





# **Serotonin und seine lichtähnliche Wirkung im circadianen System der Ratte**

Von der Fakultät für Geo- und Biowissenschaften der Universität Stuttgart zur  
Erlangung der Würde eines Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.) genehmigte  
Abhandlung

Vorgelegt von  
Andreas Kalkowski  
aus Radolfzell am Bodensee

Hauptberichter: Professor Dr. Franziska Wollnik  
Mitberichter: Privatdozent Dr. Wolfgang Hauber  
Tag der mündlichen Prüfung: 21.06.2000

Biologisches Institut der Universität Stuttgart  
2000



## Inhaltsverzeichnis

<b>1 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS .....</b>	<b>7</b>
<b>2 ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>9</b>
<b>3 EINLEITUNG .....</b>	<b>11</b>
3.1 Was sind biologische Rhythmen und welche Funktionen haben sie? .....	11
3.2 Wie alt ist die Chronobiologie? Ein kurzer geschichtlicher Rückblick.....	13
3.3 Warum ist gerade der Besitz einer Tagesrhythmik so wichtig? .....	15
3.4 Warum beträgt die Periodenlänge der innere Uhr nur annähernd 24 Stunden und bedarf deswegen der regelmäßigen Synchronisation? .....	16
3.5 Welche Auswirkungen haben Zeitgeber auf das circadiane System und was ist eine Phasen-Antwort-Kurve?.....	17
3.6 Neuronale Grundlagen und molekulare Mechanismen .....	21
3.6.1 Wo befindet sich der circadiane Schrittmacher bei Säugetieren? .....	21
3.6.2 Welches sind die wichtigsten neuronalen Projektionen des circadianen Schrittmachers?.....	23
3.6.3 Was sind induzierbare Transkriptionsfaktoren und welche Rolle spielen sie im circadianen System? .....	27
3.6.4 Welche Aufgaben haben die Transmitter NPY und GABA im circadiane System von Säugetieren? .....	30
3.7 Serotonin und seine Bedeutung für das circadianen System der Säugetiere .....	32
3.7.1 Der Neurotransmitter Serotonin: Eine Einführung .....	32
3.7.2 Das serotonerge Netzwerk im Gehirn von Säugetieren.....	34
3.7.3 Welche Aufgaben hat Serotonin im circadianen System? .....	35
3.7.4 Unterliegt die Freisetzung und die Wirkung von Serotonin selbst einem circadianen Rhythmus? .....	36
3.7.5 Wie wirken sich Läsionen des serotonergen Systems auf die circadiane Rhythmik aus? .....	36
3.7.6 Mit welchen pharmakologischen Ansätzen kann die Wirkung von Serotonin auf das circadiane System untersucht werden? .....	37
3.7.6.1 Wie wirken sich Serotonin-Agonisten bzw. Serotonin-Antagonisten auf das circadiane System aus? .....	38
3.7.6.2 Wirkt Serotonin auf direktem oder indirektem Weg auf den circadianen Schrittmacher? .....	40
3.7.7 Welchen Einfluß hat Serotonin auf die phasenverschiebende Wirkung anderer Stimuli? .....	42
3.8 Fragestellung und Ziele der vorliegenden Arbeit .....	44

<b>4 MATERIAL UND METHODEN</b> .....	<b>45</b>
4.1 Genehmigung.....	45
4.2 Versuchstiere .....	45
4.3 Haltungsbedingungen .....	45
4.3.1 Haltungsbedingungen der Tiere vor den Versuchen.....	45
4.3.2 Haltungsbedingungen der Tiere während der Versuche.....	46
4.4 Verabreichte Substanzen .....	46
4.4.1 Anästhetika .....	46
4.4.2 Versuchssubstanzen.....	47
4.4.2.1 Kontrollen.....	47
4.4.2.2 Serotonin Agonisten.....	47
4.4.2.3 Serotonin Antagonisten.....	47
4.5 Kanülenimplantation.....	48
4.6 Datenregistrierung.....	51
4.7 Aktogramme .....	51
4.8 Injektionen.....	52
4.9 Immunhistochemie .....	53
4.9.1 Gehirnpräparation .....	53
4.9.2 Herstellung der Gehirnschnitte .....	54
4.9.3 c-Fos Proteinfärbung .....	54
4.10 Versuchsdurchführung .....	55
4.10.1 Lokale Applikation von Quipazin .....	56
4.10.1.1 Auswirkungen auf den circadianen Aktivitätsrhythmus .....	56
4.10.1.2 Effekte auf die c-Fos Expression .....	56
4.10.2 5-CT-Injektionen in Kombination mit Antagonisten .....	56
4.10.2.1 Auswirkungen auf den circadianen Aktivitätsrhythmus .....	56
4.10.2.2 Effekte auf die c-Fos Expression .....	57
4.11 Auswertung .....	58
4.11.1 Aktogramme .....	58
4.11.2 Gehirnschnitte.....	58
4.11.2.1 Auswertung der DAB-Färbungen.....	59
4.11.2.2 Auswertung der Fluoreszenzfärbungen .....	61
4.11.3 Statistische Analyse.....	62

<b>5</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>63</b>
5.1	Versuchsteil I: Lokale Applikation von Quipazin .....	63
5.1.1	Überprüfung des Treffbereichs .....	63
5.1.2	Auswirkungen auf den circadianen Aktivitätsrhythmus.....	63
5.1.3	Auswirkungen auf die c-Fos Expression.....	65
5.2	Versuchsteil II: 5-CT-Injektionen in Kombination mit Antagonisten.....	67
5.2.1	Überprüfung des Treffbereichs .....	67
5.2.2	Auswirkungen auf den circadianen Aktivitätsrhythmus.....	67
5.2.3	Auswirkungen auf die c-Fos Expression.....	71
<b>6</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>77</b>
6.1	Versuchsteil I: Lokale Applikation von Quipazin.....	77
6.2	Versuchsteil II: Lokale Applikation von 5-CT in Kombination mit den Antagonisten Pindolol und Ritanserin .....	87
6.3	Schlußfolgerungen.....	97
<b>7</b>	<b>AUSBLICK .....</b>	<b>99</b>
<b>8</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>101</b>
<b>9</b>	<b>ANHANG .....</b>	<b>119</b>
9.1	Lösungen.....	119
9.2	Färbeprotokolle.....	120
	<b>DANKSAGUNG.....</b>	<b>121</b>
	<b>LEBENS LAUF.....</b>	<b>123</b>





## 1 Abkürzungsverzeichnis

3V	3. Ventrikel
5-CT	5-Carboxamidotryptamin
5,7-DHT	5,7-Dihydroxytryptamin
5-HT	5-Hydroxytryptamin/Serotonin
8-OH-DPAT	8-Hydroxy-Diprophylaminotetralin
Abb.	Abbildung
ABC	Avidin Biotin Peroxidase
AC	Adenylatcyclase
ANOVA	analysis of variance
ASO	Antisenseoligonucleotide
ATP	Adenosintriphosphat
AVP	Arginin-Vasopressin
Ca	Calcium
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
CT	circadian time/circadiane Zeit
DAB	3,3'-Diaminobenzidin Tetrahydrochlorid
DD	Dauerdunkel
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
DRN	dorsaler Raphe Nucleus
EAA	exzitatorische Aminosäure
GABA	$\gamma$ -Aminobuttersäure
GHT	geniculohypothalamischer Trakt
i.c.v.	intracerebroventricular
IEG	immediate early gene
IGL	intergeniculate leaflet
ITF	induzierbare Transkriptionsfaktoren
LD	Licht-Dunkel-Wechsel
mCPP	1-(3-Chlorphenyl)piperazine hydrochloride
MRN	medianer Raphe Nucleus
NMDA	N-Methyl-D-Aspartate
NPY	Neuropeptid Y
NR	Nucleus Raphe
n.u.	nicht untersucht
OC	optisches Chiasma
PACAP	pituitary adenylate cyclase activating peptide

PBS	phosphatgepufferte-0,9%ige-Kochsalzlösung
PBST	PBS + 0.1% Triton X-100
PLP-C	Phospholipase C
PRC	Phasen-Antwort-Kurve
RHT	retinohypothalamischer Trakt
s.c.	subcutan
SCN	Nucleus suprachiasmaticus
TFMPP	(N-(3-Trifluoromethylphenyl)piperazine)
VIP	vasoactive intestinal polypeptide

## 2 Zusammenfassung

Die verschiedenen, in einem Organismus zu beobachtenden, periodisch ablaufenden Lebensvorgänge werden durch sogenannte biologische Uhren gesteuert. Eine typische Eigenschaft dieser endogen angelegten biologischen Uhren ist die Fähigkeit, sich an geophysikalische Veränderungen der Umwelt anzupassen. Die wichtigste Anpassungserscheinung an sich wiederholende geophysikalische Phänomene zeigt sich in den sogenannten circadianen Rhythmen, welche einem Organismus die Adaptation auf den 24 Stunden-Rhythmus der Erdrotation ermöglichen. Charakteristisch für solche circadiane Rhythmen ist, daß sie unter konstanten Umweltbedingungen – das heißt ohne Information über die momentane tagesperiodische Umweltsituation - mit einer endogenen Periodenlänge von annähernd 24 Stunden erhalten bleiben. Nach dem derzeitigen Wissensstand kann davon ausgegangen werden, daß der für die circadianen Rhythmen verantwortliche Schrittmacher bei Säugetieren im sogenannten suprachiasmatischen Nucleus (SCN) lokalisiert ist. Die zur Synchronisation des circadianen Schrittmachers notwendige Lichtinformation erreicht den SCN zum einen direkt über den retinohypothalamischen Trakt und zum anderen indirekt über den geniculohypothalamischen Trakt (GHT) mit Ursprung im sogenannten intergeniculate leaflet (IGL). Neben diesen photischen Eingängen erhält der SCN ferner eine direkte serotonerge Innervation mit Ursprung in den Raphe-Kernen. Die Raphe-Kerne innervieren weiterhin das IGL und bilden somit über den GHT einen weiteren indirekten serotonergen Eingang in den SCN.

Nach dem heutigen Erkenntnisstand hat die serotonerge Innervation des SCN bei verschiedenen Spezies unterschiedliche Funktionen. Bei Hamstern scheint Serotonin an der Vermittlung nicht-photischer Stimuli beteiligt zu sein, während es bei Ratten eine photische Wirkung bzw. einen modulierenden Effekt auf photische Stimuli hat. So konnte an Ratten gezeigt werden, daß systemische Applikationen des unspezifischen Serotonin-Agonisten Quipazin zu Phasenverschiebungen in der Aktivitätsrhythmik und zu c-Fos Expressionen im SCN führen. Entsprechende Reaktionen des circadianen Systems wurden nach der Applikation von Lichtpulsen beobachtet. Aufgrund der Unspezifität des Serotonin-Agonisten Quipazin konnte aber nicht geklärt werden, welche Serotonin-Rezeptortypen für die Effekte verantwortlich sind. Aufgrund der systemischen Applikation von Quipazin blieb unklar, ob es sich um eine lokale Wirkung im Bereich des SCN oder um eine indirekte Wirkung über Strukturen wie das IGL bzw. die Raphe-Kerne handelt.

Ein erster Versuchsansatz der vorliegenden Arbeit galt daher der Frage, ob es sich bei den durch Quipazin ausgelösten Effekten auf die Aktivitätsrhythmik und die c-Fos Expression im SCN um eine direkte Wirkung im Bereich des SCN oder um eine über periphere Strukturen vermittelte, indirekte Wirkung handelt. Nach lokaler Applikation von Quipazin ergaben sich lichtähnliche Phasenverschiebungen in der Laufradaktivität und eine lichtähnliche c-Fos Expression im SCN, wie sie auch nach einer systemischen Applikation beobachtet wurden. Dies zeigt, daß die

lichtähnliche Wirkung von Serotonin direkt im Bereich des SCN erfolgt. Im zweiten Teil der vorliegenden Studie sollten dann die Serotonin-Rezeptortypen näher charakterisiert werden, welche an der Vermittlung der lichtähnlichen Effekte von Serotonin beteiligt sind. Aus *in vitro* Untersuchungen lagen bereits Hinweise auf eine Beteiligung von 5-HT<sub>1A/1B</sub> und 5-HT<sub>7</sub> Rezeptoren vor. Deshalb wurde der für 5-HT<sub>1A/7</sub> Rezeptoren selektive Serotonin-Agonist 5-CT in Kombination mit dem selektiven Serotonin-Antagonist Pindolol (mit hoher Affinität für die 5-HT<sub>1A/1B</sub> Rezeptoren) bzw. mit dem selektiven Serotonin-Antagonist Ritanserin (mit hohen Affinitäten für die 5-HT<sub>7</sub> und 5-HT<sub>2B/2C</sub> Rezeptoren) verabreicht, wobei der Agonist lokal und die Antagonisten systemisch appliziert wurden. Die Untersuchungen ergaben, daß der Serotonin-Agonist 5-CT sowohl in der Aktivitätsrhythmik als auch in der c-Fos Expression zu lichtähnlichen Effekten führte. Weiterhin zeigte sich, daß die vorherige Injektion der Serotonin Antagonisten Pindolol bzw. Ritanserin zu einer signifikanten Hemmung der phasenverschiebenden Wirkung des Serotonin-Agonisten 5-CT auf die Aktivitätsrhythmik führte. Beide Serotonin-Antagonisten führten aber zu keiner vollständigen Hemmung der durch 5-CT induzierten c-Fos Expression. Somit ließ sich keine eindeutige Aussage drüber treffen, welche 5-HT Rezeptortypen an der Vermittlung der lichtähnlichen Wirkung von Serotonin beteiligt sind. Die Ergebnisse zeigen ferner, daß eine c-Fos Expression nicht zwangsläufig mit einer Phasenverschiebung korreliert sein muß. Offensichtlich müssen für die Auslösung einer Phasenverschiebung in der Aktivitätsrhythmik noch weitere intrazelluläre Prozesse induziert werden.

