watts 1991). Die Neuronen des Hypothalamus, die auf das neuroendokrine Effektorensystem einwirken und vom SCN beeinflusst werden, lassen sich nach Kalsbeek und Buijs (2002) grob in drei Kategorien einteilen: Mono- bzw. polysynaptische Verschaltungen auf neuroendokrine Neurone und Verschaltungen auf autonome Neurone im PVN.

Über die Funktion der prominenten Projektion des SCN in die subparaventriculäre Zone (SPZ) gibt es bisher wenig Informationen; es wird postuliert, dass die SPZ die zeitlichen Informationen des SCN integriert und verstärkt (Watts 1991).

Wenig weiß man bisher auch über die extra-hypothalamischen Projektionen des SCN. Insgesamt scheinen alle Zielbereiche des SCN auf ihn zurückzuprojizieren und sich so eine eigene Rückkopplung zu geben (Moga und Moore 1997).

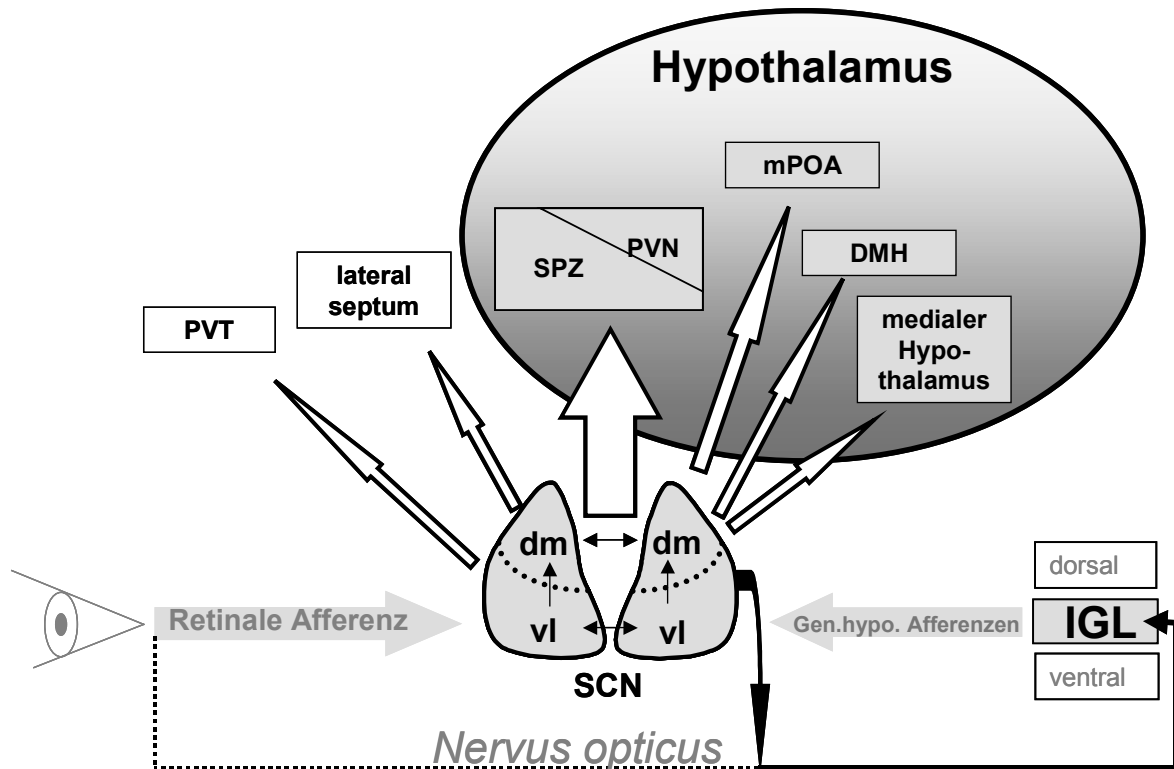


Abb.4: Schematische Darstellung der wichtigsten suprachiasmatischen Efferenzen. PVT: *paraventricular thalamic nucleus*; SPZ: *sub-paraventricular Zone*; PVN: *paraventricular nucleus*; mPOA: *medial preoptic area*; DMH: *dorso-medial hypothalamic nucleus*; IGL: *intergeniculate leaflet*.

### 1.2.4 Molekulare Grundlagen

Neben der Bedeutung des SCN als circadiane „master clock“ und seiner anatomischen Beschaffenheiten sind die molekularen Grundlagen dieser inneren Uhr in den letzten Jahren immer mehr ins Blickfeld der Forschung geraten.

Der erste Nachweis einer genetischen Basis der inneren Uhr wurde von Konopka und Benzer an der Fruchtfliege (*Drosophila melanogaster*) erbracht; die beiden Forscher fanden vor mehr als 30 Jahren das erste „Uhren“-Gen und nannten es aufgrund seiner Eigenschaften *Period* (Konopka und Benzer 1971). Durch verbesserte molekularbiologische Techniken konnten in den vergangenen Jahren eine stetig wachsende Anzahl an Uhren-Genen oder *clock-related* Genen in Modellorganismen der verschiedensten Spezies ermittelt werden – so auch bei den Säugetieren (Dunlap 1999). Im Hinblick auf die nachfolgende Arbeit werde ich mich auch im

Weiteren ausschließlich auf die molekularen Mechanismen der inneren Uhr von Säugetieren konzentrieren. Das erste Uhren-Gen dieser Tiergruppe wurde „zufällig“ bei einer Mutante des Syrischen Hamsters entdeckt und *Tau* genannt (Ralph und Menaker 1988). Kurz darauf wurde in einem Mutagenese-Screen das *Clock*-Gen gefunden (Vitaterna *et al.* 1994), das als erstes Uhren-Gen von Säugetieren geklont wurde (King *et al.* 1997). Aufgrund von gemeinsamen Eigenschaften, wie einer PAS-Domäne oder speziellen Promotor-Sequenzen, den E-Boxen, folgte die Entdeckung weiterer Gene, die an der Regulierung der inneren Uhr beteiligt sind. Insgesamt scheinen elf Gene unmittelbar in die endogenen Basismechanismen involviert zu sein, die die innere Uhr unabhängig von äußeren Einflüssen circadian „ticken“ lassen (zur Übersicht: King und Takahashi 2000; Reppert und Weaver 2002; Hirota und Fukada 2004): Drei *Per*- und zwei *Cry*-gene, *Clock*, *Bmal1*, *Tim*, *Casein kinase 1-epsilon* (CK1 $\epsilon$ ), sowie *RevErba* und *Dec1* und *Dec2* (Tab.1; Abb.5). Dieser Basismechanismus lässt sich folgendermaßen beschreiben (Abb.5): Die Proteine CLOCK und BMAL1 bilden Heterodimere, binden an die E-Box der *Per*- und *Cry*-Gene und aktivieren so deren Transkription. Die PER- und CRY-Proteine werden aus dem Cytoplasma in den Kern transportiert, inhibieren die CLOCK:BMAL1-abhängige Transkription und hemmen so ihre eigene „Produktion“. Zusätzlich zu dieser negativen Rückkoppelungsschleife wirken auch die *bHLH PAS* Transkriptionsfaktoren DEC1 und DEC2 als negativ regulierende Elemente auf CLOCK:BMAL1 ein, wobei die Expression des *Dec1*-Gens von CLOCK:BMAL1 kontrolliert wird (Honma *et al.* 2002; Gréchez-Cassiau *et al.* 2004). Die Transkription des positiven Regulators BMAL1 wird durch den *orphan nuclear receptor* REV-ERBa unterdrückt, dessen Gen wiederum von dem Heterodimer CLOCK:BMAL1 aktiviert wird (Preitner *et al.* 2002; Ueda *et al.* 2002). Auf diese Weise oszillieren BMAL1 und PER in Antiphase zueinander. Die Uhren-Proteine werden nach ihrer Translation noch modifiziert; so phosphorylieren CK1 $\epsilon$  und MAPK verschiedene Uhrenproteine (Abb.5) und modulieren so ihre Stabilität bzw. ihre Funktion (Takano *et al.* 2000; Vielhaber *et al.* 2000; Akashi *et al.* 2002; Sanada *et al.* 2002). Für das Zusammenspiel der Translationsprodukte der Uhren-Gene ist weiterhin wichtig, ob sie als Monomere oder Homo- bzw. Heterodimere vorliegen: Diese Interaktionen „entscheiden“, ob sie sich im Cytoplasma bzw. im Kern aufhalten oder abgebaut werden (Miyazaki *et al.* 2001; Kondratov *et al.* 2003). Neben diesem zentralen Mechanismus von sich regulierenden Transkription/Translation-Feedbackloops, gibt es noch weiterreichende Rückkopplungsmechanismen (Lopez-Molina *et al.* 1997; Mitsui *et al.* 2001; Newman und Keating 2003; Yamaguchi *et al.* 2000). Außerdem lassen aktuelle Studien vermuten, dass es



noch mehr Kandidatengene gibt, die in den molekularen Uhrenmechanismus involviert sind (Hofstetter *et al.* 2003; Salathia *et al.* 2002).

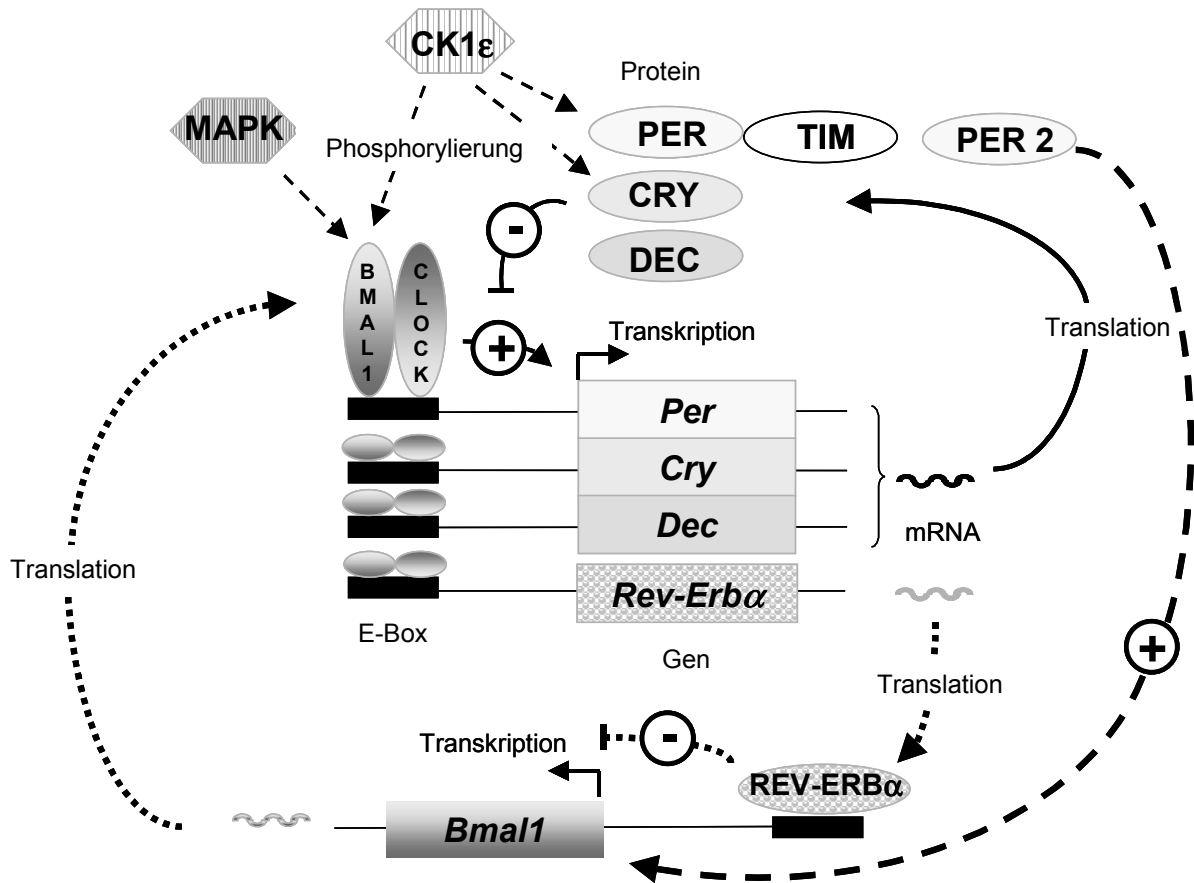


Abb.5: Vereinfachtes Modell der Feedbackmechanismen der inneren Uhr von Säugetieren. *Per*/PER: Period; *Cry*/CRY: Cryptochrome; CLOCK: *Circadian lokomotor output cycle kaput*; *Bmal1*/BMAL1: *Brain and muscle aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator-like 1*; TIM: *Timeless*; Ck1ε: *Casein-kinase 1 epsilon*; *Rev-Erbα*/REV-ERBα: *nuclear receptor sufamily 1, group D, member1*; *Dec*/DEC: *Differentiated embryo-chondrocyte expressed gene*; MAPK: *mitogene-activated protein kinase* (verändert nach Hirota und Fukada 2004).

Tab.1: Namen und Funktionen der Uhren-Gene von Säugetieren, die an den grundlegenden Rückkopplungsmechanismen beteiligt sind. *Per*: *Period*; *Cry*: *Cryptochrome*; *Clock*: *Circadian lokomotor output cycle kaput*; *Bmal1*: *Brain and muscle aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator-like1*; *Tim*: *Timeless*; *Cklε*: *Casein-kinase 1 epsilon*; *Rev-Erba*: *nuclear receptor sufamily 1, group D, member1*; *Dec*: *Differentiated embryo-chondrocyte expressed gene*.

Name	Funktion	Zitat
<i>Per1</i> (= <i>RIGUI</i> )	Negative Rückkopplung auf CLOCK:BMAL1	Sun <i>et al.</i> 1997; Tei <i>et al.</i> 1997
<i>Per2</i>	Negative Rückkopplung auf CLOCK:BMAL1 und positive Rückkopplung auf BMAL1	Albrecht <i>et al.</i> 1997; Shearman <i>et al.</i> 1997
<i>Per3</i>	Es liegen keine gesicherten Erkenntnisse vor	Bae <i>et al.</i> 2001 ; Shearman <i>et al.</i> 2000
<i>Cry1</i>	Negative Rückkopplung auf CLOCK:BMAL1	Todo <i>et al.</i> 1996; van der Horst <i>et al.</i> 1999
<i>Cry2</i>	Negative Rückkopplung auf CLOCK:BMAL1	Todo <i>et al.</i> 1996; van der Horst <i>et al.</i> 1999
<i>Clock</i>	Transkriptionsaktivator	King <i>et al.</i> 1997; Vitaterna <i>et al.</i> 1994
<i>Bmal1</i> (= <i>Mop3</i> )	Transkriptionsaktivator	Bunger <i>et al.</i> 2000; Hogenesch <i>et al.</i> 1998
<i>Tim</i>	Denkbarer Dimerisierungspartner für PER	Barnes <i>et al.</i> 2003; Tischkau <i>et al.</i> 1999
<i>Cklε</i> ( <i>TAU</i> )	Begünstigung des Abbaus von PER1	Ralph und Menaker 1988; Lowrey <i>et al.</i> 2000
<i>Rev-Erba</i>	Negative Rückkopplung auf BMAL1	Preitner <i>et al.</i> 2002; Ueda <i>et al.</i> 2002
<i>Dec1</i> <i>Dec2</i>	Negative Rückkopplung auf CLOCK:BMAL1	Gréchez-Cassiau <i>et al.</i> 2004; Honma <i>et al.</i> 2002

### 1.3 Der Einfluss von Licht auf die Mechanismen der inneren Uhr

Licht ist, wie bereits erwähnt, der wohl wichtigste Zeitgeber für alle Lebewesen und damit auch für die Säugetiere. Damit diese sich an verändernde Umweltbedingungen (z.B. saisonale Veränderungen) anpassen können, ist der bereits beschriebene endogene Mechanismus der inneren Uhr durch die Beleuchtungsverhältnisse der Umwelt beeinfluss- und justierbar. Es ist jedoch bisher wenig über die genauen Mechanismen bekannt, durch die Licht regulierend auf das endogen generierte Uhrenwerk einwirkt (Sumová *et al.* 2004).

Die photische Umweltinformation wird bei Säugetieren über die Retina und deren Photorezeptorsysteme wahrgenommen: Zum einen über das für die visuelle Lichtperzeption verantwortliche System der Stäbchen und Zapfen und zum anderen durch ein erst in den letzten Jahren identifiziertes non-visuelles System der Lichtperzeption, das sich offenbar in der retinalen Ganglienzellschicht befindet (Foster 1998; Foster und Hankins 2002; Freedman *et al.* 1999). Es gibt handfeste Hinweise darauf, dass die non-visuelle Photoperzeption mit dem Photopigment Melanopsin gekoppelt ist; es kommt in einer Subpopulation von Ganglienzellen vor, die *pituitary adenylate cyclase-activation polypeptide* (PACAP) enthalten (Bellingham und Foster 2002; Berson 2003; Hannibal *et al.* 2002; Hattar *et al.* 2002, Hattar *et al.* 2003; Semo *et al.* 2003a und b) und intrinsische Photosensitivität aufweisen (Berson *et al.* 2002). Weiterhin projizieren die Ganglienzellen dieser Subpopulation via retinohypothalamischen Trakt (RHT) auf den SCN (Gooley *et al.* 2001; Provencio *et al.* 2002), wobei sie sich bilateral auf beide Bereiche des Kerngebiets aufteilen (Morin *et al.* 2003). Obwohl das non-visuelle System mit Melanopsin als Photopigment in einigen Studien als das Photorezeptorensystem der inneren Uhr betrachtet wird (z.B. Brainard *et al.* 2001), gibt es in einer neueren Studie Hinweise darauf, dass Melanopsin selbst nicht notwendig für die Photorezeption der circadianen Rhythmik ist (Beaule *et al.* 2003). Insgesamt wird in neueren Studien auf die Verzahnung verschiedener photorezeptiver Systeme hingewiesen, die alle einen Teil zur photischen Synchronisation des Organismus beitragen (Beaule *et al.* 2003; Panda *et al.* 2003).

Als Reaktion auf das retinal detektierte Licht schütten die RHT-Terminalen Glutamat (Glu) und PACAP aus und stimulieren NMDA (*N-methyl-D-aspartate*) bzw. non-NMDA-Rezeptoren sowie die entsprechenden Rezeptoren für PACAP in den SCN-Neuronen (Reppert und Weaver 2002). Im Verlauf der nachfolgenden Signalkaskade (Abb.6) wird der Transkriptionsfaktor CREB (*CRE-binding protein*) sowohl am Ser133 (Ginty *et al.* 1993), als auch am Ser142 (Gau *et al.* 2002) phosphoryliert und damit aktiviert, wobei mögliche Coaktivatoren bei diesem Prozess diskutiert werden (Fiore und Gannon 2003). Die lichtinduzierte Phosphorylierung führt dazu, dass sich pCREB an die CRE (*cAMP response element*)-Regulationssequenz der Uhren-Gene *Per1* und *Per2* anlagert und diese ihrerseits aktiviert werden (Tránícková-Bendová *et al.* 2002). Auf diese Weise werden die Uhren-Gene *Per1* und *Per2* durch Licht exprimiert (Albrecht *et al.* 1997; Shearman *et al.* 1997). Die Justierung der inneren Uhr wird vollzogen, wenn die Konzentration an *Per*-mRNA ihren Nadir erreicht (Hastings *et al.* 2003).

Auch verschiedene immediate early genes (IEGs) reagieren auf glutamaterg vermittelte Lichtstimuli, so auch *cfos* (Kornhauser *et al.* 1993; Morris *et al.* 1998). Das Translationsprodukt dieses Gens wirkt als Transkriptionsfaktor und wird im ventro-lateralen (core), also dem retinorezipienten Bereich des SCN sehr schnell hochreguliert, wenn ein glutamaterges Signal eintrifft; im dorso-medialen (shell) Bereich kann dieses Phänomen nicht nachgewiesen werden (Jác *et al.* 2000) – hier zeigt sich eine endogene rhythmische Expression dieses Gens (Sumová *et al.* 1998; Guido *et al.* 1999). Bisher gibt es nur sehr vage Hinweise auf eine Verbindung zwischen dem zentralen Uhrenmechanismus im SCN und der rhythmischen Expression von *cfos* (Sumová *et al.* 2000), daher sollte bei *cfos* nicht von einem *clock-controlled* Gen, sondern von einem *clock-related* Gen gesprochen werden (Sumová *et al.* 2004).

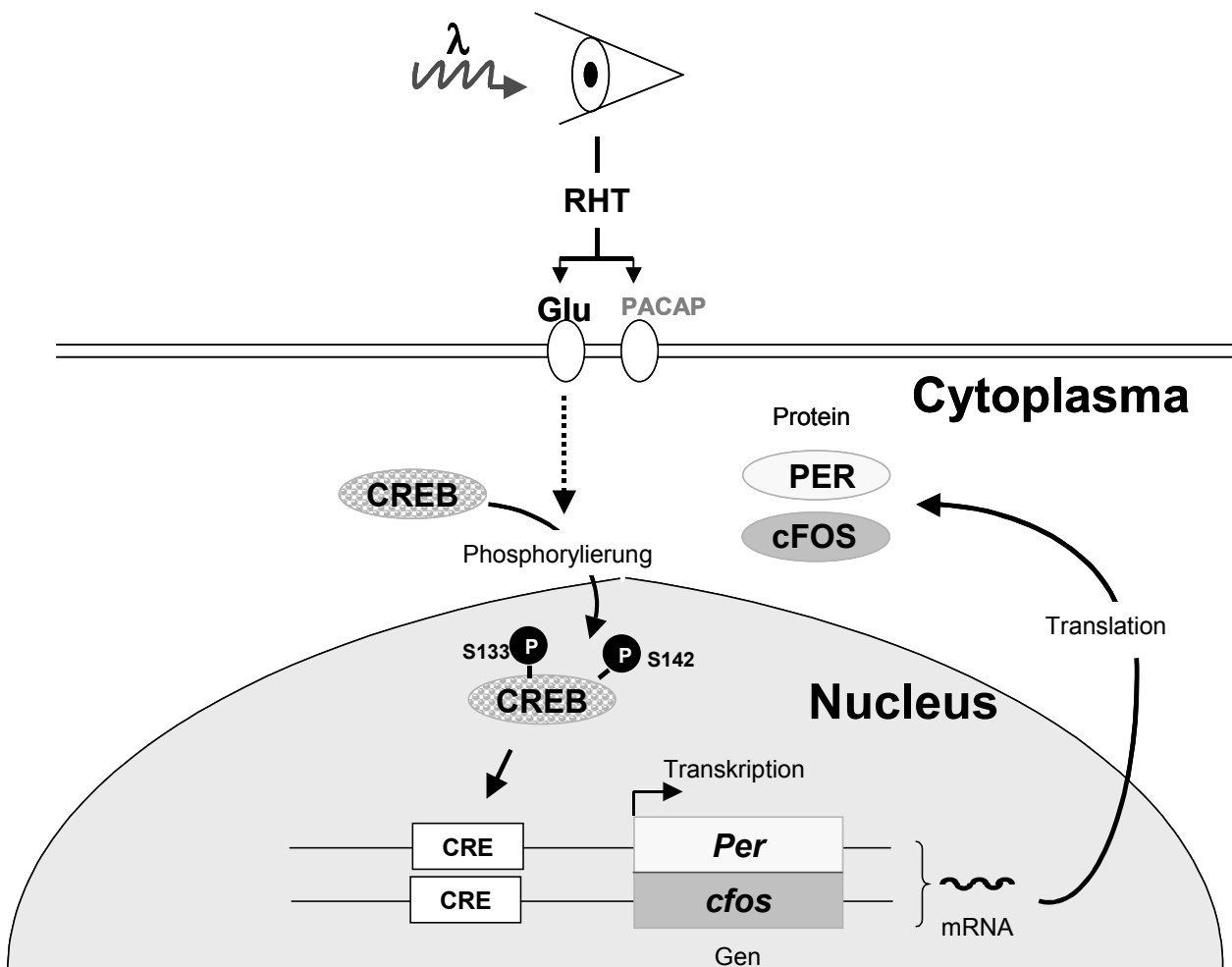


Abb.6: Vereinfachte Signaltransduktion im SCN bei photischer Stimulation. RHT: retinohypothalamischer Trakt; CRE: *cAMP respons element*; CREB: *CRE-binding protein*; *Per*/PER: *Period*.

## 1.4 „Arrhythmischer“ lokomotorischer Output

Die Mechanismen in der inneren Uhr wirken auf ein sehr heterogenes Effektorensystem. Neben den unterschiedlichsten physiologischen Wirkmechanismen haben sie auch einen Einfluss auf verschiedene Verhaltensmuster, so auch auf die lokomotorische Aktivität. Der circadiane Rhythmus der lokomotorischen Aktivität unter verschiedensten Umweltbedingungen gilt als ein wichtiger Output für eine intakte innere Uhr. Zeigt sich ein acircadianes, also gestörtes lokomotorisches Verhalten, so ist es wahrscheinlich, dass auch die innere Uhr und letztlich ihre Fähigkeit, an der periodischen Umwelt zu synchronisieren, gestört ist. Im Folgenden wird „acircadian“ und „arrhythmisch“ synonym gebraucht. Das Phänomen sich verändernder lokomotorischer Aktivität lässt sich bei alternden Organismen beobachten: Mit zunehmendem Alter wird die Präzision der Kopplung von Beleuchtungsverhältnissen und lokomotorischer Aktivität ungenauer und verschimmt schließlich, wird acircadian. „Altern ist eine unausweichliche physiologische Veränderung des Organismus mit fortschreitendem Verlust der Anpassungsfähigkeit“ – wusste schon der Physiker Georg Christoph Lichtenberg (1742-1799) im 18. Jahrhundert. Die zeitliche Organisation der alternden Organismen ändert sich und es kommt zur Verringerung der Amplitude verschiedenster Rhythmen (z.B. Sacher und Duffy 1978; Yunis et al 1974) oder zu einer möglichen Desynchronisation von sonst fest aneinander gekoppelter Rhythmen (Weinert 2000). Außerdem zeigte sich in verschiedenen Studien, dass im Alter auch ein verändertes Freilauf- und *Phase-Shift*-Verhalten nachzuweisen ist (Pittendrigh und Daan 1974). Grund für diese Verhaltensänderungen, einschließlich des arrhythmischen lokomotorischen Verhaltens, könnten Veränderungen in der Lichttransduktion (z.B. Degenerationen in der Retina; verringerte Plastizität der Glutamatrezeptoren; Veränderungen in der zeitlichen und räumlichen Zusammensetzung von lichtinduzierten Neuropeptiden etc.) sein, da Licht unter bestimmten Bedingungen nachweislich arrhythmisches Verhalten hervorrufen kann. Dies zeigte sich in Versuchen am Dsungarischen Zwerghamster, *Phodopus sungorus*. Veränderungen des Lichtregimes, vor allem Lichtpulse, die zu definierten Zeiten während der Dunkelphase gegeben werden, lösen arrhythmisches lokomotorisches Verhalten aus (Ruby *et al.* 1996; Steinlechner *et al.* 2002; Voigt 2003). Damit haben sich Lichtpulse als optimale, weil non-invasive, Methode qualifiziert, um lokomotorische Arrhythmie hervorzurufen und zu untersuchen. In den genannten Versuchen wurden vor allem junge adulte Tiere untersucht. Es wurden bisher keine vergleichenden Studien zur altersbedingten Arrhythmie durchgeführt. Die Lichtpuls-Methode bietet sich an, um eine solche Untersuchung zur lokomotorischen Arrhythmie an alten und jungen Tieren durchzuführen und so den Ursachen des gleichen

---

Phänotyps auf die Spur zu kommen. Auf diese Weise könnten fehlende Daten zu molekularen Mechanismen einer altersbedingt arrhythmischen inneren Uhr ergänzt werden. Dies würde neue Möglichkeiten eröffnen, um das Phänomen der altersbedingten lokomotorischen Arrhythmie zu behandeln und um neue Methoden zur Prävention zu entwickeln.

## 1.5 Fragestellung

In dieser Arbeit soll es um eben diese Problematik gehen: Welche Ursachen liegen der altersbedingten bzw. der induzierten lokomotorischen Arrhythmie zugrunde? Handelt es sich um die gleichen Mechanismen oder sind grundsätzlich verschiedene Motive der Grund für das Verhalten? Wie bereits erwähnt ist der Dsungarische Zwerghamster ein gutes Modelltier für diese Fragestellung, da an ihm sowohl die natürliche Altersarrhythmie als auch induzierte lokomotorische Arrhythmie dargestellt werden kann.

Um der Frage nachzugehen, welche Wirkmechanismen dem Phänomen „lokomotorische Arrhythmie“ zugrunde liegen, sind vier verschiedene Versuchsgruppen gebildet worden (junge rhythmische, junge arrhythmische, alte rhythmische, alte arrhythmische Hamster), an denen folgende Aspekte vergleichend untersucht wurden:

1. Die lokomotorische Aktivität der Versuchstiere wurde kontinuierlich überwacht und anschließend mit Hilfe der von Sokolove und Bushell (1978) beschriebenen Periodogramm-Analyse bewertet. Nur Tiere, die eindeutig einer der genannten Gruppen zugeordnet werden konnten, wurden für die weiteren Untersuchungen herangezogen. Die Aktogramme der verschiedenen Tiere wurden miteinander verglichen und auf Unterschiede bzw. Gemeinsamkeiten hin untersucht.
2. Um mögliche Diskrepanzen auf molekularer Ebene nachzuweisen, wurden immunhistochemische Untersuchungen am SCN vorgenommen. Vergleichende (unveröffentlichte) Untersuchungen von A. Hampel über photisch ausgelöste cFOS-Immunreaktivität (IR) im SCN von lichtinduziert-arrhythmischen und rhythmischen jungen adulten Zwerghamstern zeigten, dass bei den arrhythmischen Tieren offenbar weniger cFos-IR im SCN vorlag als bei den rhythmischen. Dies gab den Anlass zur Annahme, dass die Veränderungen bei den arrhythmischen Tieren im Bereich des Lichtinputs zu suchen sind. Deshalb wurde der glutamaterg vermittelte Lichtinput genauer betrachtet (siehe.1.3): Folgende lichtbeeinflussten Proteine wurden immunhistochemisch untersucht (vgl. Abb.5 und 6)

- 
- der phosphorylierte Transkriptionsfaktor CREB
  - das IEG cFOS, zur Kontrolle mit den vorliegenden Ergebnissen,
  - die Uhrenproteine PER1 und PER2
  - und abschließend der Glutamatrezeptor NMDA-R1 (=NR1).

Um einen Tagesgang dieser Proteine zu erfassen, wurde die Expression der genannten Proteine im SCN zu vier verschiedenen Zeitpunkten des circadianen Zyklus für alle Versuchsgruppen untersucht. Besonderes Augenmerk wurde auf die räumliche Verteilung der Expressionsmuster innerhalb des SCNs gelegt. Deshalb wurde der SCN sowohl in seiner rostro-caudalen als auch in der coronalen Achse in Segmente untergliedert und die Proteinverteilung vergleichend für die einzelnen Gruppen analysiert.

Zu diesen Untersuchungen der räumlichen Verteilung gibt es bisher wenig Vergleichsmaterial, da diese erst in den vergangenen Jahren verstärkt in den Focus des Interesses gerückt sind. Vergleichende Untersuchungen der räumlichen Komponente an alten und jungen Tieren gibt es bisher weder für rhythmische noch für arrhythmische Phänotypen.

3. Abschließend wurden in einer Pilotstudie Veränderungen der Retina, wie z.B. Degenerationserscheinungen, betrachtet; dabei wurde neben histologischen Abweichungen insbesondere auf abweichende Immunreaktionen gegen Melanopsin in den Ganglienzellen geachtet.

## 2 Material und Methoden

Chemikalien, Antikörper, Lösungen, Materialien und Geräte werden samt ihrer Bezugsquellen gesondert im Anhang C aufgeführt.

### 2.1 Versuchstiere und Haltungsbedingungen

Alle Tierversuche erfolgten mit Genehmigung der Bezirksregierung Hannover (Aktenzeichen 509c-42502-01/497) und in Übereinstimmung mit den Richtlinien für Tierversuche nach den Direktiven der Europäischen Gemeinschaft (Direktive 86/609/EEC).

Als Versuchstiere wurden Dsunganische Zwerghamster (*Phodopus sungorus*) aus einer Auszuchtlinie des Instituts für Zoologie der Tierärztlichen Hochschule Hannover verwendet. Die Tiere stammen aus einer seit 1968 bestehenden Linie, in die 1998 eine F2-Generation von Wildfängen aus Novosibirsk eingekreuzt wurde.

Die Tiere wurden einzeln in Makrolon-Käfigen Typ II (23 x 18 x 14 cm) auf Weichholzfäsern gehalten. Futterpellets und Wasser standen den Tieren *ad libitum* zur Verfügung. Zusätzlich zum Trockenfutter bekamen die Tiere einmal wöchentlich einen achtel Apfel.

In den Tierräumen herrschte ein Temperatur von  $20 \pm 2^\circ\text{C}$ , eine Luftfeuchtigkeit von  $55 \pm 5\%$  und ein Licht-/ Dunkelregime von L:D 16:8 (MEZ 4.00 Uhr Licht an = Zeitgeber time (ZT) 0, 20.00 Uhr Licht aus = ZT 16). Zusätzlich war in den Räumen eine Dunkelkammerlampe angebracht, die über 24 Stunden leuchtete. Die Lichtintensität betrug während der Photophase am vorderen Käfigrand  $< 300$  Lux und während der Scotophase weniger als 1 Lux. Die Käfige wurden in einem etwa zweiwöchentlichen Rhythmus gereinigt, die Tiere dabei gewogen und ihr Gesundheitszustand kontrolliert.

Für die Versuche wurden männliche und weibliche Zwerghamster in einem ausgewogenen Verhältnis eingesetzt. Das Alter der Versuchstiere lag bei den jungen adulten Hamstern zwischen 3 und 9 Monaten (Mittel: 175 Tage) und bei den alten Hamstern über 18 Monaten (Mittel: 795 Tage).



## 2.2 Aktivität

Die lokomotorische Aktivität wird als Zeiger der inneren Uhr gewertet und kann daher als geeigneter Parameter für die Rhythmik angesehen werden. Der Vorteil dieses Parameters ist, dass er einfach und non-invasiv, ohne Beeinträchtigung des Tieres zu überwachen ist.

### 2.2.1 Aktivitätsaufzeichnung

Die lokomotorische Gesamtaktivität wurde kontinuierlich mit Hilfe von Passiv-Infrarot (PIR)–Bewegungsmeldern aufgezeichnet. Die PIR-Bewegungsmelder waren direkt über den einzelnen Käfigen angebracht. Die Bewegung der Wärmequelle „Versuchstier“ führte zu einem Abfall der Spannung von 5 auf 0 Volt. Von einer INPUT/OUTPUT (I/O)-Karte wurde das Absinken der Spannung als Signal interpretiert. Weitere Signale während der folgenden drei Sekunden wurden von dem QuickBasic-Programm nicht berücksichtigt. Dies diente der Vereinheitlichung der Refraktärzeit Die Signale wurden über einen Zeitraum von 6 Minuten aufsummiert und abgespeichert (= 240 Datenpunkte/Tag).

### 2.2.2 Applikation von Lichtpulsen

Vor den Lichtpulsen zur Induktion der Arrhythmie des circadianen Systems (Steinlechner *et al.* 2002) wurden die entsprechenden Versuchstiere über einen Zeitraum von mindestens zwei Wochen in ihrer lokomotorischen Aktivität überwacht (s.o.). Auf diese Weise konnte ein sicherer Status ihrer Tagesrhythmik festgestellt werden.

Anschließend wurden die Tiere in zwei aufeinander folgenden Scotophasen je einem 15-minütigen Lichtpuls ausgesetzt. Der Lichtpuls in der ersten Scotophase erfolgte zwei Stunden vor Beginn der Hellphase (ZT 22), während er in der zweiten Dunkelphase zwei Stunden nach dem Ende der Hellphase (ZT18) gegeben wurde.

Nach der Applikation der Lichtpulse wurde die Aktivität der Tiere für weitere zwei bis drei Wochen aufgezeichnet, bevor eine Entscheidung darüber gefällt werden konnte, welche Tiere mit Arrhythmie auf die Pulse reagiert hatten. Die entsprechenden rhythmischen und arrhythmischen Tiere wurden nachfolgend zu verschiedenen Zeitgeberzeiten (ZT0, ZT8, ZT16 und ZT20) getötet und perfundiert (s.u.).

### 2.2.3 Auswertung und Statistik

Mittels eines weiteren QuickBasic-Programmes der Arbeitsgruppe wurden aus den gesammelten Aktivitätsdaten der Tiere *Doppelplot*-Aktogramme erstellt. Die Auswertung erfolgte zum Teil visuell. Außerdem wurde über zusätzliche QuickBasic-Programme Aktivitätsbeginn (*onset*) und –ende (*offset*) ermittelt sowie Tages- bzw. Dunkelphasen-Aktivität der verschiedenen Versuchsgruppen bestimmt. Ausgewertet wurden die Daten mit dem Willcoxon Test, einem Rang-Summen Test. Insgesamt wurde die Aktivität nicht in Absolutwerten, sondern als prozentualer Anteil an der Gesamtaktivität angegeben. Der Grund dafür ist, dass im Verlauf der Arbeit mit zwei verschiedenen Typen von PIR-Bewegungsmeldern gearbeitet wurde, die nicht unmittelbar miteinander vergleichbar sind. Um ein Maß für die Fragmentierung der Aktivitätsphase zu bekommen, wurde weiterhin der gleitende Mittelwert („*running average*“) von 3 und 24 Stunden ermittelt. Hierbei wurde zunächst mit einem gleitenden 24-Stunden-Intervall der Mittelwert der Daten für einen Tag berechnet; auf diese Weise wurde die Aktivitätskurve stark geglättet. Anschließend wurde über diese Kurve eine weitaus weniger geglättete Kurve gelegt, der *running-average* von 3 Stunden; die Schnittpunkte dieser beiden Kurven geben an, wie viele Aktivitätsfragmente innerhalb von 24 Stunden vorhanden sind (Abb.7)

Schließlich wurde die Tagesrhythmik der Tiere über eine *Chi-Quadrat*-Periodogrammanalyse nach Sokolove und Bushell (1978) beurteilt.

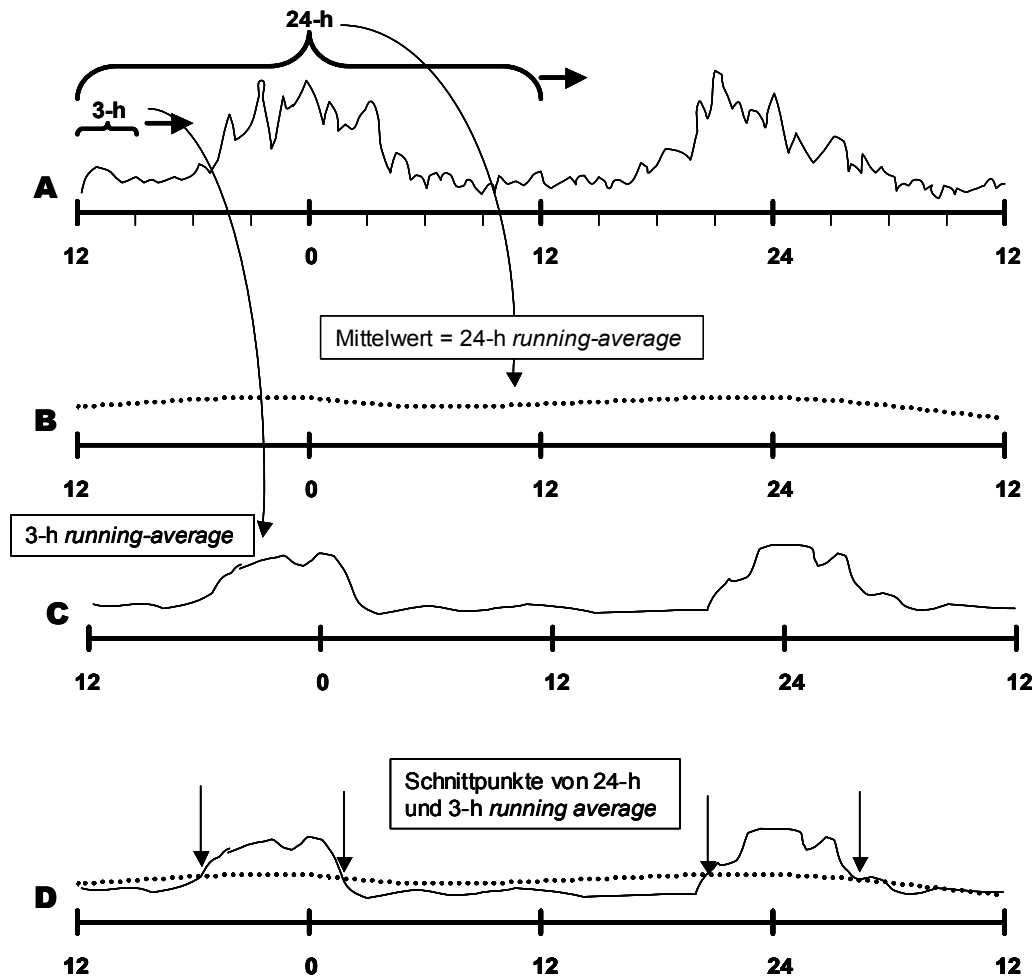


Abb.7: Exemplarische Darstellung des gleitenden Mittelwertes (*running-average*) für eine 24-Stunden Periode. A: ungeglättete Aktivitätskurve. B: 24 Stunden Mittelwert der Aktivität. C: 3-Stunden *running-average*. D: Übereinander gelegte Kurven von B und C zur Ermittlung der Schnittpunkte und damit der Aktivitätsfragmente in 24 Stunden.

## 2.3 Immunhistochemie

Mit verschiedenen immunhistochemischen Methoden wurden Proteine nachgewiesen und zellulär lokalisiert, die bei der Generierung des circadianen Rhythmus eine Rolle spielen.

Neben immunhistochemischer Markierung von Proteinen an Gefrier- und Paraffinschnitten wurden auch die *Western-Blot* Technik zu deren Nachweis eingesetzt. Des Weiteren wurden histologische Färbungen an Technovit- und Paraffinschnitten durchgeführt.

### 2.3.1 Immunhistochemie an Gewebeschnitten

Die Methode beruht auf der Erkennung eines spezifischen Gewebeeepitops durch einen Primärantikörper, an den anschließend ein biotinylierter Zweitantikörper gebunden wird. Der Nachweis erfolgt schließlich durch enzymatische Markierung des Zweitantikörpers mit einem Avidin-Biotin-Peroxidase Komplex (ABC-Technik nach HSU et al. 1981). Durch das Enzym Meerrettichperoxidase wird das Chromogen Diaminobenzidin (DAB) in Gegenwart von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oxidiert und bildet – verstärkt durch Nickel-Ammoniumsulfat – einen farbigen Niederschlag an der Stelle des Antigen-Antikörper-Komplexes.

#### 2.3.1.1 Gewebeentnahme

##### Fixiertes Gewebe

Zur Gewinnung fixierten Gewebes erfolgten Tötungen und Gewebeentnahme zu vier verschiedenen Zeitgezeiten: Ende Scotophase (= ZT0), Mitte Photophase (= ZT8), Ende Photophase (= ZT 16) und Mitte Scotophase (= ZT20). Dieses Vorgehen sollte einen möglichen Tagesgang der verschiedenen Proteine nachvollziehbar werden lassen. Dazu wurden die Tiere entsprechend der vorangegangenen Beleuchtungsverhältnisse bei Weißlicht oder dem Rotlicht einer Dunkelkammerlampe (< 1 Lux) mit CO<sub>2</sub> getötet. Die Tiere, die in der Dunkelphase getötet wurden, bekamen für den Zeitraum der sich anschließenden transkardialen Perfusion (s.o.) eine lichtundurchlässige Kappe über den Kopf gezogen; die in der Photophase getöteten Tiere wurden ohne Kappe perfundiert. Dazu wurde zunächst die Bauchhöhle eröffnet und das Herz zügig freigelegt. Eine 18G-Kanüle wurde in die linke Herzkammer eingeführt und anschließend der rechte Vorhof eröffnet, um einen Ablauf des Perfusates zu ermöglichen. Die Perfusion erfolgte dann in zwei Schritten: Zunächst wurde das Blut über 5 Minuten durch 0,01 M raumtemperierte phosphatgepufferte Saline (PBS) ersetzt, bevor 100 ml einer eiskalten 4%-igen Paraformaldehyd (PFA) - Lösung zur *in-situ*-Fixierung

des Gewebes in den Körper des Tieres geleitet wurden. Sofort nach der Perfusion wurde der Schädel vom Hinterhauptsloch aus eröffnet und die Schädeldecke vorsichtig abgehoben. Das Gehirn wurde so aus dem Schädel präpariert, dass das *Chiasma opticum* nicht beschädigt wurde. Anschließend wurde das Gehirn über Nacht bei 4°C in 4%-iger PFA-Lösung nachfixiert. Danach wurde es für die Herstellung von Gefrierschnitten aufgearbeitet.

Sofern die Augen für eine stichprobenartige Untersuchung altersabhängiger Unterschiede benötigt wurden, wurden diese ebenso wie das Gehirn nach der Perfusion aus dem Schädel präpariert und in eiskalte 4%-ige PFA-Lösung überführt.

### **Frisches Gewebe**

Um frisches Gewebe zu entnehmen wurden die Tiere nach dem oben genannten Verfahren getötet. Hier erfolgte allerdings im Anschluss an die Tötung keine transkardiale Perfusion: Das Gehirn wurde direkt nach dem Tod des Tieres frisch aus der Schädelkapsel präpariert. Danach wurde das Gewebe in eisgekühltem PBS (0,01 M) gespült und anschließend zur Kryoprotektion in eiskalte 30%-ige Saccharose-Lösung überführt und bei 4°C gelagert.

### **2.3.1.2 Gewebeaufbereitung**

#### **Fixierte Gefrierschnitte**

Im Anschluss an die Nachfixierung durch PFA wurden die Gehirne zur Kryoprotektion in 30%-ige Saccharose-Lösung überführt und so lange bei 4°C gelagert, bis sie abgesunken waren. Danach sind die Gehirne getrimmt und auf den Schneideblock des Kryostaten aufgefroren worden. Bei einer Objekttemperatur von  $-20 \pm 2^\circ\text{C}$  und einer Boxtemperatur von  $4 \pm 1^\circ\text{C}$  wurden von der SCN-Region 40 bis 50 coronale Schnitte von 20 bis 25  $\mu\text{m}$  Dicke angefertigt. Die Schnitte wurden in 0,01M PBS aufgefangen und in 4-5 Serien zusammengefasst. Bis zu ihrer Verwendung wurden die Schnitte in einer Lösung zur Kryoprotektion bei  $-80^\circ\text{C}$  gelagert. Vor der immunhistochemischen Aufarbeitung wurden die Hirnschnitte aufgetaut, bei Raumtemperatur equilibriert und in 0,01M PBS + 0,1% Triton gewaschen, um Reste der Kryoprotektions-Lösung zu entfernen. Anschließend wurden sie entweder direkt auf Gelatine/Chromalaun-beschichtete Objektträger aufgezogen, oder free-floating mittels immunhistochemischer Techniken gefärbt.

#### **Gefrierschnitte von frischem Gewebe**

Die Gehirnschnitte wurden bei dem frischen Gewebe, ebenso wie oben beschrieben, am Kryostaten gewonnen. Nach dem Schneiden wurden die Schnitte jedoch nicht in einer

---

Kryoprotektions-Lösung eingefroren, sondern gleich auf Objektträger aufgezogen und mit immunhistochemischen Färbemethoden weiter bearbeitet.

#### **Paraffinschnitte von fixiertem Gewebe**

Das PFA-fixierte Gewebe (Augen) wurde in einer aufsteigenden Alkoholreihe (70%, 80%, 2 x 96%, 2 x 100 %) entwässert. Anschließend wurde der Alkohol aus dem Gewebe entfernt, das Gewebe in Paraffin eingebettet und geschnitten. Die 10µm dicken Schnitte wurden direkt auf Objektträger aufgezogen. Vor der immunhistochemischen bzw. histologischen Weiterbearbeitung wurden die Schnitte in einer absteigenden Alkoholreihe entparaffiniert.

#### **Technovitschnitte von fixiertem Gewebe**

Das fixierte Gewebe (Augen) wurde im Anschluss an die Nachfixierung in PFA entsprechend des Protokolls des Herstellers in Technovit eingebettet und es wurden 5µm dicke Schnitte angefertigt. Die Schnitte wurden auf einer Wärmeplatte bei 90°C für mindestens eine Stunde auf den Objektträgern fixiert

### **2.3.1.3 Färbeprotokolle**

Immunhistochemische Färbemethoden bieten die Möglichkeit, in Gewebeschnitten Proteine oder Peptide spezifisch nachzuweisen und zellulär zu lokalisieren.

Sofern nicht anders vermerkt, wurden die Versuche bei Raumtemperatur durchgeführt und nach jeder Inkubation ein Waschschrift von 5 – 10 Minuten mit 0,01M PBS eingehalten. Alle Antikörper wurde mit PBS + 0,01% Triton verdünnt.

Bei jedem Färbedurchgang und für jeden Antikörper wurde die Spezifität der Immunreaktion nach Sternberger (1986) erfolgreich kontrolliert. Hierbei wurde die Methode indirekt auf unspezifische Färbungen hin überprüft, indem der Erstantikörper bei einzelnen Schnitten durch PBS ersetzt wurde. Des weiteren wurden für jeden Primärantikörper Verdünnungsreihen ausgetestet, um die Konzentration mit den besten Bindungseigenschaften zu ermitteln.

#### **Free-Floating**

Zur Blockierung der endogenen Peroxidaseaktivität wurden die Schnitte 30 Minuten mit 0,01M PBS + 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in Dunkelheit behandelt. Nach der einstündigen Blockade der unspezifischen Bindungsstellen mit Ziegen-Normalserum (GNS) in PBS + 0,1% Triton wurden die Schnitte mit dem Primärantikörper markiert. Anschließend wurden die Präparate

mit dem biotinylierten anti-Kaninchen Zweitantikörper und schließlich mit dem biotinylierten Streptavidin-Peroxidase-Komplex inkubiert. Beide Behandlungen erfolgten über einen Zeitraum von einer Stunde. Die Farbreaktion wurde sichtbar gemacht, indem die Schnitte mit DAB in 1%-igem Nickel-Ammoniumsulfat in Acetatpuffer unter Zusatz von  $H_2O_2$  behandelt wurden. Anschließend wurden sie auf Gelatine/Chromalaun beschichtete Objektträger aufgezogen, durch eine aufsteigende Alkoholreihe (70 bis 100%) und Xylol entwässert und mit DPX eingedeckt. Die Inkubationsschritte erfolgten in Multiwell-Schalen, während die Waschschrte, das Blocken der endogenen Peroxidase und die Färbung mit Ni-DAB, in Siebkammern erfolgte.

### **Färbung auf Objektträgern**

Die aufgezogenen Gehirnschnitte wurden mit einem PAP-Pen umkreist, um eine lipophile Barriere für die folgenden wässrigen Inkubationslösungen zu erzeugen. Anschließend wurden die Objektträger in *Aqua demin.* gespült, um eine Kristallbildung zu vermeiden, die durch das Aufziehen aus PBS entstehen kann. Nach dem Spülen wurden die Objektträger in Citratlösung, bei 500 Watt für 10 Minuten, in einer Mikrowelle gekocht, bevor sie in *Aqua demin.* auf Raumtemperatur abgekühlt wurden. Für Färbungen mit dem Antikörper gegen den NMDA-Rezeptor 1 wurden einige Schnitte statt in Citratpuffer in 0,5%-igem PFA gekocht (FRITSCHY *et al.* 1998); des weiteren wurde bei diesem Antikörper noch eine zusätzliche Modifikation angewandt: Einige Schnitte wurden anstelle des Citratpuffers mit einem Essigsäure-Ethanol-Gemisch bei  $-20^{\circ}C$  vorbehandelt, andere wurden vor der Behandlung mit Citratpuffer in einer 3%-igem Triton-Lösung inkubiert.

Anschließend folgte bei allen Antikörpern eine 20-minütige Behandlung mit Methanol + 3 %  $H_2O_2$ , um die endogene Peroxidase im Gewebe zu hemmen. Die Inkubation erfolgte bei Raumtemperatur und in Dunkelheit. Die anschließende 1-stündige Behandlung mit Blocking-Puffer aus 2 % Ziegen-Normalserum und 2 % BSA in 0,01M PBS bei Raumtemperatur diente der Absättigung von unspezifischen Bindungsstellen im Gewebe. Anknüpfend an diese Behandlung wurde der Primärantikörper aufgetragen, der über Nacht und bei Raumtemperatur die entsprechenden Antigen-Epitope markieren sollte. Sowohl der biotinylierte Sekundärantikörper als auch der biotinylierte Streptavidin-Peroxidase-Komplex wirkten anschließend für jeweils eine Stunde bei Raumtemperatur auf die Schnitte ein. Schließlich folgte die Färbung des Antigen-Antikörper-Komplexes sowie die Entwässerung und die Konservierung, wie bei den *free-floating* Schnitten beschrieben.

Alle Spülschritte, die Behandlung mit Citratpuffer, das Blocken der endogenen Peroxidase und die Farbreaktion mit Ni-DAB erfolgten in 250 ml Küvetten. Die verbleibenden

---

Inkubationsschritte erfolgten direkt auf den Objektträgern, die während der Reaktion in einer feuchten Kammer gelagert wurden. Die Lösungen, die direkt auf den Objektträger aufgetragen wurden, wurden am Ende der entsprechenden Einwirkzeiten abgeschlagen.

#### 2.3.1.4 Auswertung

Die gefärbten Gewebeschnitte wurden mit einer, an einen ZEISS-Mikroskop angeschlossene, digitalen Spot-Kamera 50-fach vergrößert aufgenommen und mit einem Bildbearbeitungsprogramm (MetaMorph) leicht kontrastverstärkt. Für jedes Tier wurden die Schnitte in rostral, medial und caudal aufgeteilt: Als rostral wurde ein Präparat bezeichnet, bei dem das *Chiasma opticum* noch kompakt war, mediale Schnitte waren solche, bei denen das *Chiasma* auseinander lief, ohne sich jedoch seitlich zum *Tractus opticus* hochzuziehen und als caudal wurden schließlich die Schnitte bezeichnet, bei denen das *Chiasma* ventral noch eine zusammenhängende Fläche darstellte, sich aber seitlich in den *Tractus opticus* auswuchs (Abb.8).

Die Auswertung erfolgte am Computer mit Hilfe von Photoshop 5.0: Eine Farbverfremdung der Signale diente dazu, das Hintergrundsignal zu minimieren und das spezifische Signal zu verstärken. Um einen definierten Bereich für die Zellzählung festzulegen, wurde ein Raster von 12 horizontalen und 6 vertikalen Kästchen mittig über die SCN-Region gelegt, wobei das *Chiasma opticum* das Raster ventral begrenzte. Das Raster umfasste im Wesentlichen ausschließlich den Bereich der *suprachiasmatischen Nuclei* (Abb.9).



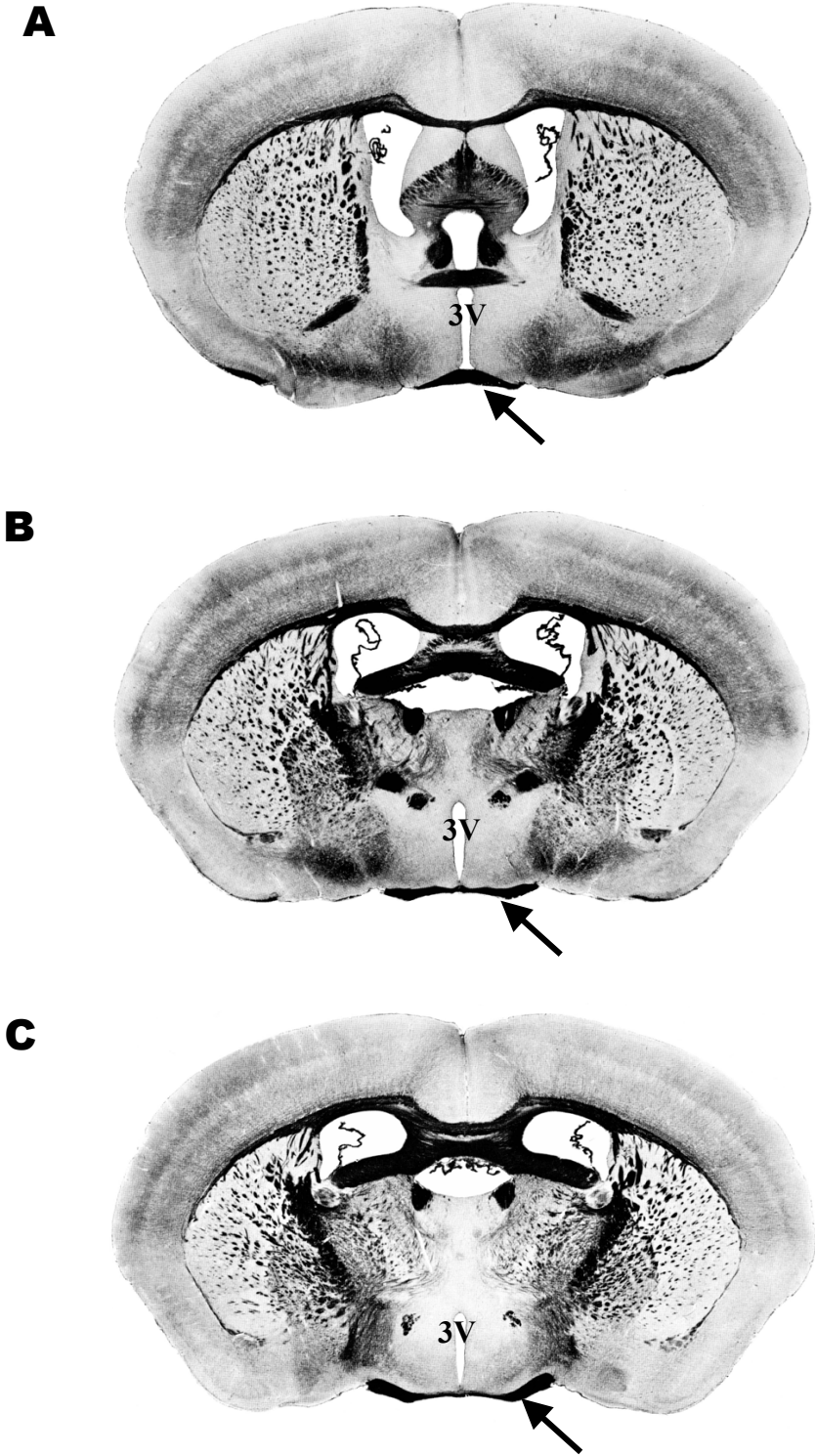


Abb.8: Abfolge coronaler Gehirnschnitte aus dem Bereich der suprachiasmatischen Nuclei: rostral (A), medial (B), caudal (C). Pfeil : *Chiasma opticum*. 3V = Dritter Ventrikel. (nach Sidman *et al.*, 1971).

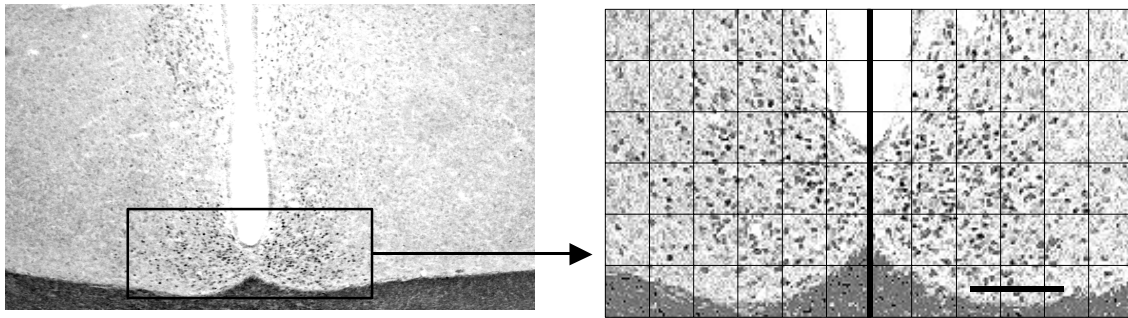


Abb.9: Bildbearbeitung am Beispiel einer Immunfärbung gegen mPER2. Links: Kontrastverstärkter Ausschnitt; Rechts: Ausschnittsvergrößerung mit Raster zum Zählen der Zellen. Balken = 100 $\mu$ m.

### **Zeitliche Verteilung der Immunreaktivität im SCN**

Um eine zeitliche Verteilung der Anzahl der immunreaktiven Zellen im SCN zu erfassen, wurden für oben definierten Bereich zu den vier verschiedenen Zeitgeberzeiten (ZT0, 8, 16, 20) alle Signale (= Zellen bzw. Zellkerne) gezählt, die nach der Farbverfremdung markiert waren. In diesem Zusammenhang konnte neben der zeitlichen Verteilung im gesamten SCN gesondert auch für die drei Abschnitte des SCNs eine solche Verteilung verfolgt werden.

### **Räumliche Verteilung der Immunreaktivität im SCN**

Um die räumliche Verteilung der Immunreaktivität im SCN zu ermitteln, wurden die Zellen nach der oben beschriebenen „Rasterung“ nicht einzeln gezählt, sondern für jedes Kästchen wurde gemäß der gezählten Zellen eine Kennzahl festgelegt (Tab.2).

Tab.2: Kennzahlen für die räumliche Verteilung der Immunreaktivität im SCN

Anzahl ir-positiver Zellen	Kennzahl
0	0
1 - 2	1
3 - 5	2
6 - 10	3
> 10	4

Anhand dieser Kennzahlen wurde eine Aussage über ein mögliches Konzentrationsgefälle der immunreaktiven Zellen im SCN möglich. Dazu wurde die Rasterung in Quadranten (je 3 x 3 Felder) geteilt: Quadrant I bis IV (rechter SCN) und Quadrant Ia bis IVa (linker SCN). Die Quadranten I bzw. Ia bezeichneten den dorso-lateralen Bereich, während II und IIa das dorso-mediale Gebiet darstellten. Die Quadranten III / IIIa und IV / IVa kodierten den ventralen

Bereich des SCN, wobei III / IIIa für den ventro-lateralen Bereich standen und IV/ IVa für die ventro-mediale Fläche (Abb.10). Jeder dieser Quadranten bestand aus 3 x 3 Feldern für die jeweils die Kennzahl nach dem oben dargestellten Schema ermittelt wurde (Tab.2). Im Anschluss daran wurden die Kennzahlen für die Quadranten addiert. Die Höhe der resultierenden Summe wurde als Maß für Zellkonzentration in dem entsprechenden Quadranten gewertet: Je höher die Zahl, desto höher die Konzentration an immunreaktiven Zellen in dem Quadranten. Maximal konnte eine Kennzahl von 36 (9 x 4) erreicht werden, d.h. in allen 9 Feldern war die Anzahl an immunreaktiven Zellen >10.

Auf diese Weise wurde es möglich zu bestimmen, in welchem Bereich des SCN sich die höchste Konzentration der immunreaktiven Zellen findet.

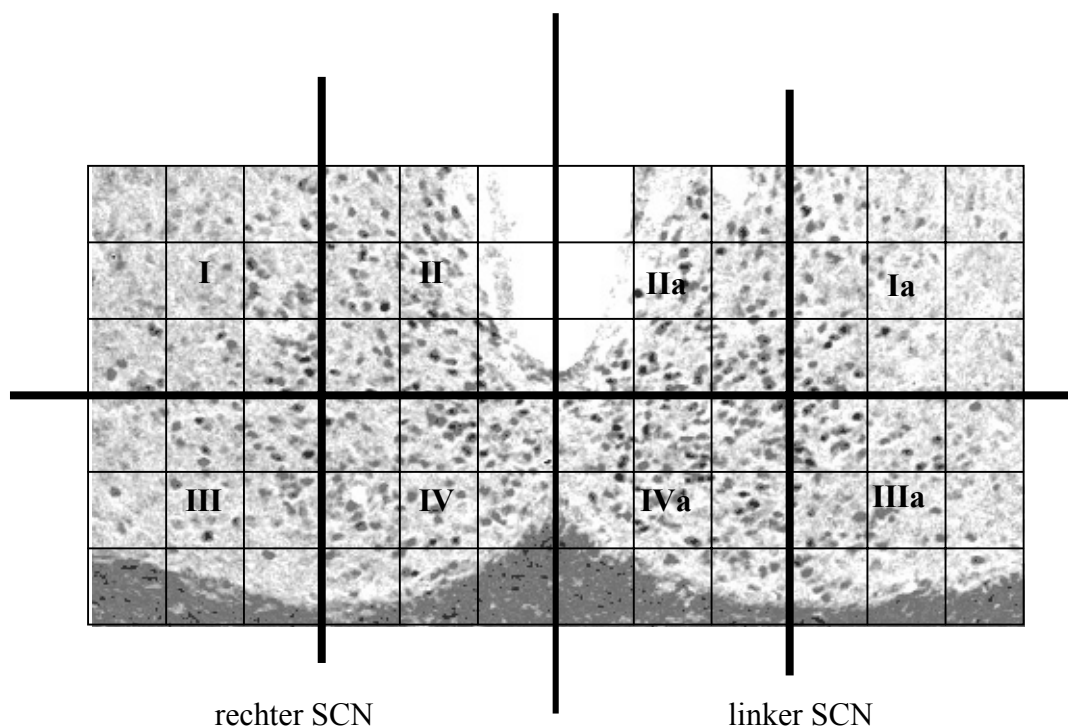


Abb.10: Einteilung des SCN in Sektoren zur Auswertung der räumlichen Verteilung der Immunreaktivität. I / Ia: dorso-lateral. II / IIa: dorso-mediale. III / IIIa: ventro-lateral. IV / IVa: ventro-medial.

Für die Auswertung erfolgte schließlich nach einem Vier-Farbschema: Dabei stand weiß für keine bis wenig immunreaktive Zellen und schwarz für eine hohe Konzentration an Immunreaktivität. Die Grautöne stehen entsprechend ihrer Intensität für eine geringe bis mittlere Anzahl an immunreaktiven Zellen. Als Grundlage für die Einteilung der Farben wurde die höchste Kennzahlensumme eines Antikörpers durch vier dividiert. Daraus ergab sich dann die Kodierungen für die Farben.