## 3 Einleitung

### 3.1 Was sind biologische Rhythmen und welche Funktionen haben sie?

Das Leben auf der Erde wird grundlegend durch die dynamische Bewegung verschiedener Himmelskörper bestimmt. Dabei spielt vor allem die Bewegung der Erde für die auf ihr beheimateten Organismen eine entscheidende Rolle. Diese Bewegung setzt sich vorwiegend aus der elliptischen Umlaufbahn der Erde um die Sonne, der Rotation der Erde um die eigene Achse und der Bewegung des Mondes um die Erde zusammen. Das Ineinandergreifen dieses Kreiselspiels führt zu vielfältigen dynamischen Veränderungen der Umweltverhältnisse auf der Erde, die sich in gleichmäßigen Abständen wiederholen. Diese geophysikalischen Rhythmen zeigen sich vor allem im periodischen Tag-Nacht-Wechsel, im Wandel der Jahreszeiten aufgrund der Schiefe der Ekliptik und in den Gezeiten, welche durch die wechselnden Anziehungskräfte des Mondes und der Sonne auf die Wassermassen der Erde verursacht werden. Die Frequenzen der einzelnen Rhythmen, das heißt die Häufigkeit mit der sich ein bestimmter Zustand wiederholt, bilden seit jeher feste Rahmenbedingungen der Erdgeschichte, denen sich kaum ein Organismus entziehen kann. Es ist daher nicht verwunderlich, daß sich in nahezu allen Organismen im Laufe der Evolution entsprechende Anpassungen an die sich regelmäßig wiederholenden Erscheinungen in der Umwelt entwickelt haben. Die einfachste Form der Anpassung an die veränderlichen Licht- und Temperaturverhältnisse wären rein reflexartige Reaktionen, die keiner genetischen Grundlage bedürfen. So könnte beispielsweise die Körpertemperatur eines Tieres ansteigen oder abfallen, sobald die Umgebungstemperatur im Laufe des Tages ansteigt bzw. im Laufe der Nacht wieder abfällt. Obwohl diese Strategie auch heute noch bei poikilothermen Lebewesen in Grundzügen zu beobachten ist, beinhaltet sie zwei wesentliche Nachteile: Erstens wird der Organismus dadurch in seinem Verhalten eingeschränkt und zweitens wird er gegenüber extremen Umweltverhältnissen ausgesprochen anfällig. Daher entwickelten schon die ersten Organismen statt der einfachen reflexartigen Reaktion ein eigenes endogenes System für die Vorhersage von regelmäßigen Umweltveränderungen, welches sich an gegebenen Naturkonstanten, wie beispielsweise dem Tages- oder Jahresverlauf orientiert. Diese Strategie führte dann im Laufe der Evolution zur Ausbildung sogenannter **innerer Uhren**, die genetisch determiniert sind. Innere Uhren ermöglichen einem Organismus zum einen die Anpassung an regelmäßige Veränderungen innerhalb seines Biotops, zum anderen ist er dadurch in der Lage, diese Veränderungen selbst vorherzusagen. Aufgrund der Entwicklung innerer Uhren konnten die Organismen bestimmte Körperfunktionen und Verhaltensweisen zeitlich strukturieren und sich dadurch einen zusätzlichen selektiven Vorteil verschaffen. Über innere Uhren gesteuerte Verhaltensweisen und Körperfunktionen findet man in erster Linie in der tagesperiodischen Anpassung zahlreicher mit der Aktivitäts- und Ruhezeit einhergehenden Verhaltensweisen und physiologischen Funktionen an den Licht-Dunkel-Wechsel. Aber auch in der jahresrhythmischen Anpassung vieler Pflanzen- und Tierarten, bei denen die optimale Nutzung von Entwicklungs- bzw. Fortpflanzungszeiten für die Überlebenschance der Nachkommen von

entscheidender selektiver Bedeutung ist, sind solche Anpassungen zu finden. In den gemäßigten und arktischen Breiten werden diese saisonale Rhythmen auf die Photoperiode, das heißt auf die Tageslichtlänge und die Umgebungstemperatur abgestimmt, während sie in subtropischen und tropischen Gebieten oft von klimatischen Veränderungen, wie beispielsweise der Regenzeit oder der Verfügbarkeit bestimmter Ressourcen abhängig sind. Aber auch die im Küstenbereich beheimateten Organismen haben sich im Laufe der Evolution an den zweimal täglich auftretenden Wechsel der Lebensbedingungen aufgrund der Gezeiten angepaßt. So zeigen Strandkrabben, Miesmuscheln und viele andere Meerestiere einen gezeitenrhythmischen Aktivitätszyklus. Weiterhin kann man bei vielen Küstenbewohnern einen entweder alle 30 Tage (zu bestimmten Tagen des Mondphasenzyklus) oder alle 15 Tage (Spring-Nipptiden-Zyklus) auftretenden Rhythmus in der Ausbildung fortpflanzungsfähiger Stadien beobachten.

In dem großen Spektrum biologischer Rhythmen (Tabelle 3.1) finden sich nun aber nicht nur Rhythmen, zu denen es ein sogenanntes exogenes Korrelat, das heißt einen entsprechenden Vorgang mit vergleichbarer Periodenlänge in der Umwelt gibt, sondern auch eine Vielzahl von Rhythmen, die ganz offensichtlich endogenen Ursprungs sein müssen, da bisher noch keine geophysikalischen Ereignisse mit gleicher Periodenlänge gefunden wurden.

Die Periodenlängen dieser endogenen Rhythmen erstrecken sich vom Millisekundenbereich bis hin zu mehreren Jahren. Rhythmen mit kurzen Periodenlängen findet man beispielsweise bei der Entladung von Neuronen, der Atmung oder der Kontraktion des Herzens. Beispiele für Rhythmen mit langer Periodendauer sind Reproduktionszyklen und Populationsschwankungen, die mehrere Tage, Wochen, Jahre oder Jahrzehnte umfassen können.

Ein biologischer Rhythmus kann daher als ein Prozeß definiert werden, der sich in periodisch wiederkehrende Phasen gliedert. Erst die Ausbildung biologischer Rhythmen ermöglicht es den Organismen, erfolgreich mit der Umwelt zu harmonisieren, da dadurch wichtige Lebensfunktionen, die einen selektiven Vorteil begünstigen, nicht mehr dem Zufall überlassen werden, sondern zeitlich strukturiert eingesetzt werden können. Auch wenn es so scheint, daß es ganz unterschiedliche biologische Rhythmen gibt, wie beispielsweise den tagesperiodischen Wechsel von Aktivität und Ruhe oder jahreszeitliche Reproduktionszyklen, so besitzen sie doch alle einen weitgehend ähnlichen Entstehungsmechanismus und zwar unabhängig davon, ob sie in einer einzelnen Zelle oder in einem komplexen Organismus vorkommen.

Tabelle 3.1: Typen biologischer Rhythmen

Zyklusdauer	Exogenes Korrelat	Nomenklatur	Beispiele
Millisekunde Sekunde Minute		Kurzzeitrhythmik	Aktionspotentiale Bewegungen von Cilien Herzschlag Darmperistaltik,
Stunden		ultradian	Nahrungsaufnahme Schlafstadien Hormonsekretion
~12,4 Stunden	Gezeiten	circatidal	Gezeitenabhängige Aktivitäten
~14,8 Tage	Springflut	circasemilunar	Marine Reproduktion
~24 Stunden	Mit der Erdrotation verbundene geophysikalische Änderungen: Tag/Nacht, Temperatur, Druck, Feuchtigkeit, Ionisation, Gravitation	circadian	Zahlreiche mit der Aktivitäts- und Ruhezeit einhergehende Verhaltensweisen
Mehrere Tage/Wochen		infradian	Östruszyklen Menstruationszyklen
~29 Tage	Wechsel der Mondphasen	circalunar	Marine Reproduktion
~365 Tage	Mit der Jahresbewegung der Erde um die Sonne verbundene Änderungen: Photoperiode, Temperatur, Erdmagnetfeld	circannual	Reproduktion Zugunruhe Winterschlaf Fellwechsel
Jahre	Sonnenaktivität (11-Jahres-Periode)	infraannual	Populationsschwankungen

### 3.2 Wie alt ist die Chronobiologie? Ein kurzer geschichtlicher Rückblick

Schon sehr früh wurde erkannt, daß viele Organismen rhythmische Veränderungen in den mannigfaltigsten Funktionen zeigen. So gehen die ersten schriftlichen Aufzeichnungen auf Androsthene im vierten Jahrhundert vor Christi zurück, der während der Feldzüge von Alexander dem Großen die rhythmische Blattbewegung des Tamarindenbaums (*Tamarindus indicus*) beobachtete. Wie viele Forscher nach ihm, ging auch er davon aus, daß das Verhalten der Pflanze sowie aller anderen lebenden Organismen mit erkennbaren Tagesrhythmen, eine rein passive Anpassung auf sich wiederholende Umwelterscheinungen darstellt. Diese Vermutung wurde erst im Jahre 1729 durch den französischen Astronomen Jean Jacques d’Ortous de Mairan angezweifelt. Er beschrieb bei der Mimose (*Mimosa pudica*), einer heliotropen Pflanze, rhythmische Blattbewegungen, bei denen die Pflanze während des Tages ihre Blätter öffnet und sie für die Dauer der Nacht schließt. Fasziniert von dieser Regelmäßigkeit führte er eines der ersten Experimente auf dem Gebiet der heutigen Chronobiologie durch. Er beobachtete, daß die Pflanze auch unter konstantem Dauerdunkel die rhythmischen, tagesperiodischen Blattbewegungen beibehielt. Daraus schloß er, daß die Pflanze eine Art

inneren Kontrollmechanismus besitzen muß, welcher sie dazu veranlaßt, ihre Blätter zu öffnen oder zu schließen (de Mairan, 1729). Im 20. Jahrhundert wurde dann von Erwin Bünning für das rhythmische Auftreten einer von innen heraus gesteuerten Erscheinung der Begriff der inneren Uhr eingeführt (Moore-Ede, 1982).

Im Jahre 1751 veröffentlichte Carolus Linnaeus (Carl von Linné) seine sogenannte „Garten- oder Blumenuhr“. In dieser stellte er verschiedene Pflanzen zusammen, die zu bestimmten Tageszeiten ihre Blüten öffnen bzw. schließen, und somit eine Bestimmung der Uhrzeit erlauben. Diese Arbeit unterstützte die Idee, daß jeder Organismus seinen ganz eigenen Rhythmus besitzen muß. Im Jahre 1832 wiederholte Augustin de Candolle das Mimosenexperiment von de Mairan und stellte dabei fest, daß die Periode zwischen dem jeweiligen Öffnen der Blätter unter Dauerdunkel-Bedingungen nicht genau 24 Stunden betrug, sondern sich eine Periodenlänge zwischen 22 und 23 Stunden zeigte (Moore-Ede, 1982). Dies war wohl die erste Demonstration einer heute als **endogen freilaufende Periode** bezeichneten Erscheinung, wie sie nur unter konstanten Bedingungen beobachtet werden kann. Aufgrund der geringen Abweichung der endogen freilaufenden Periode von der 24-Stunden Rhythmik führte Franz Halberg 1959 speziell für das Auftreten tagesperiodischer Rhythmen den Begriff **circadian** (*circa* (lat.): ungefähr und *dies* (lat.): Tag) ein (Halberg, 1959). Erst später wurde diese Nomenklatur dann nur auf biologische Rhythmen mit eindeutig endogenem Ursprung beschränkt (Tabelle 3.1), das heißt ein Tagesrhythmus wird dann als circadianer Rhythmus bezeichnet, wenn er unter konstanten Bedingungen mit einer von der Erdrotation geringfügig abweichenden Periode erhalten bleibt (Wurtmann, 1966).

Mit Hilfe der unterschiedlichsten Experimente versuchte man der Lokalisation sowie dem Mechanismus der inneren Uhr näher zu kommen. So zeigte Karl von Frisch 1922, daß tagesperiodische Rhythmen in der Hautfarbe von Elritzen nach einer Erblindung der Tiere erhalten blieben, daß sie jedoch nach der Entfernung des Pinealorgans verloren gingen. Von Frisch machte daher extraoculare Photorezeptoren im Pinealorgan für den Tagesrhythmus in der Hautfarbe verantwortlich. In einem anderen Experiment im Jahre 1929 konnte Karl von Frisch zeigen, daß Bienen, welche auf eine täglich zu einer bestimmten Zeit vorhandenen Futterquelle trainiert worden waren, diesen Futterplatz auch noch mehrere Tage lang etwa zum selben Zeitpunkt anfliegen, nachdem die Futterabgabe bereits eingestellt worden war (von Frisch, 1950). Die Wiederholung dieses Versuchs unter konstanten Bedingungen in einer Salzmine führte zu dem Schluß, daß Bienen eine Art endogenes Zeitgedächtnis besitzen müssen, da sie auch unter diesen Bedingungen den täglichen Zugang zu einer zeitlich verfügbaren Futterquelle lernen konnten.

Der Nachweis, daß die circadiane Rhythmik genetisch determiniert ist, gelang unter anderem 1954 dem Forscher Colin Pittendrigh. Er konnte zeigen, daß das tagesperiodische Schlüpfverhalten von *Drosophila melanogaster* auch unter konstanten Bedingungen immer in den frühen Morgenstunden stattfindet. Da die Tiere keine Möglichkeit hatten, dieses Verhalten zu erlernen, muß dieser 24 Stunden-Rhythmus genetisch vorbestimmt sein (Pittendrigh, 1954).



Michael Menaker konnte 1952 weiterhin eine weitgehende Temperaturunabhängigkeit der inneren Uhr nachweisen. Diesen Schluß zog er aus der Beobachtung, daß die circadianen Schwankungen in der Körpertemperatur winterschlafender Fledermäuse auch bei einer konstanten Körpertemperatur von 3 °C eine ähnliche Periodenlänge aufwiesen, wie sie bei aktiven Fledermäusen zu beobachten war (Menaker, 1959). Ähnliche Beobachtungen der Temperaturkompensation des circadianen Systems wurden auch in der Aktivitätsrhythmik von Küchenschaben gemacht, bei denen die circadiane Periodenlänge einen  $Q_{10}$ -Wert um eins aufweist, das heißt die Periodenlänge ändert sich auch unter extremen Temperaturverhältnissen kaum (Pittendrigh und Caldarola, 1973).

Auf Jürgen Aschoff geht die Erkenntnis zurück, daß sich der endogene circadiane Rhythmus auf unterschiedliche periodische Umweltreize, darunter vor allem den Licht-Dunkel-Wechsel, synchronisieren läßt. Für Umweltreize mit synchronisierender Wirkung führte er den Begriff des sogenannten **Zeitgebers** ein (Aschoff, 1954).

Die Lokalisation der inneren Uhr bei Säugetieren wurde erstmals 1967 von Curt P. Richter untersucht. Durch gezielte Läsionen konnte er zeigen, daß sie sich im ventralen Bereich des Hypothalamus befinden muß, da Läsionen in diesem Gebiet zum Verlust der circadianen Rhythmik führten (Richter, 1967). In den folgenden Jahren zeigten dann die Arbeitsgruppen von Bob Moore und Irving Zucker unabhängig von einander, daß es sich bei dem circadianen Schrittmacher um ein paariges Kerngebiet innerhalb des Hypothalamus direkt über dem optischen Chiasma handelt (Stephan und Zucker, 1972; Moore und Eichler, 1972).

In den letzten 30 Jahren ist es nun aber nicht nur gelungen, den Sitz der inneren Uhr näher zu charakterisieren, sondern man hat auch durch die Identifikation verschiedener sogenannter „Uhren-Gene“ bei einigen Modellorganismen eine erste Vorstellung von den molekularen Mechanismen entwickelt, die auf zellulärer Ebene für die Erzeugung circadianer Rhythmen verantwortlich sind. Zu diesen Modellorganismen gehören unter anderem *Neurospora*, *Drosophila melanogaster* und die Maus (Konopka und Benzer, 1971; Aronson *et al.*, 1992; Takahashi und Hoffman, 1994; Dunlap, 1999).

### **3.3 Warum ist gerade der Besitz einer Tagesrhythmik so wichtig?**

Unter den unterschiedlichsten Formen der Energiegewinnung, die die Evolution im Laufe der Zeit hervorgebracht hat, findet man nur einen Prozeß, mit dem Energie von außerhalb des geschlossenen Systems der Erdatmosphäre in ausreichender Menge genutzt werden kann. Bei diesem Prozeß handelt es sich um die Photosynthese, die in der Lage ist, die von der Sonne ausgehende Lichtenergie in chemische Energie umzuwandeln. Die Fähigkeit, die Sonne als Energiequelle zu nutzen, ist untrennbar mit dem Tag-Nacht-Wechsel verbunden. Vermutlich hatten deshalb schon die einfachsten Lebewesen, die eine circadiane Uhr ausbildeten, einen selektiven Vorteil gegenüber den Organismen, welche die tagesperiodische Veränderungen der Umwelt nicht vorhersagen konnten. So war es sicherlich für phototrophe Organismen von

Vorteil, aufgrund einer circadianen Uhr beispielsweise den Sonnenaufgang vorhersagen zu können, um die Lichtenergie über die gesamte Tageslänge nutzen zu können. Der erste Beweis eines selektiven Vorteils durch den Besitz einer Tagesuhr wurde in neuerer Zeit an Cyanobakterien erbracht. In diesem Versuch wurde bei verschiedenen Subspezies von Cyanobakterien mit unterschiedlichen circadianen Periodenlängen die relative Fitness im Wachstum unter verschiedenen Zeitgeberzyklen untersucht. Dabei zeigte sich, daß jeweils der Stamm die höchste Fitness aufwies, der mit seiner endogenen Periode am nächsten an dem vorgegebenen Zeitgeberzyklus lag (Ouyang *et al.*, 1998).

Der Besitz einer circadianen Rhythmik bringt für die Lebewesen auf der Erde also zwei wesentliche Vorteile:

- I) Die circadiane Uhr erlaubt die optimale zeitliche Anpassung verschiedener Körperfunktionen an die tagesperiodischen Schwankungen der Umwelt. Jeder Organismus besitzt gewissermaßen seine eigene „zeitliche Nische“ im Tagesverlauf, in der er die für ihn am besten geeigneten Lebensbedingungen vorfindet.
  
- II) Die circadiane Uhr verschafft einem Organismus eine interne zeitliche Struktur, das heißt sie erlaubt eine optimale zeitliche Anpassung verschiedener Körperfunktionen untereinander.

Diese beiden Aufgaben einer Tagesuhr könnten im Prinzip zwar auch durch einen Sanduhrmechanismus erfüllt werden, der jeden Tag durch einen bestimmten Umweltreiz, wie beispielsweise den Sonnenaufgang, neu in Gang gesetzt wird. Doch stattdessen hat die Natur im Laufe der Evolution einen oszillatorischen Prozeß entwickelt, der ohne jeden Anstoß von außen eine stabile Eigenschwingung erzeugt. Diese Variante hat sicherlich den Vorteil, daß die Tagesuhr auch dann ihre Funktion erfüllen kann, wenn relevante Umweltreize einmal ausbleiben oder bei Tieren, die als Höhlen- oder Tiefseebewohner nie in deren Kontakt kommen. Daraus resultiert aber gleich die Frage, weshalb die Periodenlängen der endogen erzeugten Rhythmen bei allen bisher untersuchten Organismen deutlich von der 24-Stunden Rhythmik der Erdrotation abweicht, so daß regelmäßig eine Korrektur der circadianen Uhr vorgenommen werden muß.

### **3.4 Warum beträgt die Periodenlänge der innere Uhr nur annähernd 24 Stunden und bedarf deswegen der regelmäßigen Synchronisation?**

Die circadiane Uhr erzeugt unter völlig konstanten Umweltbedingungen eine stabile Rhythmik, deren Periodenlänge aber nur annähernd der 24-Stunden Rhythmik der Erdrotation entspricht. Daraus folgt die Notwendigkeit, die innere Uhr durch verlässliche Zeitgeber täglich zu synchronisieren.

Die circadiane Uhr ist nur dann in der Lage, eine genaue Tageszeit vorherzusagen, wenn sie selbst in einer stabilen Phasenbeziehung zur Umwelt steht. Dabei sind zwei grundlegende Probleme zu bewältigen: Der Prozeß der Synchronisation muß zum einen die mögliche Instabilität der endogenen Rhythmik ausgleichen. Diese Instabilität ist nach dem bisherigen Erkenntnisstand für das einzelne Individuum aber relativ gering (Pittendrigh und Daan, 1976a). Zum anderen muß die Synchronisation eine stabile Phasenbeziehung zu den geophysikalischen Rhythmen der Umwelt gewährleisten. Nur so kann der einzelne Organismus in einer stabilen „zeitlichen Nische“ seiner Umwelt erfolgreich überleben, indem er beispielsweise als nachtaktiver Kleinsäuger seine Aktivitätsphase am Sonnenuntergang ausrichtet oder als tagaktiver Singvogel seine Balzgesänge zum Sonnenaufgang anstimmt.

Auch wenn sich im Laufe der Evolution eine stabile Periodenlänge von genau 24 Stunden ausgebildet hätte, wäre eine zusätzliche Korrektur in der Phasenlage dieser Rhythmik unumgänglich gewesen, da sich außer direkt am Äquator der Zeitpunkt von Sonnenaufgang und Sonnenuntergang im Laufe eines Jahres täglich ändert. Außerdem war auch die Dauer einer Erdrotation vor zwei bis drei Millionen Jahren, als sich die innere Uhr entwickelte, mit ungefähr 20 Stunden deutlich kürzer als in der heutigen Zeit.

Die Synchronisation der endogenen Rhythmik bedeutet also nicht nur eine zur Umwelt identische Periodenlänge, sondern auch eine stabile Phasenlage. Der in der Umwelt wohl verlässlichste Zeitgeber für die Synchronisation der Tagesrhythmik ist der Licht-Dunkel-Wechsel (Aschoff, 1954), auch wenn andere Faktoren wie Temperatur, Luftfeuchtigkeit, das Auftreten von Räubern bzw. die Verfügbarkeit von Nahrungsquellen eng damit verbunden sind (Cloudsley-Thompson, 1960). Doch alle diese Faktoren sind gegenseitig von einander abhängig und somit beeinflussbar, weshalb sie nicht die Stabilität des Licht-Dunkel-Wechsels erreichen.

### **3.5 Welche Auswirkungen haben Zeitgeber auf das circadiane System und was ist eine Phasen-Antwort-Kurve?**

#### *Die Wirkung photischer Stimuli*

Unter konstanten Lichtbedingungen verändert sich die circadiane Periodenlänge in Abhängigkeit von der Lichtintensität. Bei den meisten tagaktiven Tieren verkürzt sich die circadiane Periode mit zunehmender Beleuchtungsstärke, während sie sich dagegen bei den meisten nachtaktiven Tieren verlängert (Aschoff, 1959; Aschoff, 1960).

In der freien Natur finden die meisten Organismen nun aber keine konstanten Bedingungen vor, sondern unterliegen verschiedenen rhythmischen Umwelteinflüssen, die als Zeitgeber auf sie einwirken können. Einer der wichtigsten Zeitgeber für die Synchronisation circadianer Rhythmen ist der regelmäßige Wechsel zwischen Tag und Nacht, das heißt die Veränderung der Beleuchtungsstärke bei Sonnenaufgang bzw. Untergang. So konnte gezeigt werden, daß in einigen Fällen bereits künstlich erzeugte Helligkeitsunterschiede von einem Lux synchronisierend wirken können (Aschoff, 1969). Helligkeitsunterschiede zwischen einem und zehn Lux

treten in der freien Natur etwa eine halbe Stunde vor Sonnenaufgang bzw. eine halbe Stunde nach Sonnenuntergang auf. In dieser Zeit ändert sich auch die spektrale Zusammensetzung des Lichtes. So überwiegt während der Morgen- und Abenddämmerung der Anteil an Dunkelrot, während im Laufe des Tages mehr Hellrot vertreten ist.