Beispiel: Die höchste Kennzahlensumme des Antikörpers x ist 16.  $16 / 4 = 4$ , d.h für die Quadranten:

Kennzahlensumme	Farbcode
1-4	Weiß
5-8	Hellgrau
9-12	Dunkelgrau
13-16	Schwarz

Auf diese Weise konnten die vier verschiedenen Versuchsgruppen bezüglich eines Antikörpers gut miteinander verglichen werden.

### 2.3.1.5 Statistik

Die statistische Auswertung erfolgte mit den Programmen Microsoft Excel 2000 und StatView 5.0 für Windows. Zum Vergleich zweier unverbundener Stichproben wurde der Mann-Whitney-U-Test herangezogen. Für den Vergleich mehrerer Gruppen wurde eine einfaktorielle Varianzanalyse (*one-way* ANOVA) durchgeführt, an die sich der Tukey-Kramer *post-hoc* Test anschloss. Ein signifikanter Unterschied wurde bei  $p < 0,05$  angenommen.

Alle Daten werden als Mittelwerte mit Standardfehler des Mittelwerts ( $\pm$  SEM) angegeben, wobei die Mittelwerte sich auf einen *Nucleus* des SCN und nicht auf das gesamte Kerngebiet beziehen.

### 2.3.1.6 Histologische Färbemethode

#### HE-Färbung für Paraffinschnitte

Die Farblösungen wurden entsprechend des Protokolls (Anhang A) hergestellt. Die Färbung der Schnitte in der Hämalaun-Lösung erfolgte für 7-10 Minuten. Anschließend wurden die Objektträger mit HCl-Alkohol (2ml HCl konz. in 200ml 70%igem Alkohol) für einige Sekunden gespült, bevor sie mindestens 15 Minuten in fließendes Leitungswasser gestellt wurden. Die Gegenfärbung mit Eosin erfolgte darauf für 0,5 bis 2 Minuten. Die Differenzierung erfolgte schließlich in 70%igem Alkohol. Im Anschluss daran erfolgte eine Entwässerung der Schnitte, die schließlich mit DPX eingebettet wurden.

### **HE-Färbung für Technovitschnitte**

Im Allgemeinen erfolgte die HE-Färbung bei den Technovitschnitten wie bei den Paraffinschnitten. Im Folgenden werden nur die Unterschiede zwischen den beiden Verfahren beschrieben: Im Gegensatz zu den Paraffinschnitten werden die Technovitschnitte 60 Minuten in Hämalaun gefärbt. Die darauffolgenden Spülschritte entsprechen denen beim Paraffin. Anschließend werden die Schnitte 3 Minuten in Eosin gefärbt, bevor sie in 96%igem Alkohol differenziert werden. Auch hier werden die Schnitte nach der Entwässerung in DPX eingebettet.

## **2.3.2 Gel-Elektrophorese und *Western-Blot***

Insgesamt bietet die Gel-Elektrophorese ein probates Mittel zur Auftrennung von Proteingemischen und einen gröbenselektiven Nachweis der entsprechenden Proteine. Gekoppelt an einen *Western-Blot*, bei dem die aufgetrennten Proteine elektrisch aus dem Gel auf eine PVDF-Membran transferiert werden, ist sie eine gute Methode, um Nachweise auf Proteinebene durchzuführen und die Spezifität von Antikörpern zu überprüfen.

### **2.3.2.1 Gewebe Gewinnung und –aufbereitung**

Die Gewinnung des frischen Gehirngewebes erfolgte ähnlich wie bei den Slice-Gewebekulturen: Die Tiere wurden mit CO<sub>2</sub> getötet und das Gehirn aus der Schädelkapsel herauspräpariert. Anschließend wurde ein ca. 1 mm dicker Transversalschnitt, ein Slice, angefertigt und zwar genau an der Stelle des *Chiasma opticums*. Aus diesem Slice wurde die SCN-Region mit einer Hämatokrit-Kapillare (Innendurchmesser 1 mm ± 0,05 mm) ausgestanzt und in Probenpuffer (TRIS/EDTA/TRITON oder TRIS-CHAPS-EDTA) mit einem Proteasen-Inhibitor-Cocktail überführt. Die Gewinnung des Probenmaterials erfolgte mit gekühltem Präparationsmaterial und wurde auf Eis durchgeführt.

Mit einem Glas-Teflon-Homogenisierer wurde ein Gewebehomogenat hergestellt. Die vom Extraktionspuffer gelösten Proteine wurden über einen 15-minütigen Zentrifugationsschritt (12.000 x g) bei 4°C von den festen Bestandteilen des Homogenats getrennt. Der gewonnene Überstand wurde bis zu seiner weiteren Verwendung bei -80°C eingefroren.

### 2.3.2.2 SDS-PAGE Gel-Elektrophorese

Die denaturierten Proteine bilden mit dem Natriumdodecylsulfat (SDS) des Probenpuffers negativ geladene Komplexe, die in einem elektrischen Feld entsprechend ihres Molekulargewichts aufgetrennt werden können. In diesem Trennverfahren nach LAEMMLI (1970) ist die Laufgeschwindigkeit der Proteine umgekehrt proportional zur Größe und damit dem Molekulargewicht des Proteins. Die Konzentration des Acrylamids im Gel bestimmt seine Trennleistung: Hier wurden Gele mit einer Konzentration von 10 und 14% Acrylamid (Amersham) verwendet.

Die Proteinproben wurden mit 2 x SDS-Probenpuffer im Verhältnis 1:1 gemischt und für 2 Minuten auf 85°C erhitzt. Anschließend wurde die abgekühlte Proteinlösung in Probengrößen von jeweils ca. 30-40µg Proteinmenge in die Probentaschen des entsprechenden Gels gefüllt. Als Standard für die Proteingröße wurde zusätzlich ein farbiger Molekularmarker aufgetragen.

Die anschließende Elektrophorese erfolgte für ca. 1 bis 2 Stunden in einer vertikalen Gel-Elektrophorese-Apparatur bei einer konstanten Stromstärke von 40 mA mit einem TRIS-Glycin-Laufpuffer.

### 2.3.2.3 *Western-Blot*

Für den *Western-Blot* wurde eine auf Polyvinylidendifluorid (PVDF)- basierende Membran verwendet. Vor dem Immunoblot wurde sie mit 100% Methanol aktiviert, in *Aqua bidest.* gewaschen und mit Transferpuffer getränkt.

Die durch die Elektrophorese aufgetrennten Proteine wurden auf die PVDF-Membran übertragen; dies erfolgte in einem Semi-Dry-Verfahren, indem das Elektrophorese-Gel und die Membran aufeinander gelegt und zwischen mehrere, in Transferpuffer getränkte Filterpapierlagen eingebettet wurden. Der Transfer der Proteine vom Gel auf die Membran erfolgte in einer Elektrotransfer-Apparatur (Hoefer) für 3 bis 4 Stunden bei einer Stromstärke von 0,75 mA/cm<sup>2</sup>.

### 2.3.2.4 Immundetektion der Proteine

Um die gleichmäßige Beladung des Gels mit Protein zu überprüfen, wurde es nach Abschluss des Blots mit einer Coomassielösung gefärbt.

Die PVDF-Membran wurde zunächst mit Milchpuffer (5% Milchpulver in PBS) für 1,5 Stunden bei Raumtemperatur und unter leichtem Schütteln inkubiert, um freie und unspezifische Bindungsstellen abzusättigen. Zum Nachweis der Proteine wurde die Membran anschließend mit dem Primärantikörper (alle Antikörper 1:1000 in PBS verdünnt) über Nacht bei 4°C behandelt. Nachfolgend wurde die Membran 4 x 10 Minuten mit Milchpuffer gespült, bevor der HRP-konjugierte anti-Kaninchen Zweitantikörper für 2 Stunden bei Raumtemperatur appliziert wurde. Der Antigen-Nachweis erfolgte über Chemilumineszenz. Ähnlich wie bei der Immunhistochemie erfolgte über die Reaktion von HRP und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> die Oxidation des Chemilumineszenzsubstrats. Die Chemilumineszenzsignale wurden auf einem Hyperfilm ECL sichtbar gemacht. Schließlich konnten mit Hilfe des Farbstandards die Molekulargewichte der ausgewerteten Proteine bestimmt werden.

## **2.4 Reverse-Transcriptase-Polymerase-Chain-Reaction (RT-PCR)**

Die Reverse-Transcriptase-Polymerase-Chain-Reaction (RT-PCR) ist eine hochsensible Methode, um spezifische Genexpressionsprodukte in einem Zielgewebe nachzuweisen: Aus isolierter Gesamt-RNA kann eine gesuchte cDNA-Sequenz generiert und mit spezifischen Primern amplifiziert werden, so dass eine abschließende Elektrophorese diese Sequenz detektieren kann. Auf diese Weise können auch sehr geringe Mengen an Expressionsprodukten nachgewiesen werden. Deshalb erschien die RT-PCR als adäquate Methode, um das Vorkommen des NMDA-Rezeptors 1 (NR1) zunächst auf Nucleinsäurebasis nachzuweisen, bevor mit weniger sensiblen, immunhistochemischen Methoden auf Proteinebene Nachweise geführt werden.

### **2.4.1 Extraktion und Isolierung der RNA**

Zur Isolierung der gewünschten RNA wurden zu drei verschiedenen Zeitpunkten (ZT3,5, ZT8, ZT18,5) Gehirn (SCN, PVN als positiv Kontrolle und Cortex) sowie Muskel (negativ Kontrolle) von je drei Zwerghamstern frisch präpariert (vgl. 4.3.1.1). Das Gewebe wurde in Trizol aufgenommen und bei -80°C gelagert. Für die Extraktion wurde das Gewebe anschließend homogenisiert und die RNA nach dem Protokoll des Trizol Herstellers Sigma ausgefällt. Zum Schluss wurde die RNA mit 75%igem Ethanol gewaschen, abzentrifugiert (15 min., 13K, 4°C) und das Pellet der Gesamt-RNA anschließend in H<sub>2</sub>O/DEPC aufgenommen. Vor der Reversen Transkription (RT) wurde die RNA-Konzentration photometrisch über die optische Dichte (OD) bestimmt.

### 2.4.2 RT-PCR

Die RT-PCR besteht aus zwei aufeinanderfolgenden Reaktionen: In der ersten, der Reversen Transkription (RT), wird aus der RNA über das Enzym Reverse Transkriptase die First-Strand cDNA gebildet und in der zweiten, der eigentlichen PCR, wird die gewünschte cDNA mit spezifischen Primern amplifiziert. Für NR1 wurden Primer mit einer Länge von 23 (5'-TGC AGA ACC GCA AGC TGG AA-3' forward) und 22 (5'-GGT CCA GCA GGT ACA GCA TCA C-3' reverse) Basen eingesetzt. Um bei der PCR eine etwa vergleichbare Menge First-Strand cDNA einzusetzen, wurde nach der RT-Reaktion die Konzentration der cDNA in den verschiedenen Proben photometrisch bestimmt.

Beide Reaktionen, RT und PCR, wurden entsprechend den Angaben des Herstellers nach dem Protokoll der SuperScript™ II RNase H<sup>-</sup> Reverse Transkriptase (LIFE TECHNOLOGIES, Karlsruhe) durchgeführt. Die PCR wurde mit unterschiedlichen Temperaturgradienten gefahren, die sich aufgrund der verschiedenen Schmelztemperaturen der Primer ergaben: Bei NR1 lag er zwischen 60-70°C. Das Programm für die Thermocycler (Eppendorf Gradient Cycler und Biometra) setzte sich folgendermaßen zusammen: Zunächst wurde für 2 Minuten auf 94°C erhitzt, um dann 35 Zyklen mit 94°C für 15 Sekunden, 60-70°C für 30 Sekunden und 72°C für 1 Minute zu fahren. Nach Beendigung der Zyklen wurden die Proben nochmals für 3 Minuten auf 72°C gehalten und dann bis zur Entnahme auf 4°C herunter gekühlt.

### 2.4.3 Elektrophorese

Nach der PCR wurde eine Elektrophorese durchgeführt: Auf 1%igem Agarose-Gelen (TAE/Ethidiumbromid), wurden die 6x *low dye loading buffer* versetzten Proben aufgetragen. Auf jedem Gel lief zur späteren Differenzierung der PCR-Produkte zusätzlich eine 100 bp DNA-Leiter als Marker mit. Zur Auftrennung der Proben wurde über ca. 30 Minuten eine Spannung von 100V an die Gele angelegt. Um die aufgetrennten PCR-Produkte sichtbar zu machen, wurden die Gele unter UV-Licht betrachtet und abschließend für dauerhafte Dokumentation fotografiert.



## 3 Ergebnisse

### 3.1 Aktivität

Wie bei Steinlechner *et al.* (2002) beschrieben, kann bei *Phodopus sungorus* durch Lichtpulse arrhythmisches lokomotorisches Verhalten induziert werden. Neben dem Verlust der circadianen Rhythmik in der Lokomotion, konnte bei Steinlechner *et al.* (2002) auch bei der Körpertemperatur und der Melatoninsynthese kein Tagesgang mehr ermittelt werden. Aus diesem Grund wird die Lokomotion als ein circadianer *Output* der inneren Uhr beurteilt und hier als non-invasiv zu ermittelnder Parameter gewertet, der stellvertretend für die circadianen Systeme steht.

Im Folgenden werden die *Doppelplot*-Aktogramme als Differenzierungsgrundlage für die vier Versuchsgruppen dargestellt. Außerdem werden die einzelnen Versuchsgruppen über verschiedene aus den Aktogrammen gewonnene Parameter im Hinblick auf ihr lokomotorisches Verhalten sowie Alterseffekte genauer beschrieben.

#### 3.1.1 Aktogramme

Bei allen vier Versuchsgruppen wurde die Aktivität kontinuierlich überwacht. Alle jungen Versuchstiere zeigten unter Langtagbedingungen (L:D 16:8) bis zur Gabe eines Doppellichtpulses einen klaren, am exogenen Zeitgeber Licht synchronisierten, Aktivitätsrhythmus (Abb.11). Die lokomotorische Aktivität war in dieser Zeit nahezu auf die Scotophase beschränkt, wobei die Tiere kontinuierlich aktiv waren, d.h. die Aktivitätsbanden wenig unterbrochen sind. Für diese Phase ließ sich bei allen Tieren mittels der *Chi-Quadrat*-Periodogrammanalyse (Sokolove und Bushell 1978) ein eindeutiger, signifikanter 24-Stunden-Rhythmus feststellen (hier nur für die arrhythmische Versuchsgruppe dargestellt: Abb.11b). Nach der Gabe des Doppellichtpulses (Abb.11, Lichtpulse mit Sternen gekennzeichnet) veränderte sich das Aktivitätsmuster bei den jungen Tieren: Zunächst zeigten die meisten Tiere direkt nach den Lichtpulsen eine deutliche Kompression der Aktivitätsphase ( $\alpha$ ); bei der Gruppe der jungen „Rhythmiker“ war der Beginn der Aktivitätsphase jedoch nach ein bis zwei Tagen wieder mit dem Beginn der Scotophase synchronisiert und innerhalb weniger Tage fand wieder eine deutlich  $\alpha$ -Dekompression statt. Bei den induziert arrhythmischen Tieren hingegen nahm die  $\alpha$ -Kompression immer weiter zu; die Tiere dieser Gruppe waren nicht mehr in der Lage eine Aktivitätsphase aufrecht zu erhalten, deren Aktivitätsbeginn oder -ende mit dem Licht-

Dunkelwechsel hätte synchronisiert werden können. Nach einer individuellen  $\alpha$ -Kompressionsphase von einem bis zu sechs Tagen kam es meist zu einer schlagartigen  $\alpha$ -Dekompression und die lokomotorische Aktivität wurde fragmentiert über 24-Stunden verteilt. Die statistische Analyse für die Zeit nach dem Doppellichtpuls zeigte bei der einen Versuchsgruppe, den jungen rhythmischen Tieren, weiterhin einen 24-Stunden-Rhythmus der lokomotorischen Aktivität (Abb.11a), wohingegen die zweite Gruppe, die jungen arrhythmischen Tiere, keinen nachweisbaren circadianen Aktivitätsrhythmus mehr aufwiesen (Abb.11c). Bei einigen Tieren der jungen arrhythmischen Versuchsgruppe zeigten sich schwache ultradiane Rhythmen.

Bei den alten Versuchstieren fiel im Vergleich zu den jungen Tieren auf, dass die nächtliche Aktivitätsphase deutlich fragmentiert war: Es gab keine durchgehende Aktivitätsbande in der Scotophase, sondern mehrere Aktivitätsfragmente (Abb.12). Außerdem verloren die alten Tiere im Verlauf der Zeit die Fähigkeit, mit dem Licht-Dunkelwechsel zu synchronisieren: Bei der einen Gruppe der alten Tiere, den alten „Rhythmikern“, kam es zu „Unschärfen“ zu Aktivitätsbeginn und -ende (Abb.12C), aber es ließ sich immer noch ein deutlicher 24-Stunden-Rhythmus feststellen (Abb.12d). Bei der zweiten Gruppe, den „Arrhythmikern“, kam es zu einem natürlichen Verlust der Synchronisationsfähigkeit, d.h. die Tiere verloren kontinuierlich immer mehr die Fähigkeit, sich am Licht-Dunkelwechsel zu synchronisieren, bis sich das Aktivitätsmuster komplett auflöste und sich die Aktivität relativ gleichmäßig über 24 Stunden verteilte (Abb.12D); dabei können noch ultradiane Rhythmen vorhanden sein, aber es ließ sich keine statistisch signifikante 24-Stunden-Rhythmik mehr nachweisen (Abb.12f).

Anhand der Aktogramme ließen sich die vier verschiedenen Versuchsgruppen (jung rhythmisch, jung arrhythmisch, alt rhythmisch, alt arrhythmisch) gut voneinander unterscheiden. Die beschriebenen Charakteristika der einzelnen Gruppen gekoppelt mit der *Chi-Quadrat*-Periodogrammanalyse ließen eine eindeutige Zuordnung zu einer der vier Versuchsgruppen zu..

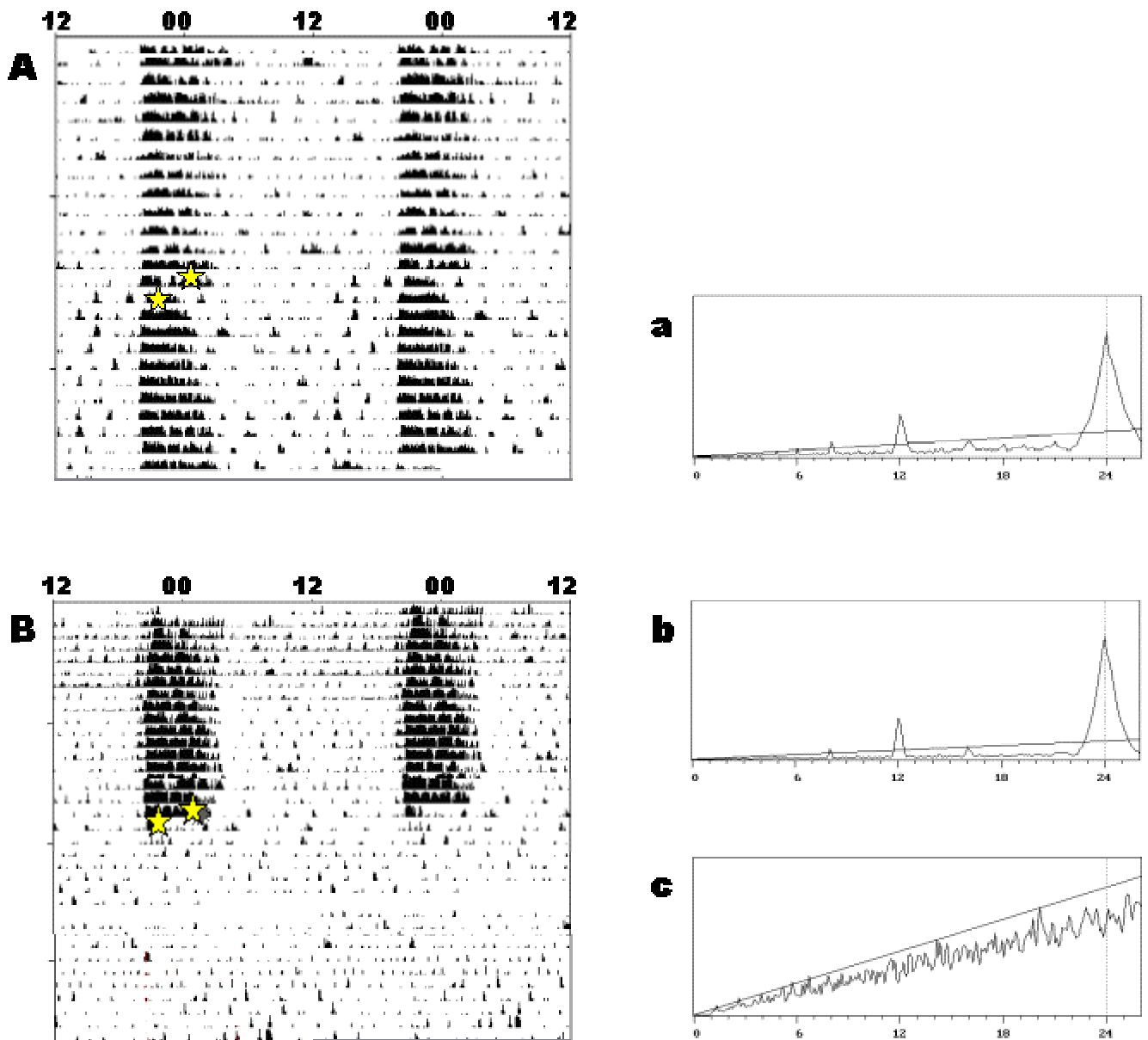


Abb.11: Repräsentative Aktogramme eines rhythmischen (A) und eines arrhythmischen (B) jungen Dsungarischen Zwerghamsters, *Phodopus sungorus*. Die Sterne kennzeichnen die Lichtpulse. Die *Chi-Quadrat*-Periodogramme (a-c) analysieren die ersten (b) bzw. die letzten (a,c) 10 Tage der entsprechenden Aktogramme – dabei entspricht die Diagonale der Signifikanzgrenze und die Teilstriche auf der X-Achse entsprechen jeweils einer Stunde.

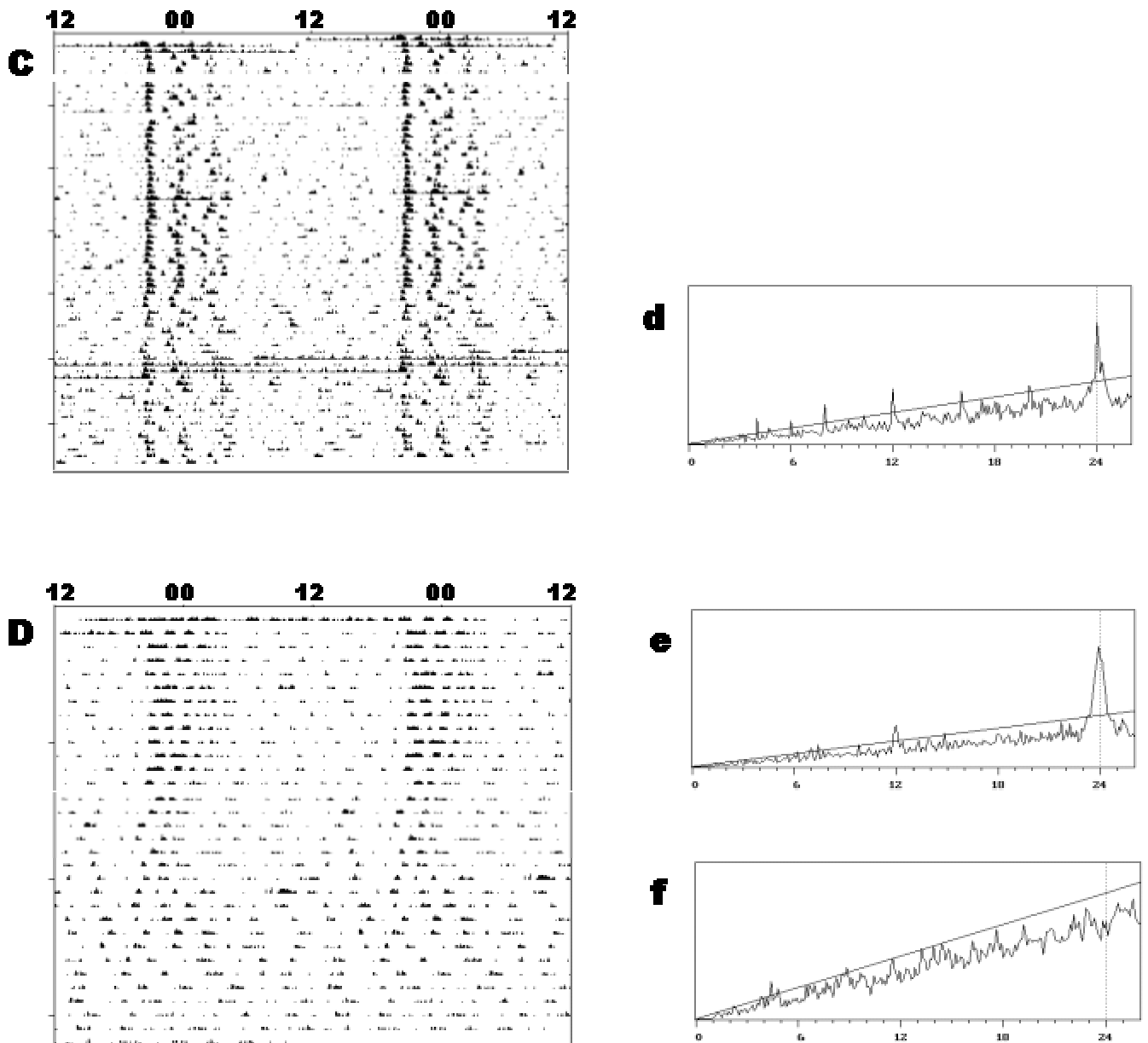


Abb.12: Repräsentative Aktogramme eines rhythmischen (C) und eines arrhythmischen (D) alten Dsungarischen Zwerghamsters, *Phodopus sungorus*. Die *Chi-Quadrat*-Periodogramme (d-f) analysieren die ersten (e) bzw. die letzten (d,f) 10 Tage der entsprechenden Aktogramme – dabei entspricht die Diagonale der Signifikanzgrenze und die Teilstriche auf der X-Achse entsprechen jeweils einer Stunde.

### 3.1.2 Nachtaktivität

Beim Vergleich des prozentualen Anteils der Nachtaktivität zwischen den vier Versuchsgruppen (Abb.13), ergab sich zwischen den beiden rhythmischen Gruppen ein signifikanter Unterschied: Die jungen rhythmischen Tiere haben sich nachts prozentual mehr bewegt als die alten rhythmischen Tiere ( $F(1,34) = 9,893$ ;  $p = 0,0034$ ). Zwischen den beiden arrhythmischen Versuchsgruppen gab es keine statistisch signifikanten Differenzen. Statistisch gut zu erfassende Unterschiede gab es jedoch wieder beim Vergleich der Versuchsgruppen gleicher Altersstruktur: Sowohl die jungen als auch die alten rhythmischen Zwerghamster wiesen mehr Nachtaktivität auf, als die entsprechende arrhythmische Altersgruppe (Alt:  $F(1,29) = 46,494$ ; Jung:  $F(1,34) = 202,458$ .  $p < 0,0001$ ).

D.h. es gibt signifikante Unterschiede zwischen den rhythmischen und arrhythmischen Versuchsgruppen im Hinblick auf die Nachtaktivität; eine Differenzierung der beiden arrhythmischen Versuchsgruppen war über einen Vergleich der prozentualen Nachtaktivität jedoch nicht möglich.

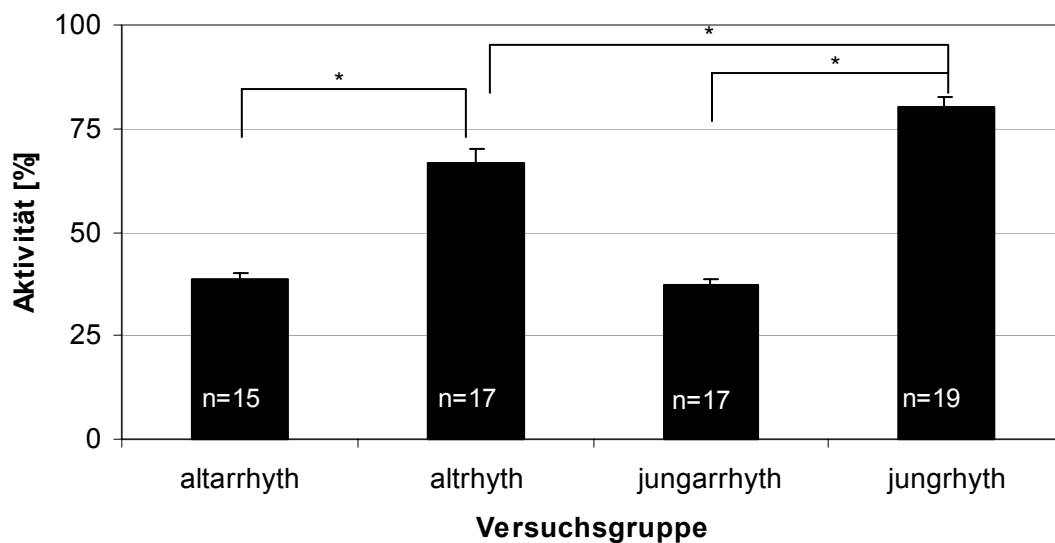


Abb.13: Durchschnittliche prozentuale Nachtaktivität bei den vier verschiedenen Versuchsgruppen von *Phodopus sungorus*.  $p < 0,05$ .

### 3.1.3 Aktivitätsbeginn (*Onset*) und –ende (*Offset*)

Der *Onset* bzw. *Offset* der Aktivität wurde nur bei den rhythmischen Tieren bestimmt, da es bei den arrhythmischen Tieren nach der Konvention keinen definierten Aktivitätsbeginn gibt. Sowohl beim *Onset* als auch beim *Offset* gab es statistisch signifikante Unterschiede zwischen den beiden Altersgruppen (*Onset*:  $Z = -2,086$ ;  $p = 0,037$ ; *Offset*:  $Z = -2,881$ ;  $p = 0,0004$ ): Es war deutlich zu erkennen, dass die jungen Tiere vor (Phasenwinkeldifferenz  $> 0$ ) und die alten Tiere mit bzw. nach dem Lichtwechsel begannen lokomotorisch aktiv zu werden (Phasenwinkeldifferenz  $\leq 0$ ) (Abb.14A). Die Darstellung des Aktivitäts-*Offset* zeigt, dass beide Gruppen im Schnitt deutlich vor dem Ende der Dunkelphase ihre Aktivität einschränkten (Abb.14B). Bei den jungen Tieren hörte die Aktivität jedoch spätestens mit dem Lichtwechsel von dunkel nach hell auf, wohingegen es in der Gruppe der alten „Rhythmiker“ einige Tiere gab, die noch deutlich nach dem Lichtwechsel zu Beginn der Photophase aktiv waren.

### 3.1.4 Fragmentierung der Aktivität

Die erwartete Anzahl an Aktivitätsschüben (= *Bouts*) bei rhythmischen Tieren liegt bei einem *Bout*, der sich ununterbrochen (siehe 4.2.1: Auflösung der Datenaufnahme) über die ganze Dunkelphase ziehen sollte. Diese Erwartung wurde von den jungen rhythmischen Tieren nahezu erfüllt: Die mittlere Anzahl an Aktivitätsschüben liegt mit  $1,28 \pm 0,08$  *Bouts* nur kurz über der erwarteten Anzahl von 1 (Abb.15). Bei den alten rhythmischen Tieren liegt die mittlere Anzahl der *Bouts* bei  $2,44 \pm 0,25$  und ist damit signifikant höher als bei den jungen Tieren ( $Z = -3,56$ ;  $p = 0,0004$ ). Der Vergleich der mittleren Anzahl der Aktivitäts*bouts* von den beiden arrhythmischen Versuchsgruppen zeigte keine statistisch signifikanten Unterschiede (jungen arrhythmische:  $4,47 \pm 0,40$  *Bouts*; alt arrhythmisch:  $4,63 \pm 0,35$  *Bouts*).

Entsprechend der o.g. Ergebnisse zeigte sich beim Vergleich der Aktivitätsschübe innerhalb der Altersgruppen, dass sowohl bei den jungen als auch bei den alten Tieren die mittlere Anzahl der Aktivitäts*bouts* bei den arrhythmischen Tieren signifikant höher lag als bei den rhythmischen Tieren (jung arrhythmisch vs. rhythmisch:  $Z = -5,054$ ;  $p < 0,001$ . alt arrhythmisch vs. rhythmisch:  $Z = -3,973$ ;  $p < 0,0001$ ).

Zusammenfassend gibt es demnach bei den alten rhythmischen Tieren im Vergleich zu den jungen „Rhythmikern“ eine erhöhte Fragmentierung der Aktivität; außerdem ist die Aktivität bei den arrhythmischen Tieren beider Altersgruppen stark zergliedert.

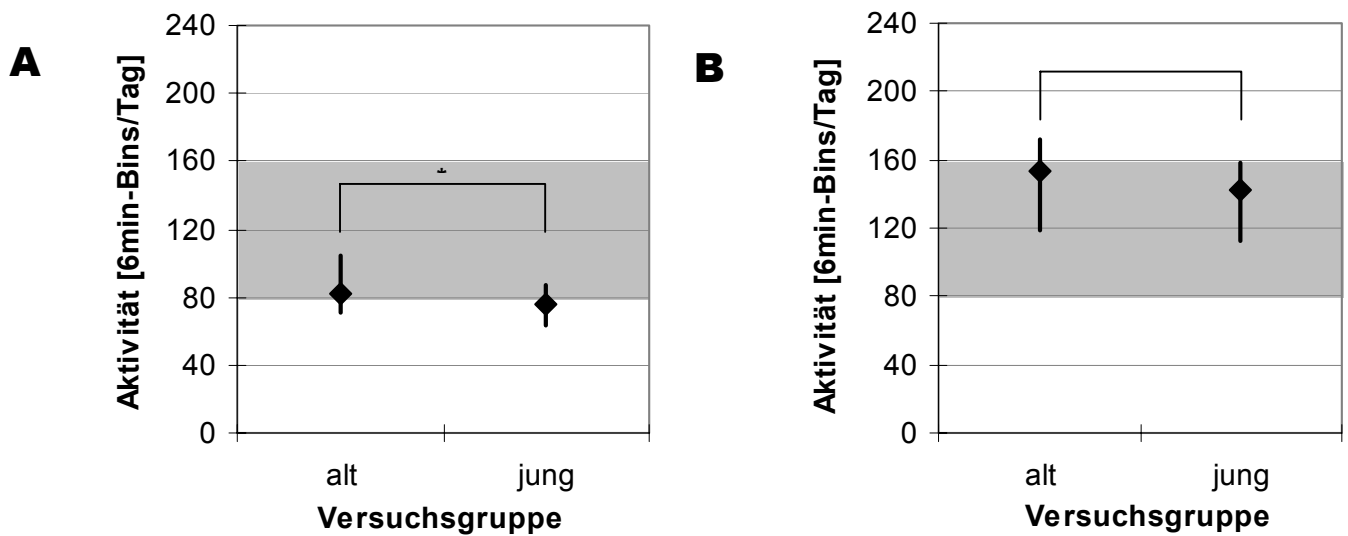


Abb.14: Spannweite des Aktivitätsbeginns (A) und -endes (B) der rhythmischen Versuchsgruppen von *Phodopus sungorus*. Angegeben sind Mittelwert (Raute) sowie Maximal- und Minimalwerte. Grau hinterlegt: Scotophase. n(jung) = 19, n(alt) = 17.

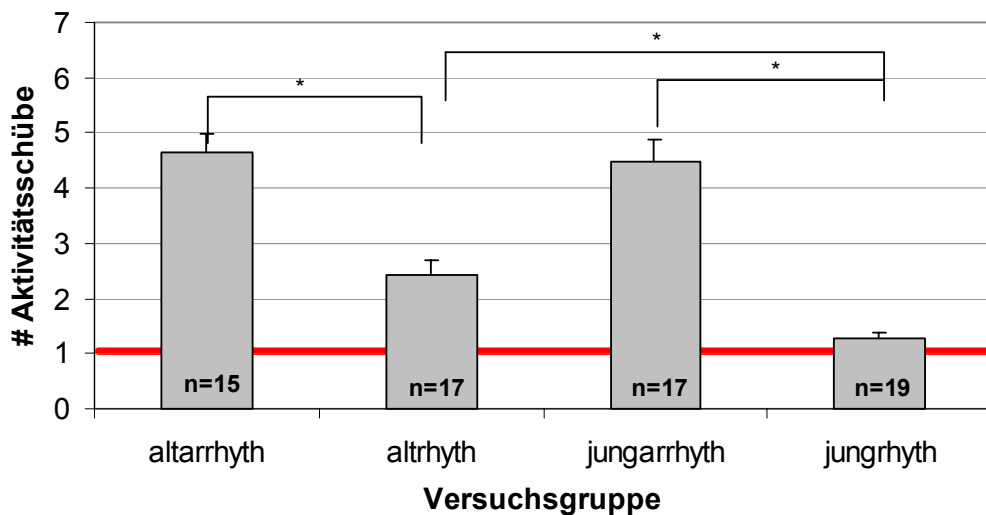


Abb.15: Mittlere Anzahl der über den *running average* von 3 Stunden bestimmten Aktivitätsschübe bei den vier Versuchsgruppen von *Phodopus sungorus*. Dunkle Linie: Erwartete Anzahl an Aktivitätsschüben bei rhythmischen Tieren in L:D 16:8.

## 3.2 Immunhistochemie am SCN von *Phodopus sungorus*

Für alle nachfolgenden Untersuchungen wurden nur Tiere verwendet, die sich eindeutig einer der vier Versuchsgruppen zuordnen ließen. Dabei spielte bei den arrhythmischen Tieren die Periodogrammanalyse der letzten Lebensstage eine entscheidende Rolle: Zeigte die Analyse noch einen annähernd 24-Stunden-Rhythmus, der auch nur minimal oberhalb der Signifikanzgrenze lag, so wurde dieses Tier nicht für die folgenden Versuche berücksichtigt

### 3.2.1 Zeitliche Verteilung

Bei allen getesteten Antikörpern wurde zu vier verschiedenen Zeitgeberzeiten (ZT 0, 8, 16, 20) die Anzahl der immunreaktiven Zellen in einem definierten Bereich des SCN ermittelt; gezählt wurden dabei alle Zellen (Zellkerne), die nach einer Farbverfremdung (siehe 4.3.1.4) markiert waren. Insgesamt wurde bei dieser Zählung der rostrale, mediale und caudale Bereich des SCN getrennt bewertet.

Für die zeitliche Verteilung der Immunreaktivität wurden jeweils die genauen Zellzahlen pro SCN ermittelt und untersucht, während für die räumliche Verteilung die Anzahl der immunreaktiven Zellen nach Kennzahlen beurteilt wurde (vgl. 4.3.1.4.)

#### 3.2.1.1 mPER1

Das mPER1-Protein gehört ebenso wie mPER2 zu den Transkriptionsfaktoren und wird auch der basic-helix-loop-helix (bHLH) Familie zugeordnet. Weiterhin fungiert mPER1 auch als negatives Rückkopplungselement auf Transkriptionsebene bei der Regulierung der Expression von Uhrgenen. mPER1 ist verstärkt im SCN des Hypothalamus zu finden, aber auch in anderen Gehirnbereichen und Geweben der Peripherie.

Zunächst wurde auf Proteinebene versucht, den Nachweis von mPER1 im SCN von *Phodopus sungorus* mittels *Western-Blot* Technik zu erbringen. Dieser Versuch scheiterte jedoch, da trotz verschiedener Modifikationen im Ablauf der Untersuchung keine verwertbare Banden auf der *Blot*-Membran zu erkennen waren. Diese Tatsache ließ Zweifel an der Spezifität des kommerziellen polyklonalen Antikörpers aufkommen.

Trotzdem wurden parallel zum *Western-Blot* immunhistochemische Probefärbungen mit dem kommerziellen mPER1-Antikörper durchgeführt. Im Gegensatz zum *Western-Blot* ließ sich mPER1 immunhistochemisch offenbar im SCN von Dsungarischen Zwerghamstern nachweisen: Auf den Probeschnitten zeigten sich im Vergleich zum angrenzenden Hypothalamus im SCN spezifisch angefärbte Zellen. Im Gegensatz dazu stand die



PBS-Negativkontrolle, bei der ein solcher Befund nicht dargestellt werden konnte. allerdings handelte es sich – entgegen der Annahme – nicht um eine Kernfärbung, sondern um eine Cytoplasmafärbung (Abb.16A). Da diese Färbung SCN-Zellen deutlich darstellte, wurden von allen vier Versuchsgruppen komplette Serien immunhistochemisch gefärbt. Bei der Auswertung der Färbungen sind jedoch – ähnlich wie beim *Western-Blot* – Probleme aufgetreten: Die Ergebnisse waren extrem diffus. Diese Tatsache, gekoppelt mit dem negativen *Western-Blot* Ergebnissen, führte zu der Entscheidung, die Ergebnisse für diesen Antikörper nicht darzustellen. Unterstützt wurde diese Entscheidung zusätzlich durch Probefärbungen mit dem kürzlich von Dr. David Weaver zur Verfügung gestellten mPER1-Antikörper, wie er von Hastings *et al.* (1999) beschrieben wurde: Bei diesem Antikörper zeigte sich eine eindeutige Kernfärbung der SCN Neurone (Abb.16B). Nähere Erläuterungen finden sich in der Diskussion.

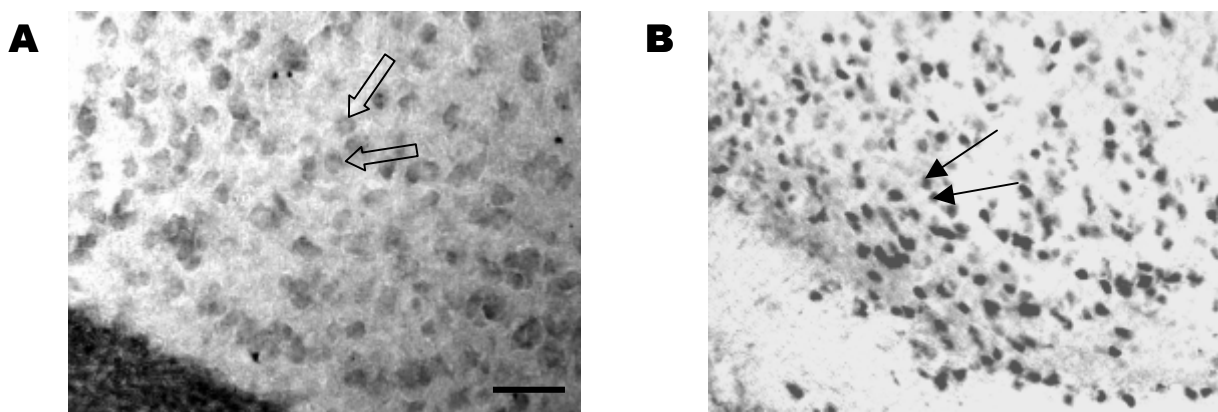


Abb.16: Immunfärbung gegen mPER1 bei *Phodopus sungorus*: Färbung mit einem kommerziellen Antikörper (A); Färbung mit dem PER1-Antikörper aus dem Labor von Reppert/Weaver (B). Balken = 20µm. Offener Pfeil = Cytoplasmafärbung; schwarzer Pfeil = Kernfärbung

### 3.2.1.2 mPER2

Bei mPER2 handelt es sich um Protein, das zur basic helix-loop-helix (bHLH) Familie der Transkriptionsfaktoren gehört. Es reguliert die Expression von Uhrgenen auf Transkriptionsebene als negatives Rückkoppelungselement. Das mPER2-Protein findet sich gehäuft im SCN, ist aber auch in anderen Teilen des Gehirns und in Geweben der Peripherie zu finden.

In dieser Arbeit wurde zunächst der Nachweis von mPER2 im SCN von *Phodopus sungorus* auf Proteinebene und schließlich auf zellulärer Ebene erbracht: Mittels der *Western-Blot*

Technik wurden verschiedene Gewebehomogenate untersucht. Der polyklonale Antikörper gegen mPER2 markierte in den Kontrollgeweben Hippocampus, cerebraler Cortex und rhinaler Cortex verschiedene Banden; u.a. auch eine, die nach dem Farbstandard ca. 120 kD entsprach und damit dem Molekulargewicht von mPER2. Diese Bande fand sich auch im Gewebehomogenat des SCN wieder (Abb.17). Neben dem Nachweis von mPER2 im SCN von *Phodopus sungorus* wurde auf diese Weise auch die Spezifität des Antikörpers belegt. Nach dem Nachweis des Proteins sollte mPER2 bei den verschiedenen Versuchsgruppen auf zellulärer Ebene im Tagesgang nachgewiesen werden. Die Zellen des SCN reagierten mit einer eindeutigen Kernfärbung auf die immunhistochemische Markierung gegen mPER2. Der SCN konnte deutlich in den verschiedenen Segmenten auf der rostro-caudalen Ebene dargestellt werden; beispielhaft ist das in Abb.18 dargestellt.

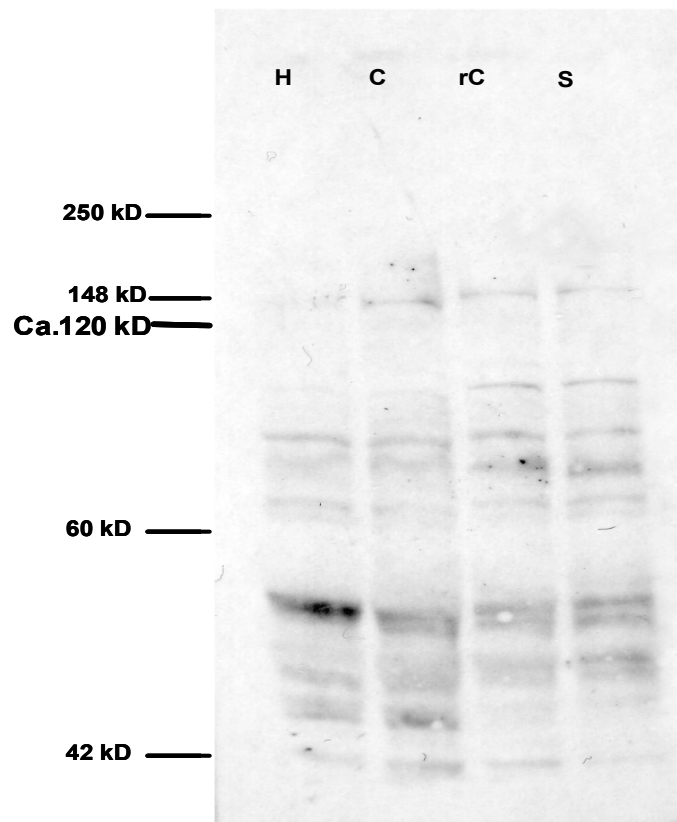


Abb.17: Immunmarkierung des *Western-Blots* mit einem Antikörper gegen mPER2 bei *Phodopus sungorus*. H = Hippocampus. C = cerebraler Cortex. rC = rhinaler Cortex. S = Suprachiasmatischer Nucleus.

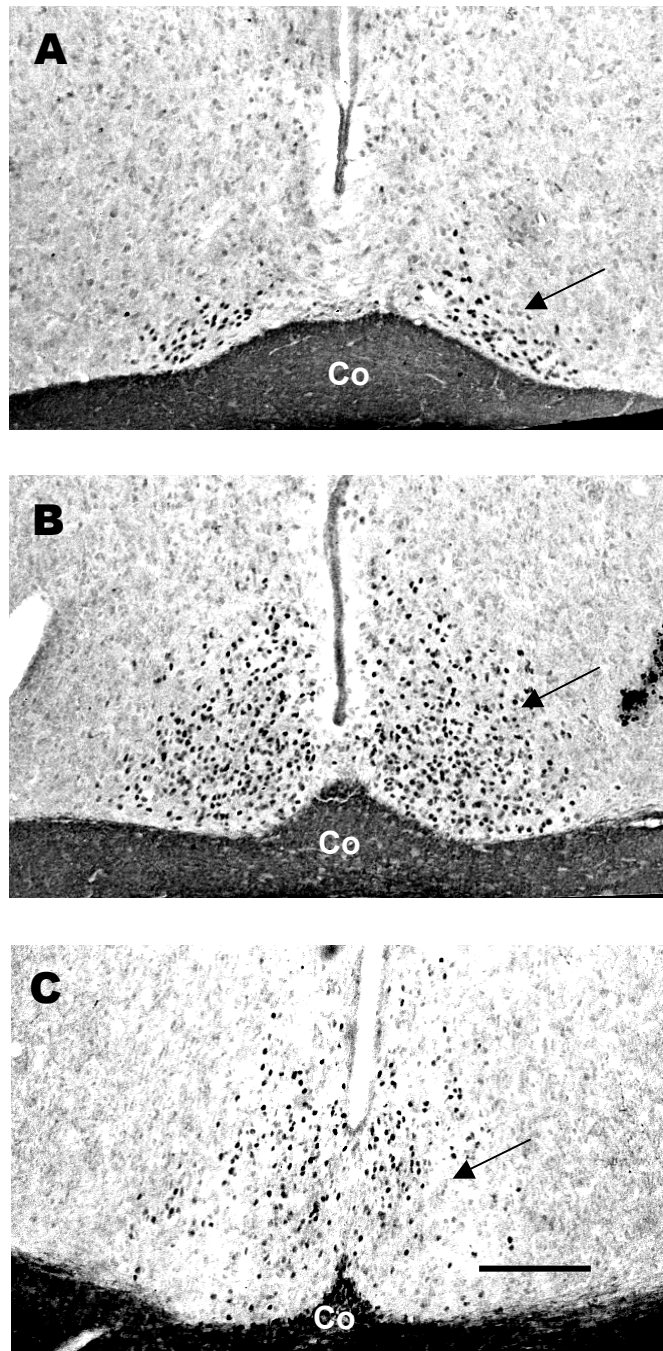


Abb.18: Immunfärbung gegen mPER2 im rostralen (A), medialen (B) und caudalen (C) Bereich des SCN von *Phodopus sungorus*. Balken = 100 $\mu$ m. Pfeil = SCN. Co = *Chiasma opticum*

## RHYTHMISCHE TIERE

### **Junge adulte Hamster**

Die Anzahl der immunreaktiven Zellen gegen mPER2 im rostralen, medialen und caudalen Bereich des SCN zu den Zeitpunkten ZT0, ZT8, ZT16 und ZT20 wird in Abb.19, Abb.20 und Abb.22 dargestellt. Die mittleren Zellzahlen  $\pm$  SEM sind in Anhang B Tab.1 aufgeführt.

Für den rostralen Bereich ergaben sich zwischen den Zeitpunkten ZT0 und ZT8, sowie zwischen ZT0 und ZT16 statistisch signifikante Unterschiede ( $F(3,12) = 3,712$ ,  $p = 0,0425$ ) (Abb.19). Den ermittelten Zellzahlen nach lag im rostralen Bereich des SCN bei ZT0 ein Maximum an immunreaktiven Zellen gegen mPER2.

Im Bereich des medialen SCN bestanden statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Zellzahlen zum Zeitpunkt ZT8 und ZT20 sowie zwischen denen der Zeitpunkte ZT16 und ZT20 ( $F(3,12) = 4,52$ ,  $p = 0,0243$ ). Der Zeitpunkt ZT0 erwies sich zu keinem anderen Zeitpunkt als signifikant verschieden. Insgesamt nahm die Signalstärke von ZT20 an kontinuierlich ab, bis sie bei ZT16 ihren Tiefpunkt erreichte (Abb.19).

Für den caudalen Bereich des SCN waren keine signifikanten Unterschiede in der Anzahl gezählter Zellen zwischen den verschiedenen Zeitpunkten zu ermitteln ( $F(3,12) = 2,654$ ,  $p = 0,0961$ , n.s.). Tendenziell ließ sich ein leichtes Maximum der Zellzahl bei ZT8 feststellen, wohingegen ein Minimum wegen hoher Streuungswerte nicht bestimmt werden konnte.

Generell war die Anzahl der immunreaktiven Zellen im medialen Bereich am höchsten, während sie im Bereich des rostralen SCN am geringsten war (Abb.20). Der Unterschied zwischen der mittleren Zellzahl im medialen und im rostralen Gebiet ließ sich über eine *one-way* ANOVA und einen anschließenden *post-hoc* Test (Tukey-Kramer) - mit Ausnahme von ZT0 - zu allen Zeitpunkten als signifikant einstufen (ZT0:  $F(3,12) = 16,509$ ,  $p = 0,0001$ , *post hoc*: n.s.; ZT8:  $F(3,12) = 82,087$ ,  $p < 0,0001$ ; ZT16:  $F(3,12) = 18,869$ ,  $p < 0,0001$ ; ZT20:  $F(3,12) = 41,82$ ,  $p < 0,0001$ ). Im caudalen Bereich des SCN zeigten sich deutlich weniger Zellen mit Immunreaktivität gegen mPER2, als im medialen Abschnitt; sie ließ sich aber nur zu ZT 20 als signifikant unterschiedlich zu diesem bestimmen (s.o.). Im Vergleich zum rostralen Bereich zeigte das caudale Gebiet in seiner Anzahl an immunreaktiven Zellen aufgrund der großen Streuung keine signifikanten Unterschiede; lediglich zu ZT8 ließ sich ein signifikanter Unterschied zwischen den mittleren Zellzahlen feststellen ( $F(3,12) = 82,087$ ;  $p < 0,001$ ) (Abb.20).

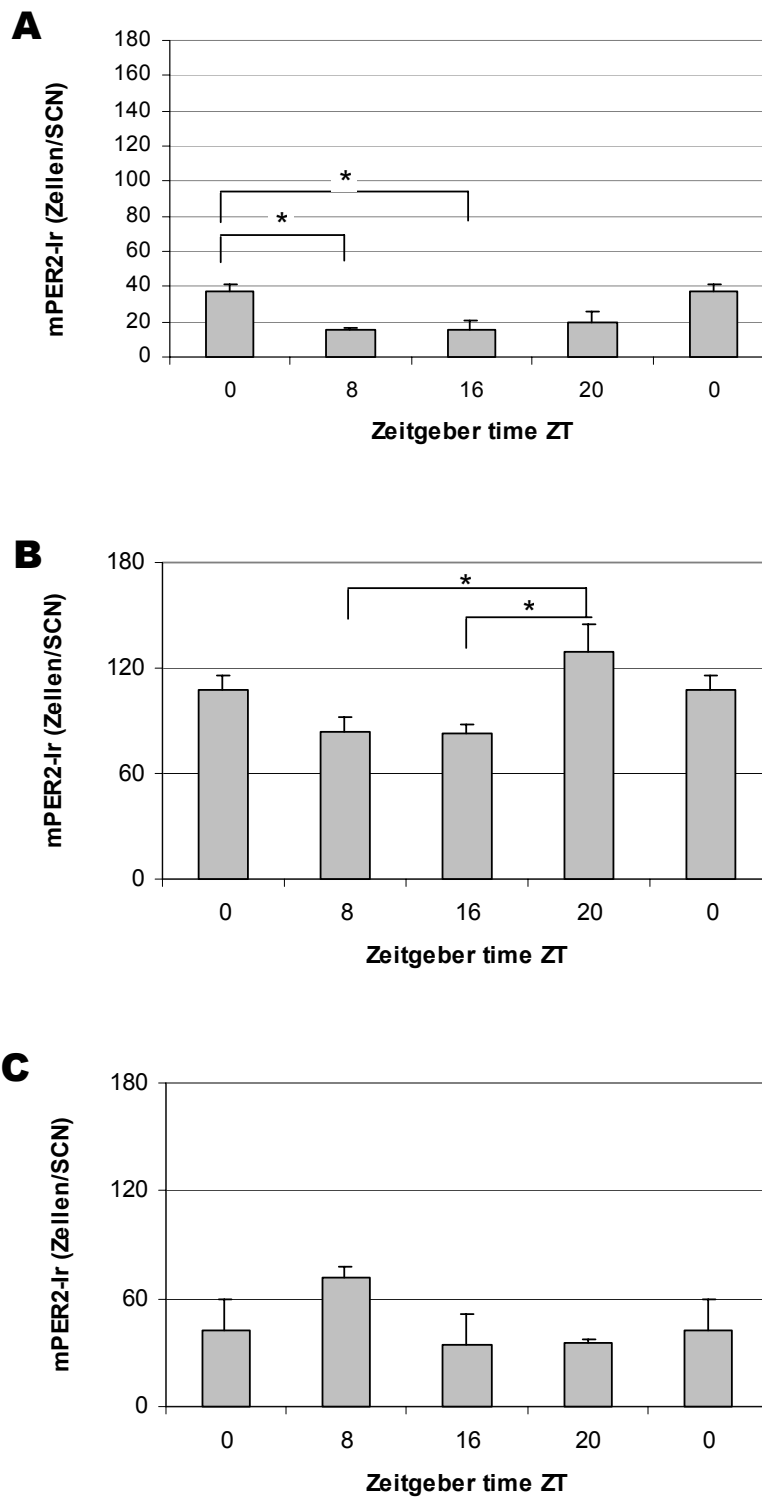


Abb.19: Anzahl der mPER2-immunreaktiven Zellen im rostralen (A), medialen (B) und caudalen (C) Bereich eines SCN von jungen adulten rhythmischen Zwerghamstern, *Phodopus sungorus*. Alle Datenpunkte sind als Mittelwerte  $\pm$  SEM dargestellt.  $n = 4$ .  $p < 0,05$ . Hier und in allen Folgenden Abbildungen diesen Typs sind die Werte für ZT0 am Ende wiederholt dargestellt um ggf. den zyklischen Charakter der Verläufe abzubilden.

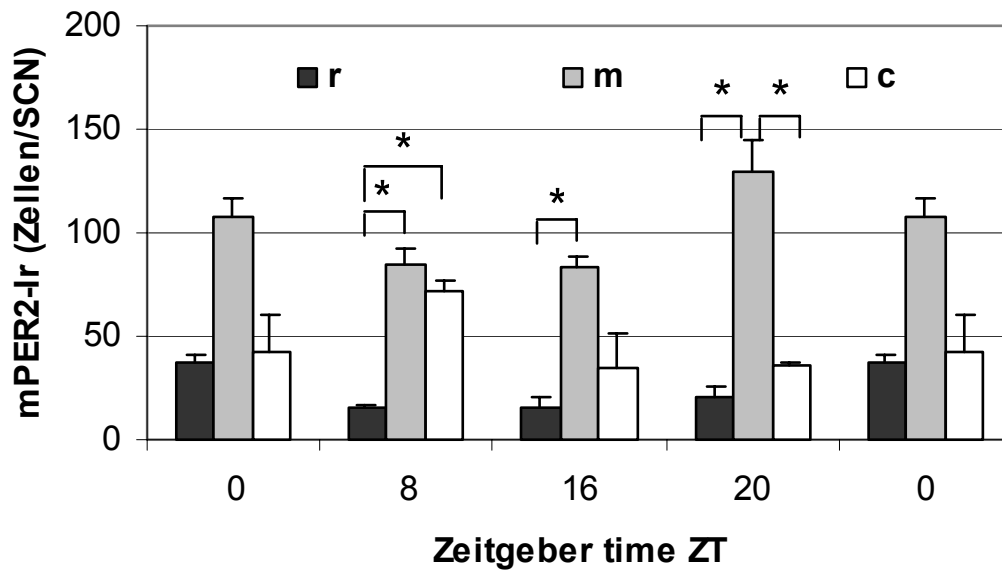


Abb. 20: Anzahl der mPER2-immunreaktiven Zellen im rostralen (r), medialen (m) und caudalen (c) Bereich eines SCN von jungen adulten rhythmischen Zwerghamstern, *Phodopus sungorus*. Alle Datenpunkte sind als Mittelwerte  $\pm$  SEM dargestellt;  $n = 4$ .  $p < 0,05$ .

### Alte Hamster

Die Zählung der immunreaktiven Zellen gegen mPER2 wurde bei den alten Hamstern ebenso durchgeführt wie bei den jungen und ist in Abb.21 dargestellt.

Insgesamt waren innerhalb der einzelnen Abschnitte auf der rostro-caudalen Achse über alle Zeitpunkte keine signifikanten Unterschiede in der Anzahl immunreaktiver Zellen festzustellen (rostral:  $F(3,14) = 1,756$ ,  $p = 0,2017$ , n.s.; medial:  $F(3,14) = 0,721$ ,  $p = 0,5557$ , n.s.; caudal:  $F(3,13) = 2,266$ ,  $p = 0,1291$ , n.s.)

Im rostralen Bereich waren Tendenzen hinsichtlich eines möglichen Maximums bzw. Minimums zu erkennen (Anhang B Tab.2; Abb.21): Ein Minimum deutete sich bei ZT 0 an, während zwischen ZT8 und ZT16 ein potentiell Maximum zu vermuten wäre.

Im medialen und caudalen Bereich war die Tendenz deutlicher sichtbar: Wie in Anhang B Tab.2 und Abbildung 21 dargestellt, schien sich im medialen Bereich ein Minimum der Immunreaktivität gegen mPER2 bei ZT0 anzudeuten; im caudalen Abschnitt war dieses Minimum etwas verschoben und befand sich zwischen den Zeitpunkten ZT 20 und ZT 0.

Bei den Maxima verhielt es sich ähnlich: Während das Maximum im medialen Bereich bei ZT16 festzustellen war, erschien es im caudalen SCN wieder etwas früher und lag bei ZT 8. Über eine *one-way* ANOVA mit einem anschließenden *post-hoc* Test (Tukey-Kramer) ließ sich auch hier, wie bei den jungen Tieren, zu allen Zeitpunkten ein signifikanter Unterschied zwischen den mittleren Zellzahlen im medialen und im rostralen Bereich feststellen. Der Unterschied zwischen der Anzahl an immunreaktiven Zellen im medialen und caudalen Bereich konnte nur zu den Zeitpunkten ZT16 ( $F(3, 12) = 794,545, p < 0,0001$ ) und ZT20 ( $F(3, 16) = 111,922, p < 0,0001$ ) als signifikant erkannt werden (Abb.21). Bei einem Vergleich der mittleren Zellzahlen von caudalem und rostralem Bereich fand sich ebenfalls nur zu den Zeitpunkten ZT16 (s.o.) und ZT20 (s.o.) ein signifikanter Unterschied (ZT0:  $F(3,12) = 12,926, p = 0,0005, post hoc: n.s.$ ; ZT8:  $F(3,12) = 14,527, p = 0,0003, post hoc: n.s.$ ).

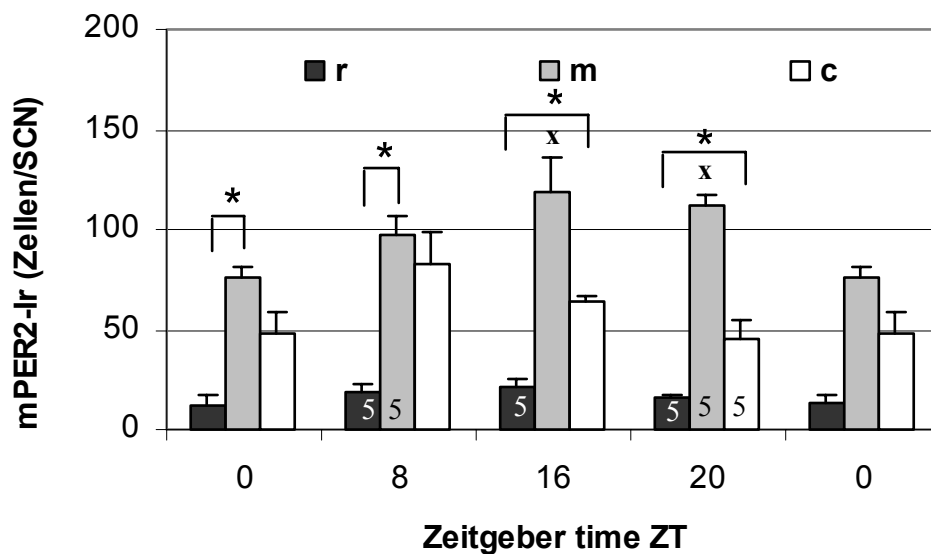


Abb.21 Anzahl der mPER2-immunreaktiven Zellen im rostralen (r), medialen (m) und caudalen (c) Bereich eines SCN von alten rhythmischen Zwerghamstern, *Phodopus sungorus*. Alle Datenpunkte sind als Mittelwerte  $\pm$  SEM dargestellt.  $n = 4$ , Ausnahmen siehe Balken.  $p < 0,05$ . x: Signifikant höhere mPER2-Immunreaktivität als in den beiden benachbarten SCN-Segmenten.

Über eine *one-way* ANOVA mit einem anschließenden *post-hoc* Test (Tukey-Kramer) ließ sich, wie bei den jungen Tieren, zu allen Zeitpunkten ein signifikanter Unterschied zwischen den mittleren Zellzahlen im medialen und im rostralen Bereich feststellen (ZT0:  $F(3,12) =$

12,926,  $p = 0,0005$ ; ZT8:  $F(3,12) = 14,527$ ,  $p = 0,0003$ ; ZT16:  $F(3,12) = 794,545$ ,  $p < 0,0001$ ; ZT20:  $F(3,16) = 111,922$ ,  $p < 0,0001$ ). Der Unterschied zwischen der Anzahl an immunreaktiven Zellen im medialen und caudalen Bereich konnte nur zu den Zeitpunkten ZT16 (s.o.) und ZT20 (s.o.) als signifikant erkannt werden (Abb.21). Bei einem Vergleich der mittlere Zellzahlen von caudalem und rostralem Bereich fand sich ebenfalls nur zu den Zeitpunkten ZT16 (s.o.) und ZT20 (s.o.) ein signifikanter Unterschied.

### **Vergleich: Junge vs. alte Hamster**

Bei dem Vergleich der Datensätze junger und alter Hamster ergab sich folgendes Bild (Abb.22): Im rostralen Bereich gab es zum Zeitpunkt ZT0 eine signifikant höhere Zellzahl bei den jungen Tieren ( $Z = -2,309$ ,  $p = 0,0209$ ).