Prinzipiell stehen den Lebewesen also zwei Informationsquellen für die Synchronisation auf den Licht-Dunkel-Wechsel zur Verfügung. Zum einen die tonischen Lichtintensitäten, wie sie während des Tages bzw. der Nacht auftreten und zum anderen die phasischen Änderungen in der Beleuchtungsstärke während des Sonnenaufgangs bzw. Untergangs. Es wird daher auch zwischen dem parametrischen und dem nicht-parametrischen Modell der Synchronisation unterschieden. Beim parametrischen Modell geht man davon aus, daß die Synchronisation auf einen Licht-Dunkel-Wechsel durch die abwechselnde Beschleunigung bzw. Verlangsamung der circadianen Rhythmik aufgrund der jeweils am Tag bzw. in der Nacht herrschenden Lichtintensität erfolgt. Im Gegensatz dazu wird die Synchronisation beim nicht-parametrischen Modell mit täglich auftretenden einmaligen Phasenverschiebungen erklärt, die durch eine akute Lichtintensitätsänderung ausgelöst werden, wie sie beim Sonnenaufgang bzw. Untergang auftreten. Dabei wird die endogene Periode durch eine einmalige Phasenverschiebung nach vorne oder Phasenverschiebung nach hinten jeweils um genau den Betrag verkürzt oder verlängert, um den sie von der Periode des Zeitgebers abweicht (Daan und Pittendrigh, 1976). Das nicht-parametrische Modell läßt sich experimentell dadurch unterstützen, daß man Organismen auf sehr kurze, sich periodisch wiederholende Lichtpulse synchronisieren kann, wodurch das Auftreten eines tonischen Lichtreizes vermieden wird (Pittendrigh und Daan, 1976b).

Die Fähigkeit zur Synchronisation setzt eine periodische Veränderung in der Empfindlichkeit der inneren Uhr gegenüber einem bestimmten Zeitgeber voraus (Aschoff, 1963). Zur besseren Beschreibung und Quantifizierung der Wirkung eines Zeitgebers auf die innere Uhr wurde die sogenannte **Phasen-Antwort-Kurve** (engl.: *phase response curve*, PRC) entwickelt (Pittendrigh und Daan, 1976b; Pittendrigh, 1981). Die PRC beschreibt die Größe und Richtung der durch einen Zeitgeber ausgelösten Phasenverschiebung in Abhängigkeit von der circadianen Periode. Zur Erstellung einer PRC wird ein sich im Freilauf befindender Organismus einer einmaligen, zeitlich begrenzten Stimulation durch einen bestimmten Zeitgeber zu verschiedenen Zeitpunkten der circadianen Periode ausgesetzt. Die Dauer einer circadianen Periode erstreckt sich von Aktivitätsbeginn zu Aktivitätsbeginn. Als Stimulus wird zum Beispiel ein Lichtpuls mit definierter Intensität und Länge eingesetzt. Die dabei auftretenden Phasenverschiebungen werden anschließend graphisch als Funktion der circadianen Phase aufgetragen (Abb. 3.1).

Da die Untersuchungen unter konstanten Bedingungen durchgeführt werden und jeder Organismus eine ganz individuelle endogene Periodenlänge aufweist, werden die verschiedenen PRCs zur Vergleichbarkeit standardisiert. Dabei wird auf der Abszisse die **circadiane Zeit** (engl.: *circadian time*, CT) aufgetragen. Diese besteht definitionsgemäß aus 24 circadianen Stunden (CT 0 bis CT 24) und entspricht der Dauer einer endogenen Periode. Die Länge einer circadianen Stunde ergibt sich daher aus der endogenen Periodenlänge geteilt durch 24. Der

Zeitraum zwischen CT 0 und CT 12 wird dabei als der subjektive Tag und der Zeitraum zwischen CT 12 und CT 24 als die subjektive Nacht bezeichnet. Da die meisten Organismen unmittelbar nach dem Eintreten der Licht- bzw. Dunkelphase mit ihrer Aktivität beginnen, kann bei tagaktiven Organismen der Zeitpunkt CT 0 und bei nachtaktiven Organismen der Zeitpunkt CT 12 mit dem Beginn der Aktivitätsphase gleichgesetzt werden. Auf der Ordinate wird die Größe der Phasenverschiebungen aufgetragen. Dabei wird unterschieden zwischen Phasenverschiebungen nach hinten, was einer einmaligen **Phasenverzögerung** entspricht (negatives Vorzeichen; engl.: *phase delay*), und Phasenverschiebungen nach vorne, was einer einmaligen **Phasenbeschleunigung** entspricht (positives Vorzeichen; engl.: *phase advance*). Phasenverzögerungen bedeuten in diesem Sinn, daß ein bestimmtes Verhalten am nächsten Tag zeitverzögert beginnt, im Gegensatz zu Phasenbeschleunigungen, bei denen ein bestimmtes Verhalten früher zu beobachten ist.

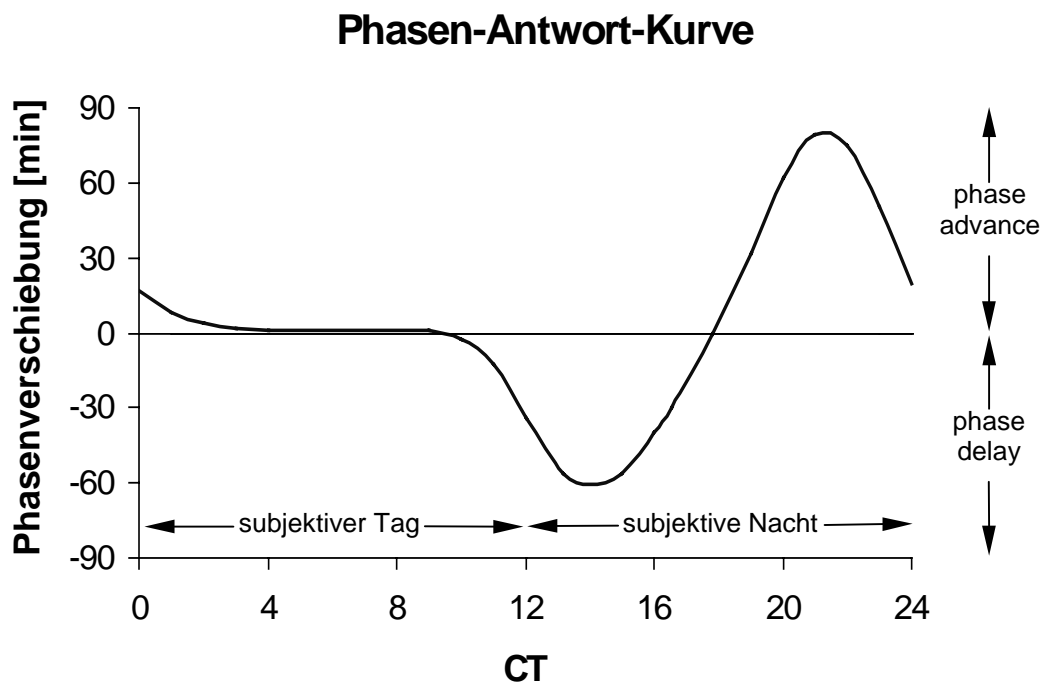


Abb. 3.1: Schematisch Darstellung des generellen Verlaufs einer Phasen-Antwort-Kurve für Lichtpulse

Der Vergleich der für Lichtpulse aufgestellten PRCs ergab bemerkenswerterweise für alle bisher untersuchten Organismen eine sehr hohe Ähnlichkeit und zwar unabhängig davon, ob es sich dabei um Einzeller, Pflanzen oder tag- bzw. nachtaktive Tiere handelte (Johnson, 1990).

In der Zwischenzeit sind PRCs aber nicht nur für Lichtpulse, sondern auch für eine ganze Anzahl anderer Stimuli wie zum Beispiel pharmakologische Substanzen erstellt worden. Diese PRCs werden heute nicht nur zur formalen Beschreibung des Synchronisationsprozesses heran-

gezogen, sondern auch sehr erfolgreich zur Analyse der zellulären Mechanismen und zur Aufklärung der neuronalen Grundlagen der inneren Uhr eingesetzt.

#### *Die Wirkung nicht-photischer Stimuli*

Wie in den vorangegangenen Abschnitten bereits erwähnt, ist der Licht-Dunkel-Wechsel zwar ein sehr dominanter, aber nicht der einzige biologisch signifikante Zeitgeber. Auch periodische nicht-photische Stimuli können einen sehr starken Effekt auf die innere Uhr verschiedener Organismen ausüben, wie beispielsweise Verhaltens- und soziale Stimuli, aber auch Hormone oder pharmakologische Substanzen. Bei Goldhamstern führt das kurzfristige Einsperren in ein Laufrad (Mrosovsky *et al.*, 1989) oder die zeitlich begrenzte soziale Interaktion mit gleichgeschlechtlichen Artgenossen (Mrosovsky, 1988; Mrosovsky *et al.*, 1989) zu prinzipiell ähnlichen Phasenverschiebungen, und zwar zu Phasenbeschleunigungen während des subjektiven Tages und zu nur geringen Phasenververzögerungen während der subjektiven Nacht. Im Gegensatz zu photischen Stimuli, die bei weitgehend allen Organismen zu einer ähnlichen PRC führen, beobachtet man bei den nicht-photischen Stimuli durchaus kleine Abweichungen von der allgemeinen Form der PRC (Abb. 3.2) sowie deutliche Unterschiede in der Wirkung des gleichen Stimulus zwischen verschiedenen Spezies. Bei Ratten beispielsweise führen Injektionen des Hormons Melatonin zum Zeitpunkt CT 10, das heißt circa zwei Stunden vor dem eigentlichen Aktivitätsbeginn, zu einer Phasenbeschleunigung des Aktivitätsrhythmus um ein bis zwei Stunden. Daher kann durch eine tägliche Behandlung mit Melatonin zum Zeitpunkt CT 10 eine stabile Synchronisation der inneren Uhr erreicht werden (Armstrong, 1989). Die reine Handhabung des Tieres und die Injektion von Kochsalzlösung führen bei der Ratte nur zu geringen bis gar keinen Effekten. Bei Goldhamstern führt dagegen schon alleine die Berührung des Tieres bzw. die Injektion von Kochsalzlösung zum Zeitpunkt CT 10 zu deutlichen Phasenbeschleunigungen, die denen bei der Ratte nach einer Melatonininjektion vergleichbar sind (Hastings *et al.*, 1992). Weiterhin konnte gezeigt werden, daß beim Goldhamster die tägliche Handhabung des Tieres oder ein regelmäßiger Käfigwechsel zur Synchronisation führen kann (Mrosovsky, 1988), während solche Manipulationen bei der Ratte im Allgemeinen keinen Einfluß auf die circadiane Rhythmik haben (Barrington *et al.*, 1993). Ein weiterer Speziesunterschied zwischen Ratten und Hamstern konnte auch in der sozialen Interaktion mit Artgenossen gefunden werden. So werden bei der Ratte im Laufe des subjektiven Tages durch soziale Stimuli keine Phasenverschiebungen ausgelöst (Meerlo und Daan, 1998), während sie bei Goldhamstern zu Phasenbeschleunigungen führen (Mrosovsky *et al.*, 1989).

Zusammenfassend läßt sich also festhalten, daß die Synchronisation der endogen erzeugten circadianen Periode durch photische und durch nicht-photische Zeitgeber erfolgen kann, wobei die Wirkung der nicht-photischen Zeitgeber stark spezieabhängig ist.

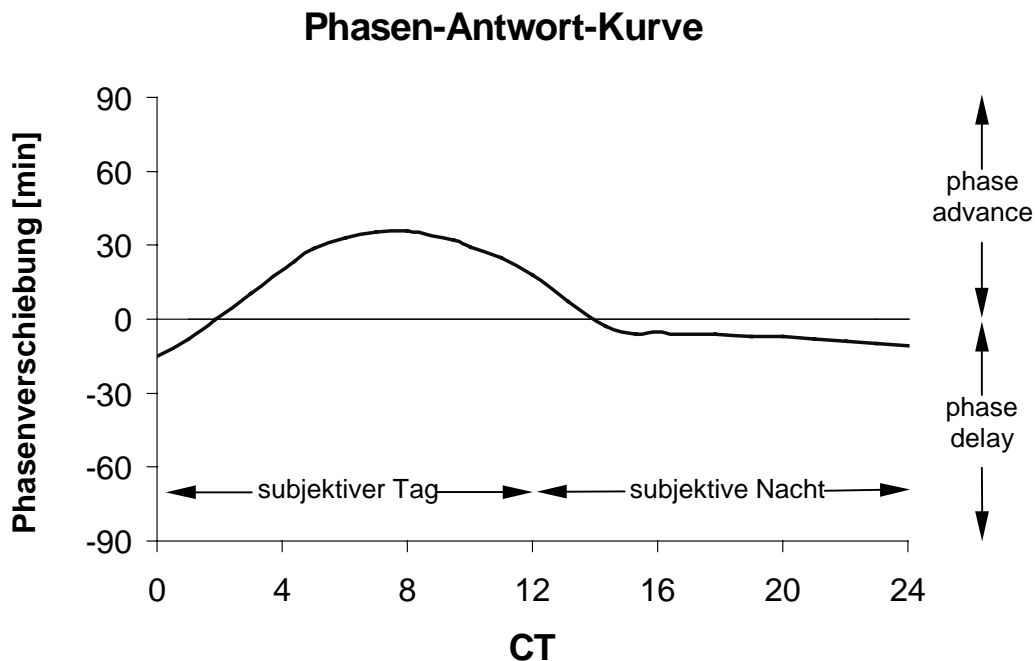


Abb. 3.2: Schematisch Darstellung des generellen Verlaufs einer Phasen-Antwort-Kurve für nicht-photische Stimuli

### 3.6 Neuronale Grundlagen und molekulare Mechanismen

#### 3.6.1 Wo befindet sich der circadiane Schrittmacher bei Säugetieren?

Die Lokalisation der inneren Uhr kann zwischen verschiedenen Organismen sehr stark variieren. So müssen bei Einzellern alle Komponenten in einer Zelle vereint sein, während sie bei höher entwickelten Lebewesen in der Regel auf verschiedene Bereiche im Nervensystem verteilt sind. Das circadiane System der Säugetiere besteht nach dem heutigen Wissensstand aus den folgenden drei Komponenten:

1. Dem endogenen Schrittmacher, der als Rhythmusgenerator fungiert.
2. Eingangsstrukturen und afferente Projektionen, die der Aufnahme und Weiterleitung von Umweltreizen dienen und somit dem Schrittmacher die nötigen Informationen für eine Synchronisation liefern.
3. Ausgangsstrukturen und efferente Projektionen, die für die Übertragung der circadianen Rhythmik auf bestimmte Zielgebiete und somit für die Abstimmung verschiedener Körperfunktionen aufeinander verantwortlich sind.

Erste Hinweise für die Lokalisation des circadianen Schrittmachers bei Säugetieren erbrachte Curt P. Richter im Jahre 1967. Nach der selektiven Ausschaltung verschiedener endokriner Organe und unterschiedlicher Bereiche des Gehirns vermutete er, daß sich der circadiane Schrittmacher im ventralen Teil des Hypothalamus befinden müßte, da Läsionen in diesem Hirnareal zum Verlust der circadianen Aktivitätsrhythmik sowie der Rhythmen im Freß- und Trinkverhalten der Tiere führten (Richter, 1967). Diese Vermutung wurde 1972 von zwei weiteren Arbeitsgruppen bestätigt (Stephan und Zucker, 1972; Moore und Eichler, 1972), indem sie zeigten, daß alleine durch die Ausschaltung des sogenannten **Nucleus suprachiasmaticus** (engl.: *suprachiasmatic nucleus*; SCN) bei Ratten die circadiane Organisation in der Corticosteron-Ausschüttung, in der Wasseraufnahme und in der Aktivität verloren ging. Bei der Struktur des SCN handelt es sich um ein paariges Kerngebiet, welches direkt oberhalb des optischen Chiasmata unmittelbar links und rechts des dritten Ventrikels liegt. Bei der Ratte besteht der SCN aus zwei Ellipsoiden mit einem Durchmesser von jeweils 0,3–0,4 mm und einer Länge von 0,7–0,9 mm. Das einzelne Ellipsoid enthält 8000–10000 Neurone, die mit einem Durchmesser von 7,8–9,4 µm zu den kleinsten Nervenzellen im Zentralnervensystem zählen (van den Pol, 1980). Der SCN der Ratte läßt sich aufgrund von anatomischen und physiologischen Merkmalen in einen dorsomedialen und einen ventrolateralen Bereich unterteilen. So sind die Neurone im ventrolateralen Bereich im Durchschnitt etwas größer als im dorsomedialen Bereich und weisen auch eine höhere Anzahl von Dendriten auf (van den Pol, 1980). Ferner unterscheiden sich der dorsomediale und der ventrolaterale Bereich in der Verteilung der Afferenzen, welche hauptsächlich im ventrolateralen Bereich auftreten, bzw. der Efferenzen, welche vorwiegend im dorsomedialen Bereich zu finden sind und im Vorkommen verschiedener Neuropeptide (Inouye *et al.*, 1993). So läßt sich das Neuropeptid **Arginin-Vasopressin** (AVP) hauptsächlich in den Somata von Neuronen im dorsomedialen Bereich nachweisen (van den Pol und Tsujimoto, 1985), während das Neuropeptid **Vasoactive Intestinal Polypeptide** (VIP) (Card *et al.*, 1981) und der Neurotransmitter **γ-Aminobuttersäure** (GABA) (Decavel und van den Pol, 1990) bevorzugt in den Somata des ventrolateralen Bereichs zu finden sind.

Nach dem derzeitigen Wissensstand steht außer Zweifel, daß der circadiane Schrittmacher bei Säugetieren im SCN lokalisiert ist (Klein *et al.*, 1991). Diese Erkenntnis ergab sich letztendlich aus experimentellen Ansätzen, die sowohl *in vivo* als auch *in vitro* durchgeführt wurden. So führten Läsion des SCN generell zum vollständigen Verlust der circadianen Rhythmik im Verhalten und in einer Vielzahl von physiologischen Parametern (Stephan und Zucker, 1972; Coindet *et al.*, 1975; Rosenwasser und Adler, 1986; Meijer und Rietveld, 1989). Damit war zwar gezeigt, daß das Fehlen des SCN zum Verlust der circadianen Organisation führt, aber noch nicht bewiesen, daß der SCN selbst als circadianer Schrittmacher fungiert. Schließlich könnte die Arrhythmie auch auf den Verlust wichtiger Efferenzen vom SCN zurückzuführen sein, die für die Weiterleitung der circadianen Information unerlässlich sind. Ein weiterer wichtiger Anhaltspunkt für die Schrittmacherfunktion des SCN lag daher im Nachweis einer



circadianen Rhythmik in der neuronalen Aktivität der SCN-Neurone sowohl *in vivo* (Inouye und Kawamura, 1979; Inouye und Kawamura, 1982) als auch *in vitro* (Green und Gillette, 1982; Shibata *et al.*, 1982). Durch Langzeitmessungen der Spontanaktivität einzelner SCN-Neurone im Zellverband (Bos und Mirmiran, 1990) bzw. an Einzelzell-Kulturen (Welsh *et al.*, 1995) konnte ferner gezeigt werden, daß auch einzelne SCN-Neurone einen circadianen Rhythmus aufweisen. Dabei haben die individuellen Zellen eines SCN recht unterschiedliche Periodenlängen. Die endogene Periodenlänge des intakten SCN entspricht dann in etwa dem Mittelwert der Perioden der einzelnen SCN-Zellen (Liu *et al.*, 1997).

Auch in vielen metabolischen Parametern des SCN konnte ein circadianer Rhythmus nachgewiesen werden. Circadiane Rhythmen findet man beispielsweise im Gehalt an **cyclischem Adenosinmonophosphat** (cAMP) (Murakami und Takahashi, 1983), im Glukoseverbrauch (Schwartz *et al.*, 1980) und in der intrazellulären Konzentration verschiedener Neuropeptide wie AVP (Earnest und Sladek, 1986; Carter und Murphy, 1989), VIP (Takahashi *et al.*, 1989; Okamoto *et al.*, 1991), **Neuropeptid Y** (NPY) (Calzá *et al.*, 1990) und Somatostatin (Shinohara *et al.*, 1991). Weitere überzeugende Beweise für die Schrittmacherfunktion des SCN lieferten Transplantationsexperimente (Sawaki *et al.*, 1984; Aguilar-Roblero *et al.*, 1986; Lehman *et al.*, 1987), mit denen gezeigt wurde, daß eine durch vollständige Läsion des SCN verursachte Arrhythmie durch die Transplantation von embryonalem SCN-Gewebe wieder rückgängig gemacht werden konnte. Durch die Transplantation kam es zu einer Übertragung von charakteristischen Eigenschaften der circadianen Rhythmik des Spendertieres, wie beispielsweise der circadianen Periodenlänge (Ralph *et al.*, 1990).

### 3.6.2 Welches sind die wichtigsten neuronalen Projektionen des circadianen Schrittmachers?

#### *Der retinohypothalamische Trakt*

Bei Säugetieren findet die Synchronisation auf photische Umweltreize nach dem derzeitigen Wissensstand über bisher noch nicht eindeutig identifizierte Photopigment in der Retina statt. Von diesen bislang noch unbekanntem Photorezeptoren wird die Lichtinformation zu einer Gruppe von Ganglienzellen in der Retina weitergeleitet, die durch große Somata gekennzeichnet sind, und den SCN direkt über feine unmyelierte Fasern innervieren (Pickard, 1982). Diese vom Auge zum SCN ziehenden Nervenfasern sind Bestandteil des optischen Nerven, werden aber aufgrund ihrer besonderen Funktion als sogenannter **retinohypothalamischer Trakt** (lat.: *tractus retinohypothalamicus*; RHT) bezeichnet. Der RHT wurde bei Ratten (Hendrickson *et al.*, 1972; Moore und Lenn, 1972) und vielen anderen Säugetieren (Moore, 1973; Eichler und Moore, 1974) nachgewiesen.

Die Funktion des RHT ist die Übermittlung von photischer Information zur Synchronisation des circadianen Schrittmachers im SCN. Die Durchtrennung aller optischen Nervenbahnen direkt hinter dem optischen Chiasma führte zur vollständigen visuellen Erblindung und zum Verlust

visueller Reflexe ohne die Synchronisationsfähigkeit des Schrittmachers auf photische Reize zu beeinflussen (Moore und Lenn, 1972; Moore und Klein, 1974). Die gezielte Durchtrennung des RHT in unmittelbarer Nähe des SCN führte zum Verlust der Synchronisationsfähigkeit, hatte aber keinen Effekt auf andere visuelle Funktionen (Johnson *et al.*, 1988a). Der RHT ist also sowohl notwendig als auch hinreichend für eine Synchronisation des SCN auf photische Umweltreize.

Obwohl noch nicht eindeutig geklärt ist, welche Transmitter an der Übertragung vom RHT zum SCN beteiligt sind, geht man derzeit davon aus, daß es sich um die exzitatorischen Aminosäuren Glutamat bzw. Aspartat handelt (Ebling, 1996). Zumindest für den Neurotransmitter Glutamat ist inzwischen bekannt, daß seine Ausschüttung über Serotoninrezeptoren auf den Endigungen des RHT reguliert werden kann. Durch immunhistologische Färbungen fand man aber auch Hinweise auf eine mögliche Beteiligung der Neuropeptide Substanz P (Shirakawa und Moore, 1994) bzw. **Pituitary adenylate cyclase activating peptide** (PACAP) (Hannibal *et al.*, 1997).

#### *Das intergeniculate leaflet und der geniculohypothalamische Trakt*

Beim sogenannten **intergeniculate leaflet** (IGL) handelt es sich um eine dünne Zellschicht zwischen dem dorsalen und ventralen Corpus geniculatum laterale im Thalamus (Hickey und Spear, 1976). Das IGL wurde bei verschiedenen Säugetierarten nachgewiesen, wie beispielsweise Hamstern (Harrington *et al.*, 1985), Ratten (Hickey und Spear, 1976), Erdhörnchen (Smale *et al.*, 1991) und Affen (Moore, 1992). Das IGL der Ratte besteht aus circa 2000 Neuronen, von denen etwa 60% das Neuropeptid Enkephalin und etwa 40% das Neuropeptid NPY enthalten (Moore und Card, 1994). Ferner wurde auch eine dichte Population von Substanz P immunreaktiver Somata beschrieben (Takatsuji *et al.*, 1991). Weiterhin kommt der Neurotransmitter GABA in weitgehend allen Neuronen des IGL vor (Moore und Speh, 1993; Moore und Card, 1994).