Im medialen Bereich des SCN zeigte sich im Vergleich der beiden Altersgruppen Tendenzen eines um vier Stunden gegeneinander verschobenen Maximums der Immunreaktivität gegen mPER2: Bei den jungen Tieren befand es sich bei ZT20, bei den alten Tieren dagegen war es schon bei ZT16 zu finden. Zum Zeitpunkt ZT16 ließ sich ein signifikanter Unterschied zwischen alten und jungen Tieren feststellen ( $Z = -2,021$ ,  $p = 0,0433$ ).

Insgesamt konnten für den caudalen Bereich des SCN keine statistisch signifikanten Unterschiede ermittelt werden (ZT0:  $Z = -0,577$ ,  $p = 0,5637$ , n.s.; ZT8:  $Z = -0,577$ ,  $p = 0,5637$ , n.s.; ZT16:  $Z = -1,155$ ,  $p = 0,2482$ , n.s.; ZT20:  $Z = -1,47$ ,  $p = 0,1416$ , n.s.). Es waren jedoch Tendenzen sichtbar: Ein paralleler Verlauf der Maxima einer positiven Immunreaktion fand sich sowohl bei den jungen als auch bei den alten Tieren zum Zeitpunkt ZT8. Die Minima der beiden Altersgruppen waren leicht gegeneinander verschoben: Während es bei den jungen Tieren zum Zeitpunkt ZT16 vorlag, ist es bei den alten Tieren zwischen ZT20 und ZT0 angesiedelt.

Abschließend war festzustellen, dass bei den jungen Tieren das Maximum in der rostro-caudalen Verteilung deutlicher moduliert war - anders als bei den alten Tieren. Außerdem gab es in den semiquantitativ ermittelten Zellzahlen bis auf die genannten Extremwerte (Max./Min.) keine deutlichen Unterschiede zwischen den beiden Altersgruppen.



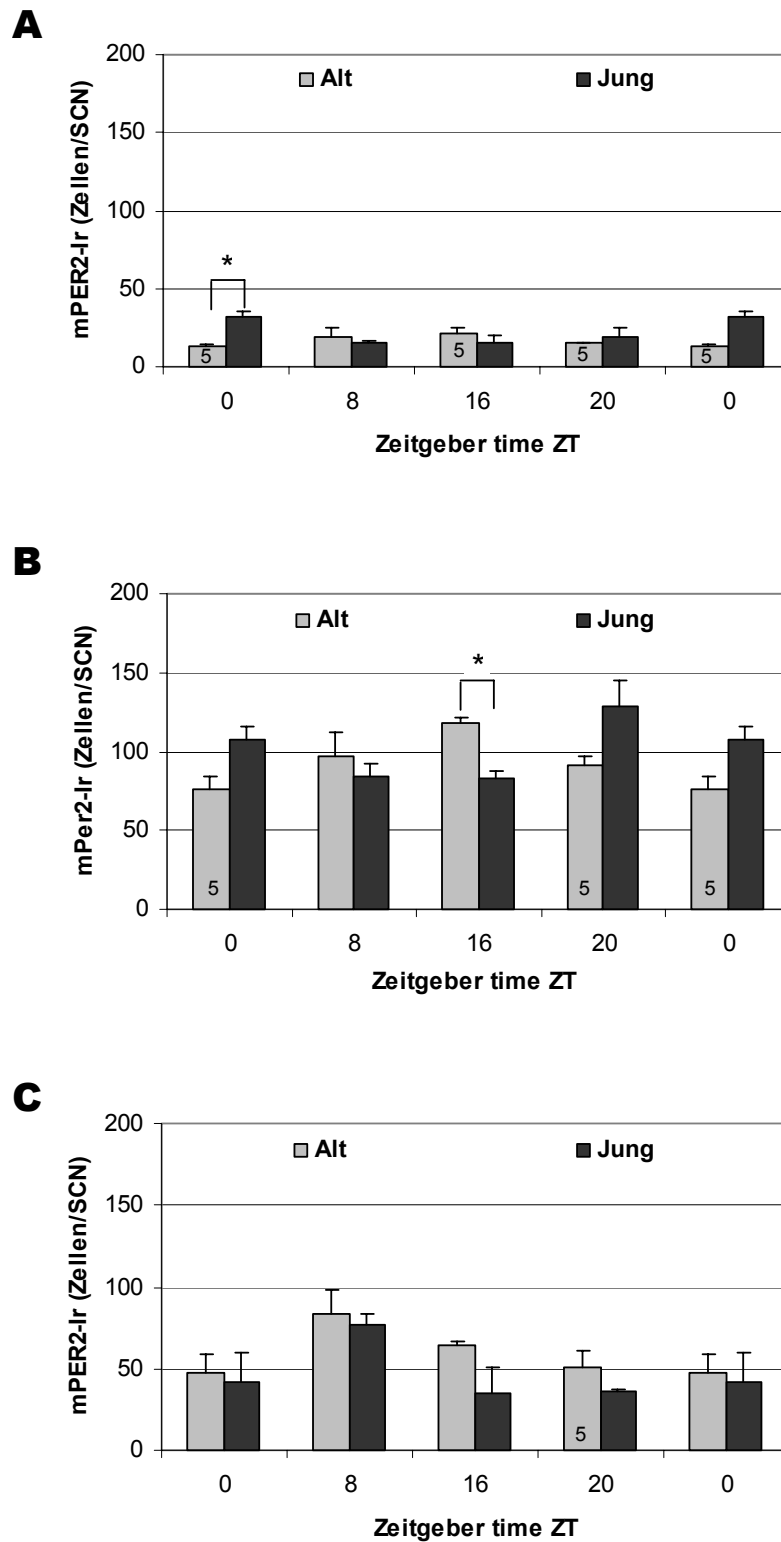


Abb.22: Vergleich der Anzahl an mPER2-immunreaktiven Zellen im rostralen (A), medialen (B) und caudalen (C) Bereich eines SCN von jungen und alten rhythmischen Zwerghamstern, *Phodopus sungorus*. Alle Datenpunkte sind als Mittelwerte  $\pm$  SEM dargestellt.  $n = 4$ , Ausnahmen siehe Balken.  $p < 0,05$ .

## ARRHYTHMISCHE TIERE

### **Junge adulte Hamster**

In Abb.23 und 24 wird die Anzahl der immunreaktiven Zellen gegen mPER2 auf der rostro-caudalen Achse des SCN zu den verschiedenen Zeitgeberzeiten gezeigt. Im Bereich des rostralen SCN ließen sich keinerlei statistisch signifikante Unterschiede bestimmen ( $F(3,12) = 2,805$ ,  $p = 0,085$ , n.s.) (Abb.23, 26).

Starke Unterschiede in der Anzahl der mPER2-reaktiven Zellen zwischen den verschiedenen Zeitpunkten waren im Gegensatz dazu im medialen SCN festzustellen: Es gab zwei Maxima und zwei Minima. Die maximale Anzahl von Zellen mit positiver Reaktion auf mPER2 lag bei ZT0 und bei ZT16, die minimale entsprechend bei ZT8 und ZT20. Diese Differenzen konnten auch über eine *one-way* ANOVA mit anschließendem *post-hoc* Test (Tukey-Kramer) als statistisch signifikant erkannt werden ( $F(3,12) = 11,366$ ,  $p = 0,0008$ ) (Abb.23 und Anhang B Tab.3).

Der caudale Bereich des SCN zeigte, wie auch der rostrale, keine statistischen Signifikanzen beim Vergleich der Zeitpunkte ( $F(3,11) = 0,178$ ,  $p = 0,9093$ , n.s.); so waren auch keinerlei Tendenzen hinsichtlich eines potentiellen Maximums oder Minimums zu erkennen (Abb.23 und 24).

Beim Vergleich der mittleren Zellzahlen der drei untersuchten Abschnitte des SCN gab es eine klare Abstufung im Hinblick auf die Anzahl der gezählten Zellen (Abb.24 und Anhang B Tab.3): Medial, caudal, rostral. Im medialen Bereich war die höchste Anzahl an Zellen mit nachgewiesener Immunreaktivität lokalisiert. Sie unterschied sich zu allen Zeitpunkten signifikant von der im rostralen und caudalen Bereich (ZT0:  $F(3,12) = 108,651$ ,  $p < 0,0001$ ; ZT8:  $F(3,12) = 81,129$ ,  $p < 0,0001$ ; ZT16:  $F(3,10) = 70,634$ ,  $p < 0,0001$ ; ZT20:  $F(3,12) = 53,988$ ,  $p < 0,0001$ ) (Abb.24). Im caudalen SCN lag die Menge der gezählten Zellen zwar höher als im rostralen SCN, war von diesem jedoch nur zu ZT8 signifikant zu unterscheiden ( $F(3,12) = 81,129$ ,  $p < 0,0001$ ).

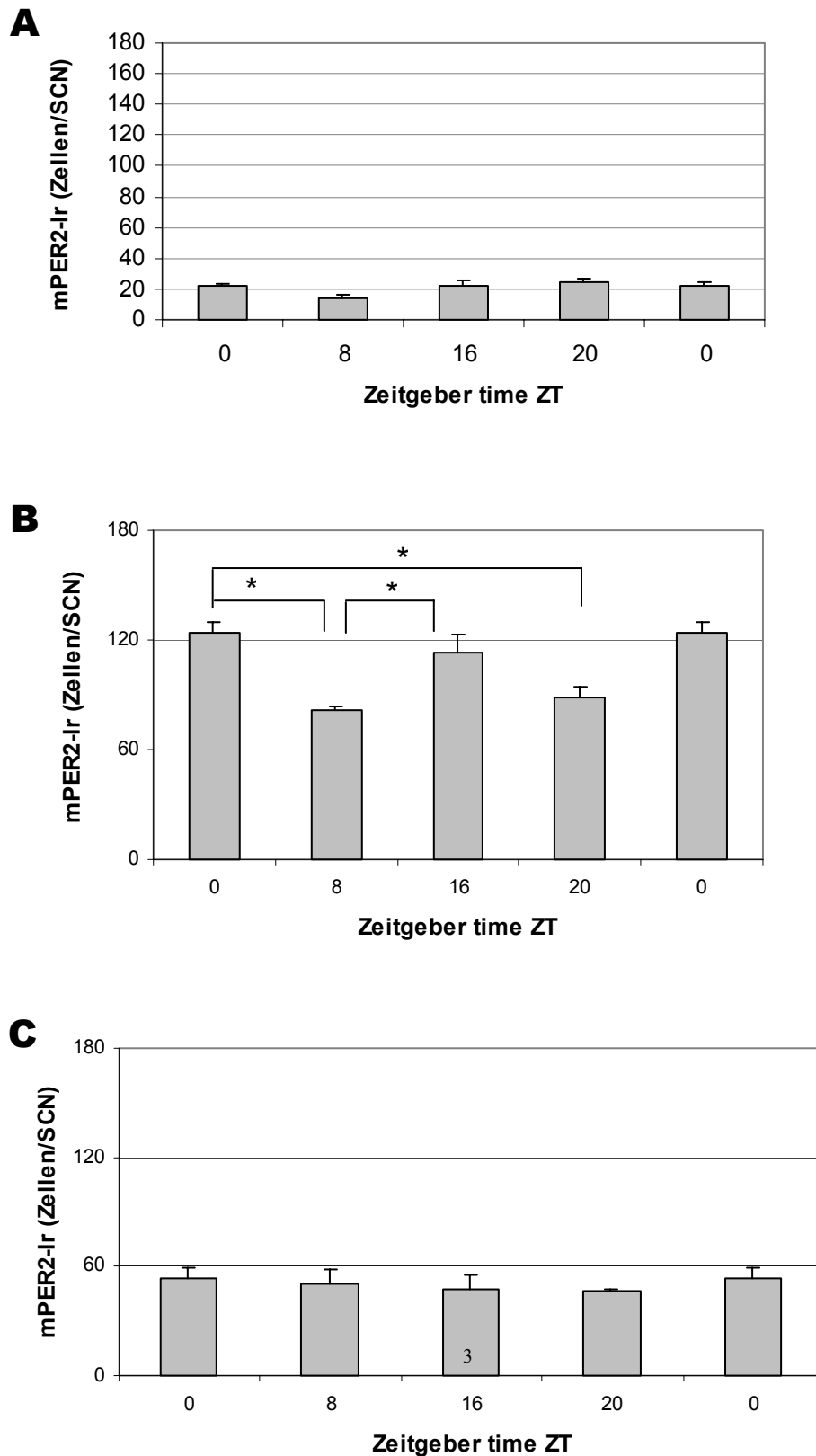


Abb.23: Anzahl der mPER2-immunreaktiven Zellen im rostralen (A), medialen (B) und caudalen (C) Bereich eines SCN von jungen adulten arrhythmischen Zwerghamstern, *Phodopus sungorus*. Alle Datenpunkte sind als Mittelwerte  $\pm$  SEM dargestellt.  $n = 4$ , Ausnahmen siehe Balken.  $p < 0,05$ .

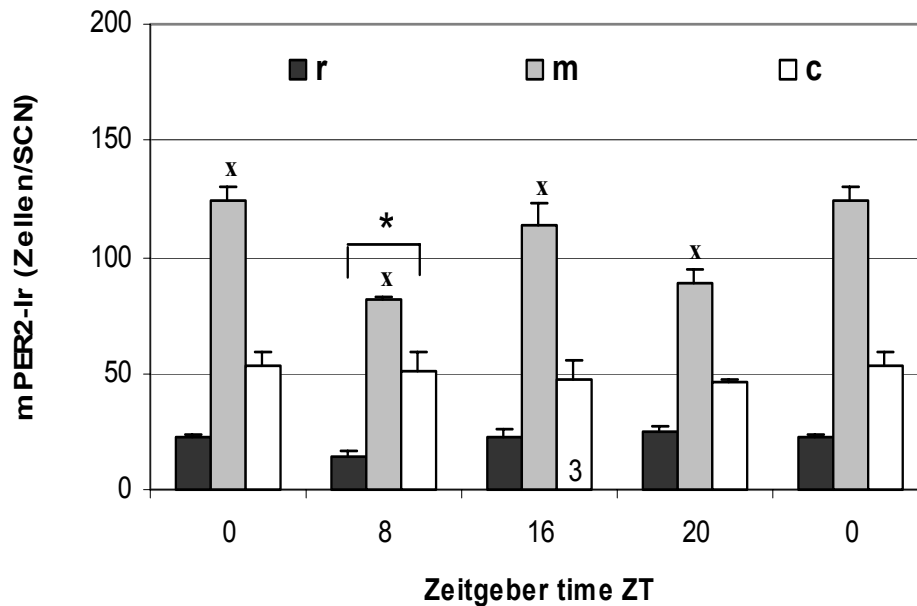


Abb.24: Anzahl der mPER2-immunreaktiven Zellen im rostralen (r), medialen (m) und caudalen (c) Bereich eines SCN von jungen adulten arrhythmischen Zwerghamstern, *Phodopus sungorus*. Alle Datenpunkte sind als Mittelwerte  $\pm$  SEM dargestellt.  $n = 4$ , Ausnahme siehe Balken.  $p < 0,05$ . x: Signifikant höhere mPER2-Immunreaktivität als in den beiden benachbarten SCN-Segmenten.

### Alte Hamster

Bei den alten Tieren konnte beim Vergleich der einzelnen SCN-Abschnitte (rostral, medial oder caudal) kein signifikanter Unterschied festgestellt werden (rostral:  $F(3,19) = 0,72$ ,  $p = 0,5523$ , n.s.; medial:  $F(3,17) = 0,723$ ,  $p = 0,552$ , n.s.; caudal:  $F(3,17) = 0,718$ ,  $p = 0,5551$ , n.s.) (Abb.25 und 26).

Rostral waren in der Verteilung der mPER2 reaktiven Zellen über alle Zeitpunkte nur sehr geringfügige Veränderungen zu erkennen (Anhang B Tab.4).

Im Gegensatz dazu konnten im medialen Abschnitt deutliche Tendenzen aufgezeigt werden, die auf ein Maximum bei ZT16 und ein Minimum bei ZT0 hinwiesen (Anhang B Tab.4).

Der caudale Bereich präsentiert, ähnlich dem rostralen, kaum Möglichkeiten, einen zeitlichen Verlauf der Immunreaktivität gegen mPER2 zu ermitteln. Lediglich die Zellzahl bei ZT0 schien auf ein Minimum an immunreaktiven Zellen hinzuweisen; die anderen Zeitpunkte sind bezüglich der Menge der gezählten Zellen nahezu identisch (Abb.25, Anhang B Tab.4).

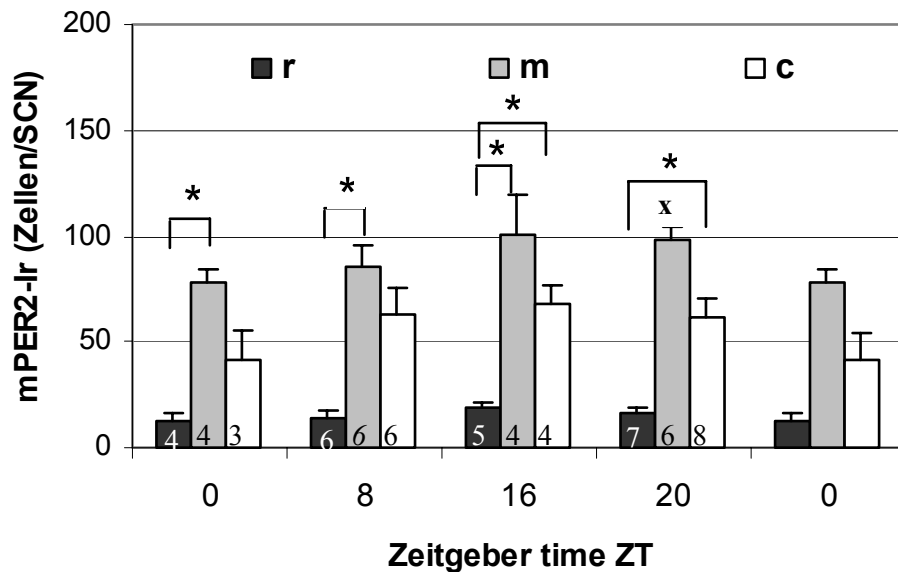


Abb.25 Anzahl der mPER2-immunreaktiven Zellen im rostralen (r), medialen (m) und caudalen (c) Bereich eines SCN von alten arrhythmischen Zwerghamstern, *Phodopus sungorus*. Alle Datenpunkte sind als Mittelwerte  $\pm$  SEM angegeben.  $n = 3-8$ , siehe Balken.  $p < 0,05$ . x: Signifikant höhere mPER2-Immunreaktivität als in den beiden benachbarten SCN-Segmenten

Beim Vergleich der mittleren Zellzahlen der einzelnen Segmente zu einem Zeitpunkt zeigte sich ein ähnliches Bild wie bei den jungen Tieren: Die Zellzahl der medialen Bereiche ist immer am höchsten, die der caudalen liegt in der Mitte und die rostralen Abschnitte zeichnen sich durch die geringste Anzahl an immunreaktiven Zellen gegen mPER2 aus. Der Unterschied zwischen den Zellzahlen im medialen und denen im rostralen Bereich erwies sich zu allen Zeitpunkten als signifikant (ZT0:  $F(3,10) = 29,627$ ,  $p = < 0,0001$ ; ZT8:  $F(3,20) = 22,569$ ,  $p < 0,0001$ ; ZT16:  $F(3,12) = 37,333$ ,  $p < 0,0001$ ; ZT20:  $F(3,25) = 67,572$ ,  $p < 0,0001$ ) (Abb.25). Im Vergleich dazu ließ sich bei einer Gegenüberstellung von rostralem und caudalem Gebiet nur zu ZT16 ( $F(3,12) = 37,333$ ;  $p < 0,0001$ ) und zu ZT20 ( $F(3,25) = 67,572$ ,  $p < 0,0001$ ) ein statistisch signifikanter Unterschied ermitteln (Abb.25). Bei einem Vergleich von caudalem und medialem Bereich war nur zu ZT20 eine signifikante Abweichung der mittleren Zellzahl zu ermitteln ( $F(3,25) = 67,572$ ;  $p < 0,0001$ ).

**Vergleich: Junge vs. alte Hamster**

Die Gegenüberstellung der Datensätze von jungen adulten und alten arrhythmischen Hamstern ergab für die drei Bereiche auf der rostro-caudalen Achse deutliche Unterschiede (Abb.26).

Im rostralen Bereich zeichnete sich weder bei den alten noch bei jungen adulten Tieren ein eindeutig zyklischer Verlauf der mittleren Zellzahlen auf der Zeitachse ab. Lediglich zum Zeitpunkt ZT20 wurde in diesem Abschnitt bei den jungen adulten Tieren eine statistisch signifikant höhere Zahl an immunreaktiven Zellen festgestellt ( $Z: -2,123$ ;  $p: 0,0338$ ); ansonsten konnten keine weiteren Signifikanzen ermittelt werden. Auffällig war jedoch trotz allem, dass die Zellzahl der jungen Tiere zu allen Zeitpunkten, bis auf ZT8, deutlich höher lagen, als die der alten Tiere.

Im medialen Abschnitt des SCN überschritt sich bei ZT16 die maximale Anzahl immunreaktiver Zellen bei den alten Tiere mit einem der Maxima bei den jungen adulten Tieren. Ansonsten war der zeitliche Verlauf der Zellzahlen bei den alten Tieren nur schwach moduliert, während bei den jungen adulten Tieren deutliche Gegensätze im Zeitverlauf zu erkennen waren. Zum Zeitpunkt ZT0, dem zweiten Peak an immunreaktiven Zellen bei den jungen Hamstern, war bei den alten Tieren das Minimum an Immunreaktivität zu finden; zu diesem Zeitpunkt ließ sich entsprechend auch ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Altersgruppen ermitteln ( $Z: -2,309$ ;  $p: 0,0209$ ). Die Anzahl der immunreaktiven Zellen bei den jungen adulten Tiere lag auch hier, wie im rostralen SCN, klar über der der alten Tiere; einzige Ausnahme bildete erneut der Zeitpunkt ZT8.

Für das caudale Kerngebiet ließen sich keinerlei statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Altersgruppen herausarbeiten. Der Verlauf beider Datensätze auf der Zeitachse erwies sich als gleichförmig (vgl. „Junge adulte Tier“ und „Alte Tiere“). Als auffällig im Vergleich zu den anderen Bereichen zeigte sich jedoch, dass die Anzahl mPER2-reaktiver Zellen bei den alten Tieren zu allen Zeitpunkten mit Ausnahme des Zeitpunktes ZT0 deutlich über der der jungen adulten Tiere lag.

Auch hier lässt sich abschließend feststellen, dass die Minima und Maxima bei den jungen adulten Tieren deutlicher moduliert sind, als bei den alten Hamstern.

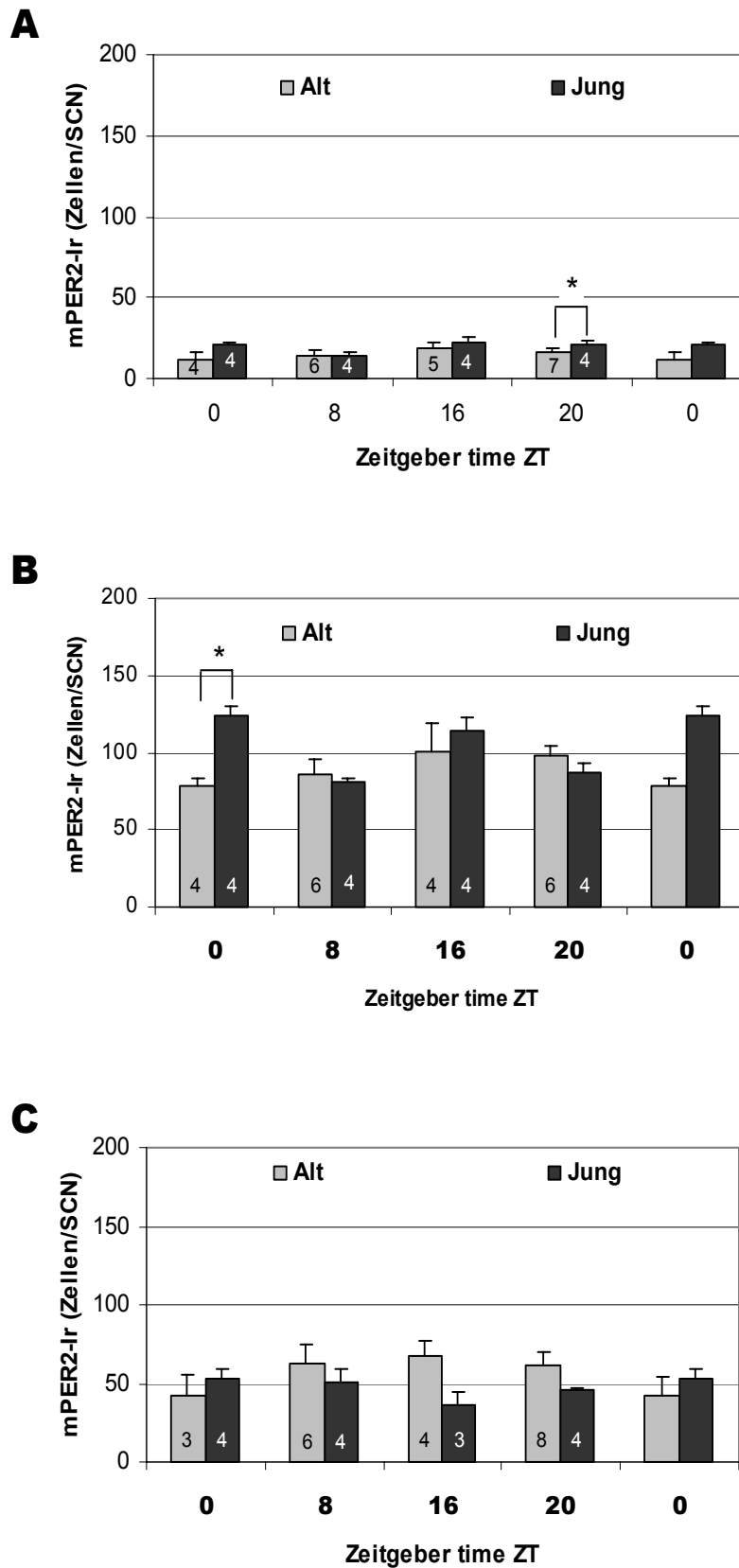


Abb.26: Vergleich der Anzahl an mPER2-immunreaktiven Zellen im rostralen (A), medialen (B) und caudalen (C) Bereich eines SCN von jungen und alten rhythmischen Zwerghamstern, *Phodopus sungorus*. Alle Datenpunkte sind als Mittelwerte  $\pm$  SEM dargestellt.  $n = 3-8$ , siehe Balken.  $p < 0,05$ .

## VERGLEICH RHYTHMISCHE UND ARRHYTHMISCHE TIERE

### **Junge adulte Hamster**

Beim Vergleich der Datensätze der rhythmischen und arrhythmischen jungen adulten Zwerghamster war auffällig, dass sich insgesamt bei beiden Gruppen die Anzahl an Zellen, die positiv auf anti-mPER2 reagierten, nicht deutlich unterschieden (Abb.27).

Im rostralen Bereich des Kerngebiets zeigte sich bei beiden Gruppen ein zeitlicher Verlauf der Immunreaktivität, der in seinen Extrempunkten etwas verschoben war: Das Maximum bei den rhythmischen Tieren lag bei ZT0 und bei den arrhythmischen Hamstern zwischen ZT20 und ZT0. Die minimale mittlere Zellzahl lag bei beiden Tiergruppen zum Zeitpunkt ZT8. Zu ZT0 war die Anzahl der reaktiven Zellen bei den rhythmischen Tieren signifikant höher als bei arrhythmischen ( $Z = -2,309$ ;  $p = 0,0209$ ). Zu allen anderen Zeitpunkten konnte im rostralen SCN keine Signifikanz ermittelt werden (ZT8:  $Z = -0,289$ ,  $p = 0,7728$ , n.s.; ZT16:  $Z = -1,155$ ,  $p = 0,2482$ , n.s.; ZT20:  $Z = -0,866$ ,  $p = 0,3865$ , n.s.)

Der zeitliche Verlauf der Immunreaktivität im medialen SCN zeichnete sich bei beiden Tiergruppen durch eine deutliche Modulation aus: Bei den rhythmischen Tieren war er durch ein Minimum (ZT8-ZT16) und ein Maximum (ZT20) gekennzeichnet. Bei den arrhythmischen Tieren ließen sich dagegen zwei Minima (ZT8/20) und Maxima (ZT0/16) lokalisieren. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen den beiden Gruppen ließen sich nur zum Zeitpunkt ZT16 feststellen (ZT0:  $Z = -1,443$ ,  $p = 0,1489$ , n.s.; ZT8:  $Z = 0$ ,  $p > 0,9999$ , n.s.; ZT16:  $Z = -2,021$ ,  $p = 0,0433$ ; ZT20:  $Z = -1,732$ ,  $p = 0,833$ , n.s.).

Für den caudalen Abschnitt des SCN war bei den jungen rhythmischen Tieren - ähnlich dem medialen - ein deutlicher zeitlicher Verlauf zu erkennen. Ein solcher Verlauf war bei den arrhythmischen jungen Zwerghamstern nicht vorhanden; die Anzahl der immunreaktiven Zellen der letztgenannten Gruppe bewegte sich über den ganzen Tag etwa auf einem Niveau. Statistische Unterschiede zwischen den beiden Tiergruppen gab es ausschließlich zum Zeitpunkt ZT20 (ZT0:  $Z = -0,722$ ,  $p = 0,4705$ , n.s.; ZT8:  $Z = -1,732$ ,  $p = 0,0833$ , n.s.; ZT16:  $Z = -0,354$ ,  $p = 0,7237$ , n.s.; ZT20:  $Z = -2,309$ ;  $p = 0,0209$ ).



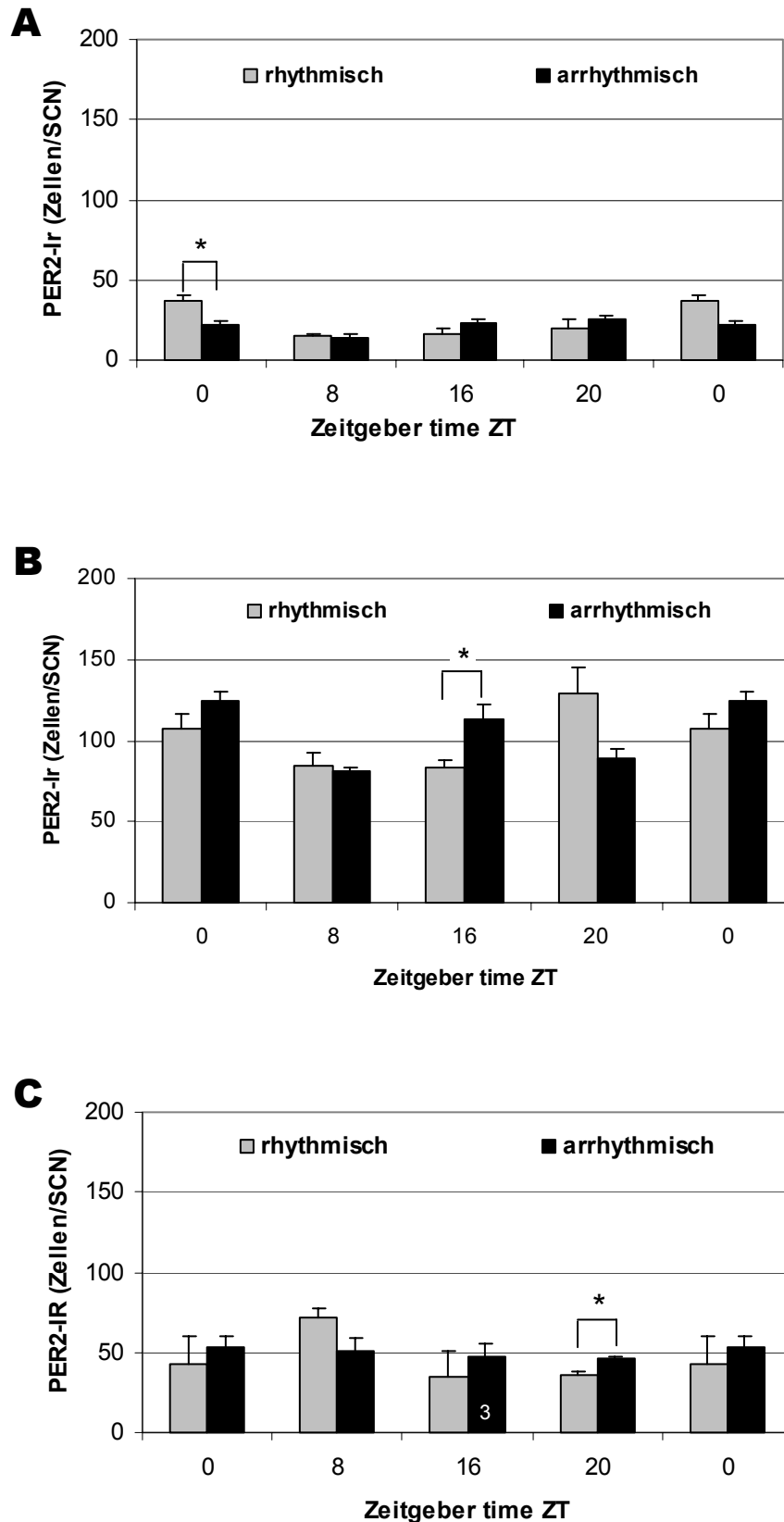


Abb.27: Vergleich der Anzahl an mPER2-immunreaktiven Zellen im rostralen (A), medialen (B) und caudalen (C) Bereich eines SCN von rhythmischen und arrhythmischen jungen Zwerghamstern, *Phodopus sungorus*. Alle Datenpunkte sind als Mittelwerte  $\pm$  SEM dargestellt. n = 4, Ausnahmen siehe Balken. p < 0,05.

**Alte Hamster**

Der Vergleich der Datensätze von alten rhythmischen und alten arrhythmischen Dsungarischen Zwerghamstern ergab zu keinem Zeitpunkt und in keinem Abschnitt des SCN einen statistisch signifikanten Unterschied (Abb.28).

Im rostralen Segment des SCN verlief die mittlere Zellzahl der beiden Tiergruppen auf der zeitlichen Achse parallel, auch wenn sie sich nur wenig moduliert darstellten: Das Maximum lag bei ZT16 und das Minimum bei ZT0 (ZT0:  $Z = -0,866$ ,  $p = 0,3865$ , n.s.; ZT8:  $Z = -0,533$ ,  $p = 0,594$ , n.s.; ZT16:  $Z = -0,731$ ,  $p = 0,4647$ , n.s.; ZT20:  $Z = -0,659$ ,  $p = 0,5101$ , n.s.)

Im Gegensatz zum rostralen Bereich wies der mediale Abschnitt deutlich größere Mengen an immunreaktiven Zellen gegen mPER2 auf und war in seiner Gesamtheit tendenziell durch einen zeitlichen Verlauf gekennzeichnet, der bei beiden Tiergruppen synchron verlief: Minima und Maxima waren, wie im rostralen SCN, bei ZT0 und ZT16 lokalisiert (ZT0:  $Z = -0,254$ ,  $p = 0,8065$ , n.s.; ZT8:  $Z = -0,213$ ,  $p = 0,8312$ , n.s.; ZT16:  $Z = -0,866$ ,  $p = 0,3865$ , n.s.; ZT20:  $Z = -1,701$ ,  $p = 0,089$ , n.s.).

Für den caudalen Bereich galt schließlich, dass der zeitliche Verlauf der Immunreaktivität bei den rhythmischen Tieren deutliche Extrempunkte (Max. ZT8, Min. ZT20) aufwies, während er bei den arrhythmischen Tieren nur einen klar umrissenen Tiefpunkt zeigte (ZT0), aber den Rest des Tages auf einem Plateau zu stagnieren schien (ZT0:  $Z = 0$ ,  $p > 0,9999$  n.s.; ZT8:  $Z = -0,853$ ,  $p = 0,3938$ , n.s.; ZT16:  $Z = -1,155$ ,  $p = 0,2482$ , n.s.; ZT20:  $Z = -0,512$ ,  $p = 0,6084$ , n.s.).

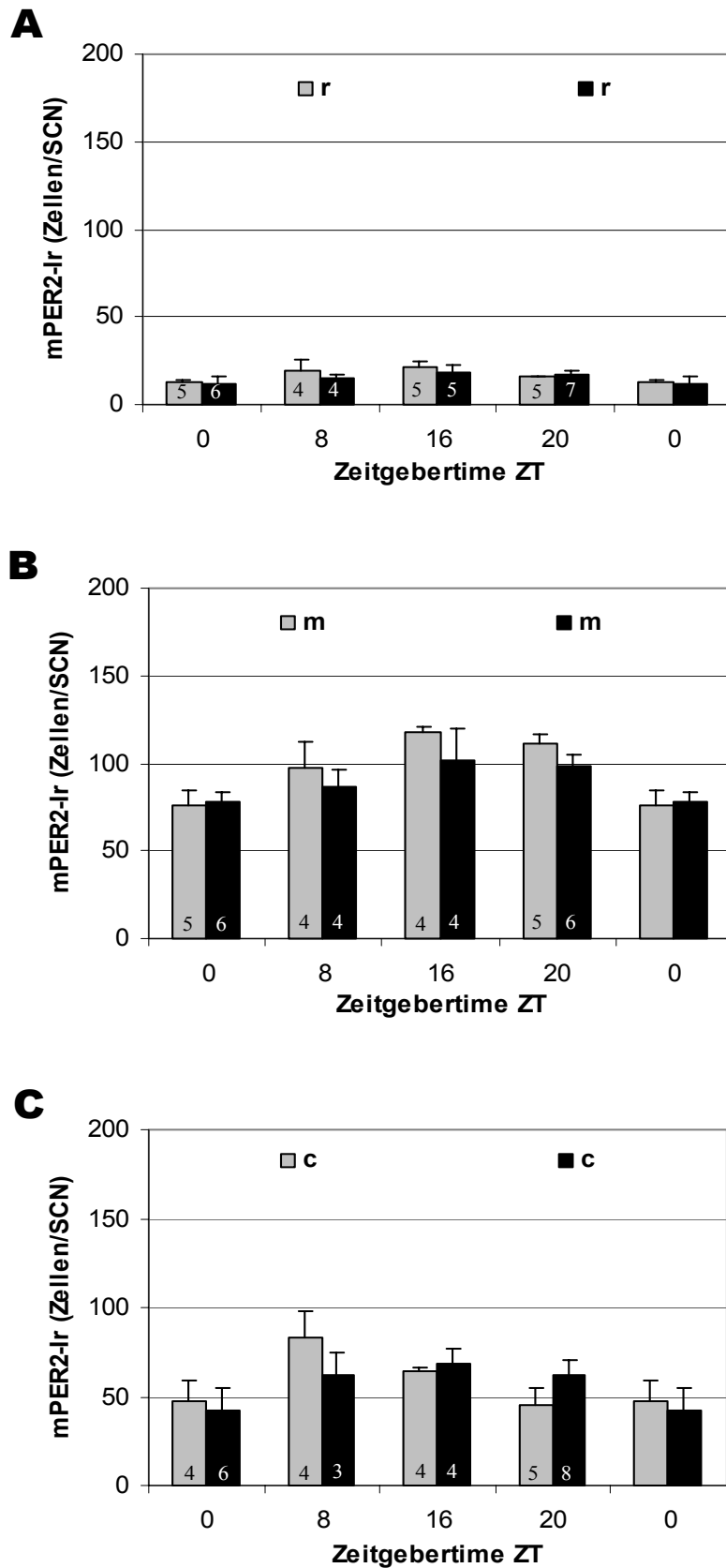


Abb.28: Vergleich der Anzahl an mPER2-immunreaktiven Zellen im rostralen (A), medialen (B) und caudalen (C) Bereich eines SCN von rhythmischen und arrhythmischen alten Zwerghamstern, *Phodopus sungorus*. Alle Datenpunkte sind als Mittelwerte  $\pm$  SEM dargestellt.  $n = 3-8$ , siehe Balken.  $p < 0,05$ .

### 3.2.1.3 pCREB

Bei pCREB handelt es sich um die phosphorylierte und damit aktivierte Form des Proteins CREB, die ubiquitär in unterschiedlichsten Geweben einschließlich des Gehirns vorkommt. Es wird im SCN im Wesentlichen durch Licht induziert; damit steht es u.a. in einer Signaltransduktionskaskade, die die glutamaterg vermittelte Lichtinformation auf zellulärer Ebene anzeigt. Das macht es für diese Untersuchung interessant, weil die Anzahl an pCREB-positiven Zellen als Hinweis darauf gewertet werden kann, wie die Lichtinformation von den verschiedenen Tiergruppen im Tagesgang verarbeitet wird.

Um den Nachweis zu erbringen, dass pCREB auf Proteinebene im SCN von *Phodopus sungorus* vorkommt und die Spezifität des polyclonalen Antikörpers nachzuweisen, wurden verschiedene Gewebehomogenate zunächst mittels eines *Western-Blots* untersucht. Der Antikörper markierte in den Kontrollgeweben und auch im SCN verschiedene Banden. Darunter war eine, die laut molekularem Farbstandard ein Molekulargewicht von etwa 43 kD markierte (Abb.29). Dies entspricht dem Gewicht von pCREB (nach Angaben des Herstellers). Damit war der Nachweis erbracht, dass pCREB im SCN von *Phodopus sungorus* vorkommt und spezifisch mit dem benutzten Antikörper nachzuweisen ist.

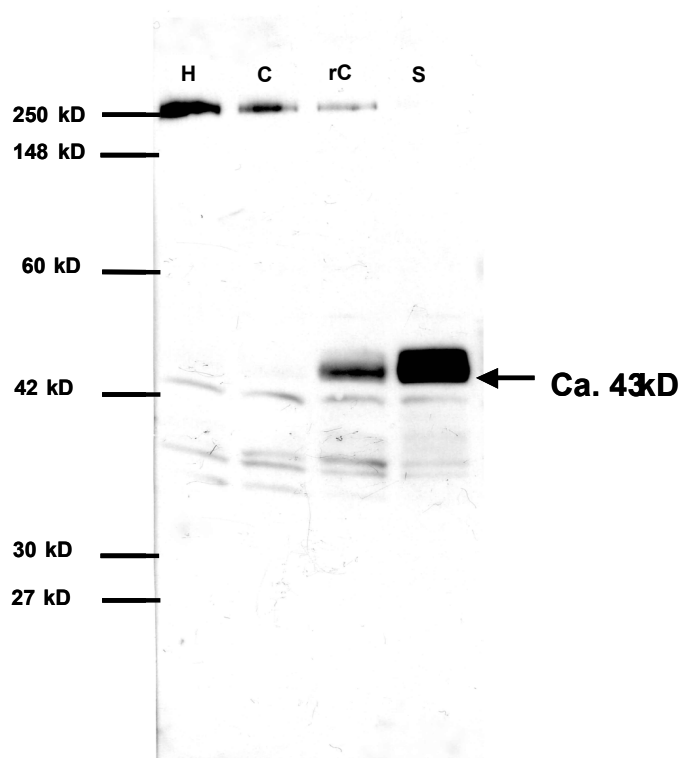


Abb.29:  
Immunmarkierung des  
*Western- Blots* mit einem  
Antikörper gegen pCREB  
bei *Phodopus sungorus*.  
H = Hippocampus.  
C = cerebraler Cortex.  
rC = rhinaler Cortex.  
S = Suprachiasmatischer  
Nucleus.

Im Anschluss an den *Western-Blot* wurden entsprechend der Fragestellung immunhistochemische Untersuchungen auf zellulärer Ebene durchgeführt. Die Färbung mit dem Antikörper an Kryoschnitten erbrachte deutlich spezifische Kernfärbungen, die den Bereich des SCN markierten und trotz einer Streuung eindeutig umrissen (Abb.30).

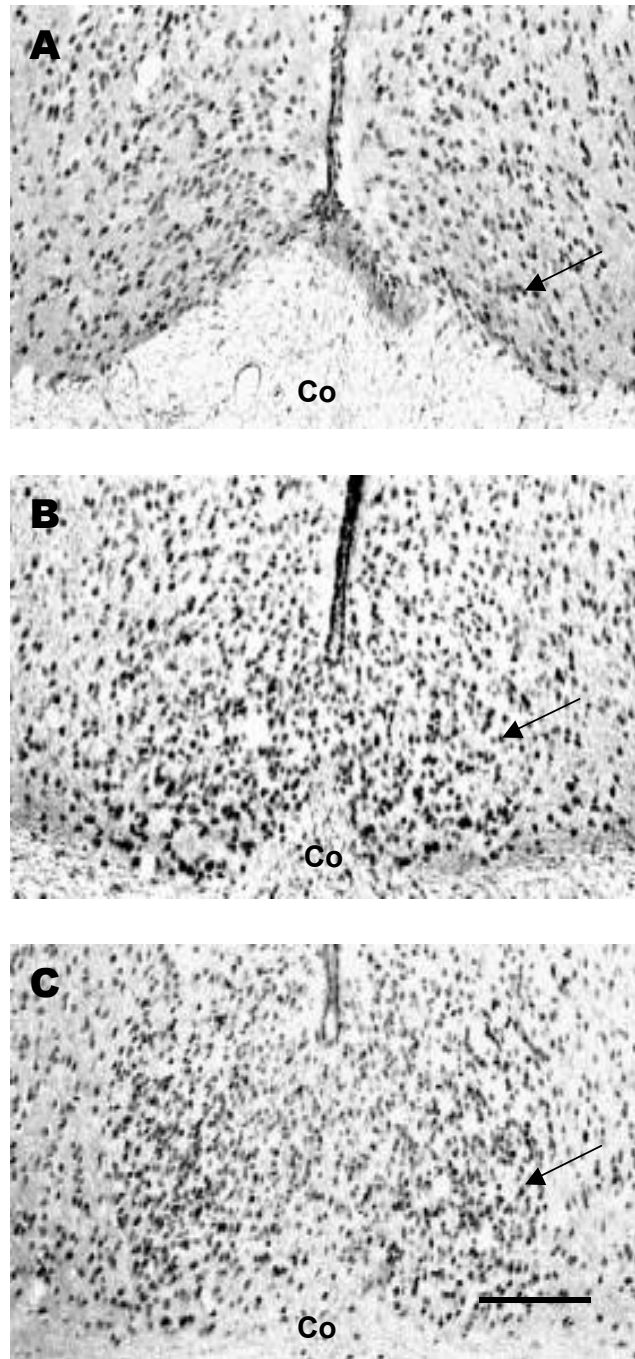


Abb.30: Immunfärbung gegen pCREB im rostralen (A), medialen (B) und caudalen (C) Bereich des SCN von *Phodopus sungorus*. Balken = 100µm. Pfeil = SCN. Co = *Chiasma opticum*

## RHYTHMISCHE TIERE

### **Junge adulte Hamster**

Zunächst ist festzustellen, dass es in allen drei Segmenten auf der rostro-caudalen Achse tendenziell einen mehr oder weniger ausgeprägten Tagsgang zu geben scheint (Abb.31). Insgesamt ließen sich hinsichtlich der Zellen, die positiv auf anti-pCREB reagierten, im SCN der jungen adulten Zwerghamster jedoch keine statistisch signifikanten Unterschiede feststellen (Abb.31); dies galt sowohl für die zeitliche Achse innerhalb eines Segments als auch im Hinblick auf einen Vergleich aller 3 Abschnitte zu einem Zeitpunkt.

Auffällig war, dass bei diesem Protein - im Vergleich zu mPER2 und cFOS (siehe Anhang B)– die mittlere Zellzahl im caudalen SCN am höchsten war; der rostrale Bereich zeichnete sich auch hier als das Segment mit der geringsten Anzahl an immunreaktiven Zellen aus.

Sowohl für den rostralen als auch für den medialen Bereich des Kerngebietes galt, dass die mittlere Zellzahl wenig variierte (Anhang B Tab.5). In beiden Segmenten war die Tendenz zu einem Maximum an pCREB-immunreaktiven Zellen bei ZT8 und die zu einem Minimum bei ZT16 zu erkennen.

Für den caudalen SCN war im Gegensatz zu den vorangegangenen Abschnitten eine sehr deutliche Variation der mittleren Zellzahl auf der zeitlichen Achse zu verzeichnen. Es gab sowohl zur Mitte der Photo- (ZT8), als auch in der Mitte der Scotophase (ZT20) ein Maximum an Immunreaktivität, wobei das Maximum in der Photophase höher ausfiel als das in der Mitte der Nacht.

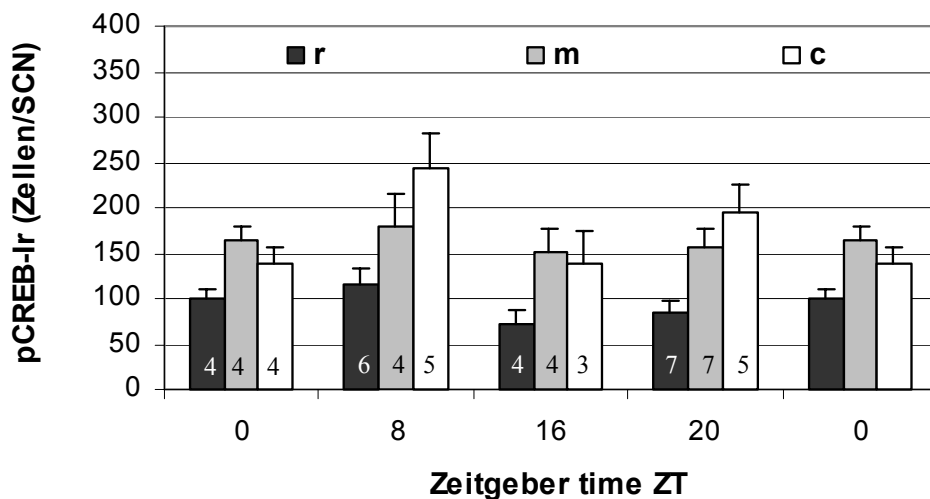


Abb.31: Anzahl der pCREB-immunreaktiven Zellen im rostralen (r), medialen (m) und caudalen (c) Bereich eines SCN von jungen adulten rhythmischen Zwerghamstern, *Phodopus sungorus*. Alle Datenpunkte sind als Mittelwerte  $\pm$  SEM angegeben.  $n = 3-7$ , siehe Balken.  $p < 0,05$ .

### Alte Hamster

Auch bei den alten Tieren gab es im rostralen und medialen Bereich des SCN auf der zeitlichen Achse nur geringe Veränderungen der mittleren Zellzahl (Anhang B Tab.6). In beiden Segmenten war das Minimum zum Zeitpunkt ZT0 lokalisiert. Das Maximum der Immunreaktivität lag im rostralen SCN bei ZT8, während es sich im medialen Bereich von ZT8 bis ZT16 erstreckte (Abb.32).

Ebenso wie für die vorangegangenen Segmente konnte für den caudalen Abschnitt eine maximale Anzahl an immunreaktiven Zellen zur Mitte der Photophase (ZT8) und eine minimale gegen Ende der Scotophase (ZT0) ermittelt werden.

Auch bei den alten rhythmischen Zwerghamstern war die Anzahl der immunreaktiven Zellen gegen anti-pCREB im caudalen Bereich am höchsten, während sie im rostralen Kerngebiet am geringsten ausfiel. In der statistischen Untersuchung konnten auch für die einzelnen Segmente auf der Zeitachse keinerlei signifikante Unterschiede ermittelt werden; beim Vergleich der verschiedenen Abschnitte des Kerngebietes zu einem Zeitpunkt lagen jedoch statistisch signifikante Unterschiede vor ZT0 ( $F(3,28) = 97,659$ ;  $p < 0,0001$ ), ZT16 ( $F(3,21) = 128,491$ ;  $p < 0,0001$ ) und ZT20 ( $F(3,28) = 110,558$ ;  $p < 0,0001$ ) (Abb.32). Sowohl der mediale als auch der caudale Bereich wiesen immer signifikant höhere Zahlen an immunreaktiven Zellen auf, als der rostrale Bereich. Für den Zeitpunkt ZT8 konnten keine

statistisch signifikanten Unterschiede festgestellt werden ( $F(3,18) = 15,639$ ,  $p < 0,0001$ , *post hoc*: n.s.)

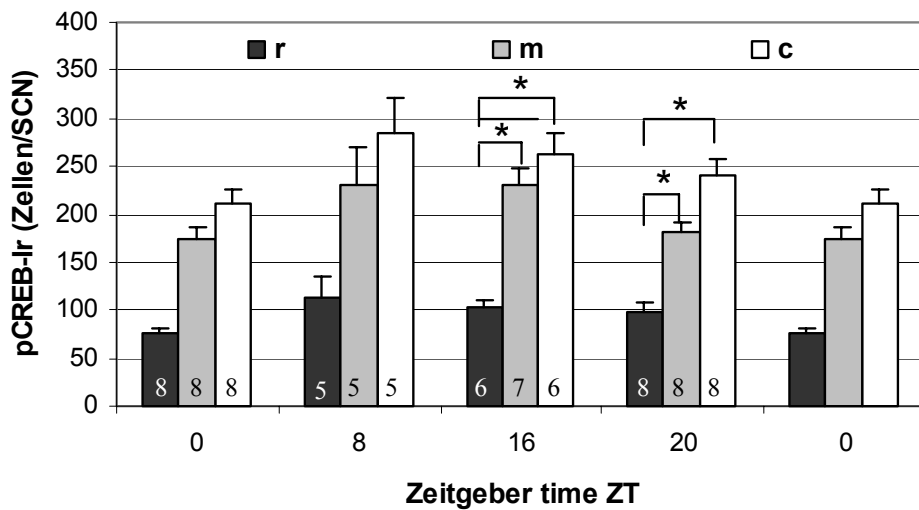


Abb.32: Anzahl der pCREB-immunreaktiven Zellen im rostralen (r), medialen (m) und caudalen (c) Bereich eines SCN von alten rhythmischen Zwerghamstern, *Phodopus sungorus*. Alle Datenpunkte sind als Mittelwerte  $\pm$  SEM angegeben.  $n = 5-8$ , siehe Balken.  $p < 0,05$ .

### Vergleich: Junge vs. alte Hamster

Bei der Gegenüberstellung der Datensätze von jungen und alten rhythmischen Hamstern stellte sich heraus, dass die Anzahl der immunreaktiven Zellen bei den alten Tieren höher ausfiel als bei den jungen Tieren; lediglich im rostralen Bereich des SCN gab es zu ZT0 und ZT8 diesbezüglich eine Ausnahme (Abb.33)

Für den rostralen Abschnitt galt weiterhin, dass die maximalen Zellzahlen bei beiden Tiergruppen zum Zeitpunkt ZT8 lokalisiert waren. Die minimalen Zellzahlen waren jedoch um 16 Stunden verschoben: Während bei den jungen Tieren das Minimum zum Ende des Tages (ZT16) auftrat, war es bei den alten Tieren am Ende der Nacht (ZT0) zu finden. Statistisch signifikante Unterschiede waren in diesem SCN-Segment nur zum Zeitpunkt ZT0 festzustellen ( $Z = -2,038$ ;  $p = 0,0415$ ).

Insgesamt konnten im medialen Abschnitt des SCN zu keinem Zeitpunkt statistisch signifikante Unterschiede zwischen den mittleren Zellzahlen der beiden Tiergruppen ermittelt werden (ZT0:  $Z = -0,17$ ,  $p = 0,8651$ , n.s.; ZT8:  $Z = -0,149$ ,  $p = 0,8815$ , n.s.; ZT 16:  $Z = -1,919$ ,  $p = 0,055$ , n.s.; ZT20:  $Z = -1,757$ ,  $p = 0,079$ , n.s.). Es zeigten sich jedoch ähnliche Tendenzen wie im rostralen Bereich: Die Maxima lagen bei beiden Gruppen in der



---

Mitte des Tages (ZT8) und die minimalen Zellzahlen waren um 16 Stunden verschoben (Alt: ZT0; Jung: ZT16).

Der caudale Bereich des SCN war besonders durch das auffällige doppelgipflige Maximum bei den jungen Tieren gekennzeichnet (Abb.33). Eine solche Tendenz ließ sich bei den alten Tieren nicht feststellen (Abb.33; Anhang B Tab.6). Die statistische Untersuchung mit dem *Mann-Whitney-U-Test* ergab, dass zu den Zeitpunkten ZT0 und ZT16 bei den alten Tieren eine signifikant höhere Anzahl an immunreaktiven Zellen vorlag als bei den Jungtieren (ZT0:  $Z = -2,378$ ;  $p = 9,9174$ . ZT16:  $Z = -2,066$ ;  $p = 0,0389$ ) (Abb.33).

Insgesamt gilt für den Vergleich zwischen jungen und alten rhythmischen Zwerghamstern, dass im Tagesgang lediglich der caudale Bereich deutliche Unterschiede zwischen den beiden Gruppen aufweist.

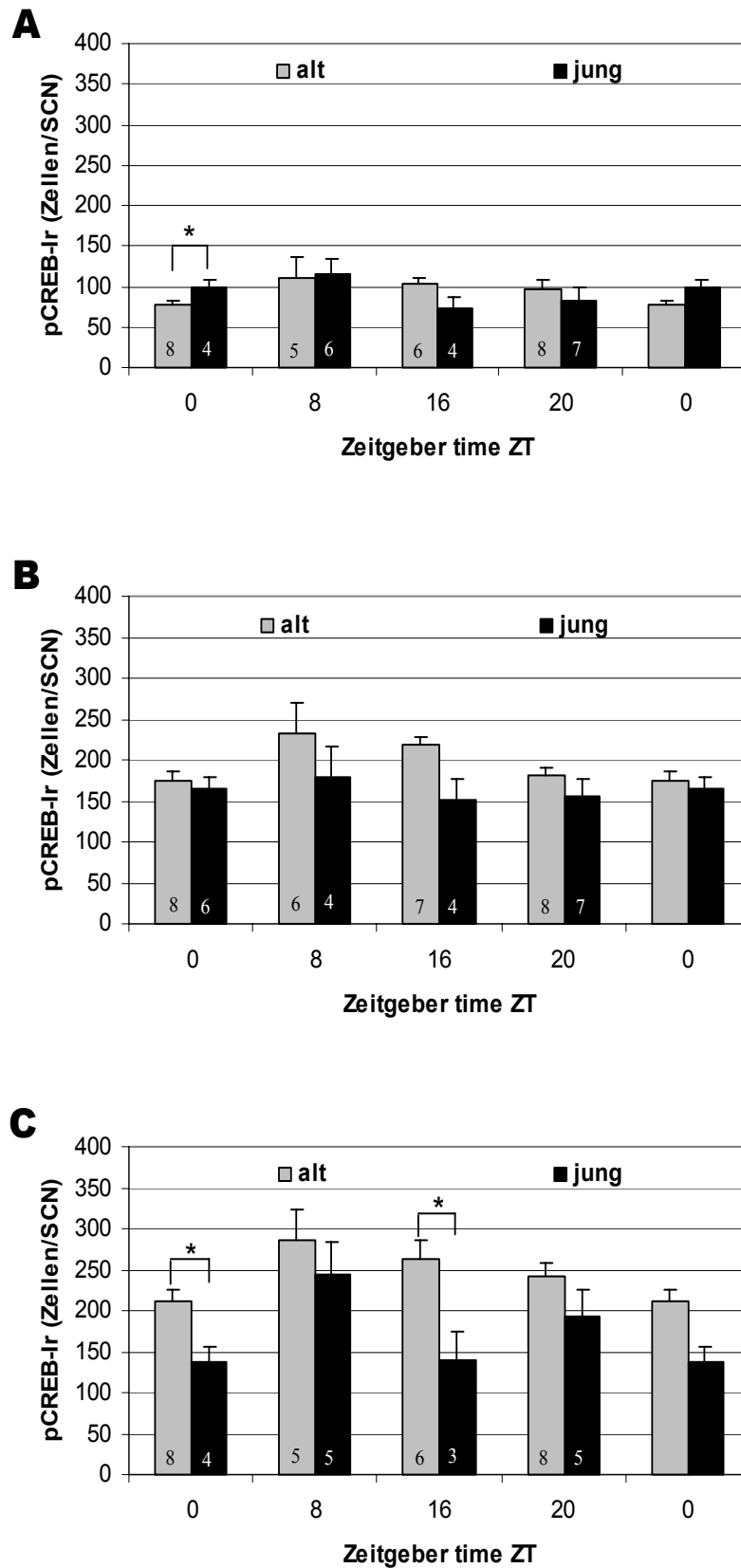


Abb.33: Vergleich der Anzahl an pCREB-immunreaktiven Zellen im rostralen (A), medialen (B) und caudalen (C) Bereich eines SCN von jungen und alten rhythmischen Zwerghamstern, *Phodopus sungorus*. Alle Datenpunkte sind als Mittelwerte  $\pm$  SEM dargestellt.  $n = 3-8$ , siehe Balken.  $p < 0,05$ .

## ARRHYTHMISCHE TIERE

### **Junge adulte Hamster**

Beim Vergleich der einzelnen Segmente in ihrem zeitlichen Verlauf konnten bei den jungen arrhythmischen Tieren keine statistisch signifikanten Unterschiede ermittelt werden. Die Unterschiede in der Anzahl der immunreaktiven Zellen waren zum Teil sehr gering (Anhang B Tab.7) und so konnten insgesamt nur Tendenzen dargestellt werden. Aber auch hier befanden sich wie bei den rhythmischen Tieren im caudalen Bereich die meisten angefärbten Zellen und im rostralen Bereich die wenigsten (Anhang B Tab.7).

Für den rostralen Bereich konnte eine maximale Immunreaktivität zum Zeitpunkt ZT0 und eine minimale zu ZT20 festgestellt werden.

Im medialen Segment des Kerngebietes waren keine Unterschiede zwischen den einzelnen Zeitgeberzeiten im Tagesgang festzustellen (Abb.34).

Die mittleren Zellzahlen im caudalen Abschnitt wiesen zwei Plateaus auf: Ein niedrigeres vom Ende der Scotophase bis zur Mitte der Photophase (ZT0–ZT8) und ein höheres vom Ende der Photophase bis zur Mitte der Scotophase (ZT16-ZT20).

Bei dem statistischen Vergleich der Segmente zu einem Zeitpunkt ergab sich für die Zeitpunkte ZT16 und ZT20, dass sowohl der caudale als auch der mediale Wert für Immunreaktivität signifikant höher lagen als der rostrale Wert (ZT16:  $F(3,11) = 68,138$ ;  $p < 0,0001$ . ZT20:  $F(3,14) = 113,929$ ;  $p < 0,0001$ . ZT0:  $F(3,14) = 57,072$ ,  $p < 0,0001$ , *post hoc*: n.s.. ZT8:  $F(3,16) = 128,491$ ,  $p < 0,0001$ , *post hoc*: n.s.).

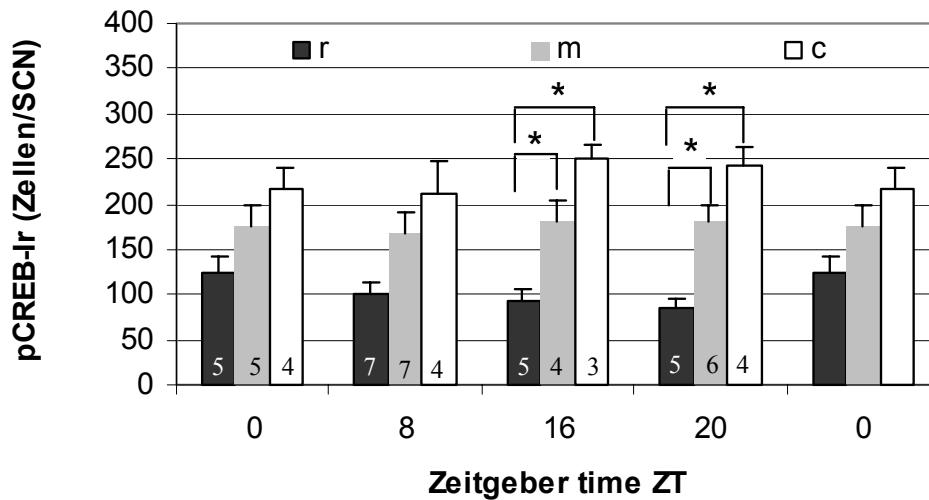


Abb.34: Anzahl der pCREB-immunreaktiven Zellen im rostralen (r), medialen (m) und caudalen (c) Bereich eines SCN von junge arrhythmischen Zwerghamstern, *Phodopus sungorus*. Alle Datenpunkte sind als Mittelwerte  $\pm$  SEM angegeben.  $n = 3-7$ , siehe Balken.  $p < 0,05$ .

### Alte Hamster

Generell war bei den alten arrhythmischen Hamstern im Gegensatz zu den jungen ein deutlicher Tagesgang für den rostralen und medialen Bereich zu erkennen, sowie eingeschränkt auch für den caudalen SCN (Abb.35). Trotzdem waren auch hier keine statistisch signifikanten Unterschiede beim Vergleich der einzelnen Abschnitte in ihrem zeitlichen Verlauf zu ermitteln. Insgesamt war aber erneut auffällig, dass der caudale Bereich des SCN die höchsten Zahlen an immunreaktiven Zellen zeigte und das rostrale Segment die geringsten (Anhang B Tab.8).

Der rostrale und der mediale Abschnitt ließen übereinstimmende Extremwerte erkennen: Das Maximum der gefärbten Zellen lag bei beiden zum Zeitpunkt ZT8 und das Minimum bei ZT0. Die Entwicklung der mittleren Zellzahlen im caudalen Bereich erinnerte an die jungen rhythmischen Tiere: Auch hier schien sich ein doppelgipfliges Maximum anzudeuten. Die maximale Anzahl an immunreaktiven Zellen war sowohl in der Mitte des Tages (ZT8) als auch in der Mitte der Nacht (ZT20) zu finden; dabei fiel das Maximum in der Nachtphase ein wenig höher aus als das in der Tagphase (Anhang B Tab.8). Durch die hohe Streuung zum Zeitpunkt ZT16 ist jedoch nicht auszuschließen, dass es sich anstelle des doppelgipfligen Maximums um ein Plateau mit erhöhter Zellzahl handeln könnte.