Das IGL erhält eine Reihe von afferenten Projektionen, welche vorwiegend von den beiden Retinae, von intrinsischen IGL Neuronen, von Neuronen des kontralateralen IGL sowie aus dem retrochiasmatischen Areal, einer Region, die selbst direkte Afferenzen von der Retina und vom SCN erhält (Card und Moore, 1989; Moore und Card, 1994). Die retinalen Afferenzen, die das IGL innervieren, entstammen den gleichen retinalen Ganglienzellen, die auch zum SCN projizieren (Pickard, 1985; Moore *et al.*, 1995). Neben den oben genannten Hauptafferenzen wurden ferner afferente Projektionen mit geringerer Dichte vom SCN, vom Locus coeruleus, einem Zellcluster in der Pons im Hirnstamm, und den Raphe-Kernen beschrieben (Moore und Card, 1994). Efferente Projektionen des IGL ziehen als sogenannter **geniculohypothalamischer Trakt** (lat.: *tractus geniculohypothalamicus*; GHT) zum SCN, wo die Transmitter NPY (Harrington *et al.*, 1985) und GABA (Moore und Speh, 1993) ausgeschüttet werden. Weitere Efferenzen des IGL sind intrinsische Projektionen, Projektionen zum kontralateralen IGL und Projektionen zu den visuellen Kerngebieten (Moga und Moore, 1997).

Obwohl das IGL und der GHT eine indirekte Projektion von der Retina zum SCN darstellen, sind sie offensichtlich für die Synchronisation des circadianen Systems auf einen normalen Licht-Dunkel-Wechsel nicht erforderlich, wie Läsionen des IGL (Dark und Asdourian, 1975) oder des primären optischen Trakts (Moore und Klein, 1974; Rusak, 1977) zeigen. Trotzdem ist das IGL an der Verarbeitung von photischen Stimuli beteiligt. Dies belegt zum einen die Tatsache, daß die neuronale Aktivität des IGL direkt auf eine Stimulation der Retina reagiert (Ralph *et al.*, 1996), zum anderen der aktuelle Befund, daß Ratten nach IGL Läsionen nicht mehr auf eine sogenannte „skeleton photoperiod“ synchronisieren, das heißt auf einen Zeitgeberzyklus mit zwei jeweils einstündigen Lichtpulsen im Abstand von 12 Stunden (Edelstein und Amir, 1999). Weitere Hinweise auf eine Beteiligung des IGL an der Verarbeitung photischer Information ergaben sich aus den Befunden, daß IGL-Läsionen beim Goldhamster zum einen die normalerweise unter Dauerlicht zu beobachtenden Verlängerung der circadianen Periode unterbinden (Harrington und Rusak, 1986; Pickard *et al.*, 1987) sowie das unter starkem Dauerlicht einsetzende „splitting“, das heißt die Dissoziation der Aktivitätsphase in zwei unabhängige Aktivitätsschübe reduzieren (Harrington und Rusak, 1986; Pickard *et al.*, 1987). Ferner wurde gezeigt, daß es nach IGL-Läsionen zu einer verkürzten Resynchronisationszeit nach einer Verschiebung des Licht-Dunkel-Wechsels kommt (Johnson *et al.*, 1988c; Pickard, 1989).

Neben den Befunden für eine Beteiligung des IGL bei der Verarbeitung photischer Stimuli, gibt es auch eindeutige Hinweise für eine Beteiligung des IGL bei der Vermittlung nicht-photischer Reize. So führten elektrische Stimulationen des IGL zu typischen nicht-photischen Phasenverschiebungen (Rusak *et al.*, 1989), wie sie auch für Dunkelpulse bekannt sind (Boulos und Rusak, 1982). Weiterhin wurde gezeigt, daß IGL-Läsionen den phasenverschiebenden Effekt nicht-photischer Stimuli reduzieren bzw. blockieren, so zum Beispiel die Wirkung von Triazolam Injektionen (Johnson *et al.*, 1988c) oder eines neuen Laufrades (Janik und Mrosovsky, 1994).

Der GHT scheint also sowohl an der Übertragung und Modulation photischer als auch an der Übermittlung nicht-photischer Stimuli beteiligt zu sein.

### *Die Raphe-Kerne*

Neben den Eingängen des RHT und GHT wird der SCN auch durch ein dichtes Netz von Projektionen der Raphe-Kerne innerviert, welche den Neurotransmitter Serotonin freisetzen (Saavedra *et al.*, 1974; Azmitia und Segal, 1978; Moore *et al.*, 1978; Steinbusch, 1981). Von den verschiedenen Raphe-Kernen ziehen die meisten Projektionen des sogenannten **medianen Nucleus raphe** (MRN) direkt zum SCN, während der sogenannte **dorsale Nucleus raphe** (DRN) hauptsächlich das IGL innerviert und somit indirekt auf den SCN wirken könnte (Meyer-Bernstein und Morin, 1996). Bei der Ratte gibt es ferner Evidenzen für eine schmale direkte Projektion vom DRN zum SCN, die beim Goldhamster bisher nicht nachgewiesen werden konnte (Morin, 1994; Morin und Meyer-Bernstein, 1999). Da bei Ratten auch eine direkte

retinale Projektion zum DRN nachgewiesen wurde (Shen und Semba, 1994; Kawano *et al.*, 1996), besteht zumindest bei dieser Spezies prinzipiell die Möglichkeit, daß photische Information auch indirekt über die serotonergen Projektionen des DRN zum SCN übermittelt werden können.

Neben dem RHT, GHT und den serotonergen Projektionen erhält der SCN noch eine Vielzahl weiterer Afferenzen, deren Funktionen jedoch noch weitgehend ungeklärt sind (Moore und Card, 1994; Moore, 1996; Moga und Moore, 1997).

Vom SCN selbst ziehen Efferenzen in verschiedene Strukturen des Hypothalamus, des Thalamus und des basalen Vorderhirns (Watts und Swanson, 1987; Watts *et al.*, 1987; Watts, 1991; Morin, 1994). Über deren Funktionen und Wirkmechanismen ist aber momentan ebenfalls noch wenig bekannt.

In der Abb. 3.1 sind die nach dem derzeitigen Wissensstand wichtigsten Afferenzen und Efferenzen des circadianen Systems in einer schematischen Übersicht dargestellt.

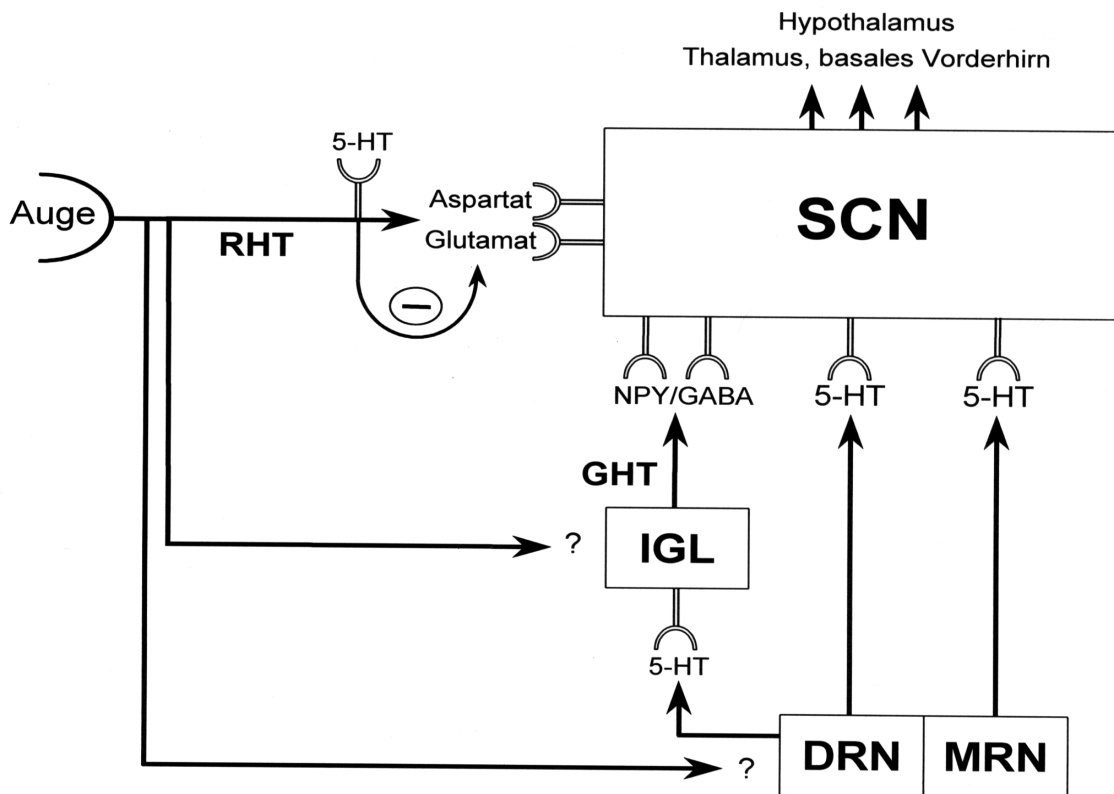


Abb. 3.3: Schematische Darstellung der neuronalen Verschaltungen des circadianen Systems

DRN: dorsaler Nucleus raphe; GABA:  $\gamma$ -Aminobuttersäure; GHT: geniculohypothalamischer Trakt; IGL: intergeniculate leaflet; MRN: medianer Nucleus raphe; NPY: Neuropeptid Y; RHT: retinohypothalamischer Trakt; SCN: suprachiasmatischer Nucleus; 5-HT: Serotonin; ?: unbekannter Transmitter.

### 3.6.3 Was sind induzierbare Transkriptionsfaktoren und welche Rolle spielen sie im circadianen System?

Bei den **induzierbaren Transkriptionsfaktoren** (ITF) handelt es sich um die ersten Proteine, welche in einer Zelle nach akuter Stimulation induziert werden. Die Transkription der sie kodierenden Gene, den sogenannten **immediate early genes** (IEG), wird durch die Aktivierung von „second messenger“-abhängigen Signaltransduktionswegen ausgelöst (Bravo, 1990). Die Proteine der IEGs fungieren dann als Transkriptionsfaktoren und regulieren nach einer Stimulation verschiedene Langzeitantworten innerhalb der Zelle (Ginty *et al.*, 1991; Morgan und Curran, 1991). Zu den bisher identifizierten IEGs gehören Gene aus der *fos*-Familie (*c-fos*, *fra-1*, *fra-2* und *fos-B*), der *jun*-Familie (*c-jun*, *JunB* und *jun-D*) und die Gene *zif/268*, *nur/77* und *c-myc* (Sheng und Greenberg, 1990; Hughes und Dragunow, 1995). Die Aktivierung dieser IEGs kann durch Zellaktivierungen ganz unterschiedlicher Art, wie beispielsweise durch Neurotransmitter, Hitzeschock, Licht, Wachstumsfaktoren und Hormone ausgelöst werden (Morgan und Curran, 1991). Das am besten untersuchte IEG im circadianen System ist das *c-fos* Gen. Dessen Transkription wird durch eine Vielzahl von Signaltransduktionskaskaden reguliert bzw. moduliert (Abb. 3.4). Wichtige Regulationselemente in der Promoterregion des *c-fos* Gens sind zum einen das **serum response element** (SRE) und zum anderen das **c-AMP response element** (CRE). Die Bindung des durch Phosphorylierung aktivierten **serum response faktor** (SRF) bzw. des **c-AMP response element binding protein** (CREB) induziert die Transkription des *c-fos* Gens. Nach der Translation bildet das c-Fos Protein mit anderen Proteinen, die meistens aus der *jun*-Familie stammen, über eine Leucin-Zipper-Wechselwirkung ein Heterodimer. Nach dieser Dimerisierung, welche zu einer verstärkten DNA-Bindeaktivität führt, kommt es zu einer Anlagerung an die entsprechende **Aktivator-Protein-Bindestelle** (AP-1) der Zielgene (Aronin *et al.*, 1990). In der Abb. 3.4 sind die wichtigsten Signaltransduktionswege, die zu einer Phosphorylierung von SRF bzw. CREB führen, in einer schematischen Zeichnung zusammengestellt.

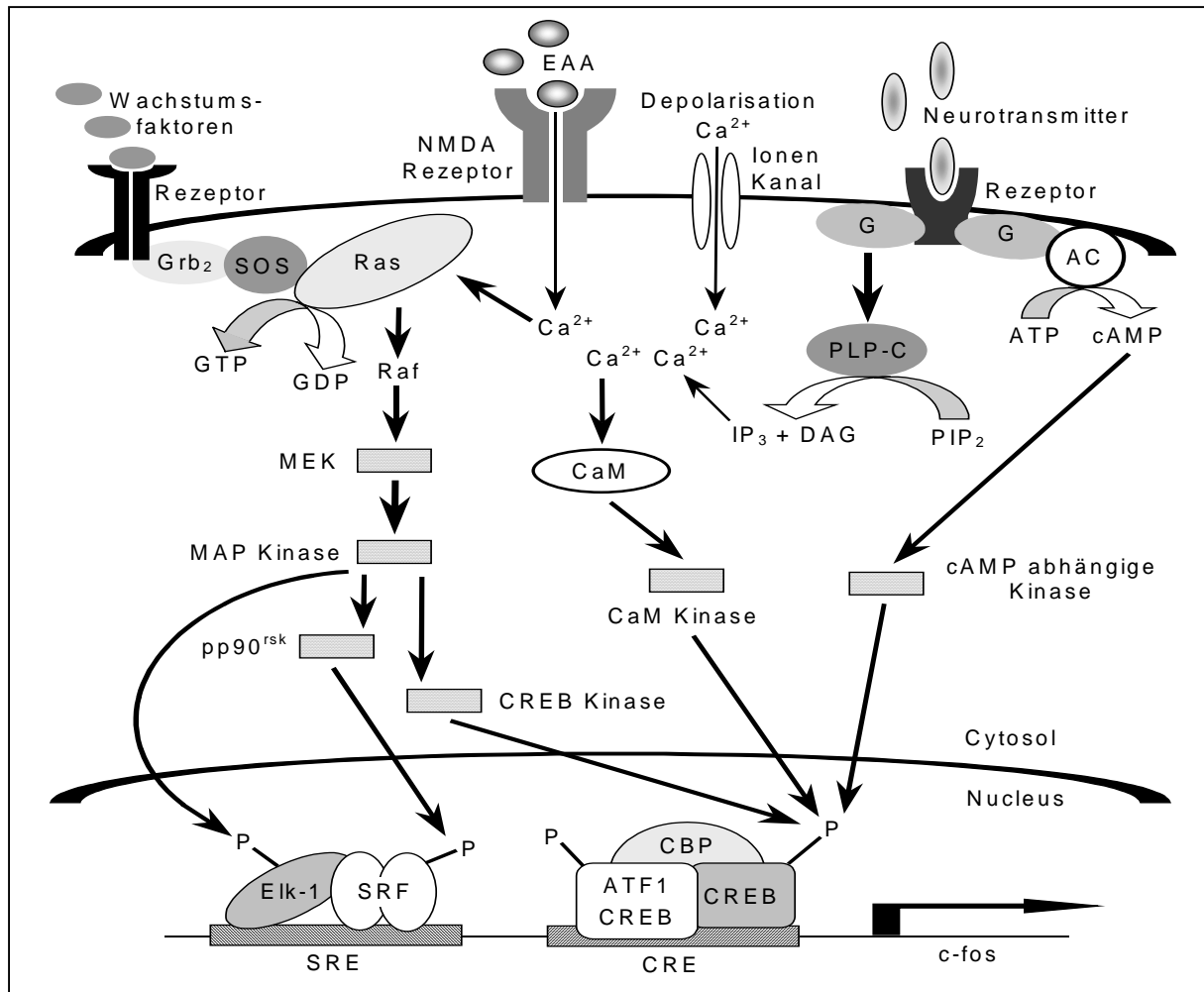


Abb. 3.4: Signaltransduktionswege zur Regulation der *c-fos* Expression.

Die Aktivierung einer G-Protein (G) gekoppelten Rezeptorantwort aufgrund der Bindung eines Neurotransmitters führt zur Aktivierung der Adenylatcyclase (AC) und/oder der Phospholipase C (PLP-C). Die Aktivierung der AC führt zu einer Erhöhung des intrazellulären Spiegels an cyclischen Adenosinmonophosphat (cAMP) Spiegels. Die Stimulation der PLP-C führt zur Spaltung von Phosphatidylinositoldiphosphat (PIP<sub>2</sub>) in Inositoltriphosphat (IP<sub>3</sub>) und Diacylglycerol (DAG). IP<sub>3</sub> führt zur Freisetzung von Kalzium (Ca<sup>2+</sup>) aus dem endoplasmatischen Reticulum. Der erhöhte cAMP Spiegel führt zur Aktivierung einer cAMP abhängigen Proteinkinase, die ihrerseits das cAMP response element binding protein (CREB) phosphoryliert. Das phosphorylierte CREB kann dann an das cAMP response element (CRE) des *c-fos* Gens binden. Die Bindung von exzitatorischen Aminosäuren (EAA) an Glutamaterezeptoren, wie beispielsweise den NMDA-Rezeptor, oder die Aktivierung eines Ionenkanals führen zum Einstrom von Ca<sup>2+</sup>. Das Ca<sup>2+</sup> bindet an das Kalziumbindepotein Calmodulin (CaM), welches zu einer Aktivierung der CaM abhängigen Proteinkinase führt, die dann ihrerseits wiederum CREB phosphorylieren kann. CREB kann mit sich selbst oder andern Transkriptionsfaktoren, wie dem activating transcriptionfactor-1 (ATF-1) Dimere bilden, die eine verstärkte Bindung an das CRE aufweisen. Ein weiterer Coaktivator des CREB stellt das CREB-binding-Protein (CBP) dar, welches an phosphoryliertes CREB binden kann, und dessen Bindungsaktivität an die dann verstärkt. Serum oder Wachstumsfaktoren führen zur Aktivierung von Tyrosinkinase, welche zu einer Aktivierung des GTP-Bindeproteins Ras (rat sarcoma virus) führen. In der weiteren Signalkaskade kommt es zur Phosphorylierung der Protein Kinasen Raf, MEK, MAP Kinase und pp90<sup>rsk</sup>. Die MAP Kinase und pp90<sup>rsk</sup> führen dann zur Phosphorylierung des Ets like transcription factor (Elk-1) und des serum response factor (SRF), die im phosphorylierten Zustand an das serum response element (SRE) des *c-fos* Gens binden. Die MAP Kinase kann vermutlich auch eine CREB Kinase aktivieren, die ihrerseits dann zur Phosphorylierung von CREB führt. Die Freisetzung von Ca<sup>2+</sup> führt ebenfalls zur Aktivierung des Ras-GTP, und somit zur Aktivierung der Kaskade. Nach der Besetzung der SRE und CRE Bindestellen, kommt es zur Expression des *c-fos* Gens. Weitere Abkürzungen: Grb<sub>2</sub>: Growth receptor bound protein 2; SOS: son of sevenless.

(Nach: Fundamental Neuroscience, Academic Press 1999, ISBN:0127808701)

Die Expression von IEGs im zentralen Nervensystem erwies sich als zuverlässiger Parameter für die Aktivierung einer Zelle. So ermöglicht die Untersuchung der Expression von IEGs nach einer Stimulation der Zelle beispielsweise die Aufklärung von Signaltransduktionswegen oder neuronalen Verschaltungen (Hughes und Dragunow, 1995).

Die Beobachtung, daß Licht zu einer Expression des c-Fos Proteins sowie anderer ITFs im ventralen Bereich des SCN von Säugetieren führt, stellte sich als eine geeignete Methode zur Erforschung der Wirkungsweise von photischer Information im SCN heraus (Kornhauser *et al.*, 1990). In weiteren Studien konnte gezeigt werden, daß die meisten ITFs, so wie c-Fos, nur zu solchen circadianen Zeitpunkten exprimiert werden, bei denen es auch aufgrund einer photischen Stimulation zu Phasenverschiebungen des circadianen Schrittmachers kommt (Aronin *et al.*, 1990; Earnest *et al.*, 1990; Rusak *et al.*, 1990; Sutin und Kilduff, 1992). Es wurde weiterhin gezeigt, daß eine Erhöhung der Lichtintensität zu einer Zunahme der c-Fos Expression führt (Kornhauser *et al.*, 1990). Weitere Hinweise für eine direkte Beteiligung von c-Fos und Jun B an der Verarbeitung photischer Stimuli ergaben sich aus Experimenten mit **Antisense-oligonukleotiden** (ASO). Dabei konnte gezeigt werden, daß lichtinduzierte Phasenverschiebungen durch die lokale Applikation von ASO gegen die *c-fos* und *junB* mRNA in die Nähe des SCN gehemmt werden können (Wollnik *et al.*, 1995). Die Reduktion lichtpuls-induzierter Phasenverschiebungen konnte auch durch die Injektion doppelsträngiger ASO, welche die AP-1 Bindestelle enthielt, erzielt werden (Takeuchi *et al.*, 1995). In neueren Arbeiten gibt es aber auch Hinweise dafür, daß eine lichtpulsinduzierte c-Fos Expression nicht zwangsläufig mit einer Phasenverschiebung des circadianen Systems korreliert sein muß. So konnte bei Mäusen, die auf eine „skeleton photoperiod“ synchronisiert waren, gezeigt werden, daß der Lichtpuls zum Ende der Aktivitätsphase zu einer c-Fos Expression führte, ohne daß es gleichzeitig zu Phasenverschiebungen kam. Im Gegensatz dazu führte der Lichtpuls zu Beginn der Aktivitätsphase sowohl zu Phasenverschiebungen als auch zu einer c-Fos Expression (Schwartz *et al.*, 1996). In einem anderen Experiment an Hamstern konnte ebenfalls eine lichtpulsinduzierte c-Fos Expression beobachtet werden, die nicht mit einer Phasenverschiebung des circadianen Systems einherging (Grosse *et al.*, 1995).

Im Unterschied zu photischen Stimuli, die in aller Regel mit einer c-Fos Expression korreliert sind, findet man für die Wirkung nicht-photischer Stimuli auf die c-Fos Expression im SCN sehr widersprüchliche Befunde. In den meisten Untersuchungen mit nicht-photischen Stimuli, wie beispielsweise der Injektion von Melatonin bei Ratten (Kilduff *et al.*, 1992), der Applikation von Triazolam oder Kochsalz beim Hamster (Mead *et al.*, 1992; Zhang und Van Reeth, 1993) und verschiedenen Verhaltensmanipulationen wie der Zugang zu einem neuen Laufrad bei Hamstern (Janik und Mrosovsky, 1992; Mead *et al.*, 1992; Janik *et al.*, 1995), wurde eine phasenverschiebende Wirkung auf das circadiane System beschrieben, ohne daß eine Änderung in der basalen Expression von c-Fos zu beobachten war. Im Gegensatz dazu, wurde bislang in einer Arbeit eine Zunahme in der c-Fos Expression im ventrolateralen Bereich des SCN der Ratte aufgrund der nicht-photischen Stimuli in Form eines Käfigwechsels bzw. einer Kochsalz-

injektion beschrieben. Allerdings wurde bei dieser Untersuchung nicht geprüft, ob die nicht-photischen Stimulationen auch zu Phasenverschiebungen des circadianen Systems führten (Edelstein und Amir, 1995). In einer weiteren neueren Arbeit wurde dagegen von einer Abnahme der c-Fos Expression im SCN des Hamsters nach nicht-photischer Stimulation beobachtet (Mikkelsen *et al.*, 1998). Es muß daher durch weitere Experimente geklärt werden, ob die kontroversen Befunde methodische Ursachen haben oder einen weiteren Speziesunterschied darstellen.

Ein weiterer Bereich des circadianen System, in dem es zu einer c-Fos Expression kommen kann, ist das von der Retina und DRN innervierte IGL. Eine c-Fos Induktion im IGL wurde sowohl bei Ratten als auch bei Hamstern nach photischen (Aronin *et al.*, 1990; Rusak *et al.*, 1990) wie auch nicht-photischen (Janik und Mrosovsky, 1992; Edelstein und Amir, 1995; Janik *et al.*, 1995) Stimuli beobachtet. Ein entscheidender Unterschied zwischen dem SCN und dem IGL besteht in der phasenspezifischen Abhängigkeit der c-Fos Expression. So ist die durch photische Stimuli induzierte c-Fos Expression im SCN phasenspezifisch, das heißt Licht führt nur während der subjektiven Nacht zu einer Erhöhung der basalen c-Fos Expression. Im IGL dagegen führen photische Stimuli sowohl während des subjektiven Tages als auch während der subjektiven Nacht zu einer c-Fos Expression (Peters *et al.*, 1996). Nicht photische Stimuli führen dagegen nur im IGL zu einer phasenspezifischen c-Fos Expression, das heißt es kommt nur während des subjektiven Tages zu einem Anstieg der basalen c-Fos Expression (Janik und Mrosovsky, 1992). Im SCN wurde bisher bei der überwiegenden Anzahl von Untersuchungen keine Veränderung der c-Fos Expression beobachtet, weder während des subjektiven Tages noch während der subjektiven Nacht.