Beim statistischen Vergleich der SCN-Segmente zu einem Zeitpunkte ergab sich für ZT0, ZT8 und ZT 20 eine signifikant höhere mittlere Zellzahl der caudalen Segmente im Vergleich zu den rostralen (ZT0:  $F(3,12) = 66,042$ ,  $p < 0,0001$ . ZT8:  $F(3,12) = 79,769$ ,  $p < 0,0001$ . ZT16: ( $F(3,12) = 20,193$ ,  $p < 0,0001$ , *post hoc*: n.s.. ZT20:  $F(3,12) = 117,159$ ;  $p < 0,0001$ ). Außerdem ließ sich zum Zeitpunkt ZT0 auch eine signifikante Differenz in den Zellzahlen zwischen medialem und rostralem Bereich ermitteln (s.o.). Schließlich erwies sich die Abweichung zwischen der Zellzahl des caudalen und des medialen SCN zum Zeitpunkt ZT20 ( $F(3) = 117,159$ ;  $p < 0,0001$ ) als statistisch signifikant (Abb.35).

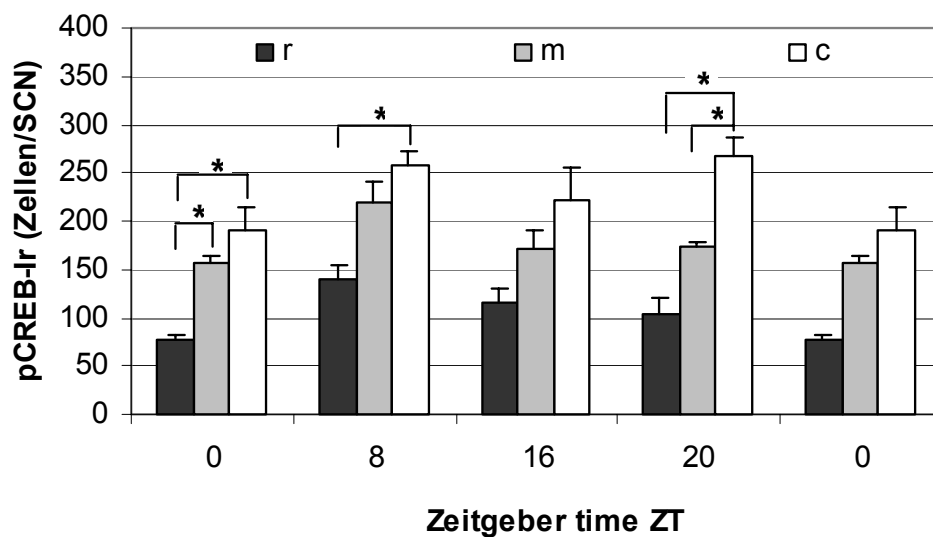


Abb.35: Anzahl der pCREB-immunreaktiven Zellen im rostralen (r), medialen (m) und caudalen (c) Bereich eines SCN von alten arrhythmischen Zwerghamstern, *Phodopus sungorus*. Alle Datenpunkte sind als Mittelwerte  $\pm$  SEM angegeben.  $n = 4$ .  $p < 0,05$ .

### Vergleich: Junge vs. alte Hamster

Beim Vergleich der Datensätze der beiden Tiergruppen wurde deutlich, dass es im Hinblick auf die Zellzahlen bei den arrhythmischen Tieren keine so eindeutigen Verhältnisse zwischen alten und jungen Tieren gab, wie bei den rhythmischen Tieren; weder auf der rostro-caudalen noch auf der zeitlichen Achse schien eine der beiden Tiergruppen kontinuierlich eine deutlich höhere Zahl an immunreaktiven Zellen aufzuweisen.

Im rostralen Bereich überschneiden sich zum Zeitpunkt ZT0 die minimalen mittleren Zellzahlen der alten Tiere mit den maximalen der jungen. Diese Tatsache führte bei einer statistischen Analyse zu einem signifikanten Unterschied zwischen den beiden Tiergruppen ( $Z = -2.205$ ;  $p = 0,0275$ ) (Abb.36). Die minimale Anzahl an immunreaktiven Zellen war bei

---

den jungen Tieren in der Mitte der Nacht (ZT20) zu finden; die höchste Zellzahl bei den alten Tieren war – wie auch bei den rhythmischen Hamstern – zum Zeitpunkt ZT8 lokalisiert.

Im medialen Bereich war bei den jungen Tieren keine Veränderung in der mittleren Zellzahl zu erkennen (Anhang B Tab.7), während bei den alten Tieren ein deutlich modulierterer, aber nicht signifikanter zeitlicher Verlauf vorlag. Insgesamt waren im medialen SCN keine statistisch signifikanten Differenzen zwischen den beiden Altersgruppen zu ermitteln.

Der caudale Abschnitt des SCN war bei den jungen Tieren durch ein Minimum- (ZT0-8) und ein Maximumplateau (ZT16-20) gekennzeichnet. Dagegen konnte bei den alten Hamstern ein variablerer zeitlicher Verlauf mit einem doppelgipfligen Maximum (ZT8 und ZT16) nachgezeichnet werden (Anhang B Tab.8, Abb.36). Trotz dieser Differenzen wurden zwischen den arrhythmischen jungen und alten Hamstern auch im caudalen Bereich keine statistisch signifikanten Unterschiede bestimmt. Insgesamt waren zu den vier untersuchten Zeitpunkten keine grundsätzlichen Abweichungen bezüglich der pCREB-Immunreaktivität im SCN von jungen und alten arrhythmischen Zwerghamstern festzustellen.

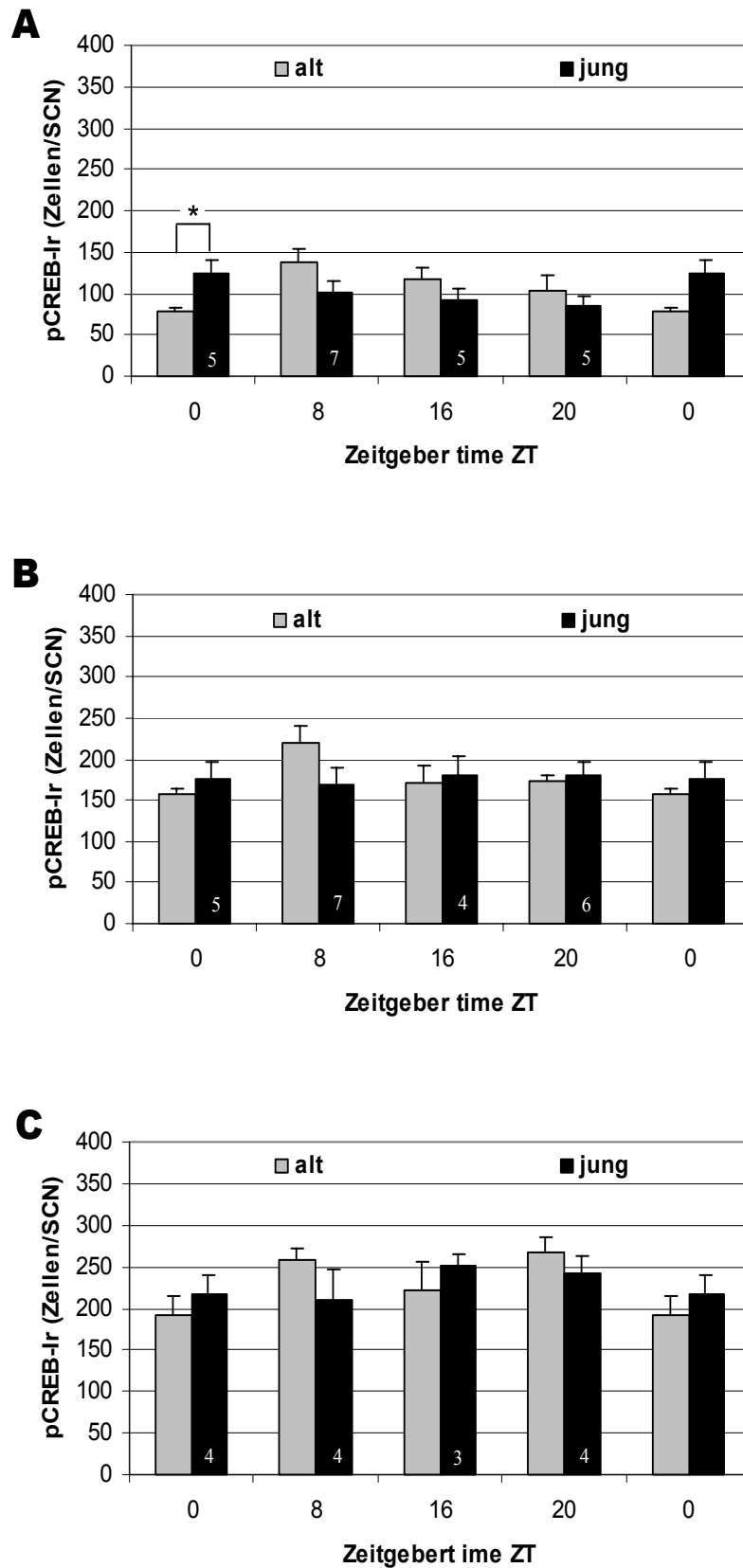


Abb.36: Vergleich der Anzahl an pCREB-immunreaktiven Zellen im rostralen (A), medialen (B) und caudalen (C) Bereich eines SCN von jungen und alten arrhythmischen Zwerghamstern, *Phodopus sungorus*. Alle Datenpunkte sind als Mittelwerte  $\pm$  SEM dargestellt.  $n(\text{jung}) = 3-7$ , siehe Balken;  $n(\text{alt}) = 4$ .  $p < 0,05$ .

---

**VERGLEICH: RHYTHMISCHE UND ARRHYTHMISCHE TIERE****Junge adulte Hamster**

Bei der Gegenüberstellung der jungen rhythmischen Hamster und der jungen arrhythmischen (Abb.37) war festzustellen, dass die mittlere Anzahl an immunpositiven Zellen im rostralen und medialen SCN in keiner der beiden Versuchsgruppen einen deutlichen zeitlichen Verlauf aufweist (Anhang B Tab.5 und 7). Im caudalen Abschnitt des Kerngebietes war bei den rhythmischen Tieren ein deutlich modulierter Tagesgang zu beobachten (doppelgipfliges Maximum bei ZT8 und ZT20), während bei den arrhythmischen Tieren erneut wenig Variationen in der Anzahl der immunpositiven Zellen auftraten (Abb.37). Im Gegensatz zu den vorangegangenen Abschnitten traten hier statistisch signifikante Unterschiede zwischen den rhythmischen und arrhythmischen jungen Tieren auf; so lag zum Zeitpunkt ZT0 ( $Z = -2,021$ ;  $p = 0,0433$ ) und ZT16 ( $Z = -1,964$ ;  $p = 0,0495$ ) die mittlere Zellzahl bei den arrhythmischen Jungtieren signifikant höher als bei den rhythmischen jungen Hamstern, bei denen diese Zeitpunkte die Minimalwerte markierten.

Als Fazit dieses Vergleichs konnte der einzige Unterschied zwischen den beiden Gruppen im caudalen Bereich lokalisiert werden: Dem doppelgipfligen Tagesgang bei den rhythmischen Tieren stand ein einheitliches 24-Stunden Niveau bei den arrhythmischen Tieren gegenüber.



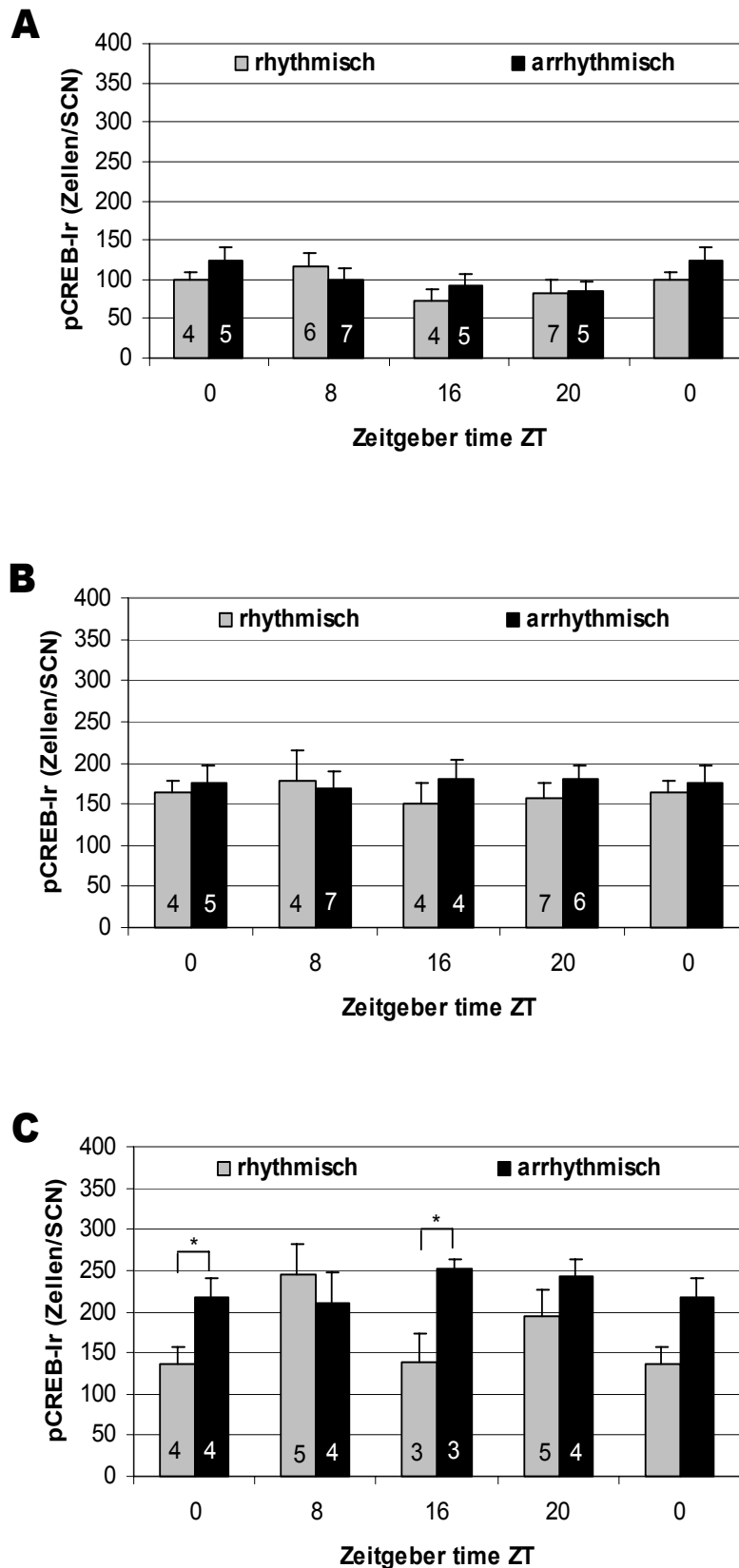


Abb.37: Vergleich der Anzahl an pCREB-immunreaktiven Zellen im rostralen (A), medialen (B) und caudalen (C) Bereich eines SCN von rhythmischen und arrhythmischen jungen Zwerghamstern, *Phodopus sungorus*. Alle Datenpunkte sind als Mittelwerte  $\pm$  SEM dargestellt.  $n = 3-7$ , siehe Balken.  $p < 0,05$ .

---

**Alte Hamster**

Bei der Gegenüberstellung der Datensätze der rhythmischen und arrhythmischen alten Hamster konnten in keinem Abschnitt auf der rostro-caudalen Achse Besonderheiten festgestellt werden (Abb.38). Die mittleren Zellzahlen der beiden Versuchsgruppen sind in allen drei Bereichen auf einem ähnlichen Niveau angesiedelt und auch die Extremwerte laufen – mit Ausnahme des caudalen Bereichs – synchron.

Generell war in beiden Gruppen übereinstimmend zu beobachten, dass die Anzahl an immunreaktiven Zellen im caudalen SCN am höchsten und im rostralen Kerngebiet am geringsten ausfiel. Es konnten keine statistisch belegbaren Unterschiede zwischen diese beiden Versuchsgruppen bestimmt werden.

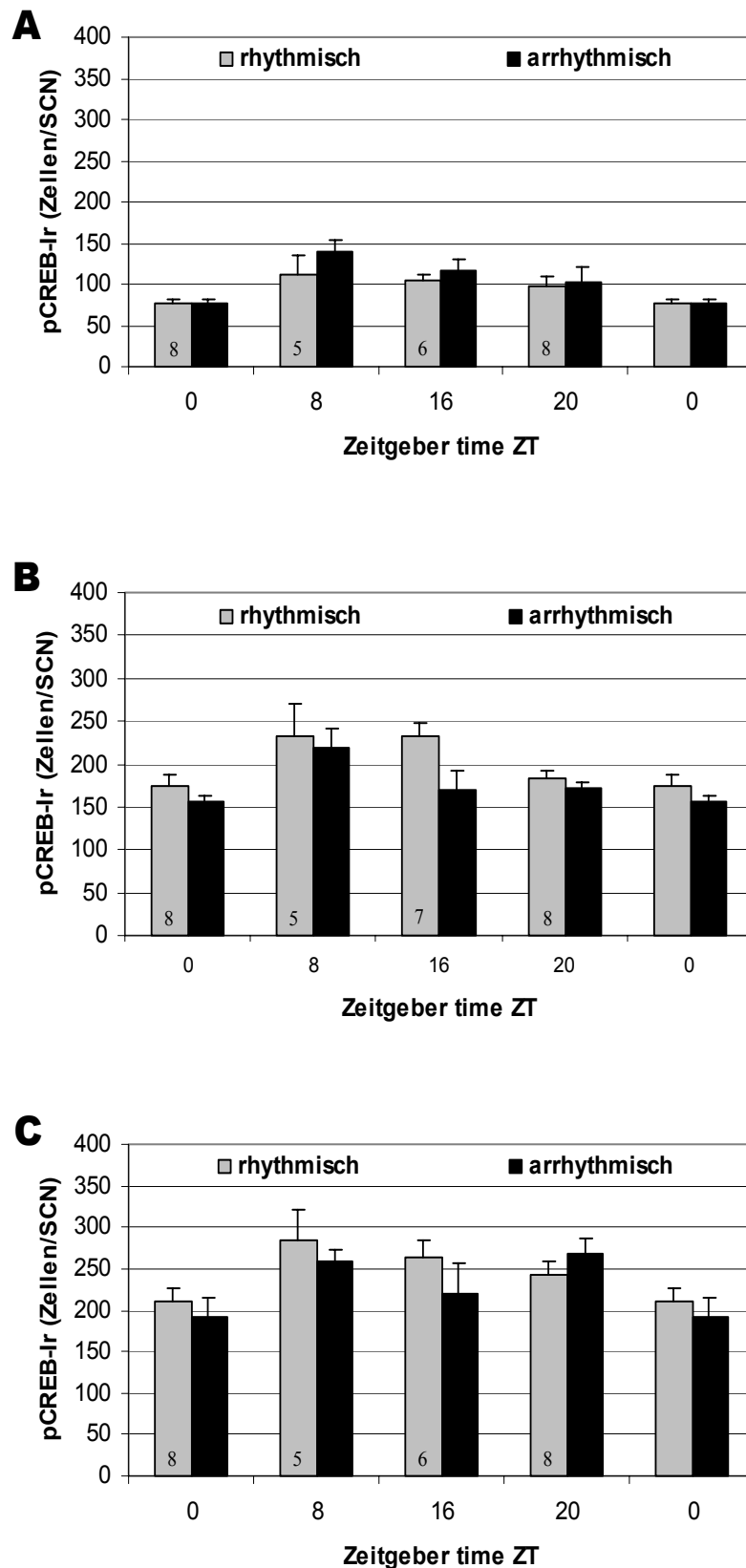


Abb.38: Vergleich der Anzahl an pCREB-immunreaktiven Zellen im rostralen (A), medialen (B) und caudalen (C) Bereich eines SCN von rhythmischen und arrhythmischen alten Zwerghamstern, *Phodopus sungorus*. Alle Datenpunkte sind als Mittelwerte  $\pm$  SEM dargestellt.  $n(\text{rhythmisch}) = 5-8$ , siehe Balken;  $n(\text{arrhythmisch}) = 4$ .  $p < 0,05$ .

### 3.2.1.4 cFOS

cFOS ist ein nucleares Phosphoprotein, das als Transkriptionsfaktor fungieren kann. Es wird durch verschiedene Stimuli induziert; so reagiert es unter anderem stark auf Lichtpulse in der Dunkelphase (zur Übersicht siehe Kornhauser *et al.* 1996). cFOS wird sehr schnell nach einem Lichtstimulus gebildet. Diese Eigenschaft führte dazu, es als geeignetes Maß für Veränderungen im Lichtinput des SCN auf zellulärer Ebene anzusehen.

Auf einen allgemeinen und undifferenzierten Nachweis des cFOS Proteins im SCN von *Phodopus sungorus* und den Spezifitätsnachweis des Antikörpers mittels eines *Western-Blots* wurde in diesem Fall verzichtet. Grund dafür war die Tatsache, dass dieser Antikörper bereits zuvor von A. Hampel (unveröffentlicht) spezifisch im SCN von *Phodopus* nachgewiesen wurde.

Um das cFOS Protein und damit mögliche Unterschiede in der „Verarbeitung“ von Lichtsignalen nachzuweisen, wurde es bei allen Versuchsgruppen zu verschiedenen Zeitgeberzeiten immunhistochemisch markiert. Es zeigte sich, dass das Protein sehr spezifisch auf den Antikörper reagierte und eine stark ausgeprägte Kernfärbung aufwies. Diese Kernfärbung ist exemplarisch für die drei Bereiche des SCN in Abbildung 39 dargestellt: In allen drei Abschnitten ließ sich das Kerngebiet deutlich in seiner Ausdehnung verfolgen, da es durch die Immunreaktivität der Zellen distinkt markiert war.

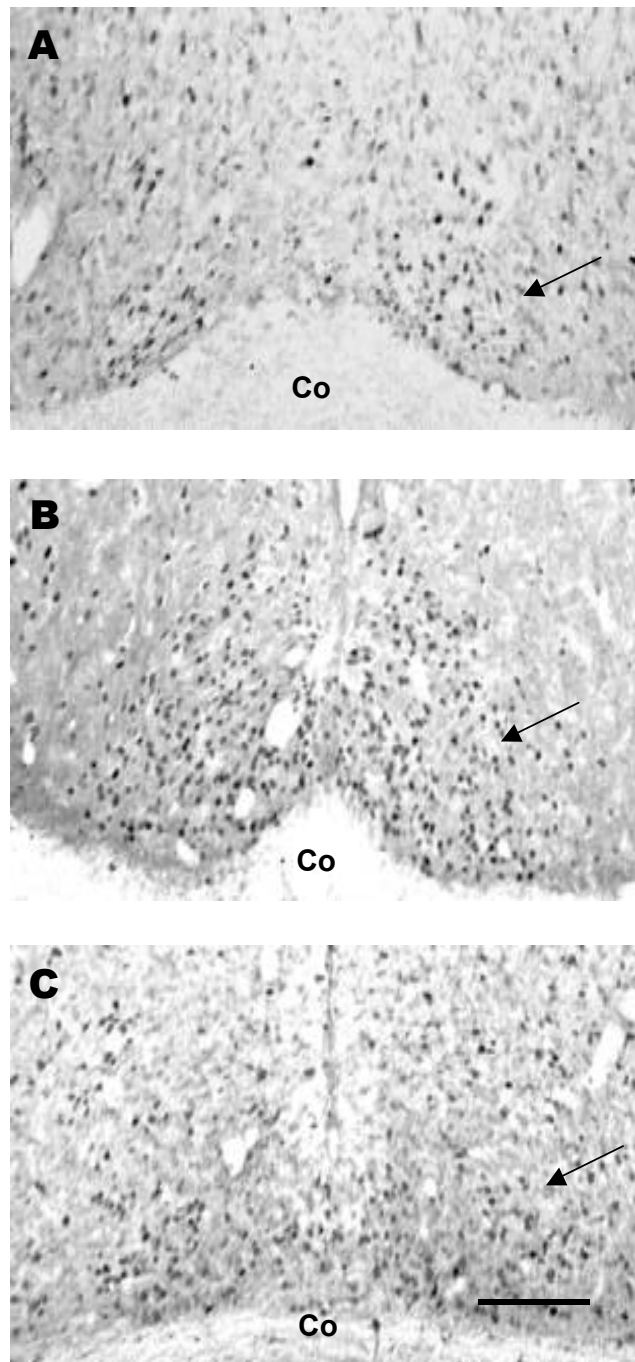


Abb.39: Immunfärbung gegen cFOS im rostralen (A), medialen (B) und caudalen (C) Bereich des SCN von *Phodopus sungorus*. Balken = 100µm. Pfeil = SCN. Co = *Chiasma opticum*

## RHYTHMISCHE TIERE

### Junge adulte Hamster

Mit immunhistochemischen Methoden wurde die zeitliche Verteilung des Proteins cFOS auf zellulärer Ebene untersucht. Die Anzahl der gezählten immunreaktiven Zellen ist für die drei Sektionen in Abb.40 und Abb.44 zu den bereits genannten Zeitpunkten ZT0, 8, 16 und 20 dargestellt worden. Die dazugehörigen mittleren Zellzahlen  $\pm$  SEM sind in Anhang B Tab.9 aufgeführt.

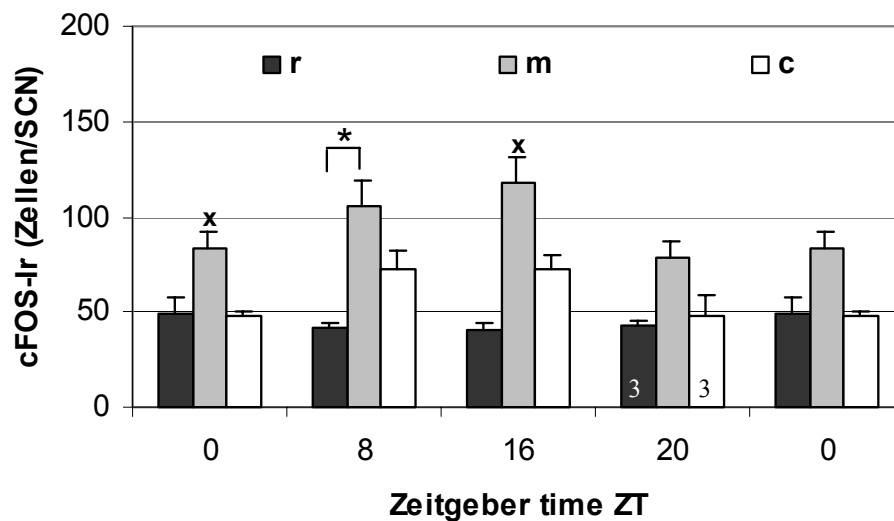


Abb.40 Anzahl der cFOS-immunreaktiven Zellen im rostralen (r), medialen (m) und caudalen (c) Bereich eines SCN von jungen rhythmischen Zwerghamstern, *Phodopus sungorus*. Alle Datenpunkte sind als Mittelwerte  $\pm$  SEM angegeben. n = 4, Abweichungen siehe Balken. p < 0,05. x: Signifikant höhere cFOS-Immunreaktivität als in den beiden benachbarten SCN-Segmenten

Im rostralen Bereich des SCN waren die Zellzahlen zu allen Zeitpunkten annähernd gleich (Anhang B Tab.9).

Der mediale Abschnitt war deutlich moduliert mit einem Maximum bei ZT16 und einem Minimum bei ZT20; jedoch ließen sich die Unterschiede aufgrund der hohen Standardabweichung nicht statistisch belegen.

Für den caudalen Bereich zeigte sich ein Maximumplateau während der Photophase (ZT8 – ZT16) und ein Minimumplateau in der Scotophase (ZT20 – ZT0).

Weder innerhalb des rostralen noch des medialen oder caudalen Bereichs des SCN ergaben sich im zeitlichen Verlauf statistisch signifikante Unterschiede.

Insgesamt war die Anzahl der immunreaktiven Zellen im Bereich des medialen SCN am höchsten und im rostralen SCN am geringsten. Der Unterschied zwischen den mittleren Zellzahlen des medialen und rostralen Gebietes ließ sich bis auf ZT20 zu allen Zeitpunkten als statistisch signifikant einstufen (ZT0:  $F(2,9) = 7,629$ ,  $p = 0,0115$ . ZT8:  $F(2,9) = 10,618$ ,  $p = 0,0043$ . ZT16:  $F(2,9) = 20,115$ ,  $p = 0,0005$ . ZT20:  $F(2,7) = 20,115$ ,  $p = 0,049$ , *post hoc*: n.s.). Im caudalen Bereich erwies sich die Anzahl an immunreaktiven Zellen gegen cFOS als deutlich geringer als im medialen SCN; statistisch signifikante Unterschiede ließen sich zu ZT0 (s.o.) und zu ZT16 (s.o.) feststellen. Beim Vergleich der Zellzahlen des rostralen und des caudalen SCN zeigten sich im caudalen Bereich lediglich in der Photophase deutlich höhere Werte. Diese Differenzen ließen sich jedoch nicht statistisch untermauern.

Grundsätzlich ließ sich also ein deutlicher Tagesgang im medialen Bereich des SCN feststellen, ein moderater im caudalen Bereich und kein Tagesgang im rostralen Abschnitt des SCN.

### **Alte Hamster**

In Abb.41 und Abb.43 wird die zeitliche Verteilung der Immunreaktivität gegen cFOS bei alten rhythmischen Zwerghamstern dargestellt.

Für den rostralen Bereich des SCN ließen sich keine statistisch signifikanten Unterschiede auf der Zeitachse bestimmen (Anhang B Tab.10).

Im medialen und auch im caudalen Bereich änderte sich die Zahl der cFOS-immunreaktiven Zellen im Tagesgang deutlich. Für die mediale Sektion des SCN ließ sich zum Zeitpunkt ZT8 ein Maximum der Immunreaktivität gegen cFOS feststellen, das geringfügig nach ZT16 und drastisch zum Tiefpunkt ZT20 absinkt (Abb.41 und 43, Anhang B Tab.10). Die Unterschiede zwischen den einzelnen medialen Werten ließen sich statistisch untermauern: Zum Zeitpunkt ZT20 war die Anzahl immunreaktiver Zellen im Vergleich zu allen anderen Zeitpunkten signifikant niedriger ( $F(3,12) = 39,242$ ,  $p < 0,0001$ ). Außerdem erwiesen sich die mittleren Zellzahlen der Zeitpunkten ZT8 und 16 als signifikant höher als die zum Zeitpunkt ZT0.

Für den caudalen Bereich des SCN ließ sich ein ähnliches Bild zeichnen: Auch hier war ein Maximum bei ZT8 und ein Minimum bei ZT20 zu erkennen. Die statistische Analyse zeigte deutlich signifikante Unterschiede zwischen ZT20 und den anderen Zeitpunkten ( $F(3,12) = 15,221$ ;  $p = 0,002$ ).

Insgesamt staffelte sich die Anzahl der immunreaktiven Zellen in absteigender Reihe nach medial, caudal und rostral. Die mittlere Zellzahl des medialen Bereichs war zu allen Zeitpunkten - mit Ausnahme von ZT20 - statistisch signifikant höher als die des rostralen

Bereichs (ZT0:  $F(3,12) = 97,224$ ,  $p < 0,001$ . ZT8:  $F(3,12) = 48,530$ ,  $p < 0,001$ . ZT16:  $F(3) = 75,733$ ,  $p < 0,001$ . ZT20:  $F(3,12) = 12,171$ ,  $p = 0,0006$ , *post hoc*: n.s.). Dagegen erwies sich die Immunreaktivität im caudalen Abschnitt des SCN nur zum Zeitpunkt ZT8 (s.o.) als signifikant höher als die im rostralen Segment. Beim Vergleich des medialen und caudalen Abschnitts stellte sich die Anzahl immunpositiver Zellen im caudalen SCN zum Zeitpunkt ZT16 als signifikant niedriger dar als die des medialen Bereichs (s.o.). Bemerkenswert war insgesamt der Zeitpunkt ZT20, der sich im Tagesgang aufgrund seiner niedrigen Werte deutlich von den anderen Zeitpunkten abhob.

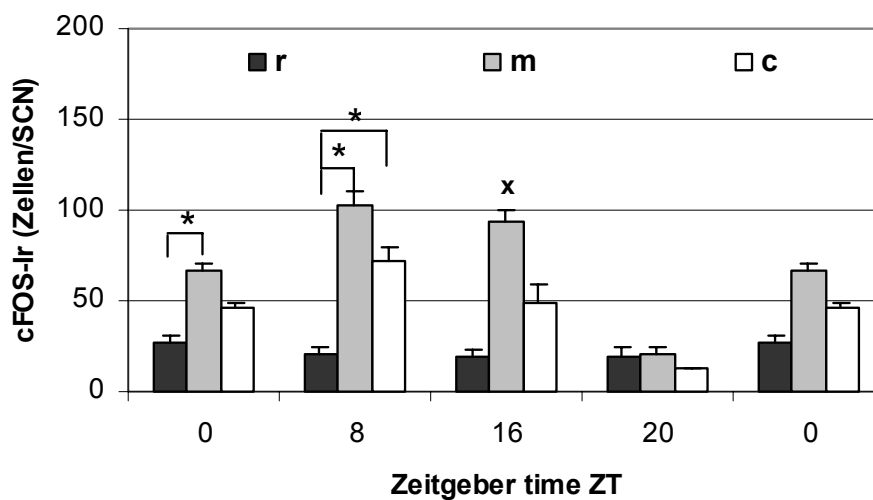


Abb.41: Anzahl der cFOS-immunreaktiven Zellen im rostralen (r), medialen (m) und caudalen (c) Bereich eines SCN von alten rhythmischen Zwerghamstern, *Phodopus sungorus*. Alle Datenpunkte sind als Mittelwerte  $\pm$  SEM angegeben.  $n = 4$ .  $p < 0,05$ . x: Signifikant höhere cFOS-Immunreaktivität als in den beiden benachbarten SCN-Segmenten



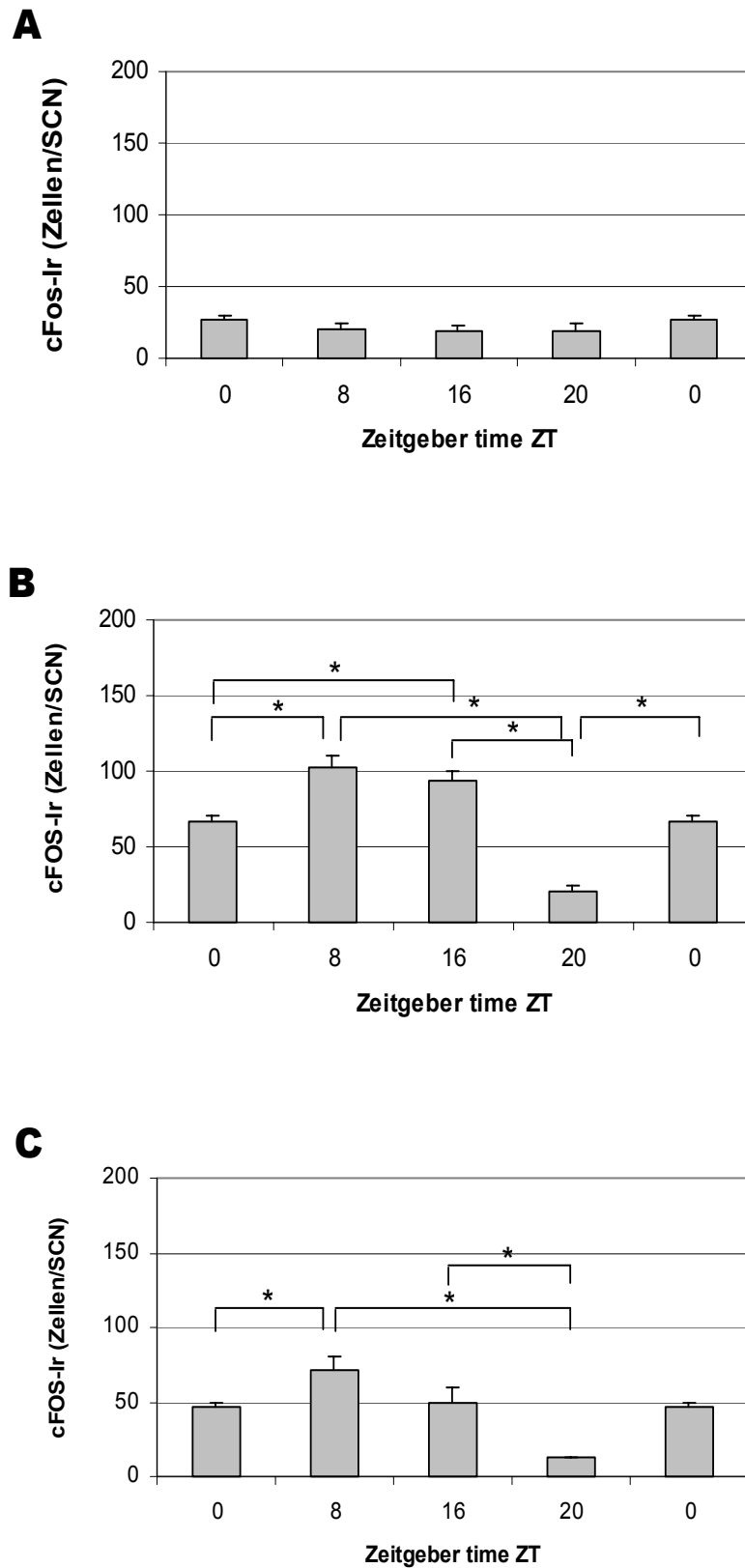


Abb.43: Anzahl der cFOS-immunreaktiven Zellen im rostralen (A), medialen (B) und caudalen (C) Bereich eines SCN von alten rhythmischen Zwerghamstern, *Phodopus sungorus*. Alle Datenpunkte sind als Mittelwerte  $\pm$  SEM dargestellt.  $n = 4$ .  $p < 0,05$ .

**Vergleich: Junge vs. alte Hamster**

Im rostralen Bereich des SCN gab es zwischen jungen und alten Hamstern keine Unterschiede im Tagesgang (Abb.44). Die Anzahl der immunreaktiven Zellen war bei den jungen Tieren zu allen Zeitpunkten statistisch signifikant höher als bei den alten (ZT0:  $Z = -2,309$ ,  $p = 0,0209$ . ZT8:  $Z = -2,309$ ,  $p = 0,0209$ . ZT16:  $Z = -2,309$ ,  $p = 0,0209$ . ZT20:  $Z = -2,121$ ,  $p = 0,0209$ ).

Für den medialen Bereich fiel auf, dass die Maxima an immunpositiven Zellen bei den beiden Tiergruppen unterschiedlich waren (alt: ZT8, jung: ZT16). Das Minimum an immunreaktiven Zellen war bei beiden Gruppen in der Mitte der Scotophase (ZT20). Der statistischen Analyse nach unterschied sich die mittlere Zellzahl bei den beiden Gruppen bis auf den Zeitpunkt ZT20 nicht (ZT0:  $Z = -1,732$ ,  $p = 0,0833$ , n.s.. ZT8:  $Z = -0,577$ ,  $p = 0,5637$ , n.s.. ZT16:  $Z = -1,443$ ,  $p = 0,1489$ , n.s.). Zum Zeitpunkt ZT20 lag die Anzahl der cFOS-immunpositiven Zellen bei den alten Hamstern deutlich niedriger als die der jungen Tiere ( $Z = -2,309$ ,  $p = 0,0339$ ). Diese Differenz zwischen den beiden Gruppen zu diesem Zeitpunkt markierte den auffälligsten Punkt im medialen SCN.

Im caudalen Bereich zeigte sich bei den alten Tieren ein ähnliches Bild wie im medialen Abschnitt des SCN. Im Gegensatz dazu bildete sich bei den jungen Tieren ein Maximumplateau in der Photo- (ZT8 – ZT16) und eine Minimumplateau in der Scotophase (ZT20 – ZT0). Die Anzahl der immunreaktiven Zellen war zu den Zeitpunkten ZT0 und ZT8 in beiden Gruppen nahezu identisch (Anhang B Tab.9 und 10); zu den Zeitpunkten ZT16 ( $Z = -2,021$ ,  $p = 0,0433$ ) und ZT20 ( $Z = -2,121$ ,  $p = 0,0339$ ) erwies sich jedoch die mittlere Zellzahl bei den jungen Tieren statistisch signifikant höher als bei den alten.

Abschließend konnte festgestellt werden, dass der Verlauf dieses Proteins im Tagesgang bei den alten Tieren stärker moduliert war als bei den jungen Tieren; außerdem zeichnete sich der mediale und der caudale Bereich der beiden Versuchsgruppen durch die markante Differenz des Zeitpunkts ZT20 zu den anderen Zeitpunkten aus. Dennoch ließen sich bis auf die genannten Extrempunkte keine nennenswerten Unterschiede in der mittleren Zellzahl zwischen den beiden Gruppen feststellen.

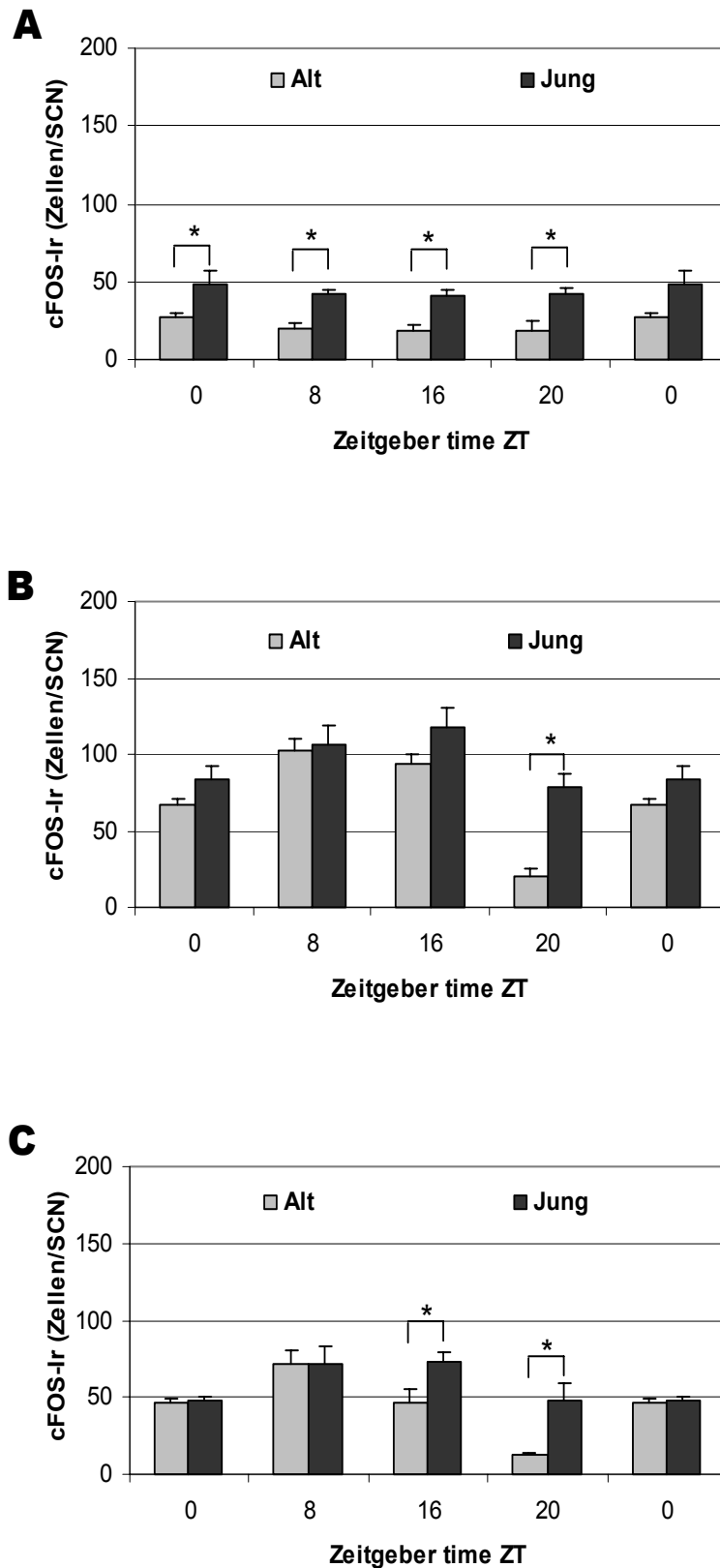


Abb.44: Vergleich der Anzahl an cFOS-immunreaktiven Zellen im rostralen (A), medialen (B) und caudalen (C) Bereich eines SCN von alten und jungen rhythmischen Zwerghamster, *Phodopus sungorus*. Alle Datenpunkte sind als Mittelwerte  $\pm$  SEM dargestellt.  $n = 4$ .  $p < 0,05$ .

## ARRHYTHMISCHE TIERE

### **Junge adulte Hamster**

Die Anzahl der immunreaktiven Zellen gegen cFOS im rostro-caudalen Verlauf des SCN wird in ihrer zeitlichen Abhängigkeit in Abbildung 45 und 46 dargestellt.

Im rostralen Bereich des SCN ließ sich mittels einer *one-way* ANOVA und einem anschließenden *post-hoc* Test (Tukey-Kramer) zwischen dem Maximum bei ZT0 und dem Minimum bei ZT16 ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den mittleren Zellzahlen (Anhang B Tab.11, Abb.45) ermitteln ( $F(3,11) = 4,772$ ,  $p = 0,0229$ ).

In der medialen Sektion war das Maximum der mittleren Zellzahl am Ende der Scotophase (ZT0) lokalisiert und das Minimum in der Mitte der Nacht (ZT20). Insgesamt ließen sich in diesem Bereich aber keine signifikanten Unterschiede feststellen ( $F(3,10) = 2,283$ ,  $p = 0,1412$ , n.s.).

Für den caudalen Bereich des SCN konnte sowohl in der Photo- als auch in der Scotophase jeweils ein Maximum (ZT0 bzw. ZT16) und ein Minimum (ZT8 bzw. ZT20) an mit cFOS-Antikörper gefärbten Zellen festgestellt werden. Die Differenz der mittleren Zellzahlen der Extrempunkte in der Nacht fiel jedoch höher aus, als die am Tag. So ließ sich für die Nachtzeitpunkte ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den beiden Extremwerten feststellen ( $F(3,11) = 4,304$ ,  $p = 0,0308$ ), während dies für die Tagzeitpunkte nicht möglich war (Abb.45).

Vergleicht man die mittleren Zellzahlen von rostralem, medialem und caudalem SCN, so findet sich auch hier wieder eine Abstufung in der Zahl der immunreaktiven Zellen auf cFOS: Im medialen Bereich waren die meisten Zellen cFOS-immunreaktiv und im rostralen Bereich die wenigsten. So erwies sich zum Zeitpunkt ZT8 die mittlere Zellzahl im medialen Segment als signifikant höher als in den anderen beiden Bereichen ( $F(3,12) = 59,350$ ,  $p < 0,0001$ ) (Abb.46). Auch zum Zeitpunkt ZT16 konnte im Verhältnis zum rostralen SCN eine statistisch signifikant höhere Zellzahl im medialen Abschnitt des SCN festgestellt werden ( $F(3,12) = 53,352$ ;  $p < 0,0001$ ).

Im caudalen Abschnitt konnte zu ZT16 ein statistisch signifikanter Unterschied zum rostralen Bereich ermittelt werden (s.o.). Ansonsten lagen für den caudalen Bereich keine weiteren signifikanten Unterschiede zu den anderen Segmenten vor (ZT0:  $F(3,8) = 27,022$ ,  $p = 0,0002$ , *post hoc*: n.s.; ZT20:  $F(3,10) = 8,785$ ,  $p = 0,0037$ , *post hoc*: n.s.).

Insgesamt war in allen drei Bereichen ein Tagesgang zu erkennen.

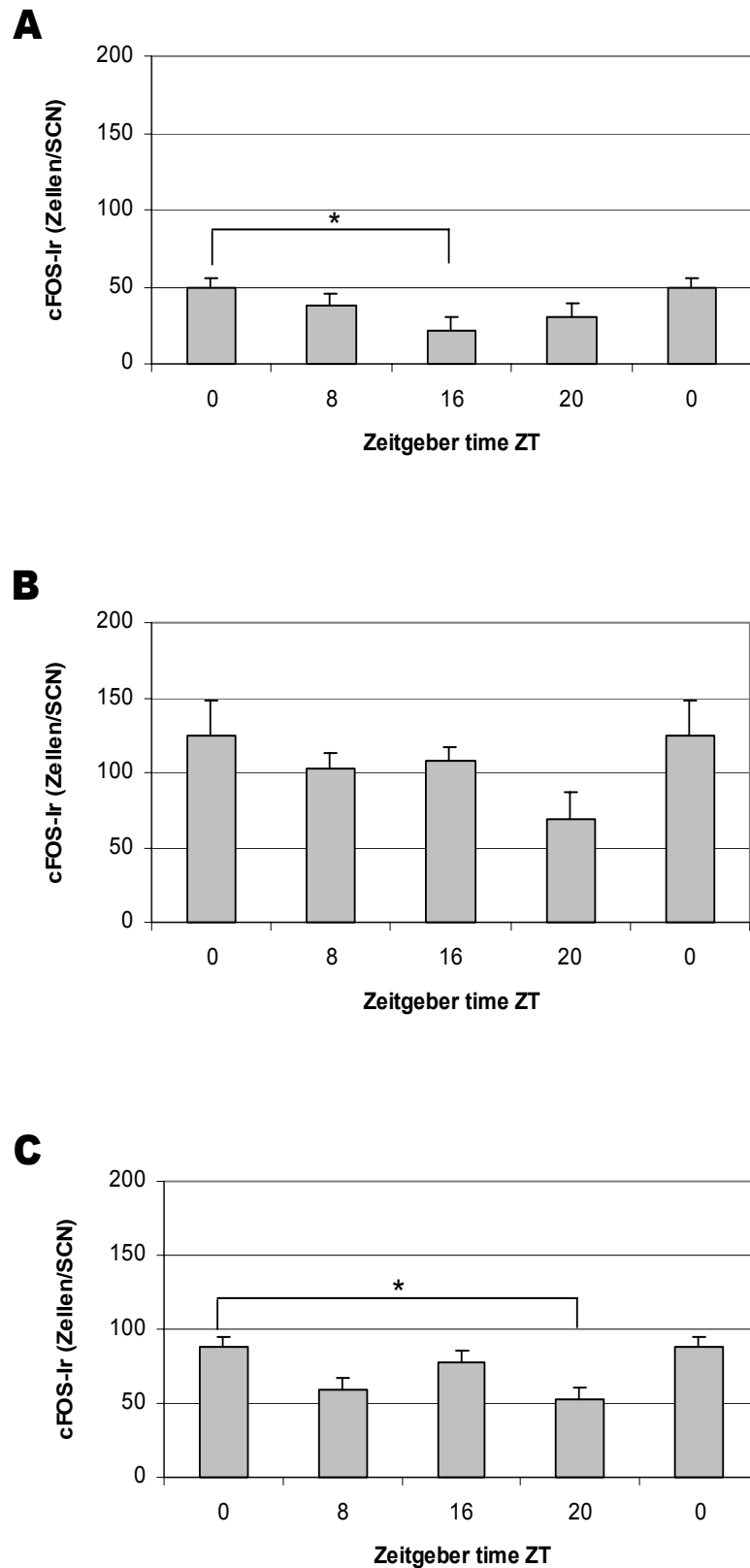


Abb.45: Anzahl der cFOS-immunreaktiven Zellen im rostralen (A), medialen (B) und caudalen (C) Bereich eines SCN von jungen arrhythmischen Zwerghamstern, *Phodopus sungorus*. Alle Datenpunkte sind als Mittelwerte  $\pm$  SEM dargestellt.  $n = 4$ .  $p < 0,05$ .

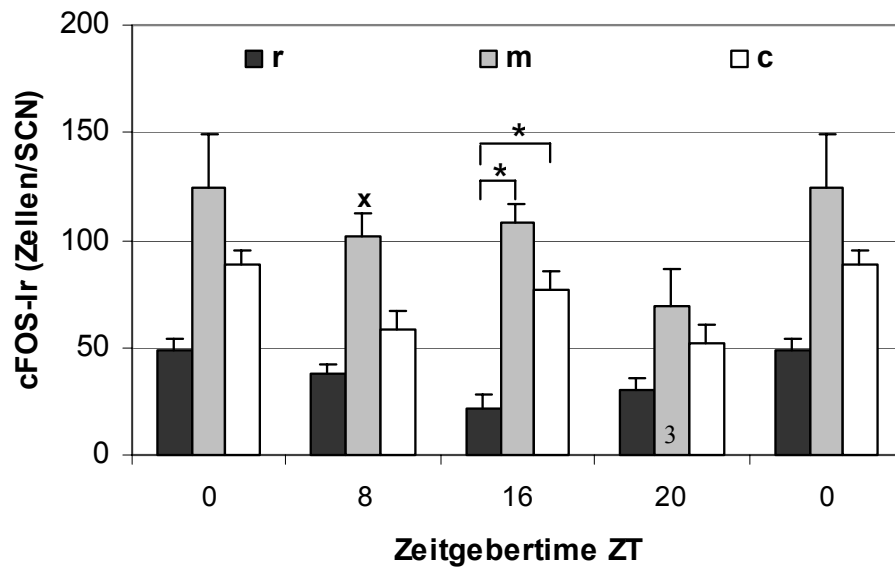


Abb.46: Anzahl der cFOS-immunreaktiven Zellen im rostralen (r), medialen (m) und caudalen (c) Bereich eines SCN von jungen arrhythmischen Zwerghamstern, *Phodopus sungorus*. Alle Datenpunkte sind als Mittelwerte  $\pm$  SEM angegeben.  $n = 4$ .  $p < 0,05$ . x: Signifikant höhere cFOS-Immunreaktivität als in den beiden benachbarten SCN-Segmenten

### Alte Hamster

Bei den alten arrhythmischen Hamstern war eine deutliche Modulation der mittleren Zellzahlen zu den verschiedenen Zeitgeberzeiten festzustellen (Anhang B Tab.12, Abb.47 und 48).

Im rostralen Bereich ließ sich ein Maximum der Immunreaktivität zum Zeitpunkt ZT8 und ein Minimum zum Zeitpunkt ZT20 feststellen. Die Anzahl der gegen cFOS immunreaktiven Zellen lag sowohl zum Zeitpunkt ZT8 als auch zum Zeitpunkt ZT16 statistisch signifikant höher als zu ZT20 ( $F(3,12) = 9,953$ ,  $p = 0,0014$ ).

Der mediale SCN zeigte einen sehr deutlichen zeitlichen Verlauf der gegen cFos-Antikörper reaktiven Zellen. Maximum und Minimum waren hier ebenso lokalisiert wie in der rostralen Sektion, aber die Niveauunterschiede waren stärker ausgeprägt. Der maximale Wert an Immunreaktivität gegen cFOS (ZT8) lag signifikant höher als der zu ZT20 (minimale Immunreaktivität) und der zu ZT0 ( $F(3,12) = 8,932$ ,  $p = 0,0022$ ).

Caudal waren keinerlei statistisch signifikante Unterschiede zu ermitteln, obwohl ein deutliches Minimum in der Mitte der Scotophase (ZT20) zu lokalisieren war ( $F(3,12) = 3,296$ ,  $p = 0,0591$ , n.s.) (Anhang B Tab.12, Abb.48).

Generell war auch hier das Niveau der mittleren Zellzahlen in der medialen Sektion des SCN am höchsten und im rostralen Bereich am niedrigsten. Statistisch signifikante Unterschiede

konnten ausschließlich zwischen dem medialen und dem rostralen Bereich festgestellt werden und zwar zu den Zeitpunkten ZT8 ( $F(3,12) = 38,952, p < 0,001$ ) und ZT16 ( $F(3,12) = 48,428, p < 0,001$ ) (ZT0:  $F(3,12) = 22,505, p < ,0001, post hoc: n.s.$ ; ZT20:  $F(3,12) = 6,657, p = 0,0067, post hoc: n.s.$ ).

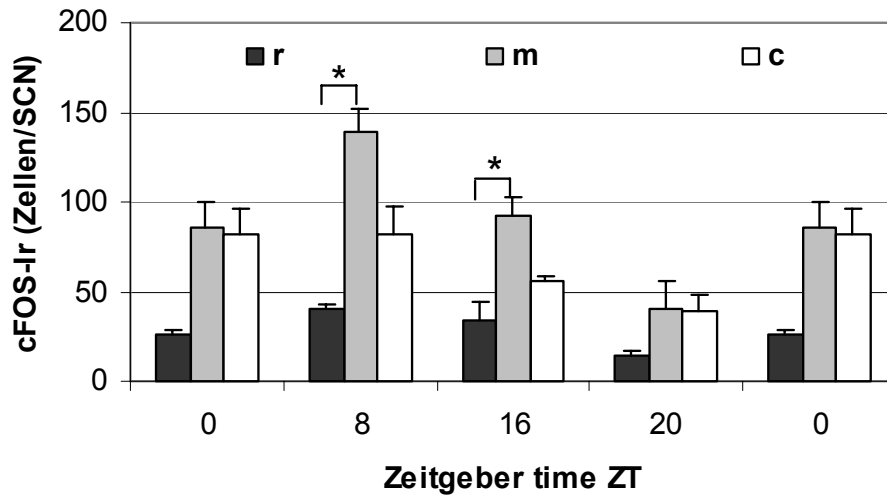


Abb.47: Anzahl der cFOS-immunreaktiven Zellen im rostralen (r), medialen (m) und caudalen (c) Bereich eines SCN von alten arrhythmischen Zwerghamstern, *Phodopus sungorus*. Alle Datenpunkte sind als Mittelwerte  $\pm$  SEM angegeben.  $n = 4. p < 0,05$ .

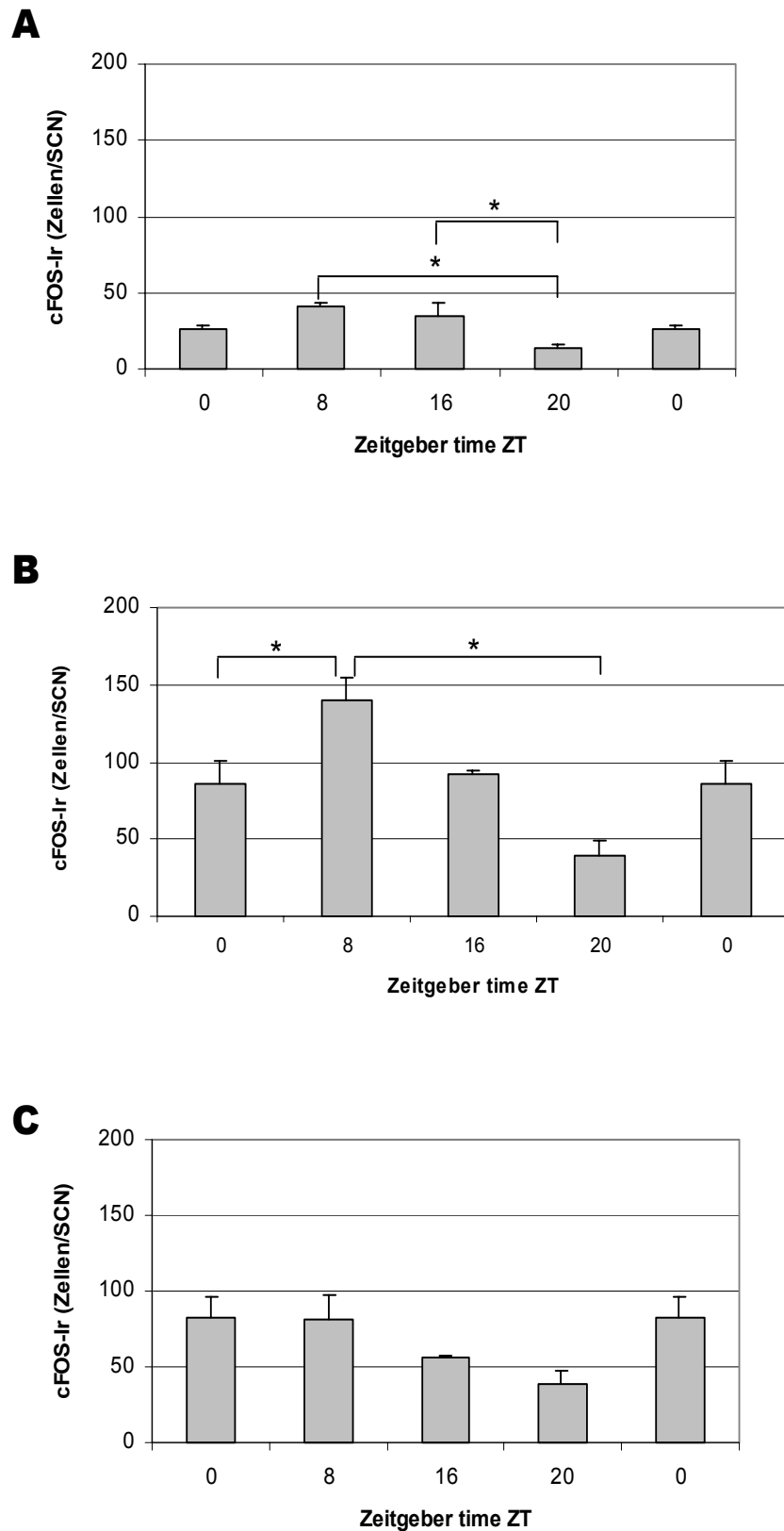


Abb.48: Anzahl der cFOS-immunreaktiven Zellen im rostralen (A), medialen (B) und caudalen (C) Bereich eines SCN von alten arrhythmischen Zwerghamstern, *Phodopus sungorus*. Alle Datenpunkte sind als Mittelwerte  $\pm$  SEM dargestellt.  $n = 4$ .  $p < 0,05$ .



### **Vergleich: Junge vs. alte Hamster**

Im rostralen Segment des SCN zeigte sich beim Vergleich der Datensätze von jungen und alten arrhythmischen Zwerghamstern ein um 8 Stunden verschobenes Maximum der mittleren Zellzahlen (Abb.49, Anhang B Tab.11 und 12): Bei den jungen Tieren lag der maximale Wert der Immunreaktivität am Ende der Scotophase (ZT0), während er bei den alten Tieren in der Mitte der Photophase (ZT8) lokalisiert war. Auch die minimale Anzahl der gegen cFOS immunreaktiven Zellen ist bei den jungen und alten Tieren gegeneinander verschoben. Hier handelte es sich allerdings nur um eine Verschiebung um 4 Stunden: Während bei den jungen Tieren die minimale mittlere Zellzahl am Ende des Tages (ZT16) erreicht wurde, ist sie bei den alten Tieren in der Mitte der Nacht (ZT20) festzustellen. Statistisch signifikante Unterschiede lagen zu den Zeitpunkten ZT0 ( $Z = -2,121$ ,  $p = 0,0339$ ) und ZT20 ( $Z = -2,309$ ,  $p = 0,0209$ ) vor, an denen die alten Tiere deutlich niedrigere Zellzahlen aufwiesen.

Wie im rostralen Kerngebiet ließ sich auch im medialen Bereich die gleiche Verschiebung der maximalen Anzahl an immunreaktiven Zellen verzeichnen. Im Gegensatz dazu fielen die Minima der mittleren Zellzahlen jedoch bei beiden Tiergruppen zusammen und waren zum Zeitpunkt ZT20 lokalisiert. In diesem Bereich des SCN konnte mit dem Mann-Whitney-U-Test lediglich zum Zeitpunkt ZT8 eine statistisch signifikant höhere Zellzahl bei den alten Tieren festgestellt werden ( $Z = -2,021$ ;  $p = 0,0433$ ; ZT0:  $Z = -1,414$ ,  $p = 0,1573$ , n.s.; ZT16:  $Z = -1,155$ ,  $p = 0,2482$ , n.s.; ZT20:  $Z = -1,061$ ,  $p = 0,2888$ , n.s.).

Im caudalen Abschnitt zeigte sich bei den alten Tieren ein ähnliches Bild wie im medialen Segment (Abb.49): Die maximale Immunreaktivität gegen cFOS war in der ersten Hälfte der Photophase lokalisiert (ZT0 bis ZT8), die minimale zum Zeitpunkt ZT20. Bei den jungen Tieren zeigte sich ein doppelgipfliger Tagesgang mit Maxima bei ZT0 und ZT16. Eine statistisch signifikant höhere Zellzahl bei den jungen adulten Tieren konnte zum Zeitpunkt ZT16 festgestellt werden ( $Z = -2,021$ ,  $p = 0,0433$ ).

Generell war auch hier kein wesentlicher Unterschied zwischen dem Niveau der mittleren Zellzahlen von alten und jungen Hamstern festzustellen. Als gravierendster Unterschied erschien der im Vergleich zu den jungen Tieren deutlich stärker modulierte Tagesgang im medialen und caudalen SCN bei den alten Tieren.