Es bleibt also festzuhalten, daß der Nachweis einer c-Fos Expression im SCN oder IGL ein geeigneter, inzwischen vielfach verwendeter methodischer Ansatz zur Untersuchung der neuronalen Verarbeitung photischer bzw. nicht-photischer Stimuli im circadianen System darstellt. Allerdings müssen die zum Teil noch widersprüchliche Ergebnisse durch weitere Untersuchungen noch geklärt werden.

#### **3.6.4 Welche Aufgaben haben die Transmitter NPY und GABA im circadiane System von Säugetieren?**

Wie in den vorangegangenen Kapiteln bereits angesprochen, spielt das IGL und seine Projektion zum SCN eine wichtige Rolle bei der Synchronisation des circadianen Systems bzw. bei der Integration von photischen und nicht-photischen Stimuli.

An den Terminalen des GHT werden vor allem die Transmitter NPY und GABA freigesetzt, deren unmittelbare Wirkung auf das circadiane System in verschiedenen Arbeiten untersucht wurde. Diese deuten darauf hin, daß NPY an der Übertragung bzw. Verarbeitung nicht-photischer Stimuli beteiligt ist. So wurde beispielsweise gezeigt, daß NPY-Injektionen in den SCN (Albers und Ferris, 1984; Biello *et al.*, 1994) zu ganz ähnlichen Phasenverschiebungen



führen, wie sie auch für nicht-photische Stimuli (Mrosovsky *et al.*, 1989; Reebbs und Mrosovsky, 1989) sowie für Dunkelpulse (Boulos und Rusak, 1982) bekannt sind. Ferner wurde gezeigt, daß sich die Wirkung eines typischen nicht-photischen Stimulus, wie beispielsweise ein Käfigwechsel, beim Goldhamster durch die lokale Applikation eines NPY-Antagonisten in den SCN hemmen läßt (Biello *et al.*, 1994). Weiterhin konnte gezeigt werden, daß der Verlust von NPY durch eine Läsion des IGL zu einer Abschwächung der Phasenverschiebungen aufgrund des Zugangs zu einem neuen Laufrad führt (Janik und Mrosovsky, 1994; Wickland und Turek, 1994). Diese Ergebnisse sprechen für eine Beteiligung von NPY an der Verarbeitung nicht-photischer Stimuli.

Neben NPY wird an den Terminalen des GHT auch der Neurotransmitter GABA freigesetzt, der ebenfalls an der Übertragung von photischer und nicht-photischer Information beteiligt zu sein scheint. GABA wirkt dabei zum einen entweder über direkt mit einem Chlorid-Kanal verbundene GABA<sub>A</sub> Rezeptoren und zum anderen über GABA<sub>B</sub> Rezeptoren, die über ein G-Protein an Kalium und Kalzium Kanäle gekoppelt sind. Beide Mechanismen führen zu einer Hyperpolarisation der Zelle, wodurch es zu einer hemmenden Wirkung kommt. Die Funktion von GABA im circadianen System wurde beispielsweise durch den Einsatz von Benzodiazepinen untersucht, die an GABA<sub>A</sub> Rezeptoren binden und dadurch die hemmende Wirkung von GABA deutlich verstärken (Möhler *et al.*, 1986). Diese Untersuchungen zeigten, daß die Applikation von Benzodiazepinen wie Triazolam (Johnson *et al.*, 1988c) oder Diazepam (Ralph und Menaker, 1989) während des subjektiven Tages bei Hamstern zu typischen nicht-photischen Phasenverschiebungen führt. Ähnliche Phasenverschiebungen wurden auch nach der Applikation des GABA<sub>A</sub> Rezeptor spezifischen Agonisten Muscimol beobachtet, und zwar sowohl bei Hamstern *in vivo* (Smith *et al.*, 1989) als auch am isolierten Ratten-SCN (Tominaga *et al.*, 1994). Ferner scheint GABA an der Verarbeitung von photischen Stimuli beteiligt zu sein. So führte die Gabe von Muscimol bzw. Diazepam zu einer Hemmung lichtinduzierter Phasenverschiebungen, während die lokale Applikation des spezifischer Antagonist Bicucullin in die Nähe des SCN eine Verstärkung der lichtinduzierten Phasenverschiebungen auslöst (Ralph und Menaker, 1989; Gillespie *et al.*, 1997). Den letztgenannten Befunden steht allerdings eine ältere Arbeit gegenüber, in der nach systemischen Injektionen von Bicucullin eine Hemmung lichtinduzierter Phasenverschiebungen beobachtet wurde (Ralph und Menaker, 1985). Eine mögliche Erklärung für diesen Widerspruch könnte in den unterschiedlichen Injektionsmethoden liegen.

Neben GABA<sub>A</sub> Rezeptoren findet man im SCN aber auch sogenannte GABA<sub>B</sub> Rezeptoren. Diese GABA<sub>B</sub> Rezeptoren scheinen ebenfalls eine wichtige Funktion bei der Vermittlung photischer Stimuli zu haben. So konnte an Hamstern gezeigt werden, daß die Applikation des GABA<sub>B</sub>-Agonisten Baclofen zu einer Hemmung lichtinduzierter Phasenverschiebungen führt (Ralph und Menaker, 1989; Gillespie *et al.*, 1997). Weiterhin wurde am isolierten SCN der Ratte gezeigt, daß der GABA<sub>B</sub>-Agonist Baclofen den Anstieg in der neuronalen Aktivität des SCN aufgrund einer Reizung des optischen Nerven hemmen kann (Jiang *et al.*, 1995).

Inzwischen gibt es mehrere Hinweise, die für eine enge Wechselwirkung der beiden Transmitter NPY und GABA sprechen. So konnten beispielsweise NPY induzierte Phasenverschiebungen durch den Natrium-Kanalblocker Tetrodotoxin gehemmt werden, während der GABA-Agonist Muscimol auch unter Tetrodotoxin weiterhin Phasenverschiebungen auslöste. Dies führte zu dem Schluß, daß GABA direkt auf die Schrittmacherneurone wirken kann, während die Wirkung von NPY wegen der Abhängigkeit von Natrium-Kanälen und somit von Aktionspotentialen vermutlich über Interneurone vermittelt wird (Huhman *et al.*, 1997). Gegen diese Hypothese sprechen allerdings *in vitro* Studien in denen gezeigt wurde, daß sich die durch NPY ausgelösten Phasenverschiebungen in der neuronalen Aktivität des SCN weder bei Hamstern (Biello *et al.*, 1997) noch bei Ratten (Shibata und Moore, 1993) durch die Gabe von Tetrodotoxin hemmen lassen. Dieser Widerspruch läßt sich nur schwer erklären. Denkbar wäre, daß NPY doch direkt an den SCN Neuronen angreifen kann, zum anderen könnte es sein, daß es durch die Isolation des SCN zu einem Verlust afferenter Projektionen kommt, die für die Verarbeitung des NPY Signals von Bedeutung sind.

### 3.7 Serotonin und seine Bedeutung für das circadianen System der Säugetiere

#### 3.7.1 Der Neurotransmitter Serotonin: Eine Einführung

Der Neurotransmitter Serotonin (Abb. 3.5) wurde zum ersten Mal 1948 aus Blut isoliert und später auch im Zentralnervensystem und im Darmbereich nachgewiesen. Serotonin ist bei Säugetieren an zahlreichen Funktionen im zentralen Nervensystem beteiligt. So spielt es beispielsweise eine wichtige Rolle beim Lernen und bei Gedächtnisfunktionen, ist an der Kontrolle der Thermoregulation und am Sexualverhalten beteiligt und hat Einfluß auf die Regulation des Hungerzustandes.

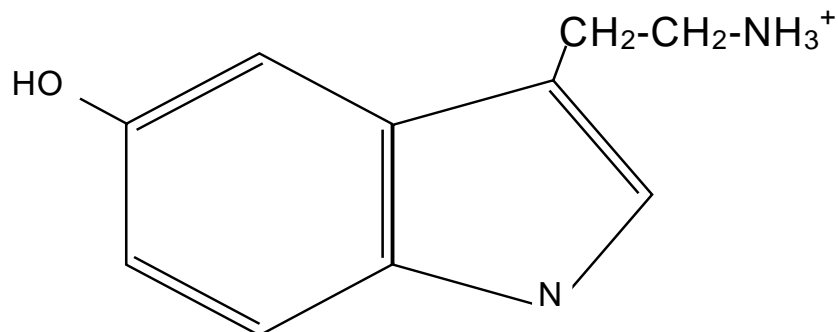


Abb. 3.5: Chemische Strukturformel des Serotonins

Die Biosynthese des Serotonins erfolgt aus der Aminosäure Tryptophan, welches zunächst über eine Hydroxylase zum 5-Hydroxytryptophan und anschließend von einer Decarboxylase zum **5-Hydroxytryptamin** (5-HT, Serotonin) umgesetzt wird. Der geschwindigkeitsbestimmende Schritt in der Biosynthese des Serotonins ist dabei die Hydroxylierung (Aghajanian und Wang, 1987). Das Serotonin wird nach seiner Synthese in Vesikel verpackt und in den synaptischen Endigungen gespeichert. Nach einer Aktivierung der Zelle kommt es aufgrund des Kalziumanstoms zu einer Verschmelzung der Vesikel mit der synaptischen Membran und somit zu einer Ausschüttung des Serotonins in den synaptischen Spalt.

Nach dem heutigen Wissensstand unterscheidet man 14 unterschiedliche Serotoninrezeptoren, welche sich in sieben Rezeptortypen einteilen lassen (Tabelle 3.2) (Hoyer *et al.*, 1994; Hoyer und Martin, 1996; Barnes und Sharp, 1999). Diese sieben Rezeptortypen können wiederum in die Gruppe der ionotropen bzw. metabotropen Rezeptoren unterteilt werden. In die Gruppe der ionotropen Rezeptoren gehört nur der 5-HT<sub>3</sub> Rezeptor, der nach seiner Aktivierung durch die Öffnung von Natrium-, Kalium- und Kalziumkanälen zu einer Depolarisierung und somit zu einer Aktivierung der Zelle führt. Unter den metabotropen Rezeptoren kann zwischen drei Gruppen unterschieden werden. Bei der ersten Gruppe handelt es sich um die 5-HT<sub>1</sub> Rezeptoren mit den Untergruppen 5-HT<sub>1A/1B/1D/1E/1F</sub> und die 5-HT<sub>5</sub> Rezeptoren mit den Untergruppen 5-HT<sub>5A/5B</sub>, die alle nach ihrer Aktivierung über ein inhibierendes G-Protein die **Adenylatcyclase** (AC) hemmen und somit eine Abnahme des cAMP-Spiegels in der Zelle bewirken. Zu der zweiten Gruppe gehören die 5-HT<sub>4</sub>, 5-HT<sub>6</sub> und 5-HT<sub>7</sub> Rezeptoren, welche nach der Bindung von Serotonin über ein aktivierendes G-Protein zu einer Aktivierung der AC und damit zu einem erhöhten cAMP-Spiegels in der Zelle führen. Die dritte Gruppe umfaßt die 5-HT<sub>2</sub> Rezeptoren mit den Untergruppen 5-HT<sub>2A</sub>, 5-HT<sub>2B</sub> und 5-HT<sub>2C</sub>. Die Bindung von Serotonin an diese Rezeptoren führt über eine G-Protein vermittelte Signaltransduktionskaskade zur Aktivierung der **Phospholipase C** (PLP-C) und somit zu einer Erregung der Zelle (Boess und Martin, 1994; Barnes und Sharp, 1999).

Tabelle 3.2: Einteilung der Serotonin-Rezeptortypen

Klassifikation der Serotonin-Rezeptoren		
Rezeptortyp	Wirkungsmechanismus	Untergruppen
5-HT <sub>1</sub>	AC ↓	<ul style="list-style-type: none"> <li>5-HT<sub>1A</sub></li> <li>5-HT<sub>1B</sub></li> <li>5-HT<sub>1D</sub></li> <li>5-HT<sub>1E</sub></li> <li>5-HT<sub>1F</sub></li> </ul>
5-HT <sub>2</sub>	PLC ↑	<ul style="list-style-type: none"> <li>5-HT<sub>2A</sub></li> <li>5-HT<sub>2B</sub></li> <li>5-HT<sub>2C</sub></li> </ul>
5-HT <sub>3</sub>	Ionen Kanäle	
5-HT <sub