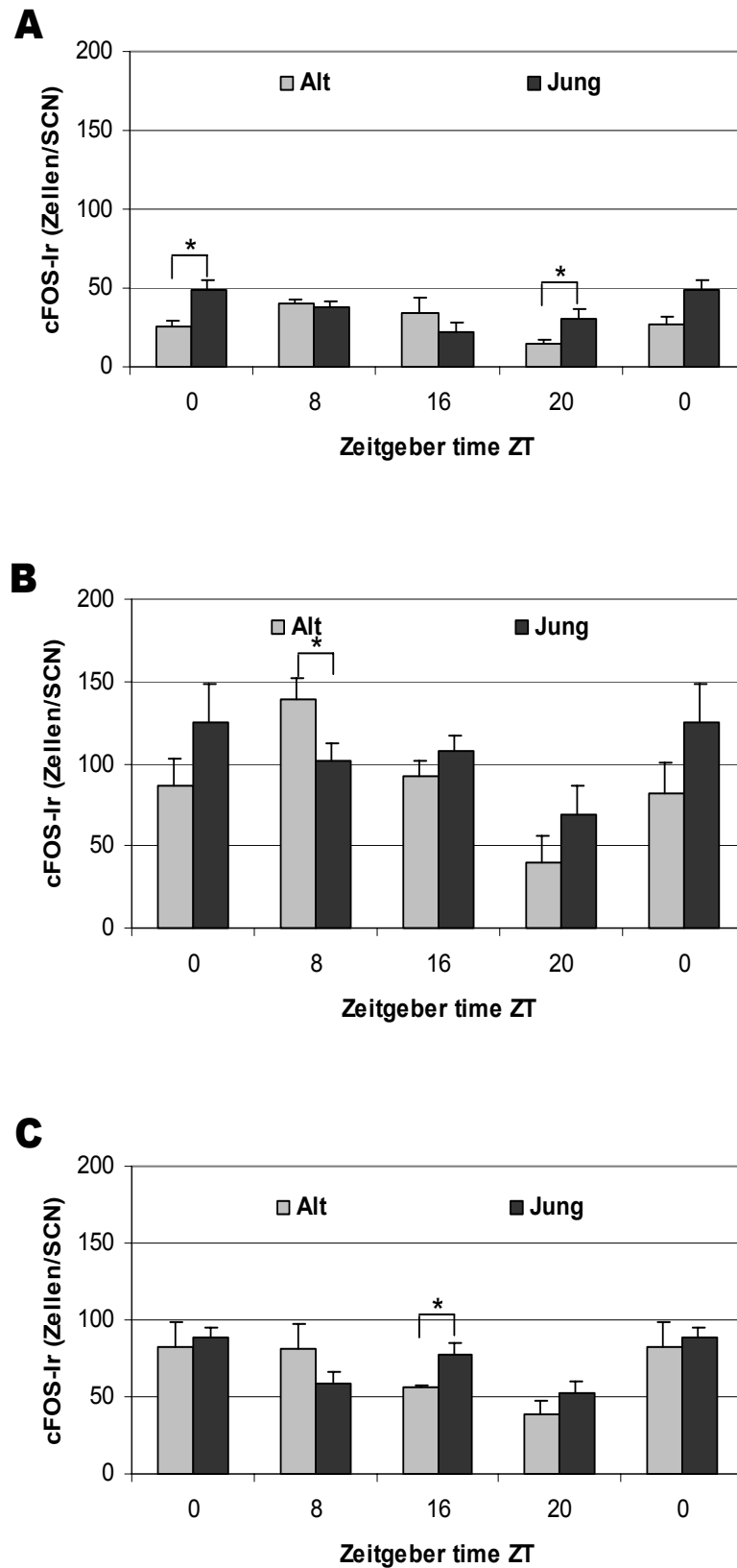


Abb.49: Vergleich der Anzahl an cFOS-immunreaktiven Zellen im rostralen (A), medialen (B) und caudalen (C) Bereich eines SCN von alten und jungen arrhythmischen Zwerghamstern, *Phodopus sungorus*. Alle Datenpunkte sind als Mittelwerte  $\pm$  SEM dargestellt.  $n = 4$ .  $p < 0,05$ .

## VERGLEICH: RHYTHMISCH UND ARRHYTHMISCHE TIERE

### **Junge adulte Hamster**

Im rostralen Abschnitt des SCN ist bei der Gegenüberstellung von jungen rhythmischen und jungen arrhythmischen Hamstern auffällig, dass bei den rhythmischen Tieren vergleichsweise wenig Modulation im zeitlichen Verlauf stattfand (Abb.50). Die maximale Zellzahl fiel bei beiden Tiergruppen auf das Ende der Scotophase (ZT0). Ein eindeutiges Minimum an Immunreaktivität ist jedoch nur bei den arrhythmischen Tieren zu erkennen (ZT16). Statistische Unterschiede ließen sich zum Zeitpunkt ZT16 feststellen ( $Z = -2,021$ ,  $p = 0,0433$ ) (Abb.50).

Die Veränderungen der mittleren Zellzahlen im Tagesgang sind im medialen SCN bei beiden Versuchsgruppen deutlich stärker ausgeprägt als im rostralen Bereich (Abb.50). Die Maxima fallen in diesem Segment jedoch nicht zusammen, sondern sind um 16 Stunden verschoben (arrhythmisch: ZT0; rhythmisch: ZT16). Die minimalen Zahlen an cFOS-immunreaktiven Zellen lagen bei beiden Gruppen zum Zeitpunkt ZT20. Insgesamt konnten keine statistisch signifikanten Unterschiede festgestellt werden (ZT0:  $Z = -1,414$ ,  $p = 0,1573$ , n.s.; ZT8:  $Z = -0,289$ ,  $p = 0,7728$ , n.s.; ZT 16:  $Z = -0,866$ ,  $p = 0,3865$ , n.s.; ZT20:  $Z = -0,707$ ,  $p = 0,4795$ , n.s.)

Auch im caudalen Bereich war bei beiden Gruppen ein zeitlicher Verlauf moduliert, jedoch mit deutlich geringeren Amplitudenschwankungen als im medialen Segment (Anhang B Tab.9 und 11). Bei den rhythmischen Tieren wurden keine eindeutigen Extremwerte gefunden, sondern ein etwas höheres Plateau in der Lichtphase und ein niedrigeres in der Dunkelphase. Bei den arrhythmischen Tieren hingegen sind sowohl in der Photo- als auch in der Scotophase jeweils ein Maximum (ZT0 / ZT16) und ein Minimum (ZT8/ZT20) lokalisiert. Statistisch signifikante Unterschiede ließen sich zum Zeitpunkt ZT0 feststellen ( $Z = -2,121$ ;  $p = 0,0339$ ).

Insgesamt war die Anzahl der Zellen, die positiv auf anti-cFOS reagierten bei den „Rhythmikern“ in der Tendenz gleich oder etwas höher als bei den arrhythmischen Tieren. Generell konnte jedoch kein deutlicher Unterschied zwischen den rhythmischen und arrhythmischen alten Tieren herausgearbeitet werden.

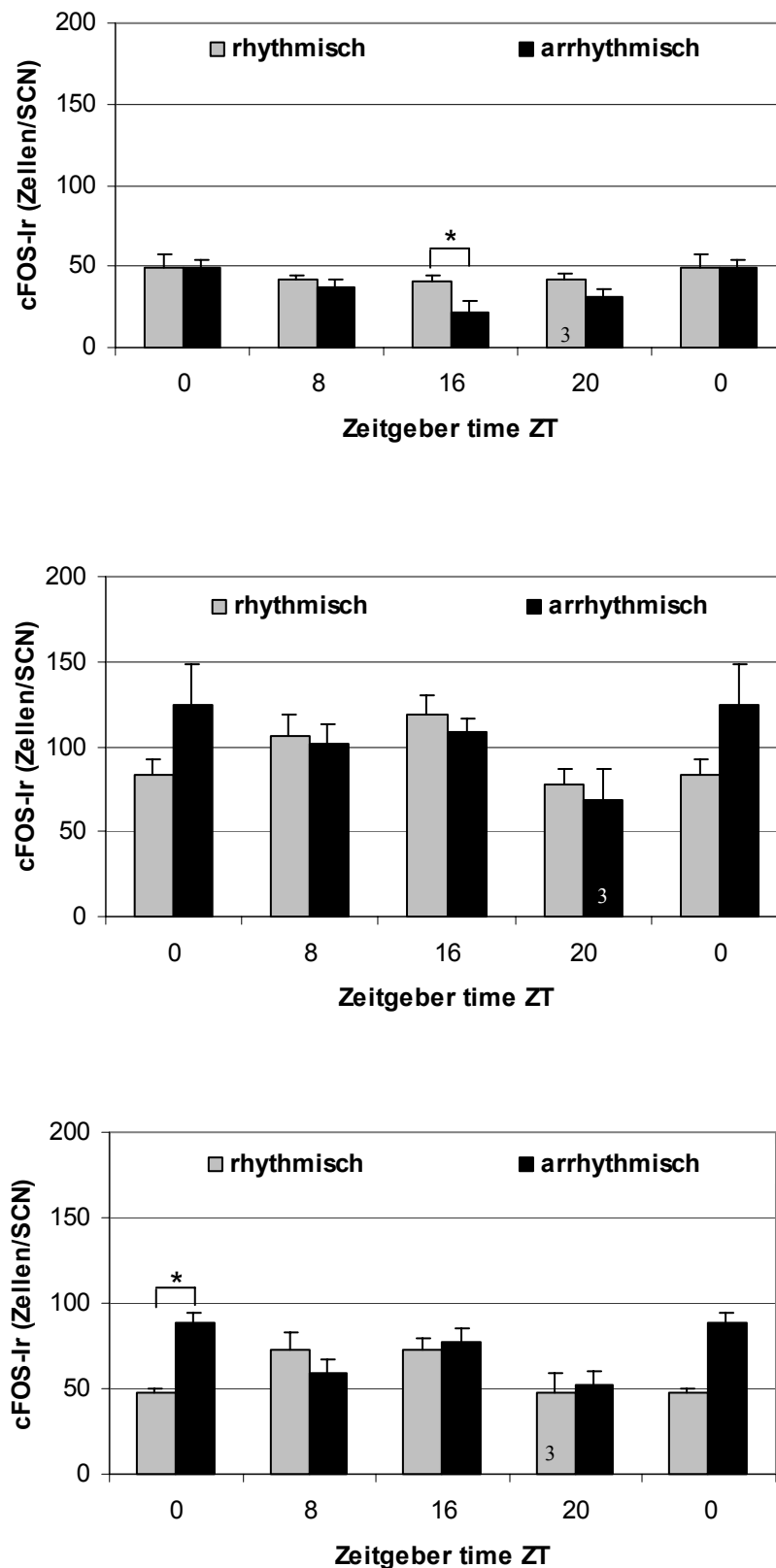


Abb.50: Vergleich der Anzahl an cFOS-immunreaktiven Zellen im rostralen (A), medialen (B) und caudalen (C) Bereich eines SCN von rhythmischen und arrhythmischen jungen Zwerghamstern, *Phodopus sungorus*. Alle Datenpunkte sind als Mittelwerte  $\pm$  SEM dargestellt.  $n = 4$ , Ausnahmen siehe Balken.  $p < 0,05$ .

**Alte Hamster**

Bei dem Vergleich der Datensätze rhythmischer und arrhythmischer alter Hamster (Anhang B, Tab.10 und 12; Abb.51) ließ sich insgesamt feststellen, dass die Anzahl der immunreaktiven Zellen bei den arrhythmischen Tieren sowohl in der gesamten rostro-caudalen Ausdehnung als auch im zeitlichen Verlauf bis auf wenige Ausnahmen höher war als bei den rhythmischen Tieren.

Für den rostralen Bereich des Kerngebietes konnte bei den rhythmischen Tieren kein Tagesgang ermittelt werden (Abb.51). Für die Versuchsgruppe der arrhythmischen Hamster zeigte sich ein Maximum an immunreaktiven Zellen zu ZT8 und ein Minimum zu ZT20 (Abb.51). Statistisch relevante Unterschiede zwischen den beiden Versuchsgruppen konnten nur zum Zeitpunkt ZT8 ermittelt werden ( $Z = -2,309$ ;  $p = 0,0209$ ; ZT0:  $Z = 0$ ,  $p > 0,9999$ , n.s., ZT16:  $Z = -1,732$ ,  $p = 0,0833$ , n.s.; ZT20:  $Z = -0,577$ ,  $p = 0,5637$ , n.s.).

Für den medialen Abschnitt des SCN galt, dass beide Gruppen einen deutlichen, parallelen Tagesgang zeigten: Maxima und Minima fielen auf die gleichen Zeitpunkte und lagen bei ZT8 bzw. bei ZT20 (Abb.51). Insgesamt war die mittlere Zellzahl bei den arrhythmischen Tieren (bis auf ZT16) höher als bei rhythmischen Tieren. Statistisch ließ sich jedoch nur zum Zeitpunkt ZT8 eine signifikant höhere Zellzahl bei den arrhythmischen Tieren feststellen ( $Z = -2,309$ ,  $p = 0,0209$ ; ZT0:  $Z = -0,722$ ,  $p = 0,4705$ , n.s.; ZT16:  $Z = 0$ ,  $p > 0,9999$ , n.s.; ZT20:  $Z = -1,443$ ,  $p = 0,1489$ , n.s.).

Im caudalen Bereich des Kerngebietes galten für Maxima und Minima die gleichen Zeitpunkte wie im medialen Segment, allerdings war die Amplitude hier im Vergleich deutlich geringer. Es ließ sich wieder ein paralleler Verlauf darstellen, wobei sich das Maximum bei den arrhythmischen Tieren über einen Zeitraum von etwas 8 Stunden hinzog (ZT0 bis ZT8). Zum Zeitpunkt ZT0 konnte bei den arrhythmischen Tieren ein signifikant höheres Niveau an immunreaktiven Zellen nachgewiesen werden als bei den rhythmischen Tieren ( $Z = -2,309$ ;  $p = 0,0209$ ).

Insgesamt war die Anzahl der cFOS-positiven Zellen bei den arrhythmischen Tieren tendenziell höher. Der Zeitpunkt ZT20 markiert bei beiden Gruppen im medialen und caudalen Bereich ein markantes Minimum.

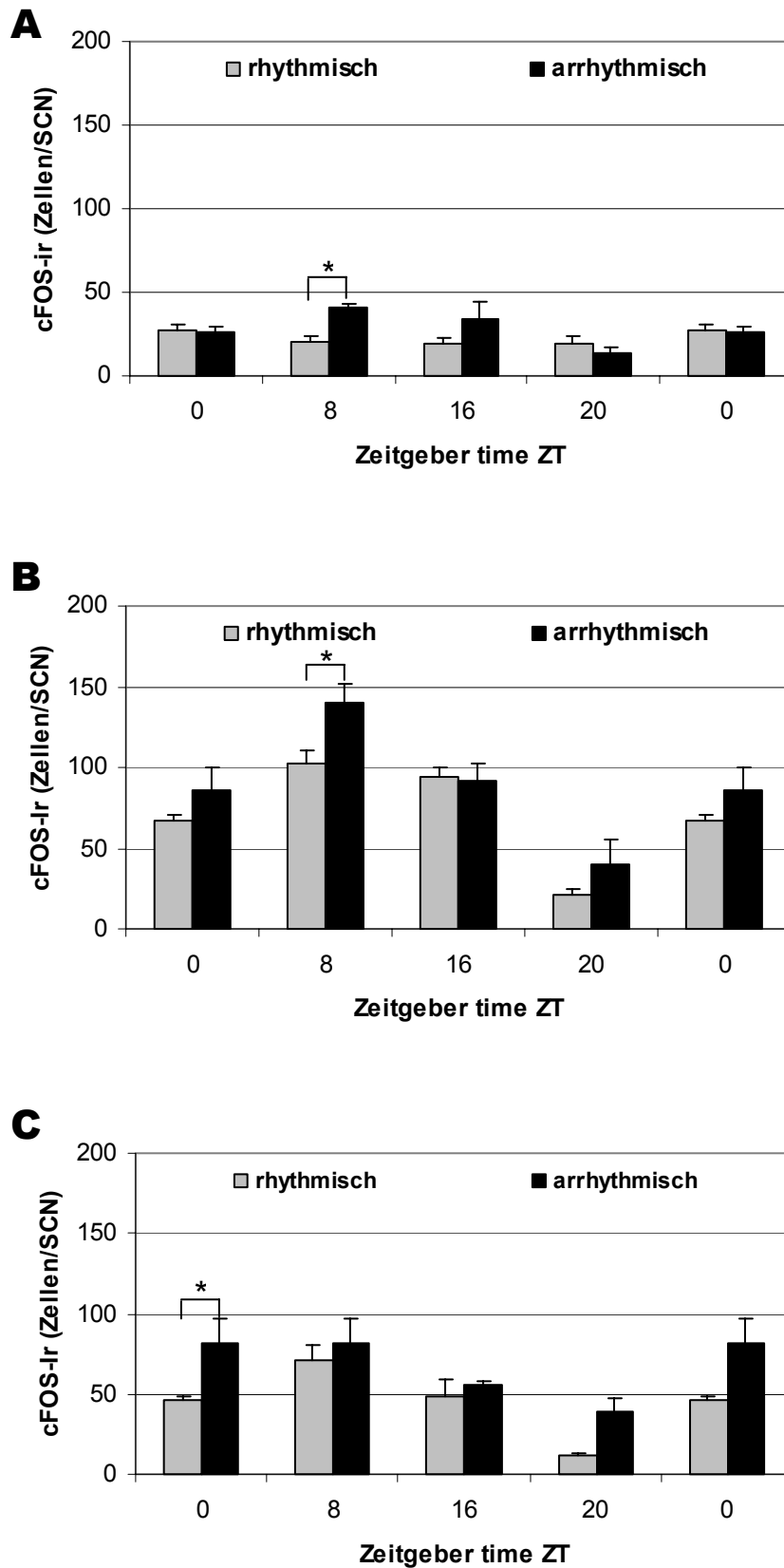


Abb.51: Vergleich der Anzahl an cFOS-immunreaktiven Zellen im rostralen (A), medialen (B) und caudalen (C) Bereich eines SCN von rhythmischen und arrhythmischen alten Zwerghamstern, *Phodopus sungorus*. Alle Datenpunkte sind als Mittelwerte  $\pm$  SEM dargestellt.  $n = 4$ .  $p < 0,05$ .

### 3.2.1.5 Glutamatrezeptor NMDA-R1 (=NR1)

Insgesamt haben die NMDA-Rezeptoren aufgrund ihrer außergewöhnlichen Eigenschaften vielfältige Funktionen im Organismus; in dieser Arbeit sind sie von besonderem Interesse, weil sie die von den Augen aufgenommene Lichtinformation vermitteln, die als Glutaminsignal via retinohypotalamischen Trakt an den Suprachiasmatischen Nucleus (SCN) herangeleitet wird. Angesichts unveröffentlichter Voruntersuchungen von A. HAMPEL (1999/2000) an cFOS, gab es Grund zur Annahme, dass es bei arrhythmischen Tieren zu einer Verringerung des Lichtinputs kommt. Deshalb sollte in diesem Experiment mit immunhistochemischen Methoden überprüft werden, ob und in wie weit sich im SCN die Anzahl von NMDA-Rezeptoren im Verlauf eines Tages ändern und ob sich Alter und arrhythmisches lokomotorisches Verhalten auf diesen Rezeptor auswirkt. Der NR1-Rezeptor wurde aufgrund seines ubiquitären Vorkommens im SCN für diese Untersuchung ausgewählt. Durchgeführt wurden die Untersuchungen an diesem NMDA-Rezeptoren im SCN junger adulter Zwerghamster.

Um zunächst zu überprüfen, ob NR1 überhaupt im SCN von *Phodopus sungorus* vorkommt, wurde mittels RT-PCR überprüft, ob sich die cDNA dieses Rezeptors nachweisen lässt. Neben verschiedenen anderen Gewebekomogenaten für weitere Fragestellungen wurden Gewebekomogenate verschiedener Zeitgeberzeiten von PVN (Positiv-Kontrolle), Skelettmuskeln (Negativ-Kontrolle) und von SCN aufgearbeitet und ausgewertet (Tab.3, Abb.52). So war ein eindeutiger Nachweise der cDNA von NR1 (ca. 655 Basenpaare) im SCN möglich.

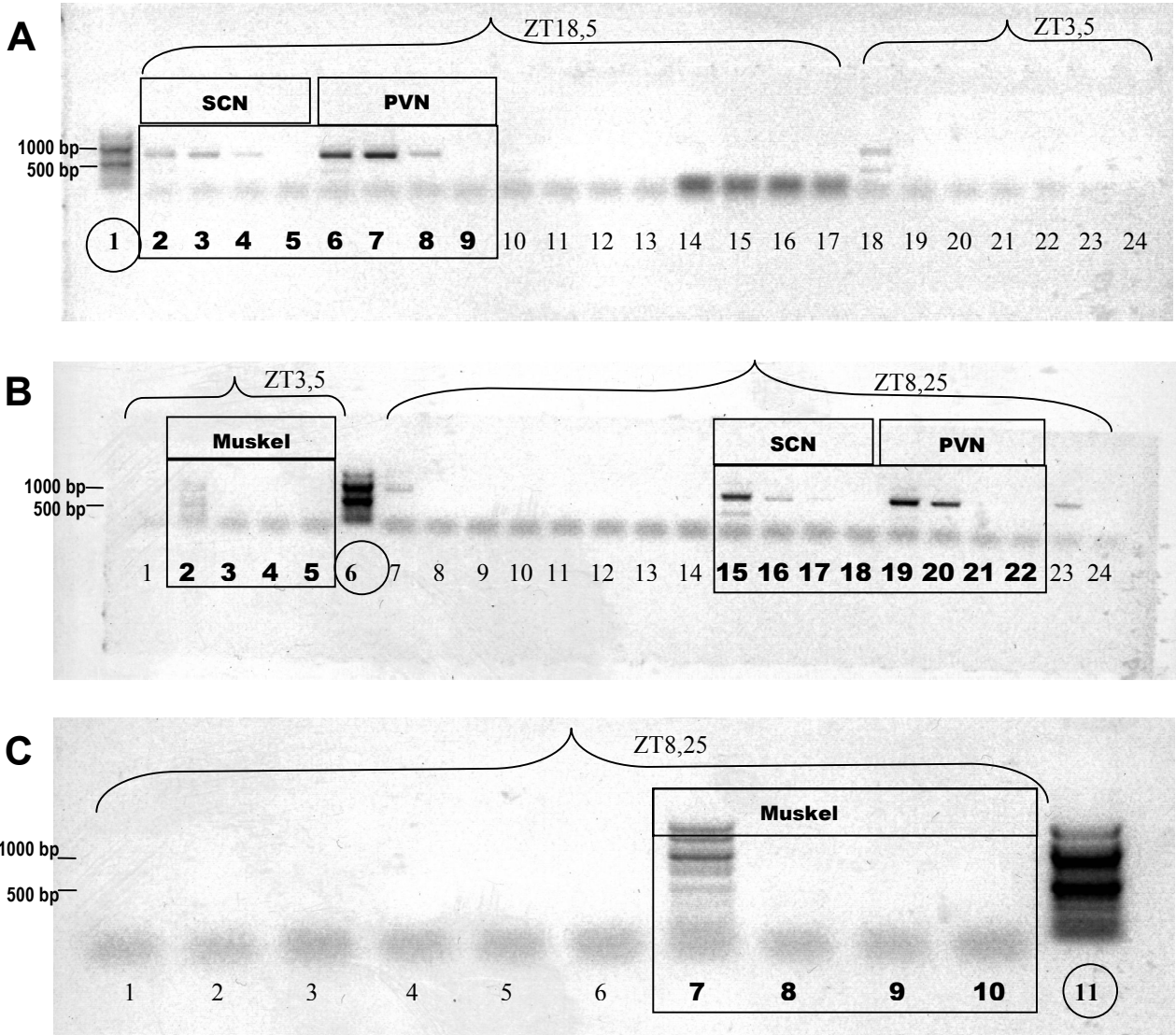


Abb.52 : Elektrophoretischer Nachweise der cDNA des Nmda-R1 Rezeptors in verschiedenen Geweben von *Phodopus sungorus*. **(A)** Gel 1: 1= 100bp-Marker. 2-5 = SCN. 6-9 = PVN. 10-13 = Cortex. 14-17 = Pankreas. 18-21 = SCN. 22-24 = PVN. Temperaturgradient über jeweils 4 Proben: 60° → 61,6°C → 65,4°C → 70,4°C. **(B)** Gel 2: 1 = PVN. 2-5 = Skelettmuskel. 6 = 100bp-Marker. 7-10 = Cortex. 11-14 = Pankreas. 15-18 = SCN. 19-22 = PVN. 23-24 = Cortex.Temperaturgradient über jeweils 4 Proben: 1-5 = 60°C → 61,6°C → 65,4°C → 70,4°C. 7-24 = 60°C → 62,7°C → 64,6°C → 70°C. **(C)** Gel 3 (vergrößerte Darstellung, da auf diesem Gel nur 11 Banden): 1-2 = Cortex. 3-6 = Pankreas. 7-10 = Muskel. 11 = 100bp-Marker. Temperaturgradient über jeweils 4 Proben: 60°C → 62,7°C → 64,6°C → 70°C.



Tab.3: Nachweis der cDNA von NR1 zu verschiedenen Zeitgeberzeiten und in verschiedenen Geweben von *Phodopus sugorus* mittels RT-PCR. +: durch Elektrophorese nachgewiesen. -: Elektrophoretisch nicht nachweisbar.

Zeitgeberzeit (ZT)	3,5				8,25				18,5			
Annealing-Temperatur [°C]	60	61,6	65,4	70,4	60	62,7	64,6	70	60	61,6	65,4	70,4
SCN	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+	-
PVN (positiv Kontrolle)	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+	-
Skelettmuskel (negativ Kontrolle)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Es folgte der Nachweis des NR1-Rezeptors auf Proteinebene. Mittels *Western Blots* wurde das Vorkommen und gleichzeitig auch die Spezifität des polyclonalen Antikörpers überprüft. Neben wenigen anderen Banden markierte der polyclonale Antikörper sowohl in den Kontrollgeweben (Abb.53) als auch im SCN eine Bande von etwa 120 kDA (entsprechend des Farbstandards), die dem Molekulargewicht von NR1 entspricht. Damit war auch auf Proteinebene eindeutig das Vorkommen von NR1 im SCN nachgewiesen, auch wenn sich die Bande im Vergleich zu den Kontrollgeweben nur sehr schwach darstellte. Außerdem konnte von einer Antikörperspezifität ausgegangen werden.

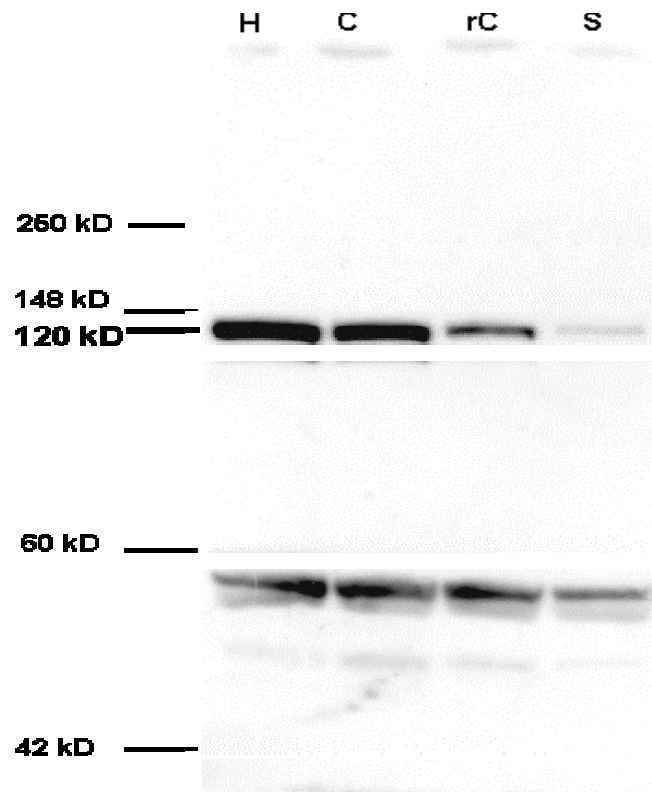


Abb.53: Immunmarkierung des *Western Blots* mit einem Antikörper gegen NR1 bei *Phodopus sungorus*. H = *Hippocampus*. C = cerebraler Cortex. rC = rhinaler Cortex. S = Suprachiasmatischer Nucleus.

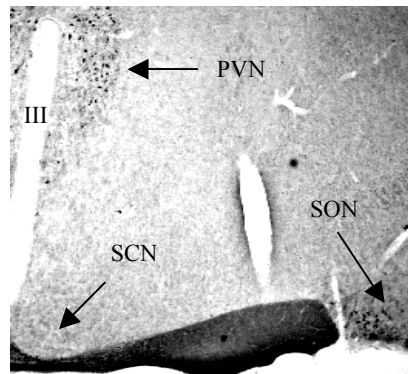
Um das Protein abschließend auf zellulärer Ebene im Tagesgang nachzuweisen, wurden Kryostatschnitte nach einem immunhistochemischen Standardprotokoll (Kochen in Citratpuffer) gefärbt. Mit diesem Protokoll konnte NR1 jedoch zu keinem Zeitpunkt im SCN nachgewiesen werden wohingegen er im *Nucleus supraopticus* (SON) und im *Nucleus paraventricularis* (PVN) deutliche spezifische Färbungen anzeigte (Abb.54, Tab.4). Daraufhin wurde die Methodik überprüft und mehrfach variiert; auch durch diese Maßnahmen konnte keine Reaktivität von NR1 im SCN gezeigt werden (Tab.4 und Abb.54). Um auszuschließen, dass die Kryoprotektion mit dem Antikörper interagiert, wurde neben den eingefrorenen Schnitten auch frisches Gewebe untersucht; hierbei wurde parallel eine Kontrollfärbung an C57BL6/J-Mäusen (ZTL) durchgeführt. Bei dem frischen Gewebe zeigte sich eine deutlich spezifische Färbung in SCN der Maus, wohingegen beim Zwerghamster auch hier wieder keine Färbung zu erkennen war (Tab.4 und Abb.54).

Tab.4 : Zellfärbungen unter verschiedenen immunhistochemischen Färbeprotokollen gegen NR1 bei *Phodopus sungorus* und C57BL6/J-Mäusen (ZTL) im Hypothalamus.\* = PFA-fixiertes, in Kryoprotektion gelagertes Gewebe. \*\* = frisches Gewebe.+ = deutliche Immunreaktion. (+) = schwache Immunreaktion. - = keine Immunreaktion.

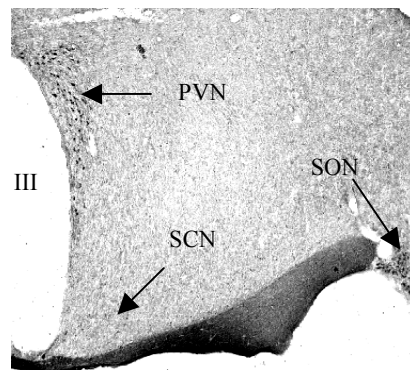
	Free floating	Kochen in Citratpuffer	Kochen in 0,5% PFA	3% Triton nach Citratpuffer	Eisessig-EtOH	ohne kochen	
		<i>Phodopus</i> *				<i>Phodopus</i> ** C57BL6/J**	
SCN	Zellen wurden mit Ni-DAB nicht angefärbt	-	Gewebe komplett zerstört	-	-	-	+
PVN		+		+	+	(+)	(+)
SON		+		(+)	+	+	(+)

*Phodopus sungorus**C57BL6/J*

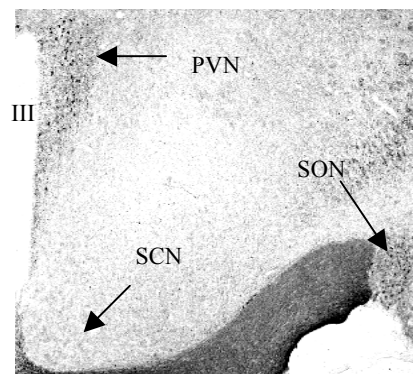
Kryoschnitt:  
Kochen in  
Citratpuffer



Kryoschnitt:  
3% Triton  
nach  
Citratpuffer



Kryoschnitt:  
Behandlung  
mit Eisessig-  
EtOH



Frisches  
Gewebe:  
ohne kochen

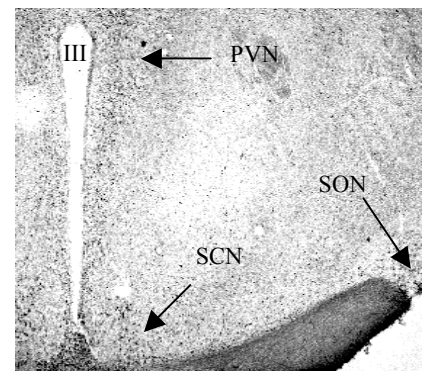
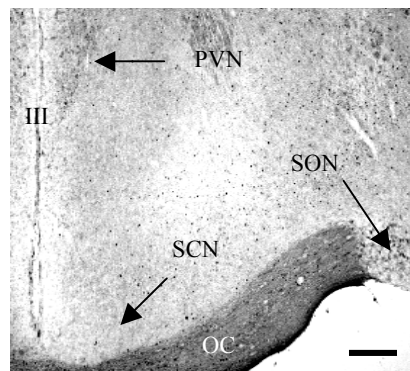


Abb.54: Immunfärbung gegen NR1 im Hypothalamus von *Phodopus sungorus* und B57BL6/J-Mäusen. OC = *Chiasma opticum*. III = 3. Ventrikel. SON = *Nucleus supraopticus*. PVN = *Nucleus paraventricularis*. SCN = *Nucleus suprachiasmaticus*. Balken = 200µm.

### **3.2.2 Räumliche Verteilung**

Durch diese Untersuchung sollte ermittelt werden, ob die Verteilung der immunreaktiven Zellen im SCN homogen oder heterogen vorliegt. Dabei wurden Veränderungen sowohl auf der zeitlichen (ZT0-ZT20) als auch auf der rostro-caudalen Achse betrachtet und ausgewertet. Die immunreaktiven Zellen wurden in Anlehnung an die klassische Core/Shell-Einteilung definierten Quadranten (I-IV) innerhalb des SCN zugeordnet (siehe 4.3.1.4): Vertikal wurde unterschieden nach medial (= ventrikelnah) bzw. lateral (ventrikelfern) und auf der horizontalen Achse nach dorsal bzw. ventral; auf diese Weise konnten vier Quadranten (dorso-lateral = I, dorso-medial = II, ventro-lateral = III, ventro-medial = IV) charakterisiert werden. In den folgenden Darstellungen wurde exemplarisch jeweils der rechte SCN abgebildet; d.h. die Quadranten I und III sind ventrikelfern, während die Quadranten II und IV am 3. Ventrikel lokalisiert sind.

#### **3.2.2.1 mPER2**

##### **JUNGE ADULTE HAMSTER**

Insgesamt konnte eine deutlich heterogene Verteilung der PER2-immunreaktiven Zellen im SCN der jungen Hamster ermittelt werden. Dabei trat bei beiden Versuchsgruppen der mediale Bereich des SCN im Vergleich zu rostral und caudal durch besonders hohe Immunreaktivität gegen mPER2 hervor. Weiterhin waren im medialen und mehr noch im caudalen SCN deutliche Tendenzen zu einer ventrikalnahen Zellkonzentration zu erkennen; dabei war die Zelldichte im II. Quadranten (dorso-medial) besonders auffällig.

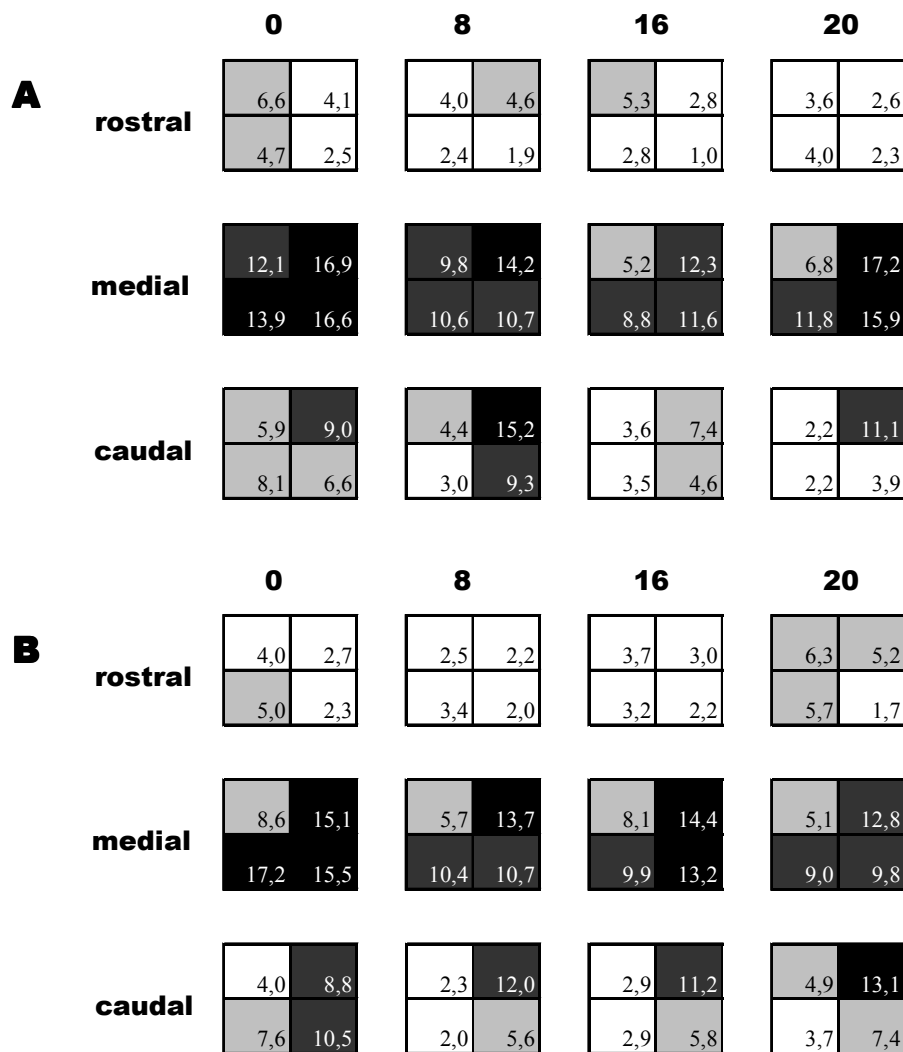


Abb.55: Exemplarische Darstellung der Verteilung von Immunreaktivität gegen mPER2 am rechten SCN bei jungen adulten Dsugarischen Zwerghamstern auf zeitlicher und rostro-caudaler Achse. A: Rhythmische Tiere. B: Arrhythmisch Tiere. n = 4. Der Farbcode ergibt sich aus dem maximalen Summen der Kennzahlen für diesen Antikörper (vgl. 4.3.1.4) dividiert durch 4: Weiß = 0-4,3; hellgrau = 4,4 – 8,6; mittelgrau = 8,7 – 12,9; schwarz = 13,0 – 17,2

### Jung rhythmisch

Bei den jungen rhythmischen Tieren (Abb.55A) war im rostralen SCN in allen Quadranten gleichbleibend wenig Immunreaktivität zu ermitteln; es gab in diesem Bereich keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Zeitpunkten.

Der mediale SCN zeichnete sich wie bereits erwähnt durch eine besonders hohe Konzentration an immunreaktiven Zellen aus. Die geringste Konzentration fand sich zu allen Zeitpunkten im dorso-lateralen Quadranten (I), während die höchste Konzentration im dorso-medialen Bereich (II) zu finden war. In diesen beiden Quadranten ließ sich auch ein Tagesgang nachzeichnen mit einem Minimum zu ZT16. Die Maxima waren um vier Stunden

gegeneinander verschoben (Quadranten I: ZT0; Quadranten II: ZT 20). Weiterhin zeichnete sich auch der gesamte ventrale Bereich (III, IV) durch eine hohe mPER2-Konzentration aus; besonders ausgeprägt zeigte sich dies in der Scotophase (ZT0 und ZT20). Statistisch relevante Unterschiede ließen sich nur für den Quadranten I feststellen: Die Zellkonzentration war in diesem Segment zum Zeitpunkt ZT0 signifikant höher als zum Zeitpunkt ZT16 ( $F(3,13) = 3,52, p = 0,046$ ).

Im caudalen SCN-Segment zeigte sich - wie bereits im medialen Bereich beschrieben - eine erhöhte Konzentration der mPER2-immunreaktiven Zellen im dorso-medialen Quadranten (II). Während der Photophase zeigte sich weiterhin die Tendenz zu einer medialen Ansammlung der immunreaktiven Zellen (Quadranten II und IV). Statistisch signifikante Unterschiede der einzelnen Quadranten auf der zeitlichen Achse ließen sich im caudalen SCN nicht ermitteln.

### **Jung arrhythmisch**

Das Bild, das sich bei den jungen arrhythmischen Zwerghamstern zeigte, war dem der rhythmischen Tiere sehr ähnlich (Abb.55B): Im rostralen SCN war in allen Quadranten nur sehr wenig Immunreaktivität gegen mPER2 zu ermitteln. Die Unterschiede der einzelnen Quadranten zueinander auf der zeitlichen Achse waren nicht statistisch signifikant.

Im medialen SCN wiederholte sich für den I. Quadranten das Ergebnis der rhythmischen Tiere: Er zeigte über alle Zeitpunkte die geringste Konzentration an mPER2-positiven Zellen. Außerdem zeigte sich von neuem eine starke Ansammlung der Zellen in den medialen Quadranten (II und IV). Im Hinblick auf den zeitlichen Verlauf der einzelnen Quadranten konnte folgendes Ergebnis ermittelt werden: In den Quadranten I, II und IV konnte - ähnlich der Ergebnisse der zeitlichen Verteilung (s.o.) - die Tendenz zur Doppelgipfligkeit verfolgt werden; im Quadrant III jedoch zeigte sich ein Tagesgang mit nur einem Minimal- und einem Maximalwert (Max. ZT0, Min. ZT 20), der sich auch statistisch untermauern ließ: Die Zellkonzentration zu ZT0 war signifikant höher als die zum Zeitpunkt ZT16 und ZT20 ( $F(3,13) = 5,338, p = 0,0129$ ). Außerdem lagen auch bei Quadrant IV signifikante Unterschiede vor: Die Differenz zwischen ZT0 und ZT20 war statistisch signifikant ( $F(3,13) = 4,403, p = 0,024$ ).

Im caudalen SCN zeigte sich erneut die Tendenz zu einer erhöhten Konzentration der mPER2-immunreaktiven Zellen im dorso-medialen Quadranten (II) und einer geringen Konzentration im dorso-lateralen Quadranten (I). Es gab insgesamt die Tendenz einer Ansammlung immunpositiver Zellen im medialen SCN (Quadranten II und IV), die besonders

während der Photophase (ZT8 und ZT16) auffiel. Auffällig waren weiterhin die erhöhten Zellkonzentrationen im den ventralen Quadranten (III und IV) zum Zeitpunkt ZT0: Für den Quadranten III galt, dass die Zellzahlen zu ZT0 signifikant höher waren, als zu den anderen drei Zeitpunkten ( $F(3,12) = 7,101$ ,  $p = 0,0053$ ). Für den Quadranten IV erwies sich die Zellkonzentration zu ZT0 als signifikant höher im Vergleich zu den Zeitpunkten ZT8 und ZT16 ( $F(3,12) = 4,615$ ,  $p = 0,0228$ ).

### **Vergleich Jung rhythmisch vs. jung arrhythmisch**

Der rostrale SCN ist in seiner räumlichen Strukturierung auf der zeitlichen Achse bei beiden Versuchsgruppen ähnlich. Es gab keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Quadranten der beiden Gruppen. Im medialen und caudalen SCN war bei beiden Gruppen eine Tendenz zur Zellkonzentration in den ventrikelnahen, medialen Quadranten (II und IV) zu erkennen. Es gab bis auf wenige Ausnahmen keine deutlichen Unterschiede zwischen der Anzahl der Zellen in diesen Quadranten. Lediglich zum Zeitpunkt ZT20 konnte in den Quadranten II ( $Z = -2,449$ ,  $p = 0,0143$ ) und IV ( $Z = -2,449$ ,  $p = 0,0143$ ) eine statistisch signifikant höher Anzahl an Zellen bei den rhythmischen Tieren ermittelt werden. Für den Quadranten I galt, dass er vergleichsweise wenig immunreaktive Zelle beinhaltete; bei den jungen arrhythmischen Tieren war dies noch deutlicher zu erkennen als bei der rhythmischen Versuchsgruppe. Ein statistisch relevanter Unterschied bezüglich dieses Quadranten konnte nur zum Zeitpunkt ZT8 ermittelt werden: Hier war die Zellkonzentration bei den rhythmischen Tieren deutlich höher als bei den arrhythmischen Tieren ( $Z = -2,082$ ,  $p = 0,0373$ ).

### **ALTE HAMSTER**

Für beide Versuchsgruppen der alten Hamster gilt, dass die Verteilung der immunreaktiven Zellen gegen mPER2 der der jungen Tiere sehr ähnelt. Auch hier war eine besonders hohe Konzentration an mPER2-immunreaktiven Zellen im medialen SCN angesiedelt (Abb.56). Außerdem konnte auch bei den alten Tieren sowohl im medialen als auch im caudalen SCN eine ausgeprägte Tendenz zur Konzentration der Zellen um den dritten Ventrikel (Quadranten II und IV) ermittelt werden.



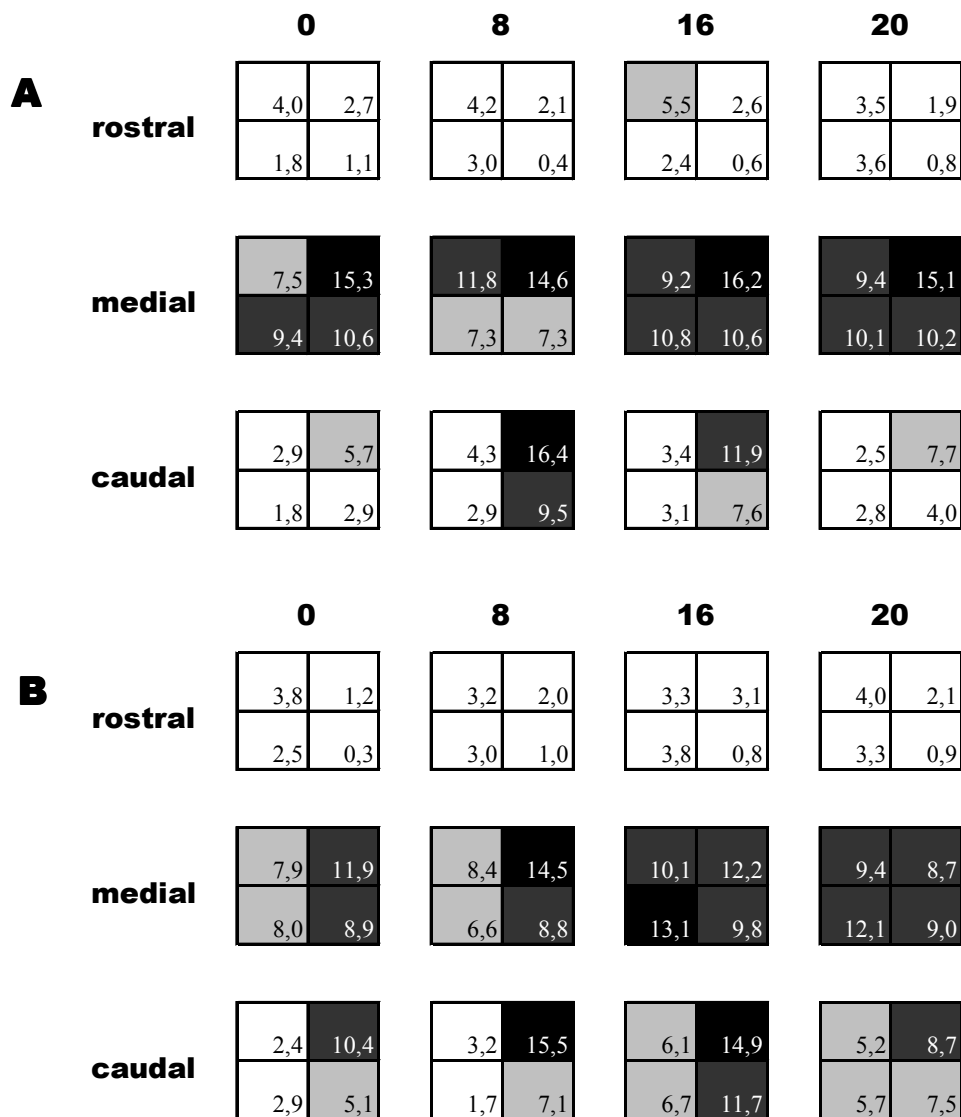


Abb.56: Exemplarische Darstellung der Verteilung von Immunreaktivität gegen mPER2 am rechten SCN bei alten Dsungarischen Zwerghamstern auf zeitlicher und rostro-caudaler Achse. A: Rhythmische Tiere. B: Arrhythmisch Tiere. n = 4. Der Farbcode ergibt sich aus dem maximalen Summen der Kennzahlen für diesen Antikörper (vgl. 4.3.1.4) dividiert durch 4: Weiß = 0-4,3; hellgrau = 4,4 – 8,6; mittelgrau = 8,7 – 12,9; schwarz = 13,0 – 17,2.

### Alt rhythmisch

Der rostrale Bereich des SCN zeichnete sich auch bei der Versuchsgruppe der alten rhythmischen Tiere durch eine relativ Verteilung der Zellen aus. Die Zellkonzentration war in allen Quadranten auf der zeitlichen Achse gering und es gab entsprechend auch keine statistisch relevanten Unterschiede (Abb.56A).

Im medialen SCN war besonders die hohe Konzentration an Zellen im dorso-medialen Quadranten (II) auffällig. Weiterhin war zum Zeitpunkt ZT8 bemerkenswert, dass im

ventralen SCN (Quadrant III und IV) deutlich weniger Zellen konzentriert waren als zu den anderen Zeitpunkten. Die Unterschiede erwiesen sich jedoch nicht als statistisch signifikant. Der caudale SCN zeichnete sich hauptsächlich durch die erhöhte dorso- und ventro-mediale Konzentration (Quadranten II und IV) der mPER2-immunreaktiven Zellen zu den Lichtzeitpunkten (ZT8 und ZT16) aus. Für diese beiden Quadranten ließ sich auch ein Tagesgang bestimmen mit parallelen Maxima (ZT8) und Minima (ZT0). Statistisch signifikante Unterschiede konnten jedoch nur beim Vergleich des Quadranten II auf der zeitlichen Achse ermittelt werden: Zum Zeitpunkt ZT8 war die Anzahl der Zellen signifikant höher als zu den Zeitpunkten ZT 0 und ZT20 ( $F(3,14) = 9,247, p = 0,0013$ ).

### **Alt arrhythmisch**

Auch bei den alten arrhythmischen Tieren zeigte der rostrale Bereich keine Strukturierung durch Konzentrationsverschiebungen. Es gab ferner wieder keine statistisch nachweisbaren Unterschiede zwischen einzelnen Quadranten auf der zeitlichen Achse.

Der mediale Bereich stellte sich im Vergleich zu den rhythmischen Tieren diffuser dar: Hier konnte bis auf die Zeitpunkte ZT0 und ZT8 keine erhöhte Konzentration der Zellen um den 3. Ventrikel (II und IV) nachgewiesen werden. Zu den Zeitpunkten ZT16 und ZT20 zeigte sich eine einheitliche Verteilung der immunpositiven Zellen über alle vier Quadranten. Bis auf den ventro-medialen (IV) ließ sich für die anderen drei Quadranten tendenziell ein Tagesgang nachweisen, deren Maxima und Minima jedoch nicht parallel verliefen (Abb.56B). Statistisch lässt sich der Tagesgang jedoch nur im ventro-lateralen Quadranten (III) belegen: Zum Zeitpunkt ZT8 sind signifikant weniger Zellen vorhanden als zu den Zeitpunkten ZT16 und ZT20 ( $F(3,18) = 5,115, p = 0,0098$ ).

Im caudalen SCN fallen die ventrikelnahen Quadranten (II und IV) analog zu den rhythmischen Tieren durch erhöhte Immunreaktivität gegen mPER2 auf. Der Schwerpunkt liegt dabei erneut im dorso-medialen Quadranten (II). Besonders deutlich ist die Konzentration auf die medialen Quadranten (II und IV) zu den Zeitpunkten ZT0 und ZT8. Zum Zeitpunkt ZT20 haben sich die Konzentrationsunterschiede fast komplett aufgelöst und es gibt eine fast homogene Verteilung der immunreaktiven Zellen über alle vier Quadranten (Abb.56B). Statistisch signifikante Unterschiede ließen sich sicher für den Quadranten III und bedingt für IV feststellen: Die Anzahl der Zellen war zu ZT16 signifikant höher als zu den Zeitpunkten ZT0 (IV) bzw. ZT8 (III) (III:  $F(3,20) = 4,065, p = 0,0209$ . IV:  $F(3,20) = 3,098, p = 0,05$ ).

**Vergleich alt rhythmisch vs. alt arrhythmisch**

Generell zeigen die Konzentrationsmuster für die alten rhythmischen und arrhythmischen Tiere ein konformes Bild: Im rostralen SCN weisen beide Gruppen nur sehr wenig Immunreaktivität gegen mPER2 auf, wohingegen es eine starke Konzentration an mPER2 im medialen Segment des SCN gibt. Weiterhin zeigen beide Gruppen im medialen und caudalen SCN die Tendenz zu einer erhöhten Konzentration an mPER2 in den ventrikelnahen Quadranten (II und IV). Statistisch signifikante Unterschiede gibt es nur wenige zwischen den beiden Versuchsgruppen: Lediglich zu ZT20 kann in den Quadranten II und IV ein solcher Unterschied nachgewiesen werden (II:  $Z = -2,03$ ,  $p = 0,0424$ . IV:  $Z = -2,269$ ,  $p = 0,0233$ ).

**VERGLEICH JUNG VS. ALT**

Beim Vergleich der Altergruppen können weder zwischen den rhythmischen noch zwischen den arrhythmischen Tieren auffallende Unterschiede in der Konzentration der mPER2-immunreaktiven Zellen ermittelt werden (Abb.55 und 56). Die Tendenzen waren bei allen vier Versuchsgruppen auffällig ähnlich: Im rostralen Bereich gab es wenig mPER2-immunreaktive Zellen, während im medialen Bereich eine besonders hohe Konzentration dieser Zellen vorlag. Sowohl im medialen als auch im caudalen Bereich des SCN gab es eine Ballung der immunreaktiven Zellen um den dritten Ventrikel (Quadrant II und IV). Signifikante Unterschiede konnten bei den rhythmischen Tieren in den Quadranten II,III und IV ermittelt werden; so gab es im caudalen SCN signifikante Unterschiede beim Vergleich der Quadranten II und III (II, ZT20:  $Z = -2,205$ ,  $p = 0,0275$ . III, ZT0:  $Z = -2,205$ ,  $p = 0,0275$ ). Für Quadrant III ließen sich außerdem noch Unterschiede zu ZT0 im rostralen Bereich belegen ( $Z = -2,132$ ,  $p = 0,033$ ). Im IV. Quadranten schließlich konnten zu ZT20 signifikante Differenzen im medialen Bereich nachgewiesen werden ( $Z = -2,449$ ,  $p = 0,0143$ ). Bei den arrhythmischen Tieren ließen sich statistisch signifikante Unterschiede zu den Zeitpunkten ZT0 und ZT20 nachweisen: Zum Zeitpunkt ZT0 erwies sich der Quadrant IV im rostralen ( $Z = -2,165$ ,  $p = 0,0304$ ) und medialen ( $Z = -2,309$ ,  $p = 0,0209$ ) SCN als signifikant unterschiedlich, außerdem gab es im medialen Bereich auch im Quadrant III zu diesem Zeitpunkt signifikante Unterschiede ( $Z = -2,021$ ,  $p = 0,0433$ ). Statistische Unterschiede zum Zeitpunkt ZT20 lagen im medialen SCN bei den Quadrant I und II vor (I:  $Z = -2,03$ ,  $p = 0,0424$ . II:  $Z = -2,192$ ,  $p = 0,0284$ ).

### 3.2.2.2 cFOS

#### JUNGE ADULTE HAMSTER

##### **Jung rhythmisch**

Bei den jungen rhythmischen Tieren ließ sich im rostralen SCN über alle Zeitpunkte als Trend verfolgen (Abb.57A), dass die maximale Konzentration an immunreaktiven Zellen im dorso-lateren Bereich (I) angesiedelt war.

Im rostralen Bereich ließ sich für keinen der Quadranten ein Tagesgang ermitteln und es gab keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den Quadranten auf der zeitlichen Achse.

In der medialen Sektion konnte zu den Zeitpunkten der Dunkelphase (ZT0 und 20) lateral die stärkste Ansammlung an Zellen ermittelt werden; in der Hellphase war der Schwerpunkt der Konzentration eher im ventralen Bereich zu finden (ZT8: III; ZT16: III und IV). Für den ventralen Bereich konnte auch ein deutlicher Tagesgang ermittelt werden: Der ventro-mediale Quadrant (IV) hatte sein Maximum an Immunreaktivität bei ZT16 und ein Minimum bei ZT0. Der ventro-laterale Bereich zeigte das gleiche Minimum, aber ein um 8 Stunden nach vorn verschobenes Maximum (ZT8). In Quadrant III gab es zu ZT8 signifikant mehr Immunreaktivität als zu ZT0 und ZT20 ( $F(3,12) = 6,667$ ,  $p = 0,0067$ ) und im IV. Quadranten lag die Anzahl immunreaktiver Zellen zu ZT16 signifikant höher, als zu allen anderen Zeitpunkten ( $F(3,12) = 8,664$ ;  $p = 0,0025$ ). Für die dorsalen Quadranten (I und II) konnte kein Tagesgang ermittelt werden.

Im caudalen Bereich veränderte sich die Verteilung der immunpositiven Zellen im Vergleich zur medialen Sektion gravierend: Zu den Zeitpunkten in der Scotophase (ZT0 und ZT20) war eine gleichmäßige Verteilung zu beobachten, während sich die Zeitpunkte der Photophase durch eine Zellansammlung im gesamten dorsalen und medialen Bereich auszeichnete. Es war in keinem Segment ein Tagesgang zu beobachten. Für den Quadranten II ließ sich jedoch ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen ZT0 und ZT16 ( $F(3;11) = 4,300$ ,  $p = 0,0309$ ) ermitteln.

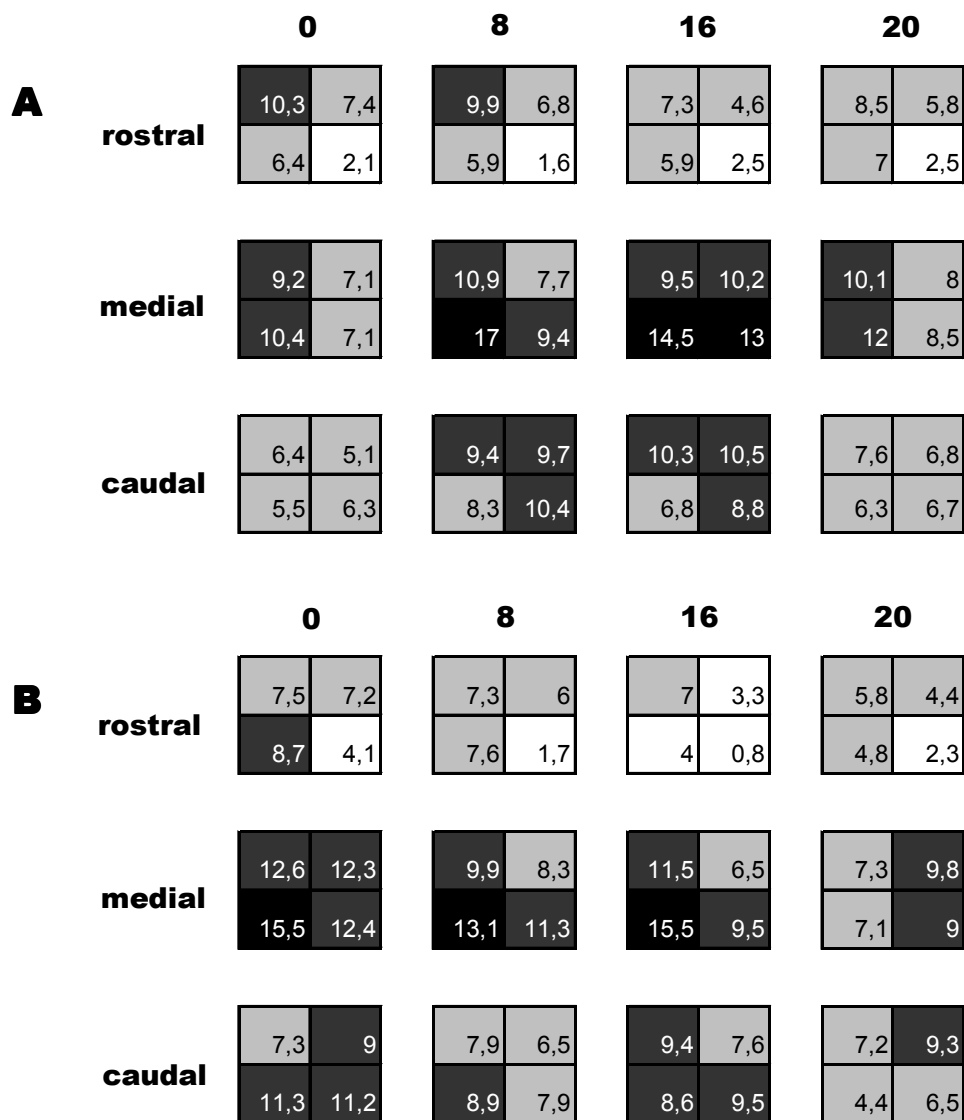


Abb.57: Exemplarische Darstellung der Verteilung von Immunreaktivität gegen cFOS am rechten SCN bei jungen adulten Dsugarischen Zwerghamstern auf zeitlicher und rostro-caudaler Achse. A: Rhythmische Tiere. B: Arrhythmisch Tiere. n = 4. Der Farbcode ergibt sich aus dem maximalen Summen der Kennzahlen für diesen Antikörper (vgl. 4.3.1.4) dividiert durch 4: Weiß = 0-4,25; hellgrau = 4,35 – 8,5; mittelgrau = 8,6 – 12,75; schwarz = 12,85 – 17,0

### Jung arrhythmisch

Im Vergleich zur Verteilung der immunreaktiven Zellen bei den jungen rhythmischen Tieren, zeigte sich bei den jungen arrhythmischen Tieren ein deutlich diffuseres Bild (Abb.57B). Im rostralen Segment konnte kein eindeutiger Trend der Zellkonzentration hinsichtlich eines bestimmten Quadranten bestimmt werden. Im ventro-lateralen Quadranten (III) wurde ein Tagesgang mit einem Maximum bei ZT0 und einem Minimum bei ZT16 ermittelt. Die maximale Konzentration an immunreaktiven Zellen zu ZT0 war statistisch signifikant höher

als die zu ZT16 und ZT20 ( $F(3,11) = 9,126$ ;  $p = 0,0025$ ); außerdem gab es in diesem Quadranten noch eine statistische Signifikanz zwischen den Zeitpunkten ZT8 und ZT16. Schließlich war im II. Quadranten die Anzahl immunpositiver Zellen zum Zeitpunkt ZT16 signifikant niedriger als zu den Zeitpunkten ZT0 und ZT8 ( $F(3,11) = 6,875$ ;  $p = 0,0071$ ). Im medialen SCN war - bis auf ZT20 - ventro-lateral (III) die maximale Anhäufung immunpositiver Zellen zu finden. ZT0 zeichnete sich in allen Quadranten durch eine besonders hohe Immunreaktivität aus, während ZT20 über alle Quadranten vergleichsweise wenig cFOS-Immunreaktivität aufwies. Es war im medialen Segment des SCN kein Tagesgang zu erkennen, wohl aber statistisch signifikante Unterschiede: Zu ZT20 zeigte sich signifikant weniger Immunreaktivität in Quadrant III als zu den Zeitpunkten ZT0 und ZT16 ( $F(3,10) = 5,956$ ,  $p = 0,0135$ ). Caudal ließ sich zu den Zeitpunkten ZT0 und ZT16 im ventralen Bereich (III u. IV) ein vergleichsweise erhöhte Zellzahl ermitteln; zu ZT0 dehnt sich diese jedoch nach medial (II) und zu ZT16 nach lateral (I) aus. Ein Tagesgang ist im caudalen SCN für keinen Quadranten zu erkennen. Bis auf den III. Quadranten ist auch kein statistisch signifikanter Unterschied im zeitlichen Verlauf zu ermitteln: Die signifikanten Differenzen im III. Quadranten lagen zwischen den Zeitpunkten ZT20 und ZT0 ( $F(3) = 5,799$ ;  $p = 0,0126$ ).

### **Vergleich jung rhythmisch vs. jung arrhythmisch**

Insgesamt ist der rostrale Bereich bei beiden Gruppen ähnlich strukturiert. Für das mediale und caudale Segment des SCN sind die Unterschiede in der Verteilung der immunreaktiven Zellen gegen cFOS zwischen den beiden Versuchsgruppen anhand der Farbskala (Abb.57) jedoch deutlich zu erkennen. Für den medialen Bereich lässt sich für beide Versuchsgruppen eine gemeinsame laterale (I und III) Konzentration der Immunreaktivität feststellen, wobei die Schwerpunkte unterschiedlich gesetzt sind. Ausnahme ist hier ZT20: Bei den rhythmischen Tieren bleibt die Hauptkonzentration in den lateralen Quadranten (I und III), während sie bei den arrhythmischen Tieren im medialen Bereich (II und IV) angesiedelt ist. Im caudalen SCN konzentriert sich bei den rhythmischen Tieren die Immunreaktivität während der Lichtphase (ZT8 und 16) in den dorsalen Quadranten (I und II); bei den arrhythmischen Tieren ist weder in der Photo- noch in der Scotophase eine auffällige Konzentration von cFOS-immunreaktiven Zellen zu erkennen.

Die genannten Unterschiede ließen sich bis auf den Zeitpunkt ZT0 im caudalen Segment (II :  $Z = -2,141$ ;  $p = 0,0339$ . III:  $Z = -2,121$ ;  $p = 0,0339$ . IV:  $Z = -2,141$ ;  $p = 0,0339$ ) und den

Zeitpunkt ZT16 im medialen SCN (IV:  $Z = - 2,221$ ;  $p = 0,0339$ ) mit dem Mann-Whitney-U Test jedoch nicht statistisch belegen.

### ALTE HAMSTER

#### **Alt rhythmisch**

Bei den alten rhythmischen Tieren ließ sich im rostralen SCN kein durchgängiges Muster in der cFOS-Konzentration erkennen (Abb.58A); generell ist in alle Quadranten im Vergleich zum medialen und caudalen SCN wenig Immunreaktivität zu erkennen. Ein Tagesgang für die einzelnen Quadranten auf der zeitlichen Achse war nicht festzustellen, ebenso wenig statistisch signifikante Unterschiede.

Im medialen SCN war in allen Quadranten besonders die geringe Konzentration an cFOS-Immunreaktivität zu ZT20 auffällig. Insgesamt lag der Schwerpunkt der Immunreaktivität in der Scotophase auf den dorsalen Quadranten (I und II); in der Photophase konnte keine einheitliche Konzentration der Zellen auf einen bestimmten Quadranten ermittelt werden. Für den ventro-lateralen (III) und den ventro-medialen (IV) Quadranten konnte ein Tagesgang ermittelt werden: In beiden Quadranten war das Minimum bei ZT20 angesiedelt; das Maximum für den III. Quadranten lag bei ZT8 und für den IV. Quadranten bei ZT16. Beim Vergleich der Zeitpunkte innerhalb dieses SCN-Segmentes konnten für alle vier Quadranten statistisch signifikante Unterschiede ermittelt werden: Im I. Quadranten lagen sie zwischen den Zeitpunkten 8 und 20 ( $F(3,12) = 4,878$ ;  $p = 0,0192$ ). In Quadrant II war die Immunkonzentration zu ZT20 signifikant geringer als zu ZT0 und ZT16 ( $F(3,12) = 4,636$ ;  $p = 0,0225$ ). In Quadrant III konnte ebenfalls zu ZT20 eine signifikant geringere Anzahl immunreaktiver Zellen ermittelt werden, als zu den anderen Zeitpunkten; außerdem lag bei ZT8 eine signifikant höhere Anzahl an immunreaktiven Zellen vor, als zu ZT0 und ZT16 ( $F(3,12) = 22,609$ ;  $p = 0,001$ ). Im IV. Quadranten schließlich konnten sowohl von ZT 0 als auch von ZT20 signifikante Unterschiede zu ZT16 bestimmt werden ( $F(3,12) = 7,929$ ,  $p = 0,0035$ ).

Im caudalen Abschnitt des SCN fällt neben einer sehr geringen Konzentration an Immunreaktivität zu ZT20 in allen Quadranten eine homogene Verteilung der Zellen auf; lediglich zu ZT8 konnte dorso-lateral (I) und ventro-medial (II) eine verstärkte Anhäufung von cFOS-positiven Zellen ermittelt werden. Ein Tagesgang war für keinen Quadranten darzustellen. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Quadranten auf der zeitlichen Achse wurden für die Quadranten I, III und IV ermittelt: In allen drei genannten

Quadranten fand sich zum Zeitpunkt ZT20 eine signifikant geringere Anzahl an immunreaktiven Zellen als zu ZT8 (I:  $F(3,11) = 5,425$ ;  $p = 0,0155$ . III:  $F(3,11) = 16,361$ ;  $p = 0,0002$ . IV:  $F(3,11) = 19,721$ ;  $p < 0,0001$ ). Im IV. Quadranten lagen auch die Zellzahlen zu den Zeitpunkten ZT0 und ZT16 signifikant über denen von ZT20 (s.o.). Außerdem war im III. Quadranten zu ZT8 signifikant mehr Immunreaktivität zu finden, als zu den Zeitpunkten ZT0 und ZT16 (s.o.).

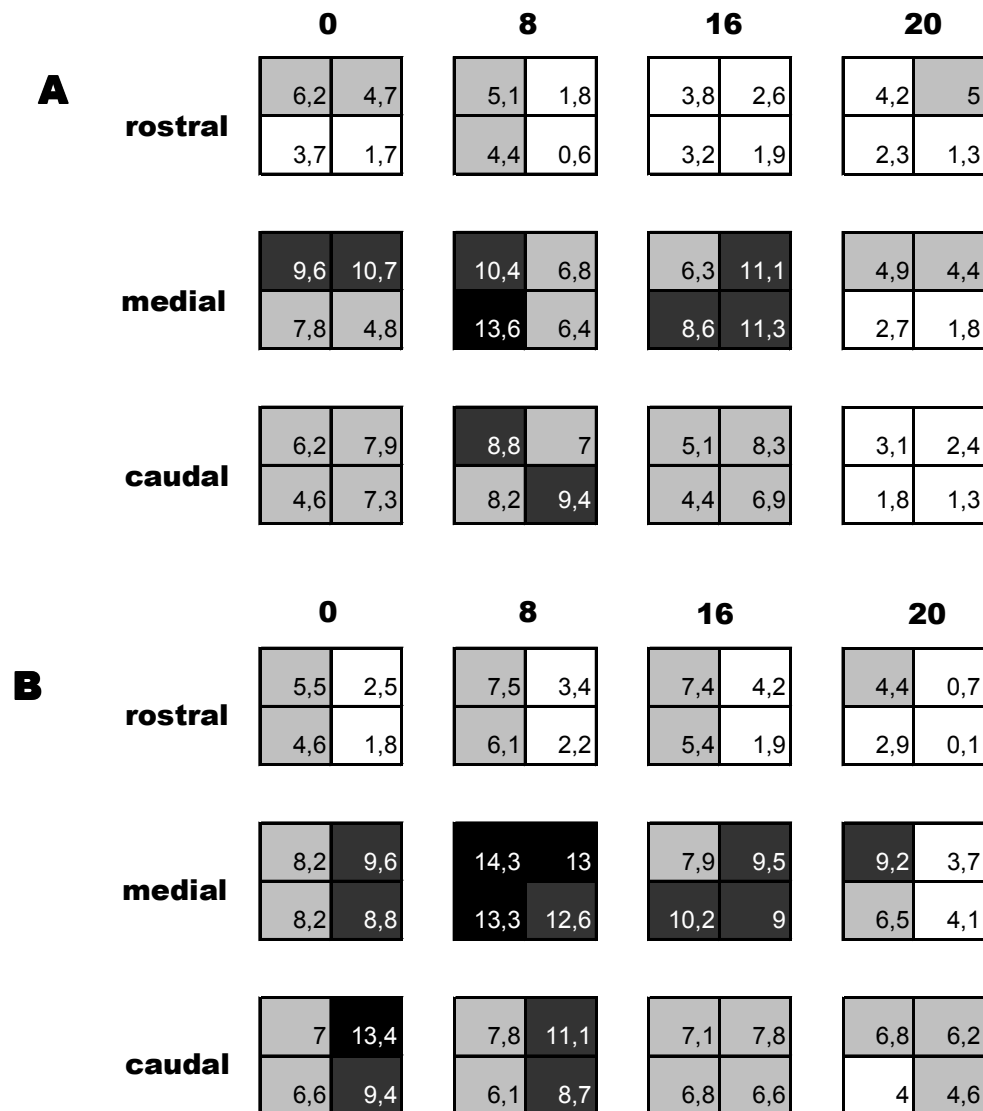


Abb.58: Exemplarische Darstellung der Verteilung von Immunreaktivität gegen cFOS am rechten SCN bei alten Dsungarischen Zwerghamstern auf zeitlicher und rostro-caudaler Achse. A: Rhythmisch Tiere. B: Arrhythmisch Tiere.  $n = 4$ . Der Farbcode ergibt sich aus dem maximalen Summen der Kennzahlen für diesen Antikörper (vgl. 4.3.1.4) dividiert durch 4: Weiß = 0-4,25; hellgrau = 4,35 – 8,5; mittelgrau = 8,6 – 12,75; schwarz = 12,85 – 17,0.



**Alt arrhythmisch**

Bei den alten arrhythmischen Tieren zeigte der rostrale Bereich einheitlich in den lateralen Quadranten (I u. III) die meisten immunreaktiven Zellen (Abb.58B). Ebenso wenig wie ein Tagesgang konnten statistisch signifikante Unterschiede der Quadranten auf der zeitlichen Achse ermittelt werden.

Im medialen SCN ist besonders die geringe Zellkonzentration in den ventrikelnahen Quadranten (II und IV) zu ZT20 auffällig. Es konnte für alle vier Quadranten ein Tagesgang beschrieben werden: Für den I. Quadranten zeigte sich ein Tagesprofil mit einem Doppelpack zu ZT8 und ZT20. Für die Quadranten II bis IV ließ sich ein mehr oder weniger ausgeprägter circadianer Verlauf ermitteln, der sein Maximum jeweils zu ZT8 und sein Minimum zu ZT20 hatte. Als statistisch signifikant ließ sich der Unterschied zwischen Minimum und Maximum jedoch nur im III. Quadranten beschreiben ( $F(3;12) = 4,698$ ;  $p = 0,0216$ ).

Im caudalen SCN war zu ZT0 und ZT8 eine Konzentration der Zellen in den ventrikelnahen Quadranten (II u. IV) zu erkennen, während zu ZT16 eine homogene und zu ZT20 ein nahezu homogene Verteilung mit einer Tendenz zu dorsal und medial (I, II u. IV) zu beobachten war. Ein Tagesgang war nur für die Quadranten II und IV zu mitteln, bei denen die höchste Konzentration an reaktiven Zellen zu ZT0 und die geringste zu ZT20 zu finden war. Statistisch konnten in diesem Segment des SCN keine Signifikanzen ermittelt werden.

**Vergleich alt rhythmisch vs. alt arrhythmisch**

Bei den alten arrhythmischen Tieren zeigten sich relativ häufig Übereinstimmungen mit den Tieren der alt-rhythmischen Versuchsgruppe (Abb.58). Im rostralen Bereich findet sich bei beiden Versuchsgruppen im Vergleich zum medialen oder caudalen SCN eine geringe Zellkonzentration und es konnte bei keiner der beiden Gruppen ein Tagesgang ermittelt werden. Unterschiedlich ist, dass bei den alten arrhythmischen Tieren über alle Zeitpunkte eine Tendenz zu den lateralen Quadranten (I und III) zu erkennen ist, die bei den rhythmischen Tieren fehlt. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen den beiden Gruppen konnten mit dem Mann-Whitney-U-Test besonders bei den dorsalen Quadranten (I und II) des rostralen Bereichs des SCN festgestellt werden, und zwar zu den Zeitpunkten ZT0 (II:  $Z = -2,309$ ;  $p = 0,0209$ ), ZT8 (I:  $Z = -2,165$ ;  $p = 0,0304$ ) und ZT20 (II:  $Z = -2,021$ ;  $p = 0,0433$ ).

Im medialen SCN war bei beiden Versuchsgruppen in den ventralen Quadranten (III und IV) ein Tagesgang zu erkennen: Bei beiden Gruppen lag das Minimum der beiden Quadranten zum Zeitpunkt ZT20; im ventro-lateralen (III) Quadranten überschritten sich auch die Maxima (ZT8), wohingegen es im ventro-medialen Bereich um 8 Stunden gegeneinander

verschoben war (alt-rhythmisch: ZT16, alt-arrhythmisch: ZT8). Unterschiede zwischen den beiden Versuchsgruppen zeigten sich im medialen Bereich darin, dass bei den arrhythmischen Tieren auch in den dorsalen Quadranten (I und II) ein Tagesgang zu verfolgen war. Außerdem war bei dieser Gruppe auch eine vergleichsweise höhere Immunreaktivität gegen cFOS zum Zeitpunkt ZT8 auffällig, ebenso wie zum Zeitpunkt ZT20 im lateralen (I und III) SCN. Schließlich fällt noch auf, dass in der Scotophase (ZT0 und ZT20) bei den alten rhythmischen Tieren eine dorsale Konzentration der gefärbten Zellen zu finden ist, wohingegen sie bei den arrhythmischen Tieren homogen (ZT20) bzw. medial (ZT0) vorliegt. Statistisch relevante Unterschiede zwischen den beiden Versuchsgruppen ließen sich für den medialen Abschnitt nur zu ZT8 ermitteln (IV:  $Z = -2,024$ ;  $p = 0,0433$ ).

Caudal findet sich in beiden Versuchsgruppen eine auffallend homogene Verteilung der Immunreaktivität gegen cFOS über alle Quadranten auf der zeitlichen Achse; lediglich bei den alten arrhythmischen Tieren ist diese einheitliche Verteilung der Zellen zu den Zeitpunkten ZT0 und ZT8 durch eine tendenzielle Konzentration der Zellen in den ventrikelnahen Quadranten II und IV unterbrochen. Die Differenzen können zu keinem Zeitpunkt in keinem Quadranten durch statistische Signifikanzen untermauert werden.

### **VERGLEICH JUNG VS. ALT**

Beim Vergleich der Altersgruppen (Abb.57 und 58) konnten bei den rhythmischen Tieren besonders häufig zu ZT20 statistisch erfassbare Unterschiede ermittelt werden: In den Quadranten I und III konnten für alle drei SCN Segmente signifikante Unterschiede festgestellt werden (I: rostral  $Z = -2,121$ ,  $p = 0,0339$ ; medial  $Z = -2,021$ ,  $p = 0,0433$ ; caudal  $Z = -2,121$ ,  $p = 0,0339$ . III: rostral  $Z = -2,121$ ,  $p = 0,0339$ ; medial  $Z = -2,309$ ,  $p = 0,0209$ ; caudal  $Z = -2,141$ ,  $p = 0,0339$ ) in den Quadranten II und IV nur im medialen und caudalen Segment (II: medial  $Z = -2,309$ ,  $p = 0,0209$ ; caudal  $Z = -2,121$ ,  $p = 0,0339$ . IV medial  $Z = -2,309$ ,  $p = 0,0209$ ; caudal  $Z = -2,121$ ,  $p = 0,0339$ ). Weiterhin konnte im I. Quadranten für den rostralen SCN noch zu ZT0 ( $Z = -2,021$ ,  $p = 0,0433$ ) und ZT8 ( $Z = -2,309$ ,  $p = 0,0209$ ) sowie im caudalen SCN zu ZT16 ( $Z = -2,309$ ,  $p = 0,0209$ ) ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Versuchsgruppen dargestellt werden. Außerdem ließ sich der III. Quadrant der rhythmischen Jungtiere im medialen SCN zu ZT16 signifikant von den alten „Rhythmikern“ unterscheiden ( $Z = -2,033$ ,  $p = 0,0433$ ).

Bei den arrhythmischen Tieren konnte beim Vergleich von jung und alt keine Häufung der signifikanten Unterschiede zu einem bestimmten Zeitpunkt ermittelt werden. Bemerkenswert

war jedoch, dass es im Gegensatz zu den anderen Zeitpunkten zum Zeitpunkt ZT8 keinerlei statistisch signifikante Differenzen gab. Besonders starke Unterschiede konnten im III. Quadranten ermittelt werden: Dort lag in allen SCN-Segmenten zum Zeitpunkt ZT0 ein signifikanter Unterschied vor (rostral  $Z = -2,121$ ,  $p = 0,0339$ ; medial  $Z = -2,121$ ,  $p = 0,0339$ ; caudal:  $Z = -2,121$ ,  $p = 0,0339$ ); außerdem sind rostral zum Zeitpunkt ZT20 ( $Z = -2,021$ ,  $p = 0,0433$ ) und medial zu ZT16 ( $Z = -2,309$ ,  $p = 0,0209$ ) signifikant unterschiedliche Kennzahlen ermittelt worden. In den ventrikelnahen Oktanten II und IV konnten im rostralen SCN signifikante Differenzen dargestellt werden (II: ZT0  $Z = -2,121$ ,  $p = 0,0339$ ; ZT20  $Z = -2,309$ ,  $p = 0,0209$ . IV: ZT20  $Z = -2,309$ ,  $p = 0,0209$ ). Im I. Oktanten wurden diese Unterschiede im medialen SCN zu ZT16 ( $Z = -2,021$ ,  $p = 0,0433$ ) ermittelt und im Quadranten IV im rostralen SCN zu ZT20 ( $Z = -2,309$ ,  $p = 0,0209$ ).

### **3.3 Histologie und Immunhistochemie an der Retina von *Phodopus sungorus***

Um zu ermitteln, ob es im Aufbau der Retina bzw. bei den Melanopsin-haltigen Ganglienzellen Unterschiede zwischen den vier Versuchsgruppen gab, wurden exemplarische Untersuchungen durchgeführt. Unterschiede bzw. Gemeinsamkeiten wurden ausschließlich über *eye-fitting* bewertet.

Bei der Beurteilung des Aufbaus der Retina wurden HE-gefärbte Paraffin- und Technovitschnitte einer Region der Retina auf Unterschiede in der Mächtigkeit und der Anordnung der verschiedenen Schichten hin betrachtet.

Bei der immunhistochemischen Untersuchung des Melanopsingehaltes in der Ganglienzellschicht der Retina wurden als Bewertungsgrundlage die Unterschiede der Färbungsintensität zwischen den Versuchsgruppen zu ZT8 (Mitte Tag) bzw. ZT20 (Mitte Nacht) mit dem PBS-Schnitten herangezogen. Lediglich bei den jungen arrhythmischen Tieren stand kein Schnitt für den Zeitpunkt ZT8 zur Verfügung. Daher wurde hier auf den Zeitpunkt ZT0 (Anfang Tag) zurückgegriffen.

### 3.3.1 Histologische Untersuchungen

Bei der histologischen Untersuchung an der Retina von *Phodopus sungorus* wurden zwei verschiedene Einbettungstechniken der Augen angewandt, um Artefaktbildung möglichst auszuschließen.

Nach der HE-Färbung stellte sich bei den Paraffinschnitten (10µm) und den Technovitschnitten (5µm) gleichermaßen heraus, dass es bei den unterschiedlichen Versuchsgruppen keine maßgeblichen Unterschiede im Aufbau und der Struktur der Retina zu geben scheint (Abb.59). Sowohl bei den rhythmischen als auch bei den arrhythmischen Versuchsgruppen unterschiedlichen Alters waren alle Schichten der Retina vorhanden und auch distinkt voneinander abzugrenzen; außerdem waren keine Unterschiede in der Mächtigkeit der verschiedenen Schichten zu ermitteln.

### 3.3.2 Immunhistochemische Untersuchungen

Für die immunhistologische Untersuchung wurden Paraffinschnitte (10µm) herangezogen, die wie bereits beschriebene (vgl. 4.3.1.6.) immunhistochemisch gefärbt wurden.

Bei den rhythmischen Tieren zeigten sich auch hier wieder die verschiedenen retinalen Schichten vollständig und deutlich (Abb.60); die Ganglienzellschicht wies bei den beiden Versuchsgruppen im Vergleich zu den entsprechenden PBS-Schnitten eine deutliche immunhistochemische Färbung gegen Melanopsin auf. Es konnten keine offensichtlichen Unterschiede zwischen Tag und Nacht ermittelt werden.

Bei den arrhythmischen Tieren zeigte sich ein etwas unterschiedliches Bild (Abb.61): Bei den jungen Hamstern sind auch hier die retinalen Schichten vollständig und deutlich ausgeprägt. Es ließ sich diesbezüglich kein Unterschied zu den jungen rhythmischen Tieren darstellen. Allerdings zeichneten sich die Ganglienzellen zu ZT0 nur durch eine geringe Immunreaktivität gegen Melanopsin aus; zum Zeitpunkt ZT20 zeigte sich – ähnlich wie bei den jungen rhythmischen Tieren – jedoch wieder eine massive Färbung gegen den genannten Antikörper.

Einzige Ausnahme in diesem relativ konformen Ergebnis bildete die Gruppe der alten arrhythmischen Tiere: Sowohl zum Zeitpunkt ZT8 als auch zu ZT20 zeigte sich im Vergleich zum PBS-Schnitt keine offensichtliche Färbung gegen  $\alpha$ -Melanopsin. Dies ist besonders deshalb auffällig, weil zu den Zeitpunkten ZT0 und ZT16 eine massive Färbung zu erkennen ist (Abb.62). Außerdem war die Retina des Tieres, das zu ZT 20 getötet wurde, deutlich degeneriert (Abb.62, ZT20): Die einzelnen Schichten lassen sich nur sehr bedingt voneinander unterscheiden und sind auch in ihrer Mächtigkeit weniger ausgeprägt, als bei den

Tieren zu den anderen Zeitgeberzeiten. Es ließen sich nirgends Ganglienzellen feststellen; lediglich die Nervenfasern waren durch den Antikörper gegen Melanopsin etwas deutlicher angefärbt. Trotz dieser Degeneration waren keine Verhaltensauffälligkeiten bei dem entsprechenden Tier festzustellen.

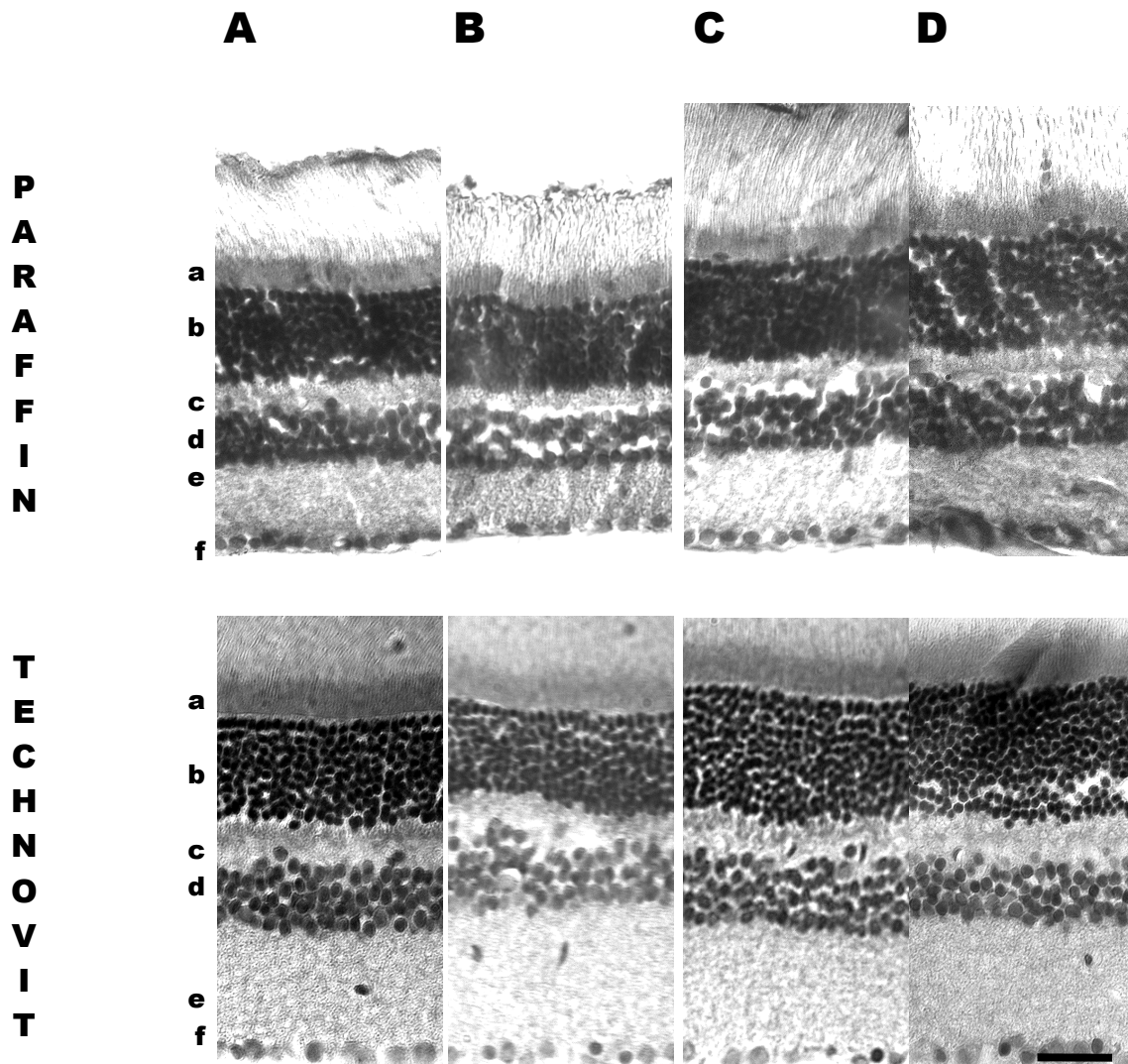


Abb.59: HE-Färbung an Paraffin- (10 $\mu$ m) und Technovitschnitten (5  $\mu$ m) der Retina von vier Versuchsgruppen Dsungarischer Zwerghamster: A : Jung rhythmisch. B: Alt rhythmisch. C: Jung arrhythmisch. D: Alt arrhythmisch. a: Photorezeptoren Schicht. b: äußere Körnerschicht. c: äußere plexiforme Schicht. d: innere Körnerschicht. e: innere plexiforme Schicht. f: Ganglienzellschicht. n = 4; Balken: 10 $\mu$ m.

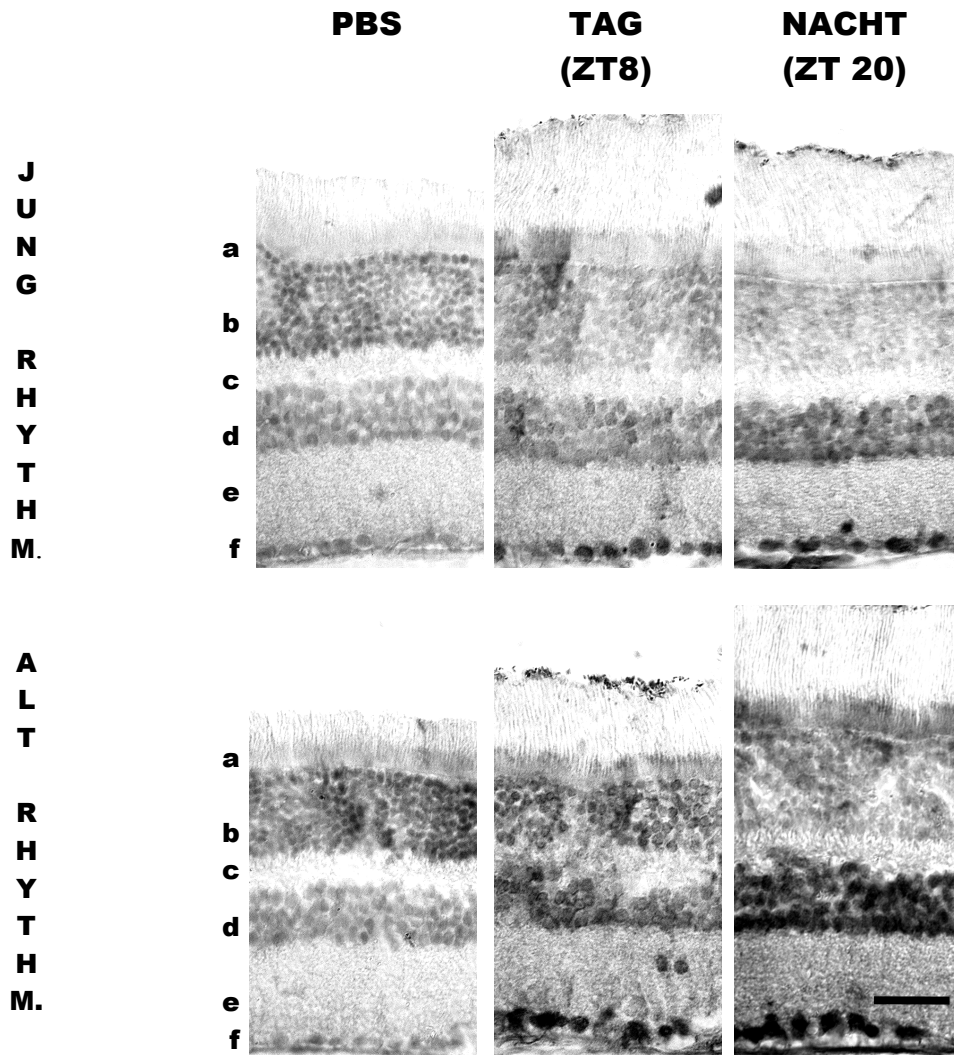


Abb.60: Immunfärbung mit  $\alpha$ -Melanopsin an Paraffinschnitten (10 $\mu$ m) der Retina junger und alter rhythmischer Dsungarischer Zwerghamster.a: Photorezeptoren Schicht. b: äußere Körnerschicht. c: äußere plexiforme Schicht. d: innere Körnerschicht. e: innere plexiforme Schicht. f: Ganglienzellschicht.n = 1; Balken: 10 $\mu$ m.

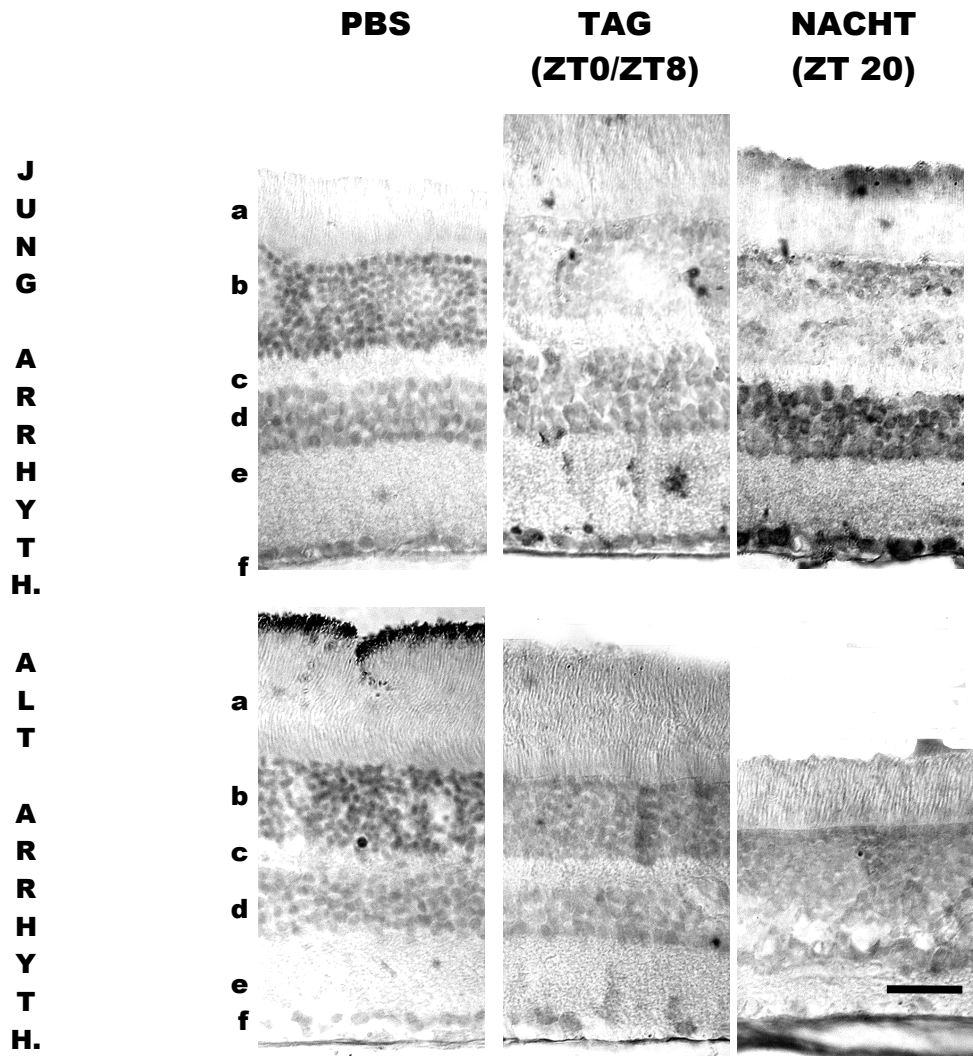


Abb.61: Immunfärbung mit  $\alpha$ -Melanopsin an Paraffinschnitten (10 $\mu$ m) der Retina junger und alter arrhythmischer Dsungarischer Zwerghamster. a: Photorezeptoren Schicht. b: äußere Körnerschicht. c: äußere plexiforme Schicht. d: innere Körnerschicht. e: innere plexiforme Schicht. f: Ganglienzellschicht. n = 1; Balken: 10 $\mu$ m.

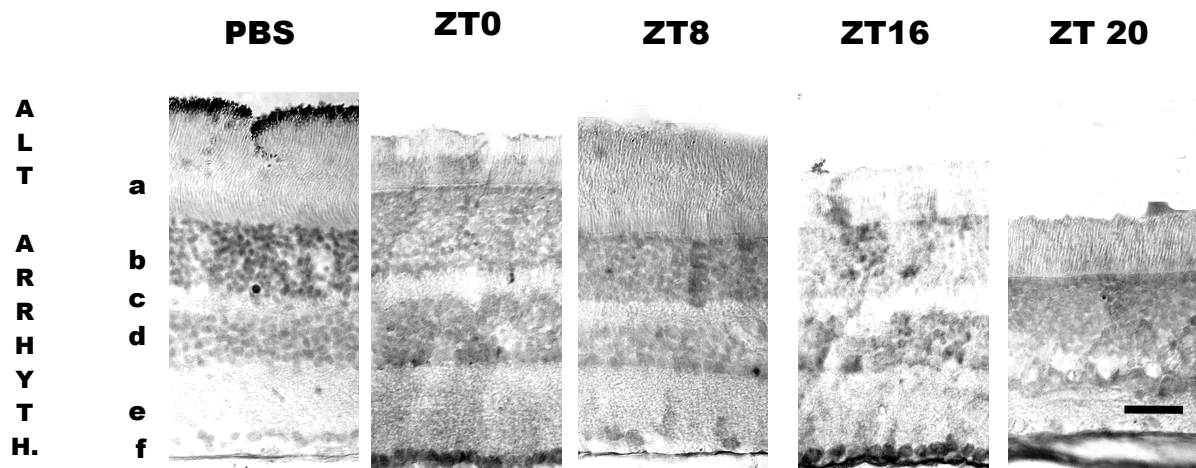


Abb.62: Immunfärbung mit  $\alpha$ -Melanopsin an Paraffinschnitten ( $10\mu\text{m}$ ) der Retina arrhythmischer Dsungarischer Zwerghamster. a: Photorezeptoren Schicht. b: äußere Körnerschicht. c: äußere plexiforme Schicht. d: innere Körnerschicht. e: innere plexiforme Schicht. f: Ganglienzellschicht. n = 1; Balken:  $10\mu\text{m}$ .



## 4 Diskussion

### 4.1 Tiermodell

Der Dsungarische Zwerghamster, *Phodopus sungorus*, interpretiert, wie viele andere Organismen auch, die Tageslichtlänge als Zeichen für die Jahreszeit. *Phodopus* reagiert in Anpassung an die extremen Witterungsbedingungen seines natürlichen Lebensraumes besonders sensibel auf Veränderungen der Photoperiode und zeigt saisonal charakteristische physiologische Veränderungen (Gorman und Zucker 1995; Hoffmann 1973; Steinlechner *et al.* 1983). Diese ausgeprägte Abhängigkeit von der Photoperiode macht ihn offenbar auch besonders anfällig für photische Störungen, die sogar arrhythmisches Verhalten zur Folge haben können (Ruby *et al.* 1996; Steinlechner *et al.* 2002). Aus diesem Grund ist *Phodopus* das bisher einzige Modelltier, um lichtinduzierte Arrhythmie zu untersuchen. Problematisch ist diese Tiermodell jedoch insofern, als zur Zeit bei *Phodopus* keine Stämme mit genau definiertem genetischen Hintergrund existieren, wie es bei Inzuchtstämmen von anderen Labornagern üblich ist. Dies führte zu Problemen in mehrerer Hinsicht: Zum einen war die Vorhersagbarkeit der Ausbeute an induziert arrhythmischen Tieren schwierig (s. auch Voigt 2003) und führte zu einem großen zeitlichen Aufwand, um die Versuchsgruppe „jung arrhythmisch“ zusammenzustellen. Zum anderen erschwerte es die Einteilung der SCN-Regionen entlang der rostro-caudalen Achse, da es im Gegensatz zu Mäusen für den Dsungarischen Zwerghamster keinen Hirnatlas gibt, der die Einteilung der Regionen stärker objektivieren würde; d.h. dass die Einteilung der Regionen rostral/medial/caudal subjektiven Einflüssen unterliegt und die Vergleichbarkeit mit anderen Untersuchungen suboptimal ist (Abe und Rusak 1994; Hamada *et al.* 2004; Yan und Okamura 2002; Yan und Silver 2004).

### 4.2 Aktivität

Lokomotorische Aktivität ist ein anerkannter und non-invasiv messbarer circadianer *Output* der inneren Uhr, die mit der Photo- bzw. Scotophase der Umwelt synchronisiert wird. Im Alter verändert sich das Aktivitätsverhalten: Bei Mäusen und Dsungarischen Zwerghamstern wurde eine stärkere Fragmentierung der Aktivitätsphasen, eine Erhöhung der Tagaktivität sowie die Abnahme der Gesamtaktivität beobachtet (Kolker *et al.* 2003; Lipokatic 2002; Penev *et al.* 1997; Valentinuzzi *et al.* 1997). Diese Veränderungen decken sich mit einer Verschlechterung des Schlaf-Wach-Zyklus bei alten Nagern (Van Gool *et al.* 1987; Welsh *et al.* 1986). Außerdem vermindert sich im Alter die Synchronisationsfähigkeit mit der

photoperiodischen Umwelt (Duncan und Deveraux 2000; Weinert und Kompauerova 1998; Weinert und Weinert 1998) und es gibt Hinweise auf Phasenbeschleunigung (*phase advances*) (Weinert 2000). Eine altersbedingte Veränderung der Freilaufperiode  $\tau$  wird kontrovers diskutiert: In verschiedenen Studien wird eine Verkürzung von  $\tau$  postuliert (Pittendrigh und Daan 1974; Morin 1988), während eine Studie von Davis und Viswanathan (1998) belegt, dass sich das individuelle  $\tau$  im Alter nicht ändert. Die altersbedingten Unterschiede können neben Defiziten im circadianen System auch im allgemeinen „Verschleiß“ zu suchen sein: So gibt es im Alter funktionelle Veränderungen von Herz, Lunge, Muskeln und Sehnen. Außerdem wurde bei alten Ratten eine verminderte Leitgeschwindigkeit des Ischiasnervs festgestellt, die eine Veränderung des Laufverhaltens nach sich zog (van der Zee *et al.* 1990). In diesem Zusammenhang sind auch vergleichende Untersuchungen des Laufmusters von jungen und alten Ratten zu beachten: Im Alter verändert sich das Laufmuster; es kommt zu einer Verminderung sowie erhöhten Varianz der Schrittweite und einer verstärkten Seitwärtsdrehung der Hinterfüße (Bergener und Reisberg 1989). Auch bei alten Dsungarischen Zwerghamstern konnten solch veränderte Laufmuster beobachtet werden (Lipokatic 2002).

In dieser Studie führte die Aktivitätsüberwachung zu einem mit der Literatur übereinstimmenden Resultat. Bei den rhythmischen Tieren sollte die Menge der Tagaktivität ein relativ geringes, die Nachtaktivität hingegen ein hohes Niveau haben. Dies konnte sowohl bei den jungen als auch bei den alten rhythmischen Tieren beobachtet werden. Dabei war in Übereinstimmung mit der oben genannten Literatur der prozentuale Anteil der Nachtaktivität bei den jungen Tieren signifikant höher als bei den alten Tieren.

Durch die in dieser Arbeit verwendete Aufnahmemethode mit Bewegungsmeldern wurde jede Bewegung dokumentiert - so auch Bewegung im Nest, Putzen oder ähnliches und nicht nur lokomotorische Aktivität im eigentlichen Sinne. Auf diese Weise ist die Aktivitätsmenge am Tag im Vergleich zu Arbeiten mit anderen Aufnahmemethoden (s.u.) höher. Die Tagaktivität ist auch deshalb relativ hoch, weil die Tiere in dieser Zeit immer wieder durch betriebsbedingte Geschäftigkeit im Tierhaus (Tierpfleger etc.) gestört und aktiv wurden. Ohne diese Störungen wären die Unterschiede zwischen Tag- und Nachtaktivität vermutlich noch eindeutiger. Die deutlichste Darstellung der lokomotorischen Aktivität wäre, sie über Laufräder zu dokumentieren und nicht durch Bewegungsmelder, da die Räder von den Tieren wirklich nur während ihrer aktiven Phase genutzt werden. In der hier vorliegenden Studie war ein solcher Versuchsaufbau jedoch nicht möglich, da Laufradaktivität stabilisierend auf die

Rhythmik einwirkt und damit Arrhythmie verhindert bzw. bereits arrhythmische Tiere wieder synchronisiert (Scherbarth *et al.* 1999; Steinlechner *et al.* 2002).

Bei den arrhythmischen Tieren war die Nachtaktivität beider Altersgruppen signifikant geringer als die der entsprechenden rhythmischen Altersgruppen. Erwartungsgemäß sollte die Aktivität bei den arrhythmischen Tieren gleichmäßig über Tag und Nacht verteilt sein und bei einem Lichtregime von 16 Stunden Licht und 8 Stunden Dunkelheit die Nachtaktivität entsprechend bei ca. 33% liegen. Dieser Erwartung wurde entsprochen. Der Vergleich der Aktivitätsverteilung über 24 Stunden zwischen jungen und alten arrhythmischen Tieren erbrachte keinen statistisch nachweisbaren Unterschied. Dies zeigt, dass ein Defekt in der inneren Uhr bei beiden Tiergruppen zum gleichen lokomotorischen Verhalten führt. Es kann am Muster der Gesamtaktivität weder ermittelt werden, ob es sich um ein junges oder altes arrhythmisches Tier handelt, noch ob es sich um gleiche oder unterschiedliche Ursachen in der inneren Uhr handelt. Dies wird nochmals unterstrichen bei der Betrachtung der mittleren Anzahl an Aktivitätsschübe (=Bouts) pro 24 Stunden, die mit Hilfe des gleitenden Mittelwertes (=running average-Methode) zur Bestimmung des Aktivitätsbeginns (=Onset) und des Aktivitätsendes (=Offset) ermittelt wurden (Abb.63; vgl. 4.2.3): Auch hier zeigt sich nahezu kein Unterschied zwischen den jungen und den alten arrhythmischen Tieren. Die Anzahl der Unterbrechungen impliziert eine fragmentierte Verteilung über 24 Stunden. Während bei den jungen und alten arrhythmischen Tieren kein Unterschied in der Anzahl der Aktivitätsschübe festzustellen ist, zeigen sich bei den beiden Versuchsgruppen rhythmischer Tiere jedoch sehr deutliche Unterschiede: Die erwartete Anzahl von einem Aktivitätsschub, nämlich dem der nächtlichen Aktivitätsphase, findet sich nur bei den jungen Tieren wieder; bei den alten rhythmischen Tieren hat sich die Aktivität auf durchschnittlich 2,5 Aktivitätsschübe erhöht. Dies ist ein deutlicher Beleg für altersbedingte Fragmentierung der Aktivität.

Alterseffekte lassen sich auch in dem Vergleich des Aktivitätsbeginns (*Onset*) finden; dabei wurden jedoch nur die rhythmischen Tiere betrachtet, da es für die arrhythmischen Versuchstiere *per definitionem* keine längeren Aktivitätsphasen gibt. Der Aktivitätsbeginn findet bei nahezu allen alten Tieren mit oder nach dem Lichtwechsel von hell nach dunkel statt (Phasenwinkeldifferenz  $\leq 0$ ), während bei den jungen Tieren der Beginn deutlich vor oder mit dem Lichtwechsel abläuft (Phasenwinkeldifferenz  $\geq 0$ ). Dies könnte auf eine stabilere circadiane Rhythmik der jungen Tiere hinweisen, die antizipieren, dass der Lichtwechsel kommt und agieren; die alten Tiere hingegen brauchen das Signal des Lichtwechsels, um darauf zu reagieren.

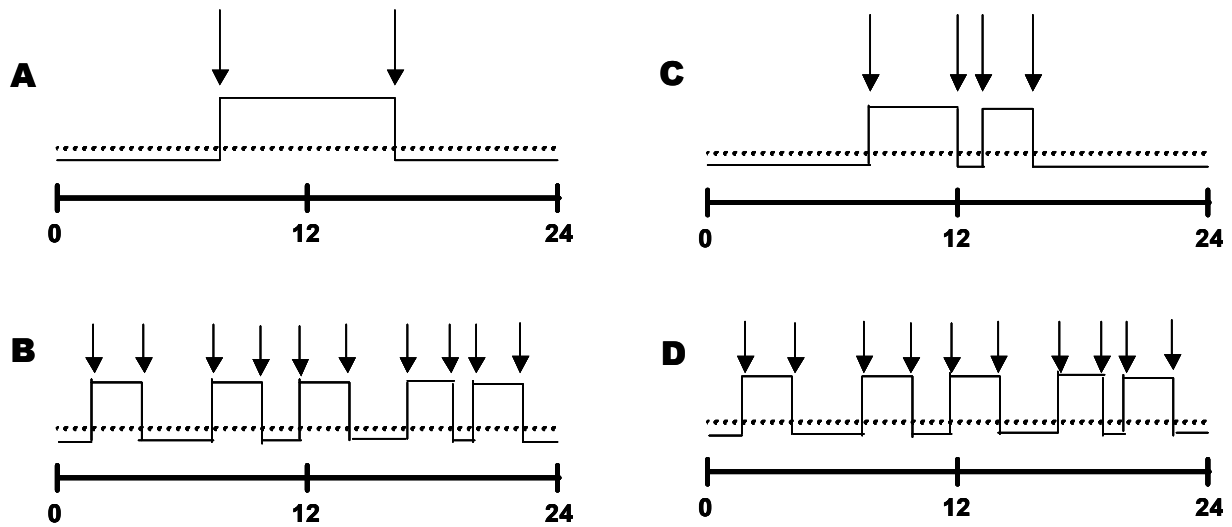


Abb.63: Schematische Darstellung der erwarteten Aktivitätsbouts und der *On-/Offsets* über 24 Stunden bei den vier Versuchsgruppen. A: junge rhythmische Tiere; B: junge arrhythmische Tiere; C: alte rhythmische Tiere; D: alte arrhythmische Tiere. gestrichelte Linie: 24-Stunden-Mittelwert; durchgezogene Linie: 3-Stunden-*running average*; Pfeile: *On-/Offsets*.

Weiterhin sprechen die für jedes Individuum variierenden *Onset*-Zeiten für ein unterschiedliches  $\tau$  der beiden Versuchsgruppen: Bei den jungen rhythmischen Tieren scheint  $\tau$  durchschnittlich kürzer und bei den alten Tieren länger als 24 Stunden zu sein. Die jungen rhythmischen Tiere beginnen schon vor der Scotophase mit der Aktivität und werden dann täglich neu mit dem Lichtregime synchronisiert (= *entrained*). Das *Entrainment* lässt sich am Aktivitätensende erkennen: Alle rhythmischen Jungtiere hörten mit Beginn der Photophase schlagartig mit der Aktivität auf. Diese Beobachtung steht jedoch im Kontrast zu den Untersuchungen von Pittendrigh und Daan (1974) sowie Morin (1988), die ein altersbedingt kürzeres  $\tau$  beim Goldhamster postulieren. Möglicherweise ist die Veränderung also speziesabhängig.

Insgesamt sind die Tiere der rhythmischen Versuchsgruppen über ihre altersbedingten Veränderungen im Aktivitätsmuster gut gegeneinander abgrenzbar, während die arrhythmischen Tiere ein relativ konformes Bild zeigen. Es zeigte sich, dass der lokomotorische Output beider arrhythmischer Altersgruppen gleich gestaltet ist und eine Differenzierung der beiden Gruppen über die Aktogramme nicht möglich ist.

## 4.3 Immunhistochemie

Bei der immunhistochemischen Untersuchung wurde der SCN in drei Abschnitte entlang der rostro-caudalen Achse eingeteilt. In der nachfolgenden Diskussion wurde das rostrale Segment ausgeklammert, da die Ergebnisse bis auf wenige Ausnahmen keine signifikante Aussagekraft hatten. Im Text wird daher insgesamt nur auf das mediale und das caudale SCN-Segment Bezug genommen.

Die Diskussion der räumlichen Verteilung der Immunreaktivität wurde zusammengefasst und ans Ende des Kapitels gestellt.

### 4.3.1 Zeitliche Verteilung

#### 4.3.1.1 Period-Gene *mPer1* und *mPer2* und ihre Translationsprodukte

*mPer1* und *mPer2* sind molekulare Komponenten der circadianen Uhr bei Säugetieren (Sun *et al.* 1997; Tei *et al.* 1997; Dunlap *et al.* 1997), die deutlich auf Licht reagieren, aber in ihrer Reaktion etwas gegeneinander verschoben sind (Albrecht *et al.* 1997; Field *et al.* 2000; Okamura *et al.* 1999; Shigeyoshi *et al.* 1997; Zyalka *et al.* 1998). Sie werden im SCN rhythmisch exprimiert und translatiert (Hastings *et al.* 1999) und spielen eine wichtige Rolle bei der Justierung der inneren Uhr (Albrecht *et al.* 2001). Die Translationsprodukte der Gene gehören beide zur bHLH-Familie (basic helix-loop-helix) der Transkriptionsfaktoren und sind Schlüsselemente im molekularen Räderwerk. Ziel dieser Arbeit war es, einen Tagesgang von mPER1 und mPER2 an den vier verschiedenen Versuchsgruppen nachzuvollziehen und Aspekte des Alterns und lokomotorischer Aktivitätsrhythmen zu berücksichtigen.

#### **mPER1**

Ein Tagesgang sowohl für *mPer1*-mRNA, als auch für das Translationsprodukt dieses Gens ist mittlerweile mehrfach belegt (Bae *et al.* 2001; Field *et al.* 2000; Hamada *et al.* 2004; Hastings *et al.* 1999; Nusslein-Hildesheim *et al.* 2000). Bevor ein solcher Tagesgang des Proteins auf zellulärer Ebene überprüft wurde, wurde die Spezifität des kommerziellen Antikörpers mittels *Western-Blot* Analyse untersucht: Das Blotergebnis ließ jedoch schon deutliche Zweifel daran aufkommen, ob der Antikörper spezifisch an mPER1 bindet. Diese Zweifel wurden bei immunhistochemischen Probefärbungen (verschiedene Protokolle) an Kryostatschnitten noch verstärkt, da sich nicht, wie erwartet, eine Kernfärbung nachweisen ließ (Field *et al.* 2000; Nusslein-Hildesheim *et al.* 2000), sondern eine Cytoplasmafärbung

auftrat. Als Erklärung für dieses Phänomen wurde die Hypothese aufgestellt, dass der Antikörper nicht gegen die nuclear vorliegenden PER1-Monomere gerichtet war, sondern sich gegen Di- oder Polymerisierungsprodukte von PER1 im Cytoplasma richtete. Eine stichprobenartige Auswertung zeigte, dass es sich um ein unspezifisches Bindungsverhalten des Antikörpers handelte, da sich in keiner Versuchsgruppe ein Tagesgang nachweisen ließ. Erst kürzlich wurde durch Dr. David Weaver der von Hastings *et al.* 1999 beschriebene PER1-Antikörper freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Immunhistochemische Probefärbungen bestätigten eine definierte Kernfärbung; dies Ergebnis deckt sich mit dem von Nuesslein-Hildesheim *et al.* (2000) beschriebenen immunhistochemischen Färbungen am SCN von *Phodopus*. Aus zeitlichen Gründen konnte die Untersuchung von PER1 in dieser Arbeit leider nicht mehr erfolgen. Um die Bedeutung von mPER1 für die hier bearbeitete Fragestellung ergänzend zu ermitteln, sollen in einer nachfolgenden Arbeit coronale Hirnschnitte der SCN Region der entsprechenden Versuchsgruppen mit dem von Dr. Weaver zur Verfügung gestellten Antikörper gefärbt und ausgewertet werden. Alternativ könnte ein Nachweis von *mPer1* mRNA erfolgen und mittels einer *in-situ* Hybridisierung - wie bereits von Voigt (2003) an *Phodopus* beschrieben - durchgeführt werden.

In diesem Zusammenhang wäre es dann auch möglich, die Tagesgänge von PER1 und PER2 zu vergleichen und Aussagen über die Gültigkeit des von Pittendrigh und Daan (1976b) postulierten und viel diskutierten Morning (M)-Evening (E)-Oszillator-Modells zu machen. Das Zwei-Oszillatoren-Modell sieht die Lichtwechsel als die markantesten Ereignisse des Tages an und postuliert, dass die Anpassung der Rhythmik von einem M-Oszillator und einem E-Oszillator übernommen wird. Der Organismus ist durch diese beiden Oszillatoren in der Lage, die Jahreszeit zu ermitteln, die durch die Beziehung der M- und E-Komponente zueinander kodiert wird. Dieses Modell wurde im Hinblick auf die molekularen Mechanismen der inneren Uhr 2001 von Daan *et al.* (2001) erweitert: Aufgrund ihrer Reaktionen auf Lichtpulse (Albrecht *et al.* 2001 ) wurde *mPer1* (mit *mCry1*) dem M-Oszillator und *mPer2* (mit *Cry2*) dem E-Oszillator zugeordnet. Steinlechner *et al.* (2002) vermuten, dass die induzierte Arrhythmie bei *Phodopus* durch eine „Kollision“ dieser beiden Oszillatoren-Komponenten zustande kommt; sie gehen von einer schwachen Kopplung dieser beiden Komponenten aus, die letztlich in arrhythmischem Verhalten mündet.

### **mPER2**

Sowohl für Mäuse als auch für Hamster und Ratten ist ein Tagesgang für *mPer2*-mRNA (Albrecht *et al.* 1997; Hamada *et al.* 2004; Maywood *et al.* 1999; Shearman *et al.* 1997; Takumi *et al.* 1998; Yan und Okamura 2003) und mPER2-Protein nachgewiesen

(Nuesslein-Hildesheim *et al.* 2000; Field *et al.* 2000). In der hier vorliegenden Arbeit sollte, wie bereits erwähnt, die Immunreaktivität der SCN-Zellen gegen mPER2 im Tagesgang überprüft werden und zwar im Hinblick auf das Alter der Tiere und ihre lokomotorische Rhythmik.

Nach einem schwachen, aber deutlichen Nachweis des Proteins mPER2 mittels *Western-Blot*-Analyse, wurde der zelluläre Nachweis des Proteins mittels immunhistochemischer Untersuchung an Kryostatschnitten durchgeführt. Übereinstimmend mit der Literatur konnte dabei auch in dieser Arbeit ein Tagesgang von mPER2 nachgewiesen werden und zwar sowohl für junge adulte als auch für alte rhythmische und arrhythmische Dsungarische Zwerghamster. Bei den jungen rhythmischen adulten Tieren wurde im medialen Segment des SCN eine maximale Konzentration an PER2-Immunreaktivität zum Zeitpunkt ZT20 und ein Minimum in der Lichtphase (ZT8-ZT16) ermittelt. Dieses Ergebnis läuft konform mit den vorliegenden mRNA-Daten für *Phodopus* (Max. ZT16, Min. zwischen ZT20 und ZT0; Voigt 2003): Die Proteinsynthese folgt dem mRNA-Zyklus um etwa vier Stunden verzögert. Dies Resultat ähnelt dem Ergebnis einer Studie an Mäusen, wo die Verzögerung zwischen den beiden Zyklen sechs Stunden betrug (Field *et al.* 2000). Diskrepanzen gibt es jedoch im Vergleich zu den in der Literatur postulierten Proteindaten: In der Arbeit von Nuesslein-Hildesheim *et al.* (2000) wird unter der gleichen Photoperiode wie in der hier vorliegenden Arbeit bei *Phodopus* ein Tagesgang von mPER2 mit einem Maximum zu ZT12 und einem Minimum zu ZT3 ermittelt. Im Gegensatz zu den jungen rhythmischen adulten Zwerghamstern, der „Normal-Kontrollgruppe“ dieser Studie, zeigten sich erstaunlicherweise große Ähnlichkeiten der Ergebnisse Nuesslein-Hildesheims *et al.* (2000) mit den hier ermittelten Daten für die alten rhythmischen Zwerghamster. Obwohl die tageszeitlichen Schwankungen statistisch nicht erfassbar waren, ließ sich eine deutliche Tendenz ableiten: Das Maximum der PER2-Immunreaktivität im medialen SCN liegt etwas später und das im caudalen SCN etwas früher als das von Nuesslein-Hildesheim *et al.* (2000) ermittelte (ZT16/8 vs. ZT12); aber das Minimum deckt sich mit ihren Werten (ZT0). Noch besser decken sich die Daten, wenn man bei den alten rhythmischen Hamstern keine Unterscheidung in rostral, medial und caudal macht, sondern die Daten für den gesamten SCN betrachtet: Dann liegt das Maximum zwischen ZT8 und ZT16 und das Minimum bleibt bei ZT0. Dieses unerwartete Ergebnis lässt vermuten, dass die Altersstruktur der Versuchstiere in der genannten Studie eher der der Versuchsgruppe der alten Zwerghamster in dieser Arbeit ähnelt. In der Arbeit von Nuesslein-Hildesheim *et al.* (2000) wird nur von „adulten Tieren“ gesprochen, jedoch nicht spezifiziert, welches Alter diese Tiere wirklich hatten. Als einfachste Erklärung für die

Diskrepanzen der PER2-Ergebnisse dieser Studie mit denen von Nuesslein-Hildesheim *et al.* (2000) könnte die Verwendung unterschiedlichen Ausgangsmaterials dienen: Beide Arbeitsgruppen haben Versuchstiere aus Zuchten entnommen, die schon seit sehr vielen Jahren getrennt voneinander laufen. Durch die kleinen Zuchtgruppen ist ein Inzuchteffekt nicht zu vermeiden. Darin liegt möglicherweise die Ursache für die unterschiedlichen Erhebungsdaten. Diese Überlegung wird unterstützt durch Studien an Maus- bzw. Ratteninzuchtstämmen: Bei vergleichenden Untersuchungen an verschiedenen Inzuchtstämmen wurden deutliche Unterschiede in Verteilung und Anzahl von AVP-Neuronen gefunden (Wollnik und Bihler 1996; Bult *et al.* 1992).

Im medialen Bereich des SCN zeichnet sich bei den alten rhythmischen Zwerghamstern im Vergleich zu den jungen Tieren ein Phasenbeschleunigung (= *phase-advance*) des Maximums der PER2-Immunreaktivität ab. Dieses Phänomen wurde für PER2 in dieser Studie das erste Mal nachgewiesen, läuft jedoch mit anderen Studien konform: Es scheint im Alter eine generelle Tendenz zu einem *phase-advance* der verschiedensten circadianen Rhythmen zu geben (Weinert 2000). Der hier beschriebene *phase-advance* für PER2 konnte jedoch nur im medialen, nicht aber im caudalen SCN nachgewiesen werden, in dem die Maxima beider rhythmischen Versuchsgruppen zusammenfallen. Dies könnte darauf hinweisen, dass altersbedingte Veränderungen sich nicht zwangsläufig auf den gesamten SCN erstrecken müssen; sie können sich möglicherweise schrittweise entwickeln, analog zur altersabhängigen Veränderung unterschiedlichster circadianer Rhythmen, die nach und nach in einem Organismus auftreten (z.B. Weinert und Waterhouse 1999). Eine solche Möglichkeit würde die Bedeutung einer differenzierten Betrachtung des SCN noch unterstreichen. Eine geringere Konzentration an Proteinen, wie sie analog von Kawakami *et al.* (1997) für *VIP* (vasoactive intestinal polypeptide)-mRNA oder Kolker *et al.* (2003) für *Bmal1*- und *Clock*-mRNA beschrieben wird, ließ sich in dieser Studie bei den alten Tieren nicht ermitteln. Allerdings deckt es sich mit den Ergebnissen von Kolker *et al.* (2003) über *mPer1* und *mPer2*, bei denen die Expressionsmuster dieser Gene ebenfalls keine altersabhängigen Unterschiede zeigten. Offenbar sind die lichtsensitiven Gene von besonderer Stabilität, so dass sie Alterungseffekten nicht oder nur in geringem Maße unterliegen. Als Unterschied zwischen den beiden Gruppen konnte jedoch eine geringe Modulation zwischen Maximum und Minimum bei den alten Versuchstieren ermittelt werden.

Die Daten der arrhythmischen Tiere müssen differenziert betrachtet werden: Während bei den alten arrhythmischen Tieren erstaunlicherweise ein Tagesgang erhalten bleibt, ist er bei den jungen arrhythmischen Tieren nicht mehr vorhanden. Bei den alten Tieren laufen die



täglichen Schwankungen des PER2-Gehaltes im medialen SCN parallel zu denen der alten rhythmischen Tiere; lediglich im caudalen Abschnitt des SCN fand eine leichte Verschiebung des Maximalwertes statt (von ZT8 nach ZT16). Die molekulare Komponente der inneren Uhr scheint sich bei den alten arrhythmischen Tieren demnach noch an den Lichtsignalen der Umwelt synchronisieren zu können. Möglicherweise „tickt“ die Uhr jedoch zu schwach, um die eingehenden Signale an die Peripherie weiterzugeben. D.h., dass der *Output* der Uhr möglicherweise nicht mehr synchronisiert werden kann, da sich die peripheren Oscillatoren von der *masterclock* entkoppelt haben. Letzteres könnte möglicherweise durch eine Verminderung der Neurone, die *output*-Signale vermitteln, verursacht werden, da Studien an Ratten einen solchen Alterungseffekt an AVP-Neuronen bereits beschrieben haben (Rooszental et al. 1987; Lucassen et al. 1995). Es besteht jedoch auch die Möglichkeit, dass molekulare Komponenten innerhalb des SCN, die in dieser Studie nicht untersucht wurden, gestört sind und zu einer lokomotorischen Arrhythmie führen.

Bei den jungen arrhythmischen Tieren deutet der Verlust eines Tagesgangs auf molekulare Veränderungen im SCN oder dessen Input hin. Eine mögliche Erklärung für die Störung des *Inputs* wäre, dass der Expressions- bzw. Translationsrhythmus von PER2 bei den einzelnen Tieren dieser Versuchsgruppe freilaufend war und aufgrund der unterschiedlichen Phasenlage zu den vier Zeitgeberzeiten der beschriebene Tagesgang zustande kommt. Denkbar wäre aber auch, dass die einzelnen Zellen des SCN einen Freilauf entwickelt haben. Um dieser Vermutung nachzugehen, könnte in nachfolgenden Arbeiten mit multiplen elektrophysiologischen Ableitungen gearbeitet werden. Außerdem sollten in diesem Zusammenhang die Synchronisationsmechanismen der SCN-Neurone genauer untersucht werden.

#### 4.3.1.2 pCREB

Ca<sup>2+</sup>/cAMP response element binding protein (CREB) fungiert in phosphorylierter Form als Transkriptionsfaktor und hat ein Molekulargewicht von ca. 43 kDa. Es spielt, phosphoryliert am Aminosäurerest Serin 133 (Ser<sup>133</sup>), eine wichtige Rolle bei der photischen Regulierung der inneren Uhr (Ding *et al.* 1997; Ginty *et al.* 1993; Sheng *et al.* 1991), scheint jedoch unabhängig von ihr zu sein (Kako *et al.* 1997). Die phosphorylierte aktive Form von CREB bindet als Dimer an die konservierte Sequenz TGACGTCA des Ca<sup>2+</sup>/cAMP response element (CRE), das in der Promotorregion vieler Gene zu finden ist (z.B. *Per* und *cFos*). Die Synthese von CREB scheint von Lichtpulsen unbeeinflusst. Im Gegensatz dazu scheint die Phosphorylierung von CREB maßgeblich von Lichtpulsen abhängig zu sein: Während bei

CREB nach einem Lichtpuls kein erhöhter Spiegel vorlag, konnte bei pCREB schon nach wenigen Minuten ein deutlich erhöhtes Niveau festgestellt werden (Ginty *et al.* 1993; Kornhauser *et al.* 1996a). Der Phosphorylierungsprozess an sich kann durch unterschiedlichste Stimuli ausgelöst werden – für diese Studie scheinen die Depolarisierung der Zellmembran und der damit verbundene erhöhte  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom (NMDA-Rezeptor vermittelt), als auch cAMP maßgeblich zu sein (Übersicht: Mayr und Montminy 2001; Sheng *et al.* 1991). Dabei können nach bisherigen Untersuchungen eine Vielzahl an Kinasen den CREB/CRE Transkriptionsweg aktivieren; so auch Proteinkinase A (PKA),  $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulin Kinase II (CaMKII) oder *mitogen-activated* Proteinkinase (MAPK) (Dziema *et al.* 2003; Grewalt *et al.* 2000; Sheng *et al.* 1991; Sheng und Greenberg 1990; Yokota *et al.* 2001). Neben der Regulierung der Funktionalität von CREB durch die Phosphorylierung an Ser<sup>133</sup> (Mayr und Montminy 2001) werden auch weitere Phosphorylierungsstellen diskutiert (Fiol *et al.* 1994). Eine neue Studie belegt, dass die Phosphorylierung von CREB an Ser<sup>142</sup> offenbar an dessen transkriptionaler Regulierung beteiligt ist. Sie gibt weiterhin Hinweise darauf, dass die Phosphorylierung an dieser Stelle den lichtinduzierten Regulierungsmechanismus der inneren Uhr unterstützt (Gau *et al.* 2002). Offenbar finden die Phosphorylierungen an den beiden Serinresten unabhängig voneinander statt und erst eine Kombination von beiden ermöglicht die maximale Transkriptionsleistung von pCREB (Gau *et al.* 2002). Beide Phosphorylierungsvarianten zeigen in Maus bzw. Hamster einen deutlichen Tagesgang mit einem Maximum während des subjektiven Tages und einem Minimum in der subjektiven Nacht (Gau *et al.* 2002; Ginty *et al.* 1993; Obrietan *et al.* 1999).

In der hier vorliegenden Studie konnte wider Erwarten bei keiner Versuchsgruppe ein Tagesgang von pCREB Ser<sup>133</sup> ermittelt werden. Dieses Ergebnis kollidiert mit den bereits vorliegenden Untersuchungen (s.o.). Als Grund für dieses abweichende Ergebnis kommen mehrere Ursachen in Frage: Zunächst könnte man vermuten, dass der Antikörper bei *Phodopus* möglicherweise nicht spezifisch an pCREB, sondern auch an CREB gebunden hat. Aufgrund der sehr ähnlichen Molekulargewichte von CREB und pCREB können diese beiden Proteine in dem hier vorgenommenen *Western-Blot* nicht getrennt werden. Die extrem starke Bande im SCN könnte ein Hinweis darauf sein, dass nicht nur das phosphorylierte Protein, sondern auch die unphosphorylierte Form markiert wurde. Weiterhin sprechen auch die Ergebnisse des immunhistochemischen Nachweises von pCREB auf zellulärer Ebene für diese Theorie: Auch hier konnte eine auffällig starke Immunreaktivität im Zellkern detektiert werden, die jedoch keinerlei Schwankungen im Tagesgang zeigte. Da CREB in unphosphorylierter Form keinen circadianen Schwankungen unterliegt und immer in relativ

hoher Konzentration in den Zellen vorhanden ist (Ginty *et al.* 1993), die Änderungen des pCREB-Spiegels möglicherweise jedoch sehr gering sind, könnten diese geringfügigen Schwankungen aufgrund des hohen CREB-Basisniveaus nicht nachgewiesen werden. Die Überprüfung, ob der Antikörper tatsächlich sowohl die phosphorylierte als auch die unphosphorylierte Form von CREB markiert, oder ob er doch spezifisch die phosphorylierte Form kennzeichnet, könnte über die Blockierung der Phosphorylierung von CREB erfolgen: Indem gezielt die Kinasen, die die Phosphorylierung bei CREB vermitteln, blockiert werden, würde eine erneute Färbung Aufschluss darüber geben, ob beide oder nur die phosphorylierte Form markiert wird. Wenn der Antikörper spezifisch ist, dann dürfte er in einem solchen Fall keine Zellen anfärben.

Eine weitere Ursache für den nicht vorhandenen Tagesgang könnte auch in der Phosphorylierungsstelle des CREB liegen. Der Antikörper wirkt gegen pCREB Ser<sup>133</sup>. Möglicherweise ist bei *Phodopus* die Phosphorylierung am Ser<sup>133</sup>-Rest nicht oder nur geringfügig oszillierend wohl aber die an Ser<sup>142</sup> oder anderen Phosphorylierungsstellen. Der von Dr. Thomas Lemberger freundlicherweise zur Verfügung gestellte Antikörper gegen pCREB Ser<sup>142</sup> funktionierte leider nicht im SCN des Dsungarischen Zwerghamsters. Auf diese Weise bleibt die Überprüfung, ob es eine Oszillation an einer anderen Phosphorylierungsstelle gibt, insbesondere der an Ser<sup>142</sup>, Gegenstand weiterführender Untersuchungen.

Insgesamt wird jedoch ein Tagesgang an phosphoryliertem CREB vermutet, da sowohl PER2 als auch cFos circadian exprimiert wurden und diese Expression wird von pCREB induziert. Anzumerken wäre noch eine besondere Auffälligkeit im Färbemuster von anti-pCREB: In allen vier Versuchsgruppen zeigte sich im Gegensatz zu den anderen überprüften Antikörpern erstaunlicherweise eine besonders hohe Immunreaktivität im caudalen Bereich des SCN. Erwartet wurde die höchste Immunreaktivität jedoch im medialen Bereich, da dort die retinorezipiente Region des SCN lokalisiert ist. Als mögliche Erklärung für dieses Phänomen käme eine Verstärkungskaskade in Frage. Mögliche Ziele und auch Ursachen dieser Kaskade können hier nicht gedeutet werden.

#### 4.3.1.3 cFOS

Das *cfos* Proto-Oncogen gehört zu den *immediate early genes* (IEG) und *cfos* Expression wird als Marker für neuronale Aktivität betrachtet. Das Translationsprodukt dieses Gens fungiert als Transkriptionsfaktor in der zellulären Signaltransduktion, indem es mit Proteinen aus der *Jun*-Familie einen so genannten *activating-protein-1* (AP1)-Komplex bildet (Übersicht:

Kornhauser *et al.* 1996). AP1 kann dann an spezielle Bindungsstellen der Zielgene („*late response genes*“) binden und deren Transkription regulieren. Durch Lichtpulse in der Dunkelphase kommt es zu einem drastischen Anstieg der mRNA und des FOS-Proteins, (Herrera und Robertson 1996), wobei die mRNA ca. 30 Minuten (Kornhauser *et al.* 1990) und das Protein etwa 1-2 Stunden (Colwell und Foster 1992) nach dem Lichtpuls ihr Maximum erreichen. Die lichtinduzierte Immunreaktivität ist jedoch nur im retinorezipienten, ventrolateralen Bereich des SCN und nicht im dorso-medialen Sektor nachzuweisen (Jác *et al.* 2000). In mehreren Studien ist ein robuster Tagesgang von cFOS beschrieben (Aronin und Schwartz 1991; Jác *et al.* 2000).

Übereinstimmend mit der Literatur konnte auch in dieser immunhistochemischen Untersuchung ein Tagesgang an cFos-Immunreaktivität nachgewiesen werden. Sowohl bei den jungen als auch bei den alten rhythmischen Tieren zeigte sich im medialen SCN, dass die cFOS-Immunreaktivität während des Tages (ZT8-ZT16) ihr Maximum erreicht und das Minimum in der Nacht (ZT20) lokalisiert ist. Bei den jungen Tieren konnten die Unterschiede zwischen Maximal- und Minimalwerten aufgrund einer relativ hohen Streuung statistisch nicht direkt nachgewiesen werden. Die Tatsache, dass es statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Segmenten zu einem Zeitpunkt gibt, weist jedoch indirekt auf einen solchen Tagesgang hin. Bei den alten Tieren hingegen ist der Unterschied zwischen den Extremwerten des Zyklus statistisch abgesichert. In dieser Versuchsgruppe scheint sich – ähnlich wie auch bei PER2 (s.u.) - im Vergleich zu den jungen Tieren ein tendenzieller, nicht signifikanter *phase-advance* anzudeuten: Das Maximum der mittleren Zellzahl liegt bei den jungen Tieren bei ZT16, während es bei den alten Tieren schon zu ZT8 lokalisiert ist. Dieses im Alter häufiger auftretende Phänomen des *phase-advance* (Weinert 2000) ist jedoch hier nur vorsichtig zu diskutieren, da bei den alten Tieren zu ZT8 nur minimal mehr Immunreaktivität vorhanden ist, als zu ZT16. Um festzustellen, ob es sich wirklich um einen *phase-advance* handelt, müsste ein Tagesgang zeitlich höher aufgelöst werden; nur so kann ausgeschlossen werden, dass das „eigentliche Maximum“ bei beiden Versuchsgruppen in der Zeitspanne zwischen ZT8 und ZT16 liegt.

Im caudalen SCN konnte nur bei den alten Tieren ein circadianer Verlauf der cFOS-Immunreaktivität ermittelt werden. Bei den jungen Tieren war die Immunreaktivität gegen cFos in allen Bereichen nahezu gleich hoch; es ließ sich lediglich eine Tendenz zu einer etwas erhöhten Immunreaktivität in der Photophase aufzeigen. Möglicherweise liegt dies an einer erhöhten Sensitivität der jungen Tiere auch gegen non-photische *cfos*-Stimulationen während bei den alten Tieren diese Sensitivität nachgelassen hat (s.u.). Bemerkenswerterweise ist die

Modulation des Tagesgangs bei den alten Tieren weitaus deutlicher ausgeprägt als bei den jungen. Der Unterschied zwischen Maximal- und Minimalwerten war sowohl im medialen als auch im caudalen Bereich signifikant unterschiedlich. Dieses Ergebnis war unerwartet, da eine so starke Modulation des Tagesgangs eher bei den jungen Tiere erwartet wurde. Der Grund für dieses ungewöhnliche Ergebnis wird in dem Prozedere des finalen Versuchs gesehen: Vor der Tötung mussten die Versuchstiere aus dem Tierhaus in das Labor transportiert werden, in dem Tötung und Perfusion durchgeführt wurden. Die jungen Tiere waren während des Transports meist unruhig und offensichtlich deutlich gestresster (sowohl positiver als auch negativer Stress wären hier möglich) als die alten Tiere, die den Transport i.d.R. relativ ruhig überstanden. Dies deckt sich mit Beobachtungen von Mrosovsky und Biello (1994), die vermuten, dass Situationen, die auf junge Tiere erregend wirken, bei alten wenig Aktivität hervorrufen.

Da cFos-Expression nicht nur durch Licht ausgelöst wird, sondern in anderen Geweben verschiedene Stimuli zur akuten Bildung des FOS-Proteins führen (Curran *et al.* 1993; Sheng und Greenberg 1990), wurde die Vermutung aufgestellt, dass durch den verstärkten Stress und/oder erhöhte lokomotorische Aktivität in anderen Gehirnregionen Prozesse ausgelöst werden könnten, die auf den SCN reflektieren und die Expression von *cfos* non-photisch ankurbeln. Dies führte dann dazu, dass der cFOS-Gehalt in der Nacht nicht so stark absinkt, wie es ohne diese „Zusatzbelastung“ der Fall wäre. Um diesen Sachverhalt jedoch genauer zu untersuchen, müsste eine Kontrollgruppe diesbezüglich untersucht werden, die vor der Tötung nicht transportiert wurde. Weiterhin ist es jedoch auch möglich, dass die jungen Tiere deutlich stärker auf das Rotlicht vor und während der Tötung reagierten, sodass auf diese Weise zudem eine geringe photische Induktion von cFOS stattgefunden hat. Dieser Punkt ist jedoch im Vergleich zum vorangegangenen eher gering zu bewerten, da die Zeitspanne zwischen Tötung und Perfusion immer sehr kurz war, so dass es bestenfalls zu sehr geringen Erhöhungen der cFOS-Immunreaktivität geführt haben kann.

Bei den jungen arrhythmischen Tieren wiesen die statistischen Signifikanzen erstaunlicherweise im rostralen Bereich einen Tagesgang aus, der sein Maximum bei ZT0 und sein Minimum bei ZT16 besitzt. Weiterhin konnten auch im caudalen Bereich signifikante Unterschiede zwischen den Zeitpunkten festgestellt werden, woraus sich aber kein 24-Stunden Tagesgang mit einem Maximum bzw. Minimum ableiten ließ. Im medialen Bereich ließen sich aufgrund der hohen Streuung keine Signifikanzen nachweisen. Bemerkenswert ist jedoch, dass sowohl im medialen als auch im caudalen Bereich die höchste cFOS-Immunreaktivität zu den Lichtwechsel-Zeitpunkten (ZT0 und ZT16) zu finden war.

Dies könnte darauf hindeuten, dass es sich um eine Reaktion auf den Lichtwechsel handelt, die jedoch ohne Beteiligung der inneren Uhr auftritt. Möglicherweise findet bei den jungen Tieren aufgrund einer erhöhten Sensitivität auf Lichtwechsel eine Art Masking der Arrhythmie statt. Die Ursachen für den rostralen Tagesgang sind nicht ersichtlich.

Bei den alten arrhythmischen Tieren zeigte sich ein ähnliches Bild wie bei PER2: Es ließ sich ein sehr deutlicher Tagesgang der cFOS-Immunreaktivität darstellen. Die minimale und maximale Konzentration an cFOS-Immunreaktivität war in dieser Versuchsgruppe ebenso ausgeprägt wie in der der alten rhythmischen Hamster. Ein bemerkenswerter Unterschied ist jedoch, dass sich der Tagesgang der alten „Arrhythmiker“ noch deutlicher moduliert darstellte als bei der vorgenannten Gruppe. Auch hier wird analog zu PER2 deutlich, dass die innere Uhr der alten Tiere offensichtlich noch mit dem Zeitgeber Licht synchronisieren kann, das *Output*-Signal jedoch zu schwach bzw. nicht mehr vorhanden ist. Bei den jungen arrhythmischen Tieren unterstreicht das Ergebnis der cFOS-Immunreaktivität die bereits bei PER2 dargestellten Vermutungen, dass die „Störung“ im SCN selbst oder oberhalb davon zu suchen ist.

#### 4.3.1.4 Glutamatrezeptor NMDA-R1 (= NR1)

Wie bereits erwähnt wird Licht vom Auge wahrgenommen und monosynaptisch auf den SCN, die „*master-clock*“ der inneren Uhr, übertragen; die aufgenommenen Lichtsignale werden glutamaterg vermittelt (deVries *et al.* 1994; Colwell und Menaker 1996; Ebling 1996; Mikkelsen *et al.* 1995). Bei diesem Mechanismus spielen die *N-methyl-D-aspartate* (NMDA)-Rezeptoren, als glutamatkontrollierte Ionenkanäle, eine wesentlichen Rolle (Colwell *et al.* 1990; Ding *et al.* 1994; Mintz und Albers 1997; Rea *et al.* 1993). Da im Lichtinput möglicherweise eine Ursache für das Phänomen der lokomotorischen Arrhythmie zu suchen ist (s. Einleitung), sollte das Vorkommen dieser „lichtsensitiven“ Rezeptoren im SCN immunhistochemisch im Hinblick auf Alters- und Rhythmikunterschiede vergleichend betrachtet werden; diese Untersuchung sollte u.a. zeigen, ob die Anzahl dieser Rezeptoren auch bei *Phodopus sungorus* im Alter abnimmt, wie es verschiedene Studien bei anderen Tierarten gezeigt haben (Übersicht: Segovia *et al.* 2001).

Bei den NMDA-Rezeptoren handelt es sich um integrale Membranproteine, die verschiedene pharmakologisch unterscheidbare Bindungsstellen besitzen, an denen die Aktivität des Rezeptors in unterschiedlicher Weise moduliert werden kann (zur Übersicht: Monaghan *et al.* 1989). Sie zeichnen sich sowohl durch eine hohe Kalziumpermeabilität als auch durch eine spannungsabhängige Sensibilität gegen Magnesiumionen aus. Außerdem muss zur

Aktivierung des Ionenkanals neben dem Glutamatmolekül noch ein Glycinmolekül als Coagonist an den Rezeptor binden; schließlich gibt es auch inhibitorische Bindungsstellen. Insgesamt sind die NMDA-Rezeptoren durch eine hohe Plastizität charakterisiert, da sie im Gegensatz zu den drei anderen ionotropen Glutamat-Rezeptoren neben einer Permeabilität für  $K^+$ - und  $Na^+$ - auch eine für  $Ca^{2+}$ -Ionen aufweisen. Das prädestiniert sie neben ihrer Funktion in der circadianen Lichttransduktion für die verschiedenartigsten physiologische Funktionen im Organismus wie z.B. das Lernen.

Ein funktionsfähiger NMDA-Rezeptor besteht aus fünf Untereinheiten, die durch unterschiedliche Gene in verschiedenen Splice-Varianten codiert sein können (NR1, NMDAR2A-D; zur Übersicht: Hollmann und Heinemann 1994). In einem Rezeptorpentamer kommt mindestens eine NR1-Untereinheit vor. Das *NR1*-Gen selbst kann wiederum an drei Stellen gespliced werden, was zu acht Isoformen des Translationsprodukts dieses Gens führt (Hollmann und Heinemann 1994; Zukin und Bennett 1995). Diese NR1-Splicevarianten haben unterschiedliche funktionelle Eigenschaften auf den Gesamtrezeptorkomplex (Anantharam *et al.* 1992; Durand *et al.* 1992, 1993; Hollmann *et al.* 1993). Als essentieller Teil der NMDA-Rezeptoren kommt NR1 in allen Bereichen des Gehirns vor (Brose *et al.* 1993; Moriyoshi *et al.* 1991); auch im SCN von Nagern wird das Vorkommen von NR1 bestätigt (Ebling 1996; Gannon und Rea 1994; Hartgraves und Fuchs 1994; Mikkelsen *et al.* 1993; O'Hara *et al.* 1995). In der hier vorliegenden Untersuchung wurde diese Aussage bekräftigt: Sowohl die cDNA (RT-PCR) als auch das Translationsprodukt von *NR1* in den Splicevarianten 1a, 1b, 2a oder 2b (*Western-Blot*) konnte im SCN von *Phodopus* lokalisiert werden. Bisherige Studien haben das Vorkommen von NR1-Splicevarianten im SCN unabhängig von der circadianen Periode gezeigt bzw. haben diurnale Expression von *NR1* ohne Berücksichtigung der Splicevarianten demonstriert (Ishida *et al.* 1994; Gannon und Rea 1994; Mikkelsen *et al.* 1993; Pennartz *et al.* 2001). In dieser Studie konnten auf DNA-Ebene nun zum ersten Mal Anhaltspunkte für eine circadiane Konzentrationsschwankung der *NR1*-cDNA ermittelt werden: Zu Beginn der Lichtphase (ZT3,5) wurde keine *NR1*-cDNA nachgewiesen, wohingegen sie zur Mitte des Tages (ZT8,25) und zu Beginn der Nacht (ZT18,5) deutlich dokumentiert werden konnte (Tab.3). Dieses Ergebnis unterstützt die Vermutung von Hartgraves und Fuchs (1994), die eine Abhängigkeit des NMDA-Rezeptors von den Lichtverhältnissen nicht ausschließen; es deckt sich jedoch nicht mit dem Ergebnis von Gannon und Rea (1994), die bei einer *in-situ*-Hybridisierung an Ratten keine nennenswerten Unterschiede zwischen Tag und Nacht ermitteln konnten. Um diese Diskrepanz zu erklären, müsste der Versuch mit einer größeren Anzahl an Tieren und einer

höheren zeitlichen Auflösung wiederholt werden; dies könnte sowohl auf der Ebene der cDNA, als auch auf Proteinebene geschehen. Zeigt sich auch hier wieder eine circadiane Rhythmik, dann kann von einem speziesabhängigen Unterschied gesprochen werden, wie er auch bei Hartgraves und Fuchs (1994) in Bezug auf die Rezeptordichte und -affinität beschrieben wird. Diese bisher fehlenden Untersuchungen waren in dieser Arbeit an Kryostatschnitten geplant; mittels Immunhistochemie sollte auf zellulärer Ebene ein Tagesgang der NR1-Proteine nachgewiesen werden, obwohl sowohl bei der RT-PCR als auch beim *Western-Blot* die Banden des NR1-Rezeptors im SCN vergleichsweise schwach angefärbt waren. Grund für diese Entscheidung war die Tatsache, dass auch bei PER2 nur eine schwache Proteinbande im *Western-Blot* nachgewiesen werden konnte, der Nachweis des Proteins auf zellulärer Ebene jedoch sehr aussagekräftig war. Bei den sich anschließenden Probefärbungen von NR1 an Kryostatschnitten des SCN von jungen adulten Hamstern zeigte sich erstaunlicherweise, dass der SCN trotz verschiedener Färbeprotokolle zu keiner Zeitgeberzeit angefärbt werden konnte. Die Zellen des PVN, des SON und z.T. auch der PVZ zeigten jedoch eine deutliche Reaktion gegen  $\alpha$ -NR1. Um auszuschließen, dass die Kryoprotektion zu einer möglichen Maskierung der Antigene im SCN führte, wurde die Färbung an frischem Gewebe wiederholt; parallel dazu wurde das Gehirn einer Maus (ebenfalls frisch) mit dem gleichen Protokoll gegen NR1 gefärbt. Bei *Phodopus* zeigte sich wieder eine Färbung in PVN und SON, jedoch erneut keine im SCN. Dies stellte sich bei der Maus anders dar: Hier war neben PVN und SON auch der SCN markiert. Dies Ergebnis zeigt, dass es speziesabhängige Unterschiede in der Konzentration der Splicevarianten von NR1 in den suprachiasmatischen Nuclei von Dsungarischem Zwerghamster und Maus geben muss (vgl. Hartgrave und Fuchs 1994). Diesen Ergebnissen zufolge muss bei der Maus eine deutlich höhere Anzahl an NR1-Rezeptoren der Splicevarianten 1a, 1b, 2a oder 2b im SCN vorliegen als beim Zwerghamster. Der polyklonale kommerzielle Antikörper wurde gewählt, da er vier Splicevarianten von NR1 abdeckte und als einer der wenigen NR1-Antikörper für immunhistochemische Untersuchungen am Hamster angeboten wurde. Offenbar kommen die genannten Splicevarianten im SCN von *Phodopus* nur in sehr geringen Mengen vor, sodass die gewählte Methode zu unempfindlich für einen zellulären Nachweis war. Für diese Vermutung sprechen die schwachen, jedoch positiven Nachweise bei der RT-PCR und im *Western-Blot*. Eine mögliche Verunreinigung der SCN-Gewebeproben durch PVN- oder SON Gewebe ist in diesem Zusammenhang weitestgehend auszuschließen, da bei Probepräparationen die Genauigkeit der Gewebeentnahme durch anschließende Kernfärbung der präparierten Slices überprüft wurde: Bis auf kleine Bereiche der Subparaventricularzone



(SPZ) wurden keine weiteren Kerngebiete entnommen. Dies spricht für eine hohe Präzision bei der Gewebeentnahme. Dass die Methode jedoch generell für die genannten NR1-Splicevarianten funktioniert, zeigen die Färbeergebnisse an PVN und SON: Hier sind die NR1-Varianten (ggf. auch nur eine der vier genannten) anscheinend in gut nachweisbarer Konzentration vorhanden. Das Ergebnis impliziert nicht, dass NR1 allgemein im SCN von *Phodopus* nur in ganz geringen Mengen vorhanden ist, sondern dass die vier getesteten Splicevarianten in sehr geringen Konzentrationen in diesem Gewebe vorkommen. Im Anschluss an diese Untersuchung müssten jetzt die vier verbleibenden Splicevarianten untersucht werden; insbesondere vor dem Hintergrund, dass NR1c als die häufigste Splicevariante im SCN von *Phodopus* postuliert wird (Ebling 1996). Diese Variante konnte mit dem hier vorliegenden kommerziellen polyklonalen (s.o.) Antikörper nicht nachgewiesen werden. Um festzustellen, ob es einen Tagesgang des NR1-Rezeptors bei *Phodopus* gibt und ob sich dieser alters- und rhythmusabhängig darstellen lässt, müssten die verschiedenen Splicevarianten getrennt voneinander zunächst wieder an den jungen adulten Tieren und dann an den vier Versuchgruppen untersucht werden

### **4.3.2 Räumliche Verteilung der untersuchten Proteine im SCN**

Bei mPER1, pCREB und dem NR1-Rezeptor ließ sich aufgrund der bereits oben beschriebenen Probleme bei der Beurteilung der Proteinverteilung auf der zeitlichen Achse keine Beurteilung der räumlichen Verteilung vornehmen. Für mPER2 und cFOS erfolgte eine Auswertung der Daten.

Insgesamt gestaltete sich die Bewertung der räumlichen Verteilung von mPER2 und cFOS im SCN schwierig, da zum einen die zeitliche Auflösung zu gering war und zum anderen auch wenig Vergleichsstudien vorhanden sind. Außerdem zeigte sich bei der Auswertung, dass die in dieser Studie verwendete Methode nicht ausreichend genau war – die Grenzen des SCN hätten präziser berücksichtigt werden müssen. In nachfolgenden Untersuchungen könnte eine Einteilung, wie sie Yan und Okamura (2002) vornehmen, differenziertere Ergebnisse produzieren.

#### **4.3.2.1 mPER2**

Zur räumlichen Verteilung von PER2 innerhalb des SCN gibt es bisher kaum Studien. Eine der wenigen Untersuchungen ist die von Yan und Okamura (2002), die bei Ratten lichtinduziertes mPER2 verstärkt im ventro-lateralen Bereich des SCN nachweist. Im

Kontrast dazu konnte in der hier vorliegenden Studie wider Erwarten in keinem der drei untersuchten SCN-Segmente ventro-lateral eine erhöhte Konzentration an PER2 in der Photophase bestätigt werden. Es ließ sich auch insgesamt keine Regelmäßigkeit des Verteilungsmusters von PER2 im Zusammenhang mit der Photoperiode feststellen. Auch eine sukzessive zeitliche Entwicklung der Proteinkonzentration, wie sie bei Hamada *et al.* (2004) für *mPer1*-mRNA beschrieben wird, ließ sich nicht ermitteln.

Bemerkenswerterweise war jedoch im medialen Segment des SCN immer eine besonders hohe PER2-Immunreaktivität zu beobachten, deren Schwerpunkt tendenziell in den medialen Quadranten des Coronalschnittes - dem Bereich, der direkt neben dem dritten Ventrikel angesiedelt ist - lag; auch im caudalen Bereich ließ sich die Konzentration von PER2 verstärkt auf die beiden medialen Quadranten beschränken. Die Bedeutung dieser offensichtlichen Konzentration von PER2 am dritten Ventrikel ist unbekannt und es gibt bisher keine Studien, die eine ähnliche Verteilung beschreiben.

Insgesamt konnten bei der Auswertung der räumlichen Verteilung von PER2 keine Muster ermittelt werden, aufgrund derer eine Differenzierung der verschiedenen Versuchsgruppen möglich gewesen wäre. Zwischen den korrespondierenden Quadranten der Versuchsgruppen gab es entsprechend auch keine signifikanten Unterschiede.

#### 4.3.2.2 cFOS

In der Literatur wird für cFOS-Immunreaktivität eine lichtabhängige Rhythmik für das ventro-laterale Segment und eine spontane, endogene Rhythmizität für den dorso-medialen SCN beschrieben (Jác *et al.* 2000; Übersicht: Sumová *et al.* 2004). Außerdem wird vermutet, dass es einen internen Verarbeitungsprozess der Lichtinformation zwischen dem ventro-lateralen und dem dorso-medialen Bereich gibt (Sumová *et al.* 2004). Im Hinblick auf die räumliche Verteilung von cFOS immunopositiven Zellen im SCN sind die Ergebnisse dieser Studie sehr indifferent. Die in der Literatur beschriebene lichtabhängige Rhythmik des ventro-lateralen Bereichs des SCN wird in dieser Arbeit nur im medialen Segment des SCN der jungen rhythmischen Tiere angedeutet, kann jedoch nicht statistisch untermauert werden: Die höchste cFOS-Immunreaktivität ist in der Photophase verstärkt im ventro-lateralen Bereich nachzuweisen, während sie in der Scotophase im lateralen Bereich zu finden ist. Der caudale Bereich des SCN zeigt für die Photophase ein gegensätzliches Bild: Hier befindet sich während des Tages die höchste Anzahl an immunopositiven Zellen einheitlich eher im dorso-medialen Bereich. Dieses Ergebnis lässt vermuten, dass in den verschiedenen Bereichen des SCN die Konzentration der Immunreaktivität unterschiedlich angeordnet ist. Eine

Ausbreitung der cFOS-positiven Zellen über die verschiedenen SCN-Kompartimente, wie bei Hamada *et al.* 2004 beschrieben, kann aufgrund der geringen zeitlichen Auflösung hier nicht bestätigt werden. Zu welchem Zweck und durch welche Mechanismen sich die räumliche Verteilung der cFOS-positiven Zellen ändert, bleibt Gegenstand weiterer Untersuchungen. Das bei den jungen „Rhythmikern“ beschriebene Muster der cFOS-Immunreaktivität lässt sich bei keiner der anderen Versuchsgruppen wiederfinden. Wenn die jungen rhythmischen Tiere als „Normalgruppe“ angesehen werden und man eine funktionale Trennung von dorso-medialem und ventro-lateralem SCN annimmt, so könnte dies Ergebnis darauf hindeuten, dass im Alter und auch bei lichtinduzierter Arrhythmie der interne Verarbeitungsprozess gestört oder blockiert ist. Um die oben beschriebene räumliche Verteilung der cFOS-positiven Zellen zu validieren und um die in der Literatur beschriebenen regionalen Unterschiede des SCN zu überprüfen, müssten zum einen der Versuch wiederholt und zum anderen die Versuchsbedingungen verändert werden: Während die Tiere in dieser Studie permanent in L:D gehalten wurden, konnte zwar der Einfluss des Lichts auf den ventro-lateralen SCN gezeigt werden, die spontane cFOS-Oszillation des dorso-medialen Bereichs wurde jedoch durch das Lichtregime maskiert. In einem erneuten Versuch sollte mit konstanten Lichtbedingungen gekoppelt mit Lichtpulsen und einer höheren zeitlichen Auflösung gearbeitet werden. Auf diese Weise könnte geklärt werden, ob die cFOS-Verteilung von ventro-lateral nach dorso-medial „wandert“. Sollte sich bei solchen Versuchen herausstellen, dass es tatsächlich Unterschiede in der Konzentration der immunreaktiven Zellen zwischen arrhythmischen und rhythmischen Tieren gibt, dann wäre dies ein erste Schritt, um die Ursachen der Arrhythmie auf zellulärer Basis zu verstehen.

#### 4.3.2.3 Vergleich mPER2 und cFOS

Beim Vergleich der räumlichen Verteilung der beiden Proteine finden sich keine Gemeinsamkeiten. Die in der Literatur (s.o.) dargestellte und damit erwartete erhöhte Immunreaktivität im ventro-lateralen, retinorezipienten Bereich des SCN während der Photophase ließ sich – bedingt - nur bei cFOS ermitteln.

Insgesamt stellte sich die hier vorgenommene räumlich differenzierte Auswertung der einzelnen SCN-Segmente nicht als probates Mittel dar, Unterschiede zwischen den verschiedenen Versuchsgruppen sicher herauszuarbeiten.

## 4.4 Melanopsin in der Retina

Der Lichtinput in den SCN spielt eine ausschlaggebende Rolle bei der Generierung von Tag-Nacht Rhythmen. Die retinale Lichtperzeption ist dabei von wesentlicher Bedeutung: Es gibt keine Synchronisation der inneren Uhr mit dem photischen Zeitgeber, wenn eine bilaterale Eucleation stattgefunden hat (Lockley *et al.* 1997), wohl aber bei einem Verlust von Stäbchen und Zapfen (Übersicht: Bellingham und Foster 2002; Mrosovsky *et al.* 2001). D.h. es gibt neben den Stäbchen und Zapfen noch weitere Systeme, die für die Lichtperzeption wichtig sind. Unter anderem sind dies intrinsisch photosensitive Ganglienzellen, die für eine Synchronisation mit dem Zeitgeber Licht sorgen (Berson *et al.* 2002). Diese Subpopulation an Ganglienzellen enthält Melanopsin als Photopigment und projiziert in den SCN (Gooley *et al.* 2001; Provencio *et al.* 2002) und weitere visuelle Nuclei (Morin *et al.* 2003). Es gibt bisher keinen beschriebenen Tagesgang für Melanopsin in den retinalen Ganglienzellen und nur eine Studie, die eine altersbedingte Reduktion von melanopsinhaltigen retinalen Ganglienzellen beschreibt (Semo *et al.* 2003). Andere Studien stellen weitere Effekte eines alternden visuellen Systems dar: So wird eine generelle Abnahme von Rhodopsin im Auge von alten Ratten und eine Veränderung des Pupillendurchmessers beschrieben (Fox und Rubinstein 1989). Im Hinblick auf die Dichte der Photopigmente des visuellen Systems beim Menschen gibt es divergierenden Ergebnissen (Elsner *et al.* 1988; Liem *et al.* 1991; van Norren und van Meel 1985). Altersbedingte Linsentrübung (grauer Star) und erhöhter Augeninnendruck (grüner Star) treten bei verschiedenen Spezies auf. Während ein grüner Star mittelfristig zu einer Schädigung des Sehnerves und damit zu einer verminderten oder ganz fehlenden Synchronisation führen würde, stellt der graue Star zwar im Hinblick visuelle Lichtperzeption ein Hindernis dar, jedoch nicht für die Synchronisation mit dem täglichen Lichtwechsel.

Bei der Bewertung der nachfolgenden Ergebnisse muss berücksichtigt werden, dass es sich um eine Pilotstudie handelt, bei der zu jedem Zeitpunkt von jeder Versuchsgruppe nur ein Tier (n=1) betrachtet wurde. Entsprechend vorsichtig müssen die Ergebnisse bewertet werden. Insgesamt gab es in allen vier Versuchsgruppen nur in fünf Fällen sichtbare Veränderungen der Augen in Form einer Linsentrübung. Die Tiere, bei denen eine solche Trübung festgestellt wurde, stammten ausschließlich aus den Versuchsgruppen der alten Tiere. Vier der Tiere gehörten zur Gruppe der alten arrhythmischen Hamster. Der Grund, warum in dieser Gruppe die meisten Tiere mit einer Linsentrübung zu finden waren, ist, dass die entsprechenden Tiere besonders alt wurden, bevor sie arrhythmisches lokomotorisches Verhalten zeigten. Die Linsentrübung begann bei allen Tieren als sie - zwar fragmentiertes - aber doch noch rhythmisches lokomotorisches Verhalten zeigten. Dies beweist, dass die Tiere trotz der

Trübung weiterhin mit dem Licht-Dunkelwechsel synchronisieren konnten. Insgesamt handelte es sich bei diesem Phänomen um einen in vielen Spezies beobachteten Alterseffekt (z.B. Gloor und Sarra 2004). Diese Vermutung, dass bei den Tieren mit getrüübter Linse eine ungestörte Lichtperzeption stattfindet, wird von den histologischen Untersuchungen der Retina unterstützt: Es konnten keine Unterschiede im Vergleich zwischen den vier Versuchsgruppen festgestellt werden. Im Bezug auf die Morphologie wiesen die Tiere aller Gruppen eine intakte Retina auf. Dies Ergebnis deckt sich mit der Untersuchung von Oster *et al.* (2003) an jungen und alten  $mPER1^{-/-}mCry2^{-/-}$  Mäusen.

Bei der Betrachtung der immunhistochemischen Färbungen der Retina gegen Melanopsin zeigte sich bei den rhythmischen Tieren (jung und alt), dass es Melanopsin-positive Ganglienzellen gibt. Dies gilt zu allen untersuchten Zeitpunkten: Sowohl zu den dargestellten Zeitpunkten ZT8 und ZT20 als auch für die nicht dargestellten Zeitpunkte ZT0 und ZT16 zeigte sich eine deutliche Färbung der Ganglienzellschicht im Vergleich zur PBS-Negativkontrolle. Es gibt offenbar keine Unterschiede zwischen Tag und Nacht und auch in der Literatur wird von einem solchen Tagesgang nicht berichtet .

Bei den arrhythmischen Versuchstieren verlief das Ergebnis der Melanopsin-Immunreaktivität nicht so konform wie bei den rhythmischen Tieren. Bei den jungen „Arrhythmikern“ konnten ebenso wie bei den jungen Rhythmikern zu ZT8 und zu ZT20 Melanopsin-positive Zellen in der Ganglienzellschicht der Retina dargestellt werden. Dies zeigt, dass das arrhythmische lokomotorische Verhalten dieser Gruppe nicht durch fehlendes Melanopsin in der retinalen Ganglienzellschicht ausgelöst sein kann. Bei der Gruppe der alten arrhythmischen Tiere zeigt sich jedoch ein ganz anderes Bild: Hier ließ sich weder zum Zeitpunkt ZT8 noch zu ZT20 eine positive Reaktion auf anti-Melanopsin nachweisen, wohingegen zu ZT0 und ZT16 eine massive Reaktion aufzutreten schien. Die Zeitpunkte der starken Melanopsin-Immunreaktivität fallen mit den Lichtwechsel-Zeitpunkten zusammen, wobei es für dieses Phänomen noch keine zufriedenstellende Erklärung gibt. Es zeigt jedoch, dass bei den alten Tieren offenbar ein Melanopsin-Defizit möglich ist. Ob und wie sich dies in einen zeitlichen Rahmen einbetten lässt, ob die Lichtwechsel-Zeitpunkte eher zufällig oder gesteuert zustande kamen, all dies konnte in dieser Pilotstudie nicht geklärt werden und bleibt Gegenstand weiterer Untersuchungen.

Bemerkenswert bleibt jedoch, dass die Gruppe der alten arrhythmischen Tiere die einzige Gruppe ist, bei der ein Melanopsin-Defizit nachgewiesen werden konnte. Dabei könnte es sich um einen generellen Alterungseffekt handeln, wie er für Rhodopsin bei Ratten von Fox und Rubinstein (1989) beschrieben wurde. Allerdings würde man dann vermuten, dass alle

Zeitpunkte vom Alter gleichermaßen beeinträchtigt sind. Zusätzlich gibt jedoch die Tatsache, dass dieses Defizit offenbar die rhythmische Synthese von cFos und PER2 nicht beeinflusst, Anlass zur Spekulation, ob sie nicht – auf einem bisher unbekanntem Weg – möglicherweise arrhythmisches lokomotorisches Verhalten begünstigt. Diese Vermutung wird unterstützt durch Morin *et al.* (2003), die neben den Projektionen der melanopsinhaltigen Ganglienzellen in den SCN auch Projektionen zu anderen visuellen Nuclei beschreiben. Möglicherweise gibt es Projektionen zurück zum SCN oder zu peripheren Oszillatoren, die eine Entkopplung zwischen der *master-clock* und der Peripherie fördern. Um diesbezüglich mehr Klarheit zu schaffen, sollte in zukünftigen Studien an alten Tieren der Melanopsingehalt in der Retina in Beziehung zur Lokomotion überprüft werden. Um die Ursachen eines möglichen Melanopsinmangels zu ergründen, sollten außerdem noch Untersuchungen hinsichtlich der Lichttransduktionskaskade innerhalb des Auges gemacht werden: Bei Oster *et al.* (2003) gibt es beispielsweise Hinweise darauf, dass bei den alten Tieren die Immunreaktivität gegen pCREB Ser<sup>133</sup> deutlich verringert ist, was auf einen transkriptionalen oder posttranskriptionalen Defekt hinweist, der sich möglicherweise negativ auf die Melanopsin-Expression auswirken könnte.

#### **4.5 Wie passt das alles zusammen?!**

Die beschriebenen und diskutierten Ergebnisse dieser Arbeit fügen sich insgesamt zu einem recht eindeutigen Bild zusammen: Offenbar haben altersbedingte spontan auftretende lokomotorische Arrhythmie und lichtinduzierte Arrhythmie trotz eines gleichen lokomotorischen *Outputs* unterschiedliche Ursachen: Die immunhistochemischen Untersuchungen an den Translationsprodukten der lichtsensitiven Gene *Per2* und *cFos* weisen darauf hin, dass die alten arrhythmischen Tiere auf molekularer Ebene offensichtlich noch mit den Lichtsignalen aus der periodischen Umwelt synchronisieren können. Es stellt sich die Frage, ob auch andere molekulare Komponenten noch einen circadianen Rhythmus aufweisen. Die Ursachen für die Arrhythmie im Alter könnten also in bisher nicht untersuchten molekularen Mechanismen der inneren Uhr oder aber in Kopplungsschwächen der *master-clock* mit den peripheren Oszillatoren liegen.

Des Weiteren zeigen die nicht vorhandenen Tagesgänge von cFOS und PER2 bei den jungen lichtinduziert arrhythmischen Tieren, dass diese im Gegensatz zu den alten Tieren nicht mehr mit der Photoperiode der Umwelt synchronisieren können. Diese Beobachtung lässt die Ursachen für den arrhythmischen lokomotorischen *Output* im Eingang zum SCN oder in den Signaltransduktionskaskaden innerhalb des SCN vermuten. Das Muster der räumlichen

Konzentration von cFOS gibt verhaltene Hinweise darauf, dass sich die Verteilung der Immunreaktivität durch gestörte interne Kommunikation bei alten und arrhythmischen Tieren im Vergleich zur Kontrollgruppe der jungen rhythmischen Tiere verändert.

Außerdem konnte gezeigt werden, dass sich die circadianen Rhythmen einiger untersuchter Parameter altersabhängig verändern. Diese Veränderungen finden offenbar nicht alle zur gleichen Zeit statt, sondern sukzessiv: So scheinen die Rhythmen PER2 und cFOS im SCN relativ stabil zu sein, während der lokomotorische Rhythmus, als *output*-Funktion, schon deutlich früher verschwindet.

Schließlich sind in dieser Studie erste Hinweise darauf gefunden worden, dass ein Defizit im Melanopsingehalt der retinalen Ganglienzellen möglicherweise im Alter lokomotorische Arrhythmie begünstigt.

## 4.6 Ausblick

Um die Mechanismen, die zur Ausbildung von Arrhythmie führen, genauer beschreiben und differenzieren zu können, sind eine Vielzahl an weiterführenden Untersuchungen notwendig. Diejenigen, die sich aus dieser Arbeit unmittelbar ableiten, sind im Folgenden aufgeführt:

1. Für die zukünftige Bewertung der Arrhythmie sollten die NMDA-Rezeptoren im SCN genauer untersucht werden. In diesem Zusammenhang sollten auch weitere Glutamatrezeptortypen überprüft werden, da es deutliche Hinweise darauf gibt, dass auch non-NMDA Rezeptoren an der Vermittlung der photischen Information beteiligt sind (Abe *et al.* 1991, 1992; Yoshida *et al.* 1998). Möglicherweise liegen die Ursachen der lichtinduzierten Arrhythmie nämlich in einer veränderten Regulierung der Lichttransduktion von der Retina zum SCN, in die auch non-NMDA Rezeptoren verwickelt sein können. Um zu klären, ob und in welchem Maß die NMDA und auch die non-NMDA-Rezeptoren an der Generierung der Arrhythmie beteiligt sind, sollten analog zu der Studie von Rusak *et al.* von 1992 Untersuchungen mit verschiedenen Glutamatrezeptor-Antagonisten folgen.
2. Weiterhin sollten zur Klärung der Mechanismen der lichtinduzierten Arrhythmie Studien zur Kopplung der Neurone innerhalb des SCN durchgeführt werden. Es besteht die Möglichkeit, dass die Kopplung und die Synchronisation der Neurone untereinander durch Lichtpulse geschwächt werden. Vermutlich würden die einzelnen Neurone als Resultat daraus einen Freilauf entwickeln. Auf diese Weise ließe sich auch das arrhythmische PER2- und cFOS Profil der jungen Tiere erklären. Ob und inwieweit die Synchronisation der SCN

- Neurone bei lichtinduziert arrhythmischen Tieren noch funktioniert, könnte mittels multipolarer Ableitungen überprüft werden. In Kombination dazu wären Studien an Slice-Kulturen notwendig, in denen eine Synchronisation der Neurone mittels GABA vorgenommen wird (vgl. Liu und Reppert 2000). In diesem Zusammenhang ist sicherlich auch die bisher unbekannte Funktion der Astrocyten im SCN zu berücksichtigen. Außerdem sollten die funktionellen Bereiche des SCN und die mit ihnen verbundenen internen Verarbeitungsprozesse genauer betrachtet werden (s.o.)
3. Die hier begonnene Studie über die Rolle von melanopsinhaltigen Ganglienzellen sollte, wie oben beschrieben, fortgeführt werden.
  4. Die Aktivitätsmuster der arrhythmischen Tiere zeigten zwar keinen circadianen Rhythmus mehr, aber es waren häufig multimodale Aktivitätsmuster zu erkennen. Wollnik und Bihler (1996) berichten in diesem Zusammenhang von einer Desynchronisation verschiedener circadianer Oszillatoren, die möglicherweise durch einen Verlust des Melatonin-Feedbacks auf den SCN zustande kommt. Um die Rolle des Melatonin auf arrhythmisches Verhalten zu überprüfen, wäre es wünschenswert, in weiterführenden Untersuchungen die Melatoninrezeptoren im SCN zu untersuchen. In diesem Zusammenhang sollte das Vorkommen und die Funktionsfähigkeit einer von LeSauter und Sliver (1999) ermittelten Subpopulation von CalB-positiven Zellen im SCN näher betrachtet werden, die für die Ausbildung lokomotorischer Aktivität verantwortlich sein sollen.
  5. Aufgrund der Tatsache, dass bei Voigt (2003) verschiedene *Phodopus*linien mit sehr unterschiedlichem Erfolg durch Lichtpulse arrhythmisch wurden, liegt die Vermutung nahe, dass die lichtinduzierte Arrhythmie möglicherweise einen genetischen Hintergrund hat, ähnlich wie er von Lynch und Lynch (1986) und Lynch *et al.* (1989) für *Non-responder* beschrieben wurde. In nachfolgenden Untersuchungen sollte überprüft werden, ob bei der lichtinduzierten Arrhythmie genetische Komponenten eine Rolle spielen, oder aber, ob sie aufgrund unzureichenden Feedbacks non-photischer Zeitgeber zustande kommt. Wenn es genetische Prädispositionen für Arrhythmie gibt, könnte dies zur Bildung eines verlässlicheren Arrhythmie-modells führen.
  6. Schließlich sollte überprüft werden, in welchem Maß photische und non-photische Zeitgeber die Rhythmik unterstützen bzw. der Arrhythmie Vorschub leisten. Dabei sollten die verschiedenen Eingänge dieser Zeitgeber in den SCN auf molekularer Ebene untersucht und mit rhythmischen Tieren verglichen werden. Durch gezielte Kombination dieser Stimuli – möglicherweise pharmakologisch unterstützt – könnte eine wirkungsvolle



---

Therapie gegen Arrhythmie erfolgen, die gerade bei der altersbedingten Arrhythmie zu einer verbesserten Lebensqualität führen könnte.

## 5 Literatur

- Abe, H., Rusak, B., Robertson H.A. (1991). Photic induction of Fos protein in the suprachiasmatic nucleus is inhibited by the NMDA-receptor antagonist MK-801. *Neurosci Lett* 127(1): 9-12.
- Abe, H., Rusak, B., Robertson H.A. (1992). NMDA and non-NMDA receptor antagonists inhibit photic induction of FOS protein in the hamster suprachiasmatic nucleus. *Brain Res Bull* 28(5): 831-835.
- Abe, H., Rusak, B. (1994). Physiological mechanisms regulating photic induction of Fos-like protein in hamster suprachiasmatic nucleus. *Neurosci Biobehav Rev* 18(4): 531-536.
- Akashi, M., Tsuchiya, Y., Yoshino, T, Nishida, E. (2002). Control of intracellular dynamics of mammalian period proteins by casein kinase I  $\epsilon$  (CKI $\epsilon$ ) and CKI $\delta$  in cultured cells. *Mol Cell Biol* 22: 1693-1703.
- Albrecht, U., Sun, Z.S., Eichele G., Lee, C.C. (1997). A differential response of two putative mammalian circadian regulators, *mper1* and *mper2*, to light. *Cell* 91:1055-1064.
- Albrecht, U., Zheng, B., Larkin, D. Sun, Z.S., Lee, C.C. (2001). *mPER1* and *mPER2* are essential for normal resetting of the circadian clock. *J Biol Rhythms* 16(2): 100-104.
- Anantharam, V., Panchal, R.G., Wilson, A., Kolchine V.V., Treistman, S.N., Barley, H. (1992). Combinatorial RNA splicing alters the surface charge on the NMDA receptor. *FEBS letters* 305: 27-30.
- Aronin, N., Schwartz W. J. (1991). A New Strategy to Explore Molecular Mechanims of Suprachiasmatic Nucleus Function. In D.C. Klein, R.C. Moor und S.M. Reppert (Eds.), *Suprachiasmatic Nucleus: The Mind's Clock*. pp. 445-456. Oxford University Press. New York, Oxford
- Aschoff, J. (1951). Die 24-Stunden-Periodik der Maus unter konstanten Umgebungsbedingungen. *Naturwissenschaften* 38: 506-507.
- Aschoff, J. (1960). Exogenous and endogenous components in circadian rhythms. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 25: 11-28.
- Aschoff, J. (1981). A Survey on Biological Rhythms. In J. Aschoff (Ed.), *Handbook of Behavioral Neurobiology – 4 – Biological Rhythms*. pp 3-8. Plenum Press. New York, London.
- Bae, K., Jin, X., Maywood, E.S., Hastings, M.H., Reppert, S.M., Weaver, D.R. (2001). Differential functions of *mPer1*, *mPer2*, and *mPer3* in the SCN circadian clock. *Neuron* 30:525-536.
- Barnes, J.W., Tischkau, S.A., Barnes, J.A., Mitchell, J.W., Burgoon, P.W., Hickok, J.R., Gillette, M.U. (2003). Requirement of mammalian *Timeless* for circadian rhythmicity. *Science* 302: 439-442.
- Beaule, C., Robinson, B., Lamont, E.W., Amir, S. (2003). Melanopsin in the circadian timing system. *J Mol Neurosci* 21 (1): 73-90.
- Begon, M., Harper, J.L., Townsend, C.R. (1991). *Ökologie: Individuen, Populationen und Lebensgemeinschaften*. Birkhäuser Verlag. Basel.
- Bellingham, J., Foster, R.G. (2002). Opsins and mammalian photoentrainment. *Cell Tissue Res* 309:57-71.
- Bergener, M., Reisberg, B. (1989). *Diagnosis and treatment of senile dementia*. Springer Verlag. Berlin, Heidelberg.
- Berson D.M. (2003). Strange vision: ganglion cells as circadian photoreceptors. *Trends Neurosci* 26: 314-320.
- Berson, D.M., Dunn, F.A., Takao, M. (2002). Phototransduction by retinal ganglion cells that set the circadian clock. *Science* 295 (5557): 955-957.

- Bosler, O., Beaudet, A. (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.
- Brainard, G.C., Hanifin, J.P., Greeson, J.M., Byrne, B., Glickman, G., Gerner, E., Rollag, M.D. (2001). Action Spectrum for Melatonin Regulation in Humans: Evidence for a Novel Circadian Photoreceptor. *J Neurosci* 21(16): 6405-6412.
- Brose, N., Gasic, G.P., Vetter, D.E., Sullivan J.M., Heinemann, S.F. (1993). Protein Chemical Characterization and Immunocytochemical Localization of the NMDA Receptor Subunit NMDA R1. *J Biol Chem* 268(30): 22663-22671.
- Bult, A., van der Zee, E.A., Compaan, J.C., Lynch, C.B. (1992). Differences in the number of arginine-vasopressin-immunoreactive neurons exist in the suprachiasmatic nuclei of house mice selected for differences in nest-building behavior. *Brain Res* 578: 335-338.
- Bunger, M.K., Wilsbacher, I.D., Moran, S.M., Clendenen, C., Radcliffe, L.A., Hogenesch, J.B., Simon, M.C., Takahashi, J.S., Bradfield, C.A. (2000). *Mop3* is an essential component of the master circadian pacemaker in mammals. *Cell* 103: 1009-1017.
- Cahill, G.M., Menaker, M. (1989). Effects of excitatory amino acid receptor antagonists and agonists on suprachiasmatic nucleus responses to retinohypothalamic tract volleys. *Brain Res* 479: 76-82.
- Card, J.P. (1999). Anatomy of the Mammalian Circadian Timekeeping System. In R. Lydic und H.A. Baghdoyan (Eds), *Handbook of Behavioral State Control: Cellular and Molecular Mechanisms*. pp. 13-29. CRC Press, Boca Raton, London, New York, Washington.
- Card, J.P., Moore, R.Y. (1984). The suprachiasmatic nucleus of the golden hamster: immunohistochemical analysis of cell and fiber distribution. *Neuroscience* 13: 415-431.
- Castel M, Belenky, M., Cohen, S., Ottesen, O.P., Storm-Mathisen, J. (1993). Glutamate-like immunoreactivity in retinal terminals of the mouse suprachiasmatic nucleus. *Eur J Neurosci* 5: 368-381.
- Challet, E., Solberg, L.C., Turek, F.W. (1998). Entrainment in calorie-restricted mice: conflicting zeitgebers and free-running conditions. *Am J Physiol* 274: R1751-R1761.
- Cloudsley-Thompson, J.L. (1960). Adaptive functions of circadian rhythms. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 25: 345-354.
- Colwell, C.S., Foster, R.G. (1992). Photic regulation of Fos-like immunoreactivity in the suprachiasmatic nucleus of the mouse. *J Comp Neurol* 324: 135-142.
- Colwell, C.S., Michel, S., Itri, J., Rodriguez, W., Tam, J., Lelievre, V., Hu, Z., Liu, X., Waschek, J.A. (2003). Disrupted circadian rhythms in VIP- and PHI-deficient mice. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 285:R939- R949.
- Colwell, D.S., Menaker, M. (1996). Regulation of circadian rhythms by excitatory amino acids. In: D. W. Brann und V.B. Mahesh (Eds.), *Excitatory Amino Acids: their Role in Neuroendocrine Function*. New York: CRC Press.
- Colwell, D.S., Ralph, M.R., Menaker, M. (1990). Do NMDA receptors mediate the effects of light on circadian behaviour? *Brain Res* 523: 117-120.
- Curran, T., Abate, C., Baker, S., Kerppola, T., Xanthoudakis, S. (1993). The regulation of c-fos: Too much is never enough. *Adv. Sec. Mess. Phosphoprotein Res* 28: 271-277.
- Cutler, D.J., Haraura, M., Reed, H.E., Shen, S., Sheward, W.J., Morrison, C.F., Marston, H.M., Harmar, A.J., Piggins, H.D. (2003). The mouse VPAC2 receptor confers suprachiasmatic nuclei cellular rhythmicity and responsiveness to vasoactive intestinal peptide in vitro. *Eur J Neurosci* 17: 197-204.
- Daan, S., Albrecht, U., van der Horst, G.T.J., Illnerova, H., Roenneberg, T., Wehr, T.A., Schwartz, W.J. (2001) Assembling a clock for all seasons: Are there M and E oscillators in the genes? *J Biol Rhythms* 16:105-116.

- Davis, F.C., Gorski R.A. (1988). Development of hamster circadian rhythms: role of the maternal suprachiasmatic nucleus. *J Comp Physiol [A]* 162: 601-610.
- Davis, F.C., Viswanathan, N. (1998). Stability of circadian timing with age in syrian hamsters. *Am J Physiol* 275(4): R960-R968.
- de Vries, M.J., Treep, J.A., de Pauw, E.S.D., Weijer, J.H. (1994). The effects of electrical stimulation of the optic nerves and anterior optic chiasm on the circadian activity rhythm of the Syrian hamster: involvement of excitatory amino acids. *Brain Res* 642: 206-212.
- Ding, J.M., Faiman, L.E., Hurst, V.J., Kuriashkina L.R., Gillette, M.U. (1997). Resetting the biological clock: mediation of nocturnal CREB phosphorylation via light, glutamate, and nitric oxide. *J Neurosci* 17: 667-675.
- Drucker-Colin, R., Aguilar-Rublero, R., Garcia-Fernandez, F., Fernandez-Cancino, F., Rattoni F.B. (1984). Fetal suprachiasmatic nucleus transplants: diurnal rhythm recovery of lesioned rats. *Brain Res* 311: 353-357.
- Duncan, M.J., Deveraux, A.W. (2000). Age-related changes in circadian response to dark pulses. *Am J Physiol* 279(2): R568-R590.
- Dunlap, J.C. (1999). Molecular basis for circadian clocks. *Cell* 96: 271-290.
- Durand, G.M., Bennett, M.V.L., Zukin, R.S. (1993). Splice variants of the N-methyl-D-aspartate receptor NR1 identity domains involved in regulation by polyamines and protein kinase C. *Proc natl Acad Sci USA* 90:6731-6735
- Durand, G.M., Gregor, P., Zheng X., Bennett .V.L., Uhl, G.R., Zukin R.S. (1992). Cloning of an apparent splice variant of the rat N-methyl-D-aspartate receptor NMDAR1 with altered sensitivity to polyamines and activators of protein kinase C. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 9359-9363.
- Dziema, H., Oatis, B., Butcher G.Q., Yates, R., Hoyt, K.R., Obrietan, K. (2003). The ERK/MAPkinase pathway couples light to immediate early gene expression in the suprachiasmatic nucleus. *Eur J Neurosci* 17: 1617-1627.
- Ebling, F.J.P. (1996). The role of glutamate in the photic regulation of the suprachiasmatic nucleus. *Prog Neurobiol* 50: 109-132.
- Elsner, A.E., Berk, L, Burns, S.A., Rosenberg, P.R.(1988). Aging and human cone photopigments. *J Opt Soc Am A*. 5(12): 2106-2112.
- Field, M.D., Maywood, E.S., O'Brien, J.A., Weaver, D., Reppert, S.M., Hastings, M.H. (2000). Analysis of clock proteins in mouse SCN demonstrates phylogenetic divergence of the circadian clockwork and resetting mechanisms. *Neuron* 25: 437-447.
- Fiol, C.J., Williams, J.S., Chou, C.H., Wang, Q.M., Roach, P.J., Andrisani, O.M. (1994). A secondary phosphorylation of CREB341 at Ser129 is required for the cAMP mediated control of gene expression. A role for glycogen synthase kinase-3 in the control of gene expression. *J Biol Chem* 269: 32187-32193.
- Fiore, P., Gannon, R.L. (2003). Expression of the transcriptional coactivators CBP and p300 in the hamster suprachiasmatic nucleus: possible molecular components of the mammalian circadian clock. *Mol Brain Res* 111(1-2): 1-7.
- Foster, R.G. (1998). Shedding light on the biological clock. *Neuron* 20: 829-832.
- Foster, R.G., Hankins, M.W. (2002). Non-rod, non-cone photoreception in the vertebrates. *Prog Retin Eye Res* 21:507-527.
- Fox, D.A., Rubinstein, S.D. (1989). Age-related changes in retinal sensitivity, rhodopsin content and rod outer segment length in hooded rats following low-level lead exposure during development. *Exp Eye Res* 48(2): 237-249.
- Freedman, M.S., Lucas, R.J., Soni, B., von Schantz, M., Muñoz, M., David-Gray, Z., Foster, R.G. (1999). Regulation of mammalian circadian behavior by non-rod, non-cone, ocular photoreceptors. *Science* 284: 502-504.

- Gannon, R.L., Rea, M.A. (1994). In situ hybridization of antisense mRNA oligonucleotides for AMPA, NMDA and metabotropic glutamate receptor subtypes in the rat suprachiasmatic nucleus at different phases of the circadian cycle. *Mol Brain Res* 23: 338-344.
- Gau, D., Lemberger, T., von Gall, C., Kretz, O., Minh, N.L., Gass, P., Schmid, W., Schibler U., Korf, H.W., Schütz, G. (2002). Phosphorylation of CREB Ser142 Regulates Light-Induced Phase Shifts of the Circadian Clock. *Neuron* 34:245-253.
- Ginty, D.D., Kornhauser, J.M., Thompson, M.A., Bading, H., Mayo, K.E., Takahashi, J.S., Greenberg, M.E. (1993). Regulation of CREB Phosphorylation in the Suprachiasmatic Nucleus by Light and a Circadian Clock. *Science* 260: 238-241.
- Gloor, B.P., Sarra, G.M. (2004). Visusverlust und Sehstörungen (2.Teil). *Schweiz Med Forum* 4: 276-280.
- Goel, N., Lee, T.M. (1997). Social cues modulate free-running circadian activity rhythms in the diurnal rodent *Octodon degus*. *Am J Physiol* 273 (2 Pt 2): R797-R804.
- Gooley, J.J., Lu, J. Chou, T.C., Scammell, T.E., Saper, C.B. (2001): Melanopsin in cells of origin of the retinohypothalamic tract. *Nat Neurosci* 4 (12):1165.
- Gorman, M.R. (1995). Seasonal Adaptions of Siberian hamsters. I. Accelerated Gonadal and Somatic Development in Increasing versus static Long-Day-Length. *Bio Reprod* 53: 110-115.
- Gorman, M.R., Zucker, I. (1995). Seasonal adaptations of Siberian Hmasters. II. Pattern of change in day length controls annual testicular and body weight rhythms. *Biol Reprod* 53: 116-125.
- Gréchez-Cassiau, A., Panda, S., Lacoche, S., Teboul, M., Azmi, S., Laudet, V., Hogenesch, J.B., Taneja, R., Delaunay, F. (2004). The transcriptional repressor STRA13 regulates a subset of peripheral circadian outputs. *J Biol Chem* 279: 1141-1150.
- Green, D.J., Gillette, R. (1982). Circadian rhythm of firing rate recorded from single cells in the rat suprachiasmatic brain slice. *Brain Res* 245: 198-200.
- Grewalt, S.S., Fass, D.M, Yao, H., Ellig, C.L., Goodman, R.H., Stork, P.J.S. (2000). Calcium and cAMP Signals Differentially Regulate cAMP-response Element-binding Protein Function via a Rap1-Extracellular Signal-regulated Kinase Pathway. *J Biol Chem* 275(44): 34433-34441.
- Groos, H., Hendricks, J. (1982). Circadian rhythms in electrical discharge of rat suprachiasmatic neurons in vitro. *Neurosci Lett* 34: 283-298.
- Guido, M.E., Goguen, D., de Guido, L., Robertson, H.A., Rusak, B. (1999). Circadian and photic regulation of immediate-early gene expression in the hamster suprachiasmatic nucleus. *Neuroscience* 90: 5555-5571
- Hamada, T., Antle, M.C., Silver, R. (2004). Temporal and spatial expression patterns of canonical clock genes and clock-controlled genes in the suprachiasmatic nucleus. *Eur J Neurosci* 19: 1741-1748.
- Hamada, T., LeSauter, J., Venuti, J.M., Silver, R. (2001). Expression of Period genes: rhythmic and nonrhythmic compartments of the suprachiasmatic nucleus pacemaker. *J Neurosci* 21:7742-7750.
- Hannibal, J., Ding, J.M., Chen, D., Fahrenkrug, J., Larsen, P.J., Geillette, M.U., Mikkelsen, J.D. (1997). Pituitary adenylate cyclase-activating peptide (PACAP) in the retinohypothalamic tract: a potential daytime regulator of the biological clock. *J Neurosci* 17: 2637-2644.
- Hannibal, J., Hinderson, P., Knudsen, S.M., Georg, B., Fahrenkrug, J. (2002). The photopigment melanopsin is exclusively present in pituitary adenylate cyclase-activating peptide-containing retinal ganglion cells of the retinohypothalamic tract. *J Neurosci* 22: RC191.

- Hannibal, J., Fahrenkrug, J. (2002). Immunoreactive substance P is not part of the retinohypothalamic tract in the rat. *Cell Tissue Res* 309(2): 293-299.
- Hannibal, J., Møller, M., Ottersen, O.P., Fahrenkrug, J. (2000). PACAP and glutamate are co-stored in the retinohypothalamic tract. *J Comp Neurol* 418: 147-155.
- Harrington, M.E., Nance, D.M., Rusak, B. (1985). Neuropeptide Y immunoreactivity in the hamster geniculo-hypothalamic tract. *Brain Res Bull* 15:465-472.
- Harrington, M.E., Rahmani, T., Lee, C.A. (1993). Effects of damage to SCN neurons and efferent pathways on circadian activity rhythms of hamsters. *Brain Res Bull* 30: 655-669.
- Hartgraves, M.D., Fuchs, J.D. (1994). NMDA receptor binding in rodent suprachiasmatic nucleus. *Brain Res* 640: 113-118.
- Hastings, M.H., Reddy, A.B., Garabette, M., King, V.M., Chahd-Ehlers, S., O'Brien, J., Maywood E.S. (2003). Expression of clock gene products in the suprachiasmatic nucleus in relation to circadian behaviour. *Novartis Foundation Symposium* 253: 203-217.
- Hastings, M.H., Maywood, M.D.; Weaver, D.R., Reppert, S.M. (1999). Differential regulation of mPER1 and mTIM proteins in the mouse suprachiasmatic nuclei: new insights into a core clock mechanism. *J Neurosci* 19: 1-7.
- Hattar, S., Liao, H.W., Takao, M., Berson, D.M., Yau, K.W. (2002). Melanopsin-containing retinal ganglion cells: architecture, projections, and intrinsic photosensitivity. *Science* 295: 1065-1070.
- Hattar, S., Lucas, R.J., Mrosovsky, N., Thompson, S., Douglas, R.H., Hankins, M.W., Lem, J., Biel, M., Hofmann, F., Foster, R.G., Yau, K.W., (2003). Melanopsin and rod-cone photoreceptive systems account for all major accessory visual functions in mice. *Nature* 424: 75-81.
- Hay-Schmidt, A., Vrang, N., Larsen, P.J., Mikkelsen J.D. (2003). Projections from the raphe nuclei to the suprachiasmatic nucleus of the rat. *J Chem Neuroanat* 25 (4):293-310.
- Herrera, D.G., Robertson, H.A. (1996). Activation of *c-fos* in the Brain. *Progr Neurobiol* 50: 83-107.
- Hirota, T., Fukada, Y. (2004). Resetting Mechanism of Central and Peripheral Circadian Clocks in Mammals. *Zoolog Sci* 21: 359-368.
- Hoffmann, K. (1968). Temperaturcyclen als Zeitgeber der circadianen Periodik. *Verhandlungen der Deutschen Zoologischen Gesellschaft in Innsbruck* 266-273.
- 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.
- Hofstetter, J.R., Trofatter, J.A., Kernek, K.L., Nurnberger, J.I. Mayeda, A.R. (2003). New quantitative trait loci for the genetic variance in circadian period of locomotor activity between inbred strains of mice. *J Biol Rhythms* 18: 450-462.
- Hogenesch, J.B., Gu, Y.Z., Jain, S., Bradfield, C.A. (1998). The basic-helix-loop-helix-PAS orphan MOP3 forms transcriptional active complexes with circadian and hypoxia factors. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 5475-5479.
- Hollmann, M., Heinemann, S. (1994). Cloned Glutamate Receptors. *Annu Rev Neurosci* 17:31-108.
- Honma, S., Kawamoto, Takagi, Y., Fujimotot, K., Sato, F., Noshiro, M., Kato, Y., Honma, K. (2002). Dec1 und Dec2 are regulators of the mammalian molecular clock. *Nature* 419: 841-844.
- Ishida, N., Matsui, M., Mitsui, Y., Mishina, M. (1994). Circadian expression of NMDA receptor mRNAs,  $\epsilon 3$  and  $\zeta 1$ , in the suprachiasmatic nucleus of the rat brain. *Neurosci Lett* 166: 211-215.

- Jác, M., Sumová, A., Illnerová, H. (2000). C-Fos rhythm in subdivisions of the rat suprachiasmatic nucleus under artificial and natural photoperiods. *Am J Physiol* 279: R2270-R2276.
- Jacobs, B.L., Azmitia E.C. (1992). Structure and function of the brain serotonin system. *Physiol Rev* 72: 165-229.
- Johnson, R.F., Moore, R.Y., Morin, L.P. (1988a). Loss of entrainment and anatomical plasticity after lesions of the hamster retinohypothalamic tract. *Brain Res* 460:297-313.
- Johnson, R.F., Morin, L.P., Moore, R.Y. (1988b). Retinohypothalamic projections in the hamster and rat demonstrated using cholera toxin. *Brain Res* 462: 301-312.
- Kako, K., Banasik, M., Lee, K., Ishida, N. (1997). Regulation of cAMP response element binding protein (CREB) binding in the mammalian clock pacemaker by light but not a circadian clock. *Mol Brain Res* 44: 39-45.
- Kalsbeek, A., Buijs, R.M. (2002). Output pathways of the mammalian suprachiasmatic nucleus : coding circadian time by transmitter selection and specific targeting. *Cell Tissue Res* 309: 109-118.
- Karatsoreos, I., Yan, L., LeSauter, J., Silver, R. (2004). Phenotype matters : Identificaton of light responsive cells in the mouse SCN . *J Neurosci* 24: 68-75.
- Kawakami, F., Okamura, H., Tamada, Y., Maebayashi, Y., Fukui, K., Ibata, Y. (1997). Loss of day-night differences in VIP mRNA levels in the suprachiasmatic nucleus of aged rats. *Neurosci Lett* 222: 99-102.
- Kim, D.Y., Kang, H.C., Shin, H.C., Lee, K.J., Yoon, Y.W., Han, H.C., Na, H.S., Hong, S.K., Kim Y.I. (2001). Substance P plays a critical role in photic resetting of the circadian pacemaker in the rat hypothalamus. *J Neurosci* 21(11): 4026-4031.
- Kim, Y.I., Kim S.H., Kim, D.Y., Lee, H.W., Shin, H.C., Chung, J.M., Han, H.C., Na, H.S. Hong, S.K. (1999). Electrophysiological evidence for the role of substance P in retinohypothalamic transmission in the rat. *Neurosci Lett* 274(2): 99-102.
- King, D.P., Takahashi, J.S. (2000). Molecular genetics of circadian rhythms in mammals. *Annu Rev Neurosci* 23: 713-742.
- King, D.P., Zhao, Y., Sangoram, A.M., Wilsbacher, L.D., Tanaka, M., Antoch, M.P., Steeves, T.D., Vitaterna, M.H., Kornhauser, J.M., Lowrey, P.L, Turek, F.W., Takahashi, J.S. (1997). Positional cloning of the mouse circadian clock gene. *Cell* 89: 641-653.
- Kolker, D.E., Fukuyama, H., Huang, D., Takahashi, J.S., Horton, T.H., Turek, F.W. (2003). Aging alters circadian and ligh induced expression of clock genes in golden hamsters. *J Biol Rhythms* 18(2): 159-169.
- Kolker, D.E., Vitaterna M.H., Fruechte, E.M., Takahashi, J.S., Turek, F.W. (2004). Effects of age on circadian rhythms are similar in wild-type and heterozygous Clock mutant mice. *Neurobiol Ageing* 25(4): 517-523.
- Kondratov, R.V., Chernov, M.V., Kondratova, A.A., Gorbacheva, V.Y., Gudkov, A.V., Antoch, M.P. (2003). BMAL1-dependent circadian oscillation of nuclear CLOCK: posttranslational events induced by dimerization of transcriptional activators of the mammalian clock system. *Genes Dev* 17: 1921-1932.
- Konopka, R.J., Benzer, S. (1971). Clock mutants of *Drosophila melanogaster*. *Proc Natl Acad Sci USA* 68: 2112-2116.
- Kornhauser J.M., Mayo, K.E., Takahashi J.S. (1996a). Light, Immediate-Early Genes, and Circadian Rhythms. *Behav Genet* 26(3): 221-240.
- Kornhauser, J.M., Ginty, D.D., Greenberg, M.E., Mayo, K.E., Takahashi, J.S. (1996). Light entrainment and activation of signal transduction pathways in the SCN. *In* R.M. Buijs, A. Kalsbeek, H.J. Romijn, C.M.A. Pennartz, M.Mirmiran (Eds.): *Progress in Brain Research III: Hypothalamic Integration of Circadian Rhythms*. pp133-146. Elsevier, Amsterdam, Lausanne, New York, Oxford, Shannon, Tokyo.

- Kornhauser, J.M., Maxo, K.E., Takahashi, J.S. (1993). Immediate-early gene expression in a mammalian circadian pacemaker: the suprachiasmatic nucleus. In M.W. Young (Ed.), *Molekular Genetics of Biochemical Rhythms*. Dekker, New York.
- Kornhauser, J.M., Nelson D.E., Mayo, K.E., Takahashi, J.S. (1990). Photic and circadian regulation of *c-fos* gene expression in the hamster suprachiasmatic nucleus. *Neuron* 5: 127-134.
- Kriegsfeld L.J., LeSauter, J., Silver, R. (2004). Targeted Microlesions Reveal Novel Organization of the Hamster Suprachiasmatic Nucleus. *J Neurosci* 24(10): 2449-2457.
- Laemle, L.K., Ottenweller, J.E. (1999). Nonphotic Entrainment of Activity and Temperature Rhythms in Anophthalmic Mice. *Physiology & Behavior* 66: 461-471
- Leak, R.K., Card, J.P., Moore, R.Y. (1999). Suprachiasmatic pacemaker organization analyzed by viral transynaptic transport. *Brain Res* 819: 23-32.
- LeSauter, J., Silver, R. (1999). Localization of a Suprachiasmatic Nucleus Subregion Regulating Locomotor Rhythmicity. *J Neurosci* 19(13): 5574-5585.
- Levine, J.D., Funes, P., Dowse, H.B., Hall, J.C. (2002). Resetting the circadian clock by social experience in *Drosophila melanogaster*. *Science* 298: 2010-2012.
- Liem, A.T., Keunen, J.E., Van Norren, D., Van de Kraats, J. (1991). Rod densitometry in the aging human eye. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 32(10): 2676-2682.
- Liou, S.Y., Shibata, S., Iwasaki, K., Ueki, S. (1986). Optic nerve stimulation-induced increase of release of <sup>3</sup>H-Glutamate and <sup>3</sup>H-Asparatate but not <sup>3</sup>H-GABA from the suprachiasmatic nucleus in slices of rat hypothalamus. *Brain Res Bull* 16: 527-531.
- Lipokatic, E. (2002). Altersabhängiges Verhalten: Vergleichende Untersuchungen zur Aktivitätsrhythmik von Dsungarischen Zwerghamstern und Grauen Mausmakis. Universität Hannover, FB Biologie, Diplomarbeit.
- Liu, C., Reppert, S.M. (2000). GABA synchronises clock cells within the suprachiasmatic circadian clock. *Neuron* 25:123-128.
- Lockley, S.W., Skene, D.J., Arendt, J., Tabandeh, H., Bird, A.C., DeFrance, R. (1997). Relationship between melatonin rhythms and visual loss in the blind. *J Clin Endocrinol Metab* 82: 3763-3770.
- Lopez-Molina, L., Conquet, F., Dubois-Dauphin, M., Schibler, U. (1997). The DBP gene is expressed according to a circadian rhythm in the suprachiasmatic nucleus and influences circadian behavior. *Embo J* 16: 6762-6771.
- Lowrey, P.L., Shimomura, K., Antoch, M.P., Yamazaki, S., Zemenides, P.D., Ralph, M.R., Menaker, M., Takahashi, J.S. (2000). Positional syntenic cloning and functional characterization of the mammalian circadian mutation *tau*. *Science* 288: 483-492.
- Lucassen, P.J., Hofmann, M.A., Swaab, D.F. (1995). Increased light intensity prevents the age related loss of vasopressin-expressing neurons in the rat suprachiasmatic nucleus. *Brain Res* 693: 261-266.
- Lynch, G.R., Lynch, C.B. (1986). Seasonal photoperiodism in the Djungarian hamster: A genetic component influences photoresponsiveness. *Behav Genet* 16: 775-780.
- Lynch, G.R., Lynch, C.B., Kliman, R.M. (1989). Genetic analyses of photoresponsiveness in the Djungarian hamster, *Phodopus sungorus*. *J Comp Physiol A* 164: 475-481.
- Mayr, B., Montminy, M. (2001). Transcriptional regulation by the phosphorylation-dependent factor CREB. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2: 599-609.
- Maywood, E.S., Mrosovsky, N., Field, M.D., Hastings, M.H. (1999). Rapid down-regulation of mammalian *Period* genes during behavioral resetting of the circadian clock. *PNAS* 96(26): 15211-15216.
- Menaker, M., Eskin, A. (1966). Entrainment of circadian rhythms by sound in *Passer domesticus*. *Science* 154: 1579-1581.



- Meridith, G.E., Ingham, C.A., Voorn, P., Arbuthnott, G.W. (1993). Ultrastructural characteristics of enkephalin-immunoreactive boutons and their postsynaptic targets in the shell and core nucleus accumbens of the rat. *J Comp Neurol* 332(2) : 224-236.
- Meyer-Bernstein, E.L., Morin, L.P. (1996). Differential serotonergic innervation of the suprachiasmatic nucleus and the intergeniculate leaflet and its role in circadian rhythms modulation. *J Neurosci* 16(6): 2097-2111.
- Mikkelsen, J.D., Larsen P.J., Ebling, F.J.P. (1993). Distribution of N-methyl D-aspartate (NMDA) receptor mRNAs in the suprachiasmatic nucleus. *Brain Res* 632: 329-333.
- Mikkelsen, J.D., Larsen P.J., Mick, G., Vrang, N., Ebling F.J.P. Maywood E.S., Hastings, M.H., Møller, M. (1995). Gating of Retinal Inputs through the Suprachiasmatic Nucleus: Role of Excitatory Neurotransmission. *Neurochem Int* 27(1): 263-272.
- Mintz, E.M., Albers H.E. (1997). Microinjection of NMDA into the SCN region mimics the phase shifting effect of light in hamsters. *Brain Res* 758:245-249.
- Mitsui, S., Yamaguchi, S., Matsuo, T., Ishida, Y., Okamura, H. (2001). Antagonistic role of E4BP4 and PAR proteins in the circadian oscillatory mechanism. *Genes Dev* 15: 995-1006.
- Miyazaki, K., Mesaki, M., Ishida, N. (2001). Nuclear entry mechanism of rat PER2 (rPER2): role of rPER2 in nuclear localization of CRY protein. *Mol Cell Biol* 21: 6651-6659.
- Moga, M.M., Moore, R.Y. (1997). Organization of neuroal inputs to the suprachiasmatic nucleus in the rat. *J Comp Neurol* 389: 508-534.
- Monaghan, D.T., Bridges, R.J., Cotman, C.W. (1989). The Excitatory Amino Acid Receptors: Their Classes, Pharmacology, and distinct Properties in the Function of the Central Nervous System. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 29: 365-402.
- Moore, R. (1996). Entrainment pathways and the functional organization of the circadian system. *Prog Brain Res* 111:103-119.
- Moore, R.Y. (1992). The enigma of the geniculohypothalamic tract: why two visual entraining systems? *J Interdisc Cycle Res* 23: 144-152
- Moore, R.Y., Eichler, V.B. (1972). Loss of a circadian adrenal corticosterone rhythm following suprachiasmatic lesions in the rat. *Brain Res* 42: 201-206.
- Moore, R.Y., Lenn N.J. (1972). A retinohypothalamic projection in the rat. *J Comp Neurol* 146: 1-14.
- Moore, R.Y., Speh, J.C., Leak, R.K. (2002). Suprachiasmatic nucleus organization. *Cell Tissue Res* 309: 89-98.
- Morin, L.P. (1988) Age-related Changes in Hamster Circadian Period, Entrainment and Rhythm Splitting. *J Biol Rhythms* 3(3): 237-248.
- Morin, L.P., Blanchard, J.H. (1992). Depletion of brain serotonin by 5,7-DHT modifies hamster circadian rhythm response to light. *Brain Res* 566:173-185.
- Morin, L.P., Blanchard, J.H., Provencio, I. (2003). Retinal ganglion cell projections to the hamster suprachiasmatic nucleus, intergeniculate leaflet, and visual midbrain: Bifurcation and melanopsin immunoreactivity. *J Comp Neurol* 465 (3) :401-416.
- Moriyoshi, K., Masu, M., Ishii, T., Shigemoto, R., Mizuno, N., Nakanishi, S. (1991). Molecular cloning and characterization of the rat NMDA receptor. *Nature* 354: 31-37.
- Morris, M.E., Viswanathan, N., Kuhlman, S., Davis, F.C., Weitz, C.J. (1998). A screen for genes induced in the suprachiasmatic nucleus by light. *Science* 279: 1544-1547.
- Mrosovsky, N., Biello, S.M. (1994). Nonphotic Phase Shifting in the Old and the Cold. *Chronobiol Int* 11(4): 232-252.
- Mrosovsky, N., Lucas, R.J., Foster, R.G. (2001). Persistence of Masking Responses to Light in Mice Lacking Rods and Cones. *J Biol Rhythms* 16(6): 585-587.
- Murakami, N., Takamura, M., Takahashi, K., Utunomiya, K., Kuroda, H., Ethoh, T. (1991). Long-term cultured neurons from rat suprachiasmatic nucleus retain the capacity for circadian oscillation of vasopressin release. *Brain Res* 545:173-185.

- Newmann, J.R., Keating, A.E. (2003). Comprehensive interactions with coiled-coil arrays. *Science* 300: 2097-2101.
- Nuesslein-Hildesheim, B., O'Brien, J.A., Ebling, F.J.P., Maywood, E.S., Hastings, M.H. (2000). The circadian cycle of mPER clock gene products in the suprachiasmatic nucleus of the Siberian hamster encodes both daily and seasonal time. *Eur J Neurosci* 12: 2856-2864.
- O'Hara, B.F., Andretic, R., Heller, H.C., Carter, D.B., Kilduff, T.S. (1995). GABA<sub>A</sub>, GABA<sub>C</sub>, and NMDA receptor subunit expression in the suprachiasmatic nucleus and other brain regions. *Mol Brain Res* 28: 239-250.
- Obrietan, K., Impey, S., Smith, D., Athos, J., Storm, D.R. (1999). Circadian regulation of cAMP response element-mediated gene expression in the suprachiasmatic nuclei. *J Biol Chem* 274: 17748-17756.
- Okamura, H., Miyake, S., Suni, Y., Yamaguchi, S., Yasui, A., Muijtens, M., Hoeijmakers, J.H.J., van der Horst, G.T.J. (1999). Photic induction of *mPer1* and *mPer2* in *Cry*-deficient mice lacking a biological clock. *Science* 286: 2531-2534.
- Oster, H., Baeriswyl, S., van der Horst, G.T.J., Albrecht, U. (2003). Loss of circadian rhythmicity in aging *mPer1*<sup>-/-</sup>*mCry2*<sup>-/-</sup> mutant mice. *Genes Dev* 17: 1366-1379.
- Panda, S., Provencio, I., Tu, D.C., Pires, S.S., Rollag, M.D., Castrucci, A.M., Pletcher, M.T., Sato, T.K., Wiltshire, T., Andahazy, M., Kay S.A., van Gelder, R.N., Hogenesch, J.B. (2003). Melanopsin is required for non-image-forming photic response in blind mice. *Science* 301: 525-527.
- Penev, P.D., Zee, P.C., Turek, F.W. (1997). Quantitative analysis of the age-related fragmentation of hamster 24-h activity rhythms. *Am J Physiol* 273: R2132-R2137.
- Pennartz C.M.A., Hamstra R., Geurtsen A.M.S. (2001). Enhanced NMDA receptor activity in retinal inputs to the rat suprachiasmatic nucleus during subjective night. *J Physiol* 532.1: 181-194.
- 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.
- Piggins, H.D., Rusak, B. (1999). Intercellular Interactions and the Physiology of Circadian Rhythms in Mammals. In R. Lydic und H.A. Baghdoyan (Eds), *Handbook of Behavioral State Control: Cellular and Molecular Mechanisms*. pp. 31-44. CRC Press, Boca Raton, London, New York, Washington.
- Pittendrigh, C.S. (1960). Circadian rhythms and the circadian organization of living systems. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 25: 159-184.
- Pittendrigh, C.S. (1981). Circadian Systems: General Perspective. In J. Aschoff (Ed.), *Handbook of Behavioral Neurobiology – 4 – Biological Rhythms*. pp 57-80. Plenum Press. New York, London.
- Pittendrigh, C.S., Daan, S. (1974). Circadian oscillation in rodents: A systematic increase of their frequency with age. *Science* 186: 548-550.
- Pittendrigh, C.S., Daan, S. (1976). A functional analysis of circadian pacemakers in nocturnal rodents. IV. Entrainment: Pacemaker as clock. *J Comp Physiol* 106: 291-331.
- Pittendrigh, C.S., Daan, S. (1976b). A functional analysis of circadian pacemakers in nocturnal rodents. V. Pacemaker structure: a clock for all seasons. *J Comp Physiol* 106: 333-355.
- Preitner, N., Damiola, F., Lopez-Molina, L, Zakany, J., Duboule, D., Albrecht, U., Schibler, U. (2002). The orphan nuclear receptor REV-ERB $\alpha$  controls circadian transcription within the positive limb of the mammalian circadian oscillator. *Cell* 110: 251-260.

- Provencio, I., Rolag, M.D., Castrucci, A.M. (2002). Photoreceptive net in the mammalian retina. This mesh of cells may explain how some blind mice can still tell day from night. *Nature* 415 (6871): 493.
- Purves, W.K., Orians, G.H., Heller, C. (1995). *Life: The Science of Biology*. First Edition. Sinauer Associates Inc., New York.
- Rajaratnam, S.M., Redman, J.R. (1999). Social contact synchronizes free-running activity rhythms of diurnal palm squirrels. *Physiol Behav* 66(1): 21-26.
- Ralph, M.R. (1991). Suprachiasmatic Nucleus Transplant Studies Using the Tau Mutation in Golden Hamsters. In D.C. Klein, R.C. Moor und S.M. Reppert (Eds.), *Suprachiasmatic Nucleus: The Mind's Clock*. pp. 341-374. Oxford University Press. New York, Oxford
- Ralph, M.R., Foster, R.G., Davis, F.C., Menaker, M. (1990). Transplanted suprachiasmatic nucleus determines circadian period. *Science* 247: 975-978.
- Ralph, M.R., Menaker, M. (1988). A mutation of the circadian system in golden hamsters. *Science* 241: 1225-1227.
- Rea, M.A., Buckley, B, Lutton, L.M. (1993). Local administration of EAA antagonists blocks light-induced phaseshifts and c-fos expression in hamster SCN. *Am J Physiol* 265: R1191-1198.
- Reppert, S.M., Weaver, D.R. (2002). Coordination of circadian timing in mammals. *Nature* 418: 935-941.
- Roenneberg, T., Mellow, M. (2002a). Life before the clock: modeling circadian evolution. *J Biol Rhythms* 17: 495-505.
- Roenneberg, T., Mellow, M. (2002b). „What watch? ... such much!“ Complexity and evolution of circadian clocks. *Cell Tissue Res* 309: 3-9.
- Romijn, H.J., Sluiter, A.A., Pool, C.W., Wortel, J., Buijs, R.M. (1997). Evidence from confocal fluorescence microscopy for a dense, reciprocal innervation between AVP-, somatostatin-, VIP/PHI-, GRP-, and VIP/PHI/GRP-immunoreactive neurons in the rat suprachiasmatic nucleus. *Eur J Neurosci* 9: 2613-2623.
- Rooyendaal, B., Van Gool, W.A., Swaab, D.F., Hoogendijk, J.E., Mirmiran, M. (1987). Changes in vasopressin cells of the rat suprachiasmatic nucleus with aging. *Brain Res* 409: 259-295.
- Ruby, N.F., Saran, A., Kang, T., Franken P., Heller, H.C. (1996). Siberian hamsters free run or become arrhythmic after a phase delay of the photocycle. *Am J Physiol* 271: R881-R890.
- Rusak, B. (1977). The role of the suprachiasmatic nuclei in the generation of circadian rhythms in the golden hamster, *Mesocricetus auratus*. *J Comp Physiol* 118: 145-164.
- Rusak, B., Zucker, I. (1979). Neural regulation of circadian rhythms. *Physio Rev* 59: 449-526.
- Sacher, G.A., Duffy, P.H. (1978). Age changes in rhythms of energy metabolism, activity, and bodytemperature in *Mus* und *Peromyscus*. In H.V. Samis, Jr. und S. Capobianco (Eds), *Aging and Biological rhythms*. Plenum Press, New York, London.
- Sakawi, Y., Nihonmatsu, I., Kawamura, H. (1984). Transplantation of the neonatal suprachiasmatic nuclei into rats with complete suprachiasmatic lesions. *Neurosci Res* 1: 67-72.
- Salathia, N., Edwards, K., Millar, A.J., (2002). QTL for timing: a natural diversity of clock genes. *Trends Genet* 18: 15-118.
- Sanada, K., Okano, R., Fukada, Y. (2002). Mitogen-activated protein kinase phosphorylates and negatively regulates basic helix-loop-helix-PAS transcription factor BMAL1. *J Biol Chem* 277: 267-271.
- Scherbarth, F., Breustedt, A., Steinlechner, S. (1999). Wheel-running activity – a remedy for broken clocks? 8<sup>th</sup> meeting of the European Pineal Society, Tours: A08

- Segovia, G., Porras, A., Del Arco A., Mora, F. (2001). Glutamatergic neurotransmission in aging: a critical perspective. *Mech Ageing Dev* 122: 1-29.
- Semo, M., Lupi, D., Peirson, S.N., Butler, J.N., Foster, R.G. (2003b). Light-induced c-fos in melanopsin retinal ganglion cells of young and aged rodless/coneless (rd/rd cl) mice. *Europ J Neurosci* 18: 3007-3017.
- Semo, M., Peirson, S., Lupi, D., Lucas, R.J., Jeffery, G., Foster, R.G. (2003a). Melanopsin retinal ganglion cells and the maintenance of circadian and pupillary responses to light in aged rodless/coneless (rd/rd cl) mice. *Europ J Neurosci* 17:1793-1801.
- Shearman, L.P., Jin, X., Lee, C., Reppert, S.M., Weaver, D.R. (2000). Targeted disruption of the mPer3 gene: subtle effects on circadian clock function. *Mol Cell Biol* 20: 6269-6275.
- Shearman, L.P., Zylka, M.J., Weaver, D.R., Kolkowsik L.F., Jr., Reppert, S.M. (1997). Two period homologs: circadian expression and photic regulation in the suprachiasmatic nuclei. *Neuron* 19: 1261-1269.
- Sheng, M., Greenberg M.E. (1990). The Regulation and Function of c-fos and other Immediate Early Genes in the Nervous System. *Neuron*: 4(4): 477-485.
- Sheng, M., Thompson, M.A., Greenberg, M.E. (1991). CREB: A Ca<sup>2+</sup>-Regulated Transcription Factor Phosphorylated by Calmodulin-Dependent Kinases. *Science* 252: 1427-1430.
- Shibata, S., Moore, R.Y. (1993). Tetrodotoxin does not affect circadian rhythms in neuronal activity and metabolism in rodent suprachiasmatic nucleus in vitro. *Brain Res* 606: 259-266.
- Shibata, S., Oomura, Y., Kite, H., Hattori, K. (1982). Circadian rhythmic changes of neuronal activity in the suprachiasmatic nucleus of the rat hypothalamic slice. *Brain Res* 247:154-157.
- Shigeyoshi, Y., Taguchi, K., Yamamoto, S., Takekida, S., Yan, L., Tei, H., Moriya, T., Shibata, S., Loros, J.L., Dunlap, J.C., Okamura, H. (1997). Light-induced resetting of the mammalian circadian clock is associated with rapid induction of the mper1 transcript. *Cell* 91: 1043-1053.
- Sidman, R.L., Angevine, J.B., Taber-Pierce, E. (1971). Atlas of the mouse brain and spinal cord. Harvard University Press, Cambridge.
- Sokolove, P., Bushell, W.N. (1978). The chi square periodogram: Its utility for analysis of circadian rhythms. *J Theor Biol* 72: 131-160.
- Steinlechner S., Buchberger, A., Heldmaier, G. (1987). Circadian rhythms of pineal N-acetyltransferase activity in the Djungarian hamster, *Phodopus sungorus*, in response to seasonal changes of natural photoperiod. *J Comp Physiol. A.* 160 (5): 593-597.
- Steinlechner, S., Heldmaier, G., Becker, H. (1983). The seasonal cycle of body weight in the Djungarian hamster: photoperiodic control and the influence of starvation and melatonin. *Oecologia* 60: 401-405.
- Steinlechner, S., Stieglitz, A., Ruf, T. (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., Zucker, I. (1972). Circadian rhythms in drinking behavior and locomotor activity of rats are eliminated by hypothalamic lesions. *Proc Natl Acad Sci USA* 69: 1583-1586.
- Sternberger, L.A. (1986). Immunocytochemistry. Third Edition. Wiley, New York.
- Stopa, E.G., Johnson, J.K., Friedman, D.I., Reyer, H.I., Reidy, J., LeBlanc, V., Albers, H.E. (1995). Neuropeptide Y receptor distribution and regulation in the suprachiasmatic nucleus of Syrian hamster (*Mesocricetus auratus*). *Peptide Res* 8: 95-100.
- Strecker, G.J., Wuarin, J.P., Dudek, F.E. (1997). GABA<sub>A</sub>-mediated local synaptic pathways connect neurons in the rat suprachiasmatic nucleus. *J Neurophysiol* 78:2217-2220.

- Sumová, A., Bendová, Z., Sládek, M., Kováčiková, Z., Illnerová, H. (2004). Seasonal Molecular Timekeeping Within the Rat Circadian Clock. *Physiol Res* 53 (Suppl 1): S167-S176.
- Sumová, A., Trávníčková, Z., Illnerová, H. (2000). Spontaneous c-Fos rhythm in the rat suprachiasmatic nucleus: location and effect of photoperiod. *Am J Physiol* 279: R2262-2269.
- Sumová, A., Trávníčková, Z., Mikkelsen, J.D., Illnerová, H. (1998). Spontaneous rhythm in c-Fos immunoreactivity in the dorso-medial part of the rat suprachiasmatic nucleus. *Brain Res* 801: 254-258.
- Sun, Z.S., Albrecht, U., Zhuchenko, O., Bailey, J., Eichele, G., Lee, C.C. (1997). RIGUI, a putative mammalian ortholog of the *Drosophila period* gene. *Cell* 90: 1003-1011.
- Swanson, L., Cowan, W.M., Jones, E.G. (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.
- Takano, A., Shimizu, K., Kani, S., Buijs, R.M., Okada, M., Nagai, K. (2000). Cloning and characterization of rat casein kinase 1 $\epsilon$ . *FEBS Lett* 477: 106-112.
- Takumi, T., Matsubara, C., Shigeyoshi, Y., Yagita, K., Meabayashi, Y., Sakakida, Y., Okamura, K., Takashima, N.; Okamura, H. (1998). A new mammalian period gene predominantly expressed in the suprachiasmatic nucleus. *Genes Cells* 3: 167-176.
- Tei, H., Okamura, H., Shigeyoshi, Y., Fukuhara, C., Ozawa, R., Hirose, M., Sakaki, Y. (1997). Circadian oscillation of a mammalian homologue of the *Drosophila period* gene. *Nature* 389:512-516.
- Tischkau, S.A., Barnes, J.A., Lin, F.J., Myers, E.M., Barnes, J.W., Meyer-Bernstein, E.L., Hurst, W.J., Burgoon, P.W., Chen, D., Sehgal, A., Gillette, M.U. (1999). Oscillation and light induction of timeless mRNA in the mammalian circadian clock. *J. Neurosci* 19: RC15.
- Todo, T., Ryo, H., Yamamoto, K., Toh, H., Inui, T., Ayaki, H., Nomura, T., Ikenaga, M. (1996). Similarity among the *Drosophila* (6-4)photolyase, a human photolyase homolog, and the DNA photolyase-blue-light-photoreceptor family. *Science* 272: 109-112.
- Trávníčková-Bendová, Z., Cermakian, N., Reppert, S.M., Sassone-Corsi P. (2002). Bimodal regulation of mPeriod promoters by CREB-dependent signaling and CLOCK/BMAL1 activity. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 7728-7733.
- Treep, J.A., Abe, H., Rusak, B., Goguen, D.M. (1995). Two distinct retinal projections to the hamster suprachiasmatic nucleus. *J Biol Rhythms* 10: 299-307.
- Ueda, H.R., Chen, W., Adachi, A., Wakamatsu, H., Hayashi, S., Takasugi, T., Nagano, M., Nakahama, K., Suzuki, Y., Sugano, S., Iino, M., Shigeyoshi, Y., Hashimoto, S. (2002). A transcription factor response element for gene expression during circadian night. *Nature* 418: 534-539.
- Valentinuzzi, V.S., Scarbrough, K., Takahashi, J.S., Turek, F.W. (1997). Effects of aging on the circadian rhythm of wheel-running activity in C57BL/6 mice. *Am J Physiol* 273: R1957-R1964.
- van den Pol, A.N. (1991). The suprachiasmatic nucleus: morphological and cytochemical substrates for cellular interaction. In D.C. Klein, R.C. Moor und S.M. Reppert (Eds.), *Suprachiasmatic Nucleus: The Mind's Clock*. pp. 17-50. Oxford University Press. New York, Oxford
- van den Pol, A.N., Tsujimoto, K.L. (1985). Neurotransmitters of the hypothalamic suprachiasmatic nucleus: immunocytochemical analysis of 25 neuronal antigens. *Neuroscience* 15: 1049-1086.
- van der Horst, G.T., Muijtjens, M., Kobayashi, K., Takano, R., Kanno, S., Takao, M., de Wit, J., Verkerk, A., Elker, A.P., van Leenen, D., Buijs, R., Bootsma, D.,

- Hoeijmakers, J.H., Yasui, A., (1999). Mammalian Cry1 and Cry2 are essential for maintenance of circadian rhythms. *Nature*. 398: 627-620.
- van der Zee, C.E., Schuurman, T., van der Hoop, R.G., Traber, J., Gispen, W.H. (1990). Beneficial effect of nimodipine on peripheral nerve function in aged rats. *Neurobiol Aging* 11(4): 451-456.
- van Gool, W.A., Witting, W., Mirmiran, M. (1987). Age-related changes in circadian sleep-wakefulness rhythms in male rats isolated from time cues. *Brain Res* 413: 384-387.
- van Norren, D., van Meel, G.J. (1985). Density of human cone photopigments as a function of age. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 26(7): 1014-1016.
- Vielhaber, E., Eide, E., Rivers, A., Gao, Z.H., Virshup, D.M. (2000). Nuclear entry of the circadian regulator mPER1 is controlled by mammalian casein kinase I  $\epsilon$ . *Mol Cell Biol* 20: 4888-4899.
- Vitaterna, M.H., King, D.P., Chang, A.M., Kornhauser, J.M., Lowrey, P.L., McDonald, J.D., Dove, W.F., Pinto, L.H., Turek F.W., Takahashi, J.S. (1994). Mutagenesis and mapping of a mouse gene, *Clock*, essential for circadian behavior. *Science* 264: 719-725.
- Voigt, H. (2003). Charakterisierung der lichtinduzierten Arrhythmie des circadianen Systems beim Dsungarischen Zwerghamster (*Phodopus sungorus*) auf physiologischer und molekularer Ebene. Universität Hannover. FB Biologie. Dissertation.
- Watanabe, M., Inoue, Y., Sakimura, K., Mishina, M. (1993). Distinct distributions of five NMDA receptor channel subunit mRNAs in the forebrain. *J Comp Neurol* 338:377-390.
- Watts, A.G. (1991). The efferent projections of the suprachiasmatic nucleus: anatomical insights into the control of circadian rhythms. In D.C. Klein, R.C. Moore und S.M. Reppert (Eds.), *Suprachiasmatic Nucleus: The Mind's Clock*. pp. 77-119. Oxford University Press. New York, Oxford
- Weinert, D., Waterhouse, J. (1999). Daily activity and body temperature rhythms do not change simultaneously with age in laboratory mice. *Physiol Behav* 66: 605-612.
- Weinert, D. (2000). Age-Dependent Changes of the Circadian System. *Chronobiol Int* 17(3): 261-283.
- Weinert, D., Kompauerova, V. (1998). Light-induced phase and period responses of circadian activity rhythms in laboratory mice of different ages. *Zoology* 101: 45-52.
- Weinert, H., Weinert, D. (1998). Circadian activity rhythms of laboratory mice during the last weeks of their life. *Biol Rhythm Res* 29(2): 159-178.
- Welsh, D., Richardson, G.S., Dement, W.C. (1986). Effect of age on the circadian pattern of sleep and wakefulness in the mouse. *J Gerontol* 41: 579-586.
- Welsh, D.K., Logothetis, D.E., Meister, M., Reppert, S.M. (1995). Individual neurons dissociated from rat suprachiasmatic nucleus express independently phased circadian firing rhythms. *Neuron* 14: 697-706.
- Wollnik, F., Bihler, S. (1996). Strain differences in the distribution of arginine-vasopressin- and neuropeptide Y-immunoreactive neurons in the suprachiasmatic nucleus of laboratory rats. *Brain Res* 724: 191-199.
- Yamaguchi, S., Isejima, H., Matsuo, T., Okura, R., Yagita, K., Kobayashi, M., Okamura, H. (2003). Synchronization of cellular clocks in the suprachiasmatic nucleus. *Science* 302: 1408-1412.
- Yamaguchi, S., Mitsui, S., Yan, L., Yagita, K., Miyake, S., Okamura, H. (2000). Role of DBP in the circadian oscillatory mechanism. *Mol Cell Biol* 20: 4773-4781.
- Yan, L., Okamura, H. (2002). Gradients in the circadian expression of *Per1* and *Per2* genes in the rat suprachiasmatic nucleus. *Eur J Neurosci* 15: 1153-1162.
- Yan, L., Silver, R. (2004). Resetting the brain clock: time course and localization of mPER1 and mPER2 protein expression in suprachiasmatic nuclei during phase shifts. *Eur J Neurosci* 19: 1105-1109.

- 
- Yokota, S., Yamamoto M., Moriya, T., Akiyama, M, Fukunaga K., Miyamoto E., Shibata S. (2001). Involvement of calcium-calmodulin protein kinase but not mitogen-activated protein kinase in light-induced phase delays and *Per* gene expression in the suprachiasmatic nucleus of the hamster. *J Neurochem* 77: 618-627.
- Yoshida, K., Imaki, J, Okamoto Y, Iwakabe, H., Fujisawa, H., Matsuda, A., Nakanisi, S., Matsuda, H., Hagiwara, M. (1998). CREB-induced transcriptional activation depends on mGluR6 in rod bipolar cells. *Mol Brain Res* 57(2): 241-247.
- Yunis, E.J., Fernandes, G., Nelson, W., Halberg, F. (1974). Circadian temperature rhythms and aging in rodents. *In* L.E. Scheving, F. Halberg und J.E. Pauly (Eds), *Chronobiology*. Iguku Shoin, Tokyo.
- Zukin, R.S., Bennett, M.V.L. (1995). Alternatively spliced isoforms of the NMDAR1 receptor subunit. *Tins* 18: 306-313.
- Zyalka, M.J., Shearman, L.P., Weaver, D.R., Reppert, S.M. (1998). Three period homologues in mammals: differential light response in the suprachiasmatic circadian clock and oscillating transcripts outside of brain. *Neuron* 20: 1103-1110.

## 6 Anhang

### 6.1 Anhang A - Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
#	Anzahl
ANOVA	Varianzanalyse (= Analysis of varianz)
AVP	Adenosin Vasopressin
bHLH	Basic-helix-loop-helix
Bmal1/BMAL1	Brain and muscle aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator-like 1
bp	Basenpaare
CalB	Calbindin
cAMP	zyklisches Adenosin Monophosphat
cDNA	copy DNA
CK1 $\epsilon$	Caseinkinase 1-epsilon
CLOCK	Circadian locomotor output cylice kaput
Co	Chiasma opticum
CRE	cAMP responsive element
CREB	CRE-binding protein
Cry/CRY	Cryptochrome
Da	Dalton
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
Dec/DEC	Differential embryo-chondrocyte expressed gene
dest	destilliert
dm	dorso-medial
DMH	Dorso-medial hypothalamic nucleus
DNA	Desoxyribonucleinsäure
g	Gramm
GABA	$\gamma$ - Aminobuttersäure
GHT	geniculohypothalamischer Trakt
GLU	Glutamat
GRP	gastric releasing peptide
h	Stunde



---

5-HT	Serotonin
IEG	Immediate early gene
IGL	Intergeniculate leaflet
III / 3V	Dritter Ventrikel
Ir	Immunreaktivität
l	Liter
L:D	Licht:Dunkel Zyklus
LGN	Lateral geniculate nucleus
LS	Laterales septum
lx	Lux
M	Molar
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
(m)Per / (m)PER	(mouse)Period
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
mg	Milligramm
min	Minuten
ml	Milliliter
mPOA	medial preoptic area
mRNA	messenger RNA
n	Anzahl von Tieren in einer Versuchsgruppe
n.s.	nicht signifikant
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
NMDA-R1 = NR1	N-Methyl-D-Aspartat Rezeptor 1
NPY	Neuropeptid Y
OD	Optische Dichte
P	Fehlerwahrscheinlichkeit
PACAP	pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PAS	Per, Arnt, Sim
PB	Phosphatpuffer
PBS	Phosphat gepufferte Saline
pCREB	phosphoryliertes CREB
PFA	Paraformaldehyd

---

---

PHI	peptide histidin isoleucin
PIR	Passiv Infrarot
PKA	Proteinkinase A
PVN	Nucleus paraventricularis
PVT	Paraventricular thalamic nucleus
Rev-Erba/ REV-ERBa	Nuclear receptor subfamily 1, group D, member 1
RHT	Retinohypothalamischer Trakt
RNA	Ribonucleinsäure
RT-PCR	Reverse-Transcriptase-Polymerase-Chain-Reaction
s	Sekunden
SCN	Suprachiasmatischer Nucleus
SDS	Natriumdodecylsulfat
SON	Supraoptic Nucleus
SPZ	Subparaventriculare Zone
SS	Somatostatin
$\tau$	Periodenlänge des biologischen Rhythmus
TIM	Timeless
TRIS	2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3 propandiol
VIP	Vasoactive intestinal polypeptide
vl	ventro-lateral
vs.	versus
ZT	Zeitgeber time; ZT0 = Licht an
$\Sigma$	Summe

---

## 6.2 Anhang B - Mittelwerte der gezählten immunreaktiven Zellen

### a) mPER2

Tab. 1: Mittelwerte der Anzahl mPER2-positiver Zellen auf der rostro-caudalen Achse zu verschiedenen Zeitgeberzeiten (ZT) in einem SCN von jungen rhythmischen Zwerghamster. Der Mittelwert ist  $\pm$  SEM angegeben. n = 4.

Sektion	ZT0	ZT8	ZT16	ZT20
Rostral	36,9 $\pm$ 4,0	15,3 $\pm$ 1,4	15,9 $\pm$ 4,3	20,0 $\pm$ 6,0
Medial	108,0 $\pm$ 8,3	84,2 $\pm$ 8,3	82,9 $\pm$ 5,2	129,0 $\pm$ 16,1
Caudal	42,3 $\pm$ 17,4	71,5 $\pm$ 6,0	34,7 $\pm$ 16,5	35,8 $\pm$ 1,8
$\Sigma$	187,1 $\pm$ 9,9	171,1 $\pm$ 5,2	133,5 $\pm$ 8,6	184,8 $\pm$ 8,0

Tab.2: Mittelwerte der Anzahl mPER2-positiver Zellen auf der rostro-caudalen Achse zu verschiedenen Zeitgeberzeiten (ZT) in einem SCN von alten rhythmischen Zwerghamster. Der Mittelwert ist  $\pm$  SEM angegeben. n = 4-5.

Sektion	ZT0	ZT8	ZT16	ZT20
Rostral	12,7 $\pm$ 1,0	19,2 $\pm$ 5,9	21,8 $\pm$ 2,7	15,6 $\pm$ 0,9
Medial	76,1 $\pm$ 8,1	97,3 $\pm$ 15,0	118,1 $\pm$ 3,2	111,5 $\pm$ 5,3
Caudal	47,5 $\pm$ 11,4	83,2 $\pm$ 15,0	64,0 $\pm$ 2,2	45,4 $\pm$ 9,4
$\Sigma$	136,3 $\pm$ 6,8	199,7 $\pm$ 12,0	203,9 $\pm$ 2,7	172,5 $\pm$ 5,2

Tab. 3: Mittelwerte der Anzahl mPER2-positiver Zellen auf der rostro-caudalen Achse über verschiedene Zeitpunkte (ZT) in einem SCN von jungen arrhythmischen Zwerghamstern. Der Mittelwert ist  $\pm$  SEM angegeben. n = 3-4.

Sektion	ZT0	ZT8	ZT16	ZT20
Rostral	22,5 $\pm$ 1,2	14,2 $\pm$ 1,9	22,6 $\pm$ 2,9	25,0 $\pm$ 2,2
Medial	124,3 $\pm$ 5,4	81,5 $\pm$ 1,7	113,6 $\pm$ 9,2	88,7 $\pm$ 6,1
Caudal	53,2 $\pm$ 6,4	50,5 $\pm$ 8,3	47,3 $\pm$ 8,1	46,3 $\pm$ 1,0
$\Sigma$	200,0 $\pm$ 4,4	146,2 $\pm$ 4,0	183,5 $\pm$ 6,7	160,0 $\pm$ 3,1

Tab. 4: Mittelwerte der Anzahl mPER2-positiver Zellen auf der rostro-caudalen Achse über verschiedene Zeitpunkte (ZT) in einem SCN von alten arrhythmischen Zwerghamstern. Der Mittelwert ist  $\pm$  SEM angegeben. n = 3-8.

Sektion	ZT0	ZT8	ZT16	ZT20
Rostral	12,0 $\pm$ 4,6	14,4 $\pm$ 2,8	18,3 $\pm$ 3,7	16,2 $\pm$ 2,2
Medial	78,5 $\pm$ 5,3	86,1 $\pm$ 9,7	101,1 $\pm$ 18,2	98,6 $\pm$ 6,3
Caudal	43,1 $\pm$ 12,8	62,5 $\pm$ 12,5	67,9 $\pm$ 8,9	62,0 $\pm$ 8,2
$\Sigma$	132,6 $\pm$ 7,6	163,1 $\pm$ 8,4	187,3 $\pm$ 10,3	177,2 $\pm$ 5,6

### b) pCREB

Tab. 5: Mittelwerte der Anzahl pCREB-positiven Zellen in ihrer rostro-caudalen Verteilung zu verschiedenen Zeitgeberzeiten (ZT) in einem SCN von jungen rhythmischen Zwerghamstern. Der Mittelwert ist  $\pm$  SEM angegeben. n = 4 -7.

Sektion	ZT0	ZT8	ZT16	ZT20
Rostral	98,9 $\pm$ 10,4	116,4 $\pm$ 17,9	71,9 $\pm$ 15,2	83,5 $\pm$ 15,0
Medial	164,8 $\pm$ 14,2	179,0 $\pm$ 36,4	151,0 $\pm$ 24,7	156,2 $\pm$ 20,4
Caudal	137,4 $\pm$ 19,2	244,1 $\pm$ 39,0	139,7 $\pm$ 34,2	193,6 $\pm$ 32,4
$\Sigma$	401,1 $\pm$ 14,6	539,5 $\pm$ 31,1	362,6 $\pm$ 24,7	433,3 $\pm$ 22,6

Tab. 6: Mittelwerte der Anzahl immunpositiver Zellen gegen pCREB in ihrer rostro-caudalen Verteilung zu verschiedenen Zeitgeberzeiten (ZT) in einem SCN von alten rhythmischen Zwerghamstern. Der Mittelwert ist  $\pm$  SEM angegeben. n = 4 -7.

Sektion	ZT0	ZT8	ZT16	ZT20
Rostral	77,2 $\pm$ 4,7	111,7 $\pm$ 24,3	104,2 $\pm$ 6,6	97,0 $\pm$ 11,1
Medial	174,7 $\pm$ 12,2	231,7 $\pm$ 37,7	231,9 $\pm$ 16,9	182,2 $\pm$ 8,9
Caudal	210,5 $\pm$ 15,7	285,5 $\pm$ 36,6	263,6 $\pm$ 21,5	241,6 $\pm$ 16,7
$\Sigma$	462,4 $\pm$ 10,9	628,9 $\pm$ 32,9	599,7 $\pm$ 15,0	520,9 $\pm$ 12,2

Tab. 7: Mittelwerte der Anzahl pCREB-positiver Zellen in ihrer rostro-caudalen Verteilung zu verschiedenen Zeitgeberzeiten (ZT) in einem SCN von jungen arrhythmischen Zwerghamstern. Der Mittelwert ist  $\pm$  SEM angegeben. n = 4 –7.

Sektion	ZT0	ZT8	ZT16	ZT20
Rostral	123,5 $\pm$ 17,3	100,4 $\pm$ 13,7	92,8 $\pm$ 13,3	84,7 $\pm$ 12,0
Medial	174,8 $\pm$ 22,8	168,4 $\pm$ 21,5	181,3 $\pm$ 22,3	179,7 $\pm$ 17,8
Caudal	217,7 $\pm$ 22,5	210,4 $\pm$ 37,3	251,0 $\pm$ 13,6	242,3 $\pm$ 21,7
$\Sigma$	516,0 $\pm$ 20,9	479,2 $\pm$ 24,2	525,1 $\pm$ 16,4	506,6 $\pm$ 17,2

Tab. 8: Mittelwerte der Anzahl pCREB-positiven Zellen in ihrer rostro-caudalen Verteilung zu verschiedenen Zeitgeberzeiten (ZT) in einem SCN von alten arrhythmischen Zwerghamstern. Der Mittelwert ist  $\pm$  SEM angegeben. n = 4.

Sektion	ZT0	ZT8	ZT16	ZT20
Rostral	77,3 $\pm$ 4,8	139,0 $\pm$ 14,7	116,1 $\pm$ 14,6	102,6 $\pm$ 18,4
Medial	156,6 $\pm$ 7,6	220,0 $\pm$ 20,9	170,1 $\pm$ 21,2	172,4 $\pm$ 6,8
Caudal	191,3 $\pm$ 22,7	258,2 $\pm$ 14,7	220,6 $\pm$ 35,3	267,9 $\pm$ 18,2
$\Sigma$	425,1 $\pm$ 11,7	617,1 $\pm$ 16,8	506,8 $\pm$ 23,7	542,9 $\pm$ 14,5

### c) cFOS

Tab. 9: Mittelwerte der Anzahl cFOS-positiver Zellen in ihrer rostro-caudalen Verteilung zu verschiedenen Zeitgeberzeiten (ZT) in einem SCN von jungen rhythmischen Zwerghamstern. Der Mittelwert ist  $\pm$  SEM angegeben. n = 4.

Sektion	ZT0	ZT8	ZT16	ZT20
Rostral	48,8 $\pm$ 8,8	41,9 $\pm$ 2,8	40,5 $\pm$ 4,2	42,4 $\pm$ 3,1
Medial	83,4 $\pm$ 8,9	105,9 $\pm$ 13,2	118,3 $\pm$ 12,4	78,2 $\pm$ 8,6
Caudal	47,4 $\pm$ 2,4	72,3 $\pm$ 10,2	72,4 $\pm$ 7,5	47,4 $\pm$ 11,2
$\Sigma$	179,6 $\pm$ 6,7	220,1 $\pm$ 8,8	231,1 $\pm$ 8,0	167,9 $\pm$ 7,7

Tab. 10: Mittelwerte der Anzahl cFOS-positiver Zellen in ihrer rostro-caudalen Verteilung zu verschiedenen Zeitgeberzeiten (ZT) in einem SCN von alten rhythmischen Zwerghamstern. Der Mittelwert ist  $\pm$  SEM angegeben. n = 4

Sektion	ZT0	ZT8	ZT16	ZT20
Rostral	27,2 $\pm$ 3,0	19,8 $\pm$ 4,0	18,9 $\pm$ 3,9	19,2 $\pm$ 5,1
Medial	67,0 $\pm$ 3,6	102,2 $\pm$ 8,4	94,1 $\pm$ 6,2	20,8 $\pm$ 4,0
Caudal	46,4 $\pm$ 2,7	71,5 $\pm$ 8,4	49,1 $\pm$ 11,3	12,4 $\pm$ 1,0
$\Sigma$	140,6 $\pm$ 3,1	193,6 $\pm$ 6,9	162,1 $\pm$ 6,8	52,4 $\pm$ 3,4

Tab. 11: Mittelwerte der Anzahl cFOS-positiver Zellen in ihrer rostro-caudalen Verteilung zu verschiedenen Zeitgeberzeiten (ZT) in einem SCN von jungen arrhythmischen Zwerghamstern. Der Mittelwert ist  $\pm$  SEM angegeben. n = 4.

Sektion	ZT0	ZT8	ZT16	ZT20
Rostral	49,1 $\pm$ 5,3	37,7 $\pm$ 4,2	21,8 $\pm$ 6,6	30,7 $\pm$ 5,3
Medial	124,8 $\pm$ 23,9	102,0 $\pm$ 10,9	108,1 $\pm$ 8,7	68,9 $\pm$ 17,9
Caudal	88,4 $\pm$ 6,4	58,6 $\pm$ 8,2	77,1 $\pm$ 8,5	52,1 $\pm$ 8,4
$\Sigma$	262,4 $\pm$ 11,9	198,3 $\pm$ 7,8	206,9 $\pm$ 7,9	151,7 $\pm$ 10,5

Tab. 12: Mittelwerte der Anzahl cFOS-positiver Zellen in ihrer rostro-caudalen Verteilung zu verschiedenen Zeitgeberzeiten (ZT) in einem SCN von alten arrhythmischen Zwerghamstern. Der Mittelwert ist  $\pm$  SEM angegeben. n = 4

Sektion	ZT0	ZT8	ZT16	ZT20
Rostral	25,8 $\pm$ 3,3	40,6 $\pm$ 2,5	34,2 $\pm$ 9,7	14,1 $\pm$ 2,6
Medial	86,0 $\pm$ 14,3	139,5 $\pm$ 12,0	92,3 $\pm$ 9,7	39,8 $\pm$ 15,9
Caudal	81,9 $\pm$ 14,6	81,5 $\pm$ 15,6	56,0 $\pm$ 1,9	39,0 $\pm$ 8,7
$\Sigma$	193,7 $\pm$ 10,7	261,6 $\pm$ 10,0	182,5 $\pm$ 7,1	92,9 $\pm$ 9,1

## 6.3 Anhang C - Material

### a) Chemikalien und Fertigmaterien

Substanz	Hersteller
100 bp DNA LaderMarker	Gibco BRL, Manufacturer Life Technologies, UK
3,3' Diaminobenzidine, (DAB)	Sigma Chemicals Co, USA
Agar, reinst	Merck, Darmstadt
Agarose	Gibco BRL, Manufacturer Life Technologies, UK
Ammoniumaluminiumsulfat-12-hydrat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Ammonium-Nickel-Sulfat $H_8N_2NiO_8S_2 \cdot 6H_2O$	Fluka Chemie GmbH, Buchs, CH
BD advantage TM 2 PCR kit	BD Biosciences Clontech, USA
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt
Calciumchlorid $CaCl_2$	Merck, Darmstadt
CHAPS $C_{32}H_{58}N_2O_7S$ 3[3-Cholamidopropyl) dimethylammonio]-1- propanesulfonate	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Chloroform $CHCl_3$	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Citronensäure $C_6H_8O_7$	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
D (+) Saccharose $C_{12}H_{22}O_{11}$	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
Di-Natriumhydrogenphosphat $Na_2HPO_4$	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
Dithiothreitol (DTT)	Gibco BRL, Manufacturer Life Technologies, UK
DPX (Eindeckmedium Immunhisto.)	Fluka Chemie GmbH, Buchs CH

---

ECL Plus Western Blotting Detection Reagents (RPN2132)	Amersham Biosciences Corp., USA
Einbettmedium für Gefrierschnitte	Jung Reichert
Eosin Y	Merck, Darmstadt
Essigsäure (96%) $\text{CH}_3\text{COOH}$	Merck, Darmstadt
Ethanol $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Sigma Chemicals Co., USA
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Gelatine	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Glycerol $\text{C}_3\text{H}_8\text{O}_3$	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
Hämatoxylin	Fluka Chemie GmbH, Buchs, CH
Hyperfilm ECL , 18 x 24 cm (RPN2103K)	Amersham Pharmacia Biotech Inc, USA
Isopropanol $\text{C}_3\text{H}_8\text{O}$	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
Kaliumchlorid KCl	Merck, Darmstadt
Kaliumchromsulfat („Chromalaun“) $\text{KCr}(\text{SO}_4)_2$	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
Magermilchpulver	SUCOFIN®
Magnesiumchlorid (Hexahydrat) $\text{MgCl}_2 * 6 \text{H}_2\text{O}$	Fluka Chemie, Buchs, CH
Magnesiumsulfat (Heptahydrat) $\text{MgSO}_4 * 7 \text{H}_2\text{O}$	Merck, Darmstadt
Methanol $\text{CH}_3\text{OH}$	Merck, Darmstadt
MultiMark® Multi-Colored Standard	Invitrogene, Karlsruhe
Natriumacetat (Trihydrat) $\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2\text{Na} * 3 \text{H}_2\text{O}$	Sigma Chemicals Co, St. Louis, Mo, USA

---



---

Natriumchlorid NaCl	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
Natriumdihydrogenphosphat NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Natriumhydrogencarbonat NaHCO <sub>3</sub>	Merck, Darmstadt
Natronlauge NaOH (1N)	Merck, Darmstadt
PallFluoroTransW-Membrane, P/N EH 2222, 2µm Porengröße	Pall, Dreieich
PAP-Pen	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Paraformaldehyd (PFA)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Phenolrot	Merck, Darmstadt
PlusOne Coomassie Tablets, PhastGel Blue R350	Amersham Pharmacia Biotech Inc, USA
Protease-Inhibitor-Cocktail	Sigma Chemicals Co, USA
Rinderserumalbumin (BSA)	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
RNAse Zap	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Roentogen Liquid 1 + 3,5	Tetenal
Roentogen Superfix 1 + 4	Tetenal
Salzsäure HCl (1N)	Merck, Darmstadt
SuperScript™ II- Kit	Gibco BRL, Manufacturer Life Technologies, Paisley, UK
Technovit	Heraeus Kulzer GmbH,
Tri-Natriumacetat (Dihydrat) C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> Na <sub>3</sub> O <sub>7</sub> * 2 H <sub>2</sub> O	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
Tris(hydrosymethyl)aminomethan (TRIS)	Sigma Chemicals Co, USA
Tris-Glycin-Gele (10%,14%)	Anamed Elektrophorese GmbH, Darmstadt
Triton X-100	Sigma Chemicals Co, USA

---

---

TRIZOL	Sigma Chemicals Co, USA
Vectastain Elite ABC-Kit	Vector Laboratories Inc., USA
Wasserstoffperoxid H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Merck, Darmstadt
Xylencyanol für Elektrophorese	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
Xylol C <sub>8</sub> H <sub>10</sub>	Merck, Darmstadt

---

### **b) Puffer und Lösungen**

#### **Lichtmikroskopische Untersuchungen**

##### **PB (0,2 M Phosphatpuffer)**

Stammlösung A: 27,598 g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> in 1 l dH<sub>2</sub>O

Stammlösung B: 35,658 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> in 1 l dH<sub>2</sub>O

1 Teil Stammlösung A + 4 Teile Stammlösung B

##### **PBS (0,01 M phosphatgepufferte Saline)**

8 g NaCl

50 ml PB 0,2M

auf 1 l mit dH<sub>2</sub>O

##### **PFA (Paraformaldehyd-Lösung, 4%)**

80 g PFA

in ca. 900 ml dH<sub>2</sub>O

auf 60°C erhitzen und rühren

tropfenweise mit NaOH versetzen, bis sich die Lösung klärt (max. 0,1 ml)

filtrieren

auf 1 l mit dH<sub>2</sub>O auffüllen

1 l 0,2M PB hinzugeben

pH 7,4 ggf. mit HCl einstellen

Saccharoselösung

30% Saccharose  
in 0,1M PB (pH 7,4)

Kryoprotektions-Lösung

4,28 g Saccharose  
0,07 g Magnesiumchlorid Hexahydrat  
in 25 ml 0,1 M PBS lösen  
mit Glycerol (87%) auf 50 ml auffüllen

Gelatine-Chromalaun-Lösung für die Beschichtung von Objektträger

1,25 g Gelatine  
0,26 g Kaliumchromsulfat  
in 200 ml dH<sub>2</sub>O

blocking-Puffer für aufgezogene Schnitte

60 µl Ziegen-Normalserum (= 2%)  
60 mg Rinderserumalbumin (= 2%)  
in 3 ml 0,01 M PBS + 0,1% Triton X-100

blocking-Puffer für free-floating

150 µl Ziegen-Normalserum (= 1,5%)  
in 10 ml 0,01M PBS + 0,1% TritonX-100

Methanol / H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

1% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>  
in 100% Methanol

Citratlösung

Lösung A: 0,21 g Citronensäure in 100 ml dH<sub>2</sub>O (0,01M)  
Lösung B: 1,18 g Na-Citrat in 400 ml dH<sub>2</sub>O (0,01M)  
Lösung B vorlegen und mit Lösung A auf pH 6 einstellen

---

Ammoniumnickelsulfat in 0,1 M Acetatpuffer (pH 6)

27,7 g Natriumacetat  
0,5 ml Eisessig  
10 g Ammoniumnickelsulfat  
in 1 l dH<sub>2</sub>O

DAB (Diaminobenzidine)-Lösung

17,5 mg DAB (in 1 ml dH<sub>2</sub>O)  
in 100 ml Ammoniumnickelsulfat in 0,1 M Acetatpuffer  
100 µl 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

HE-Färbung:

## a) Hämalaun nach Delafield

4g Hämatoxylin  
in 25 ml 100% Ethanol lösen,  
400 ml gesättigtes Ammoniumalaun zusetzen  
(40g Ammoniumalaun auf 400 ml dH<sub>2</sub>O);  
4 Tage reifen lassen;  
Filtrieren;  
100 ml Glycerin  
100 ml Methanol;  
1-2 Monate reifen lassen

## b) Eosin für Technovitschnitte

1 g Eosin Y  
8 ml VE-H<sub>2</sub>O  
auf 200 ml mit 100% Ethanol auffüllen  
2 Tropfen Eisessig

## c) Eosin für Paraffinschnitte

1g Eosin Y  
in 100 ml VE-H<sub>2</sub>O lösen  
1 Tropfen Eisessig

---

**Gel-Elektrophorese und *Western Blot***Probenpuffer

## a) Tris/EDTA/Triton (pH 6,8)

20mM Tris(Hydroxymethyl)aminomethan (TRIS)

5 mM Ethylendiamintetraacetat (EDTA)

0,5% TRITON x-100

1% Natriumdodecylsulfat (SDS)

10 ml Proteasen-Inhibitor-Cocktail

in 25 ml dH<sub>2</sub>O

## b) Tris/CHAPS/EDTA (pH 6,8)

0,5M TRIS

5 mM EDTA

1% Cholamidopropyl-dimethylammonio-1-propane-sulfate (CHAPS)

20% Glycerol

10 ml Proteasen-Inhibitor-Cocktail

in 25 ml dH<sub>2</sub>O2 x SDS Probenpuffer

0,5 M TRIS-Cl (pH6,8)

10% SDS

20% Glycerol

20 mM Dithiothreitol (DTT)

0,03 mM Bromphenolblau

in 25 ml dH<sub>2</sub>OTris-Glycin-Puffer

## a) Kathodenpuffer

28 mM TRIS

190 mM Glycin

0,1% SDS

in 1 l dH<sub>2</sub>O

---

**b) Anodenpuffer**

25 mM TRIS  
190 mM Glycin  
in 1 l dH<sub>2</sub>O

**c) Transferpuffer (pH 8,2 - 8,4, ohne Einstellen)**

25 mM TRIS  
192 mM Glycin  
0,1% SDS  
in 10% Methanol

**Coomassie-Blue**

1 PhastGel-Blue Tablette  
in 2l 10% Essigsäure

**blocking-Puffer für Immunhistochemie**

5% Milchpulver  
in PBS (pH 7,3)

**RT-PCR****H<sub>2</sub>O/DEPC (RNase freies Wasser)**

DH<sub>2</sub>O wurde mit 0,05% DEPC versetzt und bei 37°C über Nacht inkubiert; das DEPC wurde anschließend durch eine 21-minütige Sterilisation bei 121°C im Autoklaven zerstört

**TAE-Puffer für Agarose Gele**

48,4 g Tris  
11,4 ml Essigsäure  
20 ml 0,5 M EDTA, pH8  
in 1 l dH<sub>2</sub>O

**1% Agorose Gel**

400 mg Agarose  
in 400 ml TAE

6 x Low Dye loading buffer

25 mg Brompeholblau

25 mg Xylencyanol FF

3 ml Glycerol

in 10 ml dH<sub>2</sub>Oc) Antikörper

<b>Primärantikörper</b>	<b>Monoklonal/ polyklonal</b>	<b>Verdünnung</b>	<b>Hersteller</b>
$\alpha$ -cFOS		1:6000	Calbiochem
$\alpha$ -Melanopsin		1: 6000	zur Verfügung gestellt von Dr. I. Provencio
$\alpha$ -NMDAR1 (1a+b und 2a+b)	Polyklonal - Kaninchen	1:500	Chemicon
$\alpha$ -pCREB <sup>Ser133</sup>		1 :500	Upstate
$\alpha$ -pCREB <sup>Ser142</sup>		1:500	Zur Verfügung gestellt von Dr. T. Lemberger
$\alpha$ -PER1		1:250	Alpha Diagnostic
$\alpha$ -PER1		1: 250	zur Verfügung gestellt von Dr. D. Weaver
$\alpha$ -PER2		1:500	Alpha Diagnostic

Als Sekundärantikörper wurde ein biotinylierter Goat-Anti-Rabbit Antikörper der Firma Sigma BioScience, St. Louis, Mo., USA verwendet.

d) Primer

Die Primer wurden von der Firma MWG Biotech in Ebersberg hergestellt.

### e) Geräte und Verbrauchsmaterialien

<b>Gerät / Material</b>	<b>Hersteller</b>
18 G Kanülen	Roth, Karlsruhe
24 Multiwellschalen	Nunc Intermed, UK
Mitsubishi video copy processor P91W für high-density Papier K65HM	Mitsubishi
Analysenwaage MC1	Sartorius GmbH, Göttingen
Axiophot	Zeiss, Oberkochen
Biotubes 2mL	Eppendorf, Hamburg
Digital pH-Meter 525	WTW , Omnilab ehemals Jürgens
Digitalkamera Spot, Model 1.3.0	Diagnostic Instruments Inc. USA
Dunkelkammerlampe E27 PF7 12E, red	Philips, Hamburg
Elektrophorese-Apparatur Hofer Mighty small II	Pharmacia Biotech, USA
Elektrotransfer-Apparatur Hofer Mighty Small SE 215	Amersham Pharmacia Biotech Inc, USA
Homogenisator	Braun Int. GmbH, Melsungen
Mikrotom Leica RM2065	Leica
Mikrotom-Kryostat HM 500 OM	Microm Laborgeräte GmbH, Walldorf
Objektträger Super Frost 26 x 76 cm	Roth, Karlsruhe
Petrischalen (klein)	Nunc Intermed, UK
Photometer	
Standard UV-Vis-Systems HP8453	Hewlett Packard
Polytron PT1200	Kinematica, Littau, Schweiz
Reaktionsgefäße, diverse Größen	Eppendorf, Hamburg
Schlauchpumpen	
- Masterflex L/S Economy Drive 7518-10	Cole & Parmer
- Minipuls 3 Abimed	Gilson,
Spritzenvorsatzfilter 0,2 µl	Roth, Karlsruhe
Thermomixer	Eppendorf, Hamburg
Zentrifugen	
a) GS-15R Centrifuge	a) Beckmann
b) Sorvall RC 3B Plus	b) Kendro Laboratory Products
c) Biofug Primo R	c) Heraeus Instruments
d) QL 3100-P	d) Omnilab
e) Biofug pico	e) Heraeus Instruments



### **f) Verbrauchsmaterial Hamsterzucht**

<b>Material</b>	<b>Hersteller</b>
Einstreu aus Weichholzfäsern	Altromin GmbH, Lage
Hamster-Zucht-Diät 7014	Altromin GmbH, Lage
Makrolonkäfige Typ II	Ehret GmbH & Co KG, Emmerdingen

### **g) Computerprogramme**

<b>Programm</b>	<b>Hersteller</b>
AlignX	Vector NTI Suite 5.5
Axiophot MetaMorph 5.0	Zeiss, Oberkochen
Msoffice 2000	Microsoft Corporation, USA
- Exel	
- Powerpoint	
- Word	
Photoshop 5.0	Adobe Systems Inc., USA
Primer3	Entwickelt am Whitehead Institut und Howard Hughes Medical Institut
QuickBasic Programme:	Institut für Zoologie, AG Steinlechner
- Aktogramme	basierend auf Programmen von T. Ruf,
- Periodogramme	weiterentwickelt von H. Dernbach, H. Voigt
- Tag/ Nachtaktivität	und F. Scherbarth
- Running Average	
StatView 5.0	SAS Institute Inc., Cary, N.C., USA

## 7 Danksagung

Das Zustandekommen dieser Arbeit wäre ohne eine Vielzahl an hilfsbereiten und lieben Menschen niemals geglückt und deshalb habe ich allen Grund mich herzlich zu bedanken!

Zunächst möchte ich mich bei Prof. Dr. Stephan Steinlechner bedanken für die Möglichkeit diese Arbeit in seiner Arbeitsgruppe durchzuführen, mich zu beweisen und meine Grenzen auszutesten.

Für die freundliche Überlassung von Antikörpern danke ich Dr. Ignacio Provencio, Department of Anatomy, Physiology & Genetics, Uniformed Services University, Bethesda, USA (Melanopsin), Dr. Thomas Lemberger, Deutsches Krebs Forschungszentrum, Abteilung Molekularbiologie der Zelle I, Heidelberg (pCREB<sup>Ser142</sup>) und Dr. David Weaver, Laboratory of Developmental Chronobiology, Pediatric Service, Massachusetts General Hospital and Harvard Medical School, Boston, USA (PER1).

In der Hoffnung niemanden zu vergessen..... danke ich weiterhin

- ☺ Dr. Henrik Oster (Max Planck Institut für experimentelle Endokrinologie, Hannover) für die Möglichkeit die RT-PCR durchzuführen.
- ☺ Prof. Dr. Peter Redecker (Medizinische Hochschule Hannover, Institut für Anatomie 1) für die Unterstützung bei den *Western- Blots*.
- ☺ Prof. Dr. Wilfried Meyer (Tierärztliche Hochschule Hannover, Institut für Anatomie) für die fachliche und technische Unterstützung bei der Einbettung der Augen in Paraffin und Technovit.
- ☺ Siegried Hilken, ohne deren Hilfe ich nicht nur die immunhistochemischen Untersuchungen niemals geschafft hätte; zudem hat sie durch ihre nette gradlinige Art die Dinge immer wieder ins rechte Licht gerückt.
- ☺ Marianne Brünning für die umsichtige und umfassende Betreuung meiner Tiere und für das gute Zuchtmanagement.
- ☺ Dr. Heike Pabst, deren Freundschaft und fachlicher Rat mich durch viele Tiefen getragen hat
- ☺ Dr. Henning Voigt für die fachlichen Diskussionen – besonders in der Endphase dieser Arbeit - und für seine Freundschaft.
- ☺ Frank Scherbarth und Dr. Robert Dallmann für „technical support“ und Statistik-Notdienst.
- ☺ Astrid Wolf für ihre Geduld beim Korrekturlesen und ihre Hilfe beim Formatieren dieser Arbeit und ganz besonders für ihre Freundschaft.
- ☺ Nadja Ufer, Annika Herwig und Esther Lipokatic, die ein tolles Arbeitsklima geschaffen und dazu beigetragen haben, mich immer wieder neu zu motivieren.
- ☺ Elisabeth Engelke für die Technovitschnitte.
- ☺ Reinhard Löhmer und Peter Ebinger, die immer ein offenes Ohr und aufmunternde Worte für mich hatten.
- ☺ Sandra Hamacher, der besten Sekretärin von allen, die für alle bürokratischen Probleme eine Lösung gefunden hat.

Abschließend gehört mein besonderer Dank meinen Eltern, Peter und Renate Perl, und meiner Schwester Imke, die mir durch „Hiwi-Jobs“ und Kinderbetreuung die nötige Luft zum Schreiben verschafften und vor allem dafür, dass sie mich immer unterstützt, motiviert und an mich geglaubt haben.

Und schließlich danke ich Andreas und unserem Sohn Paul, die die Prioritäten in meinem Leben neu geordnet haben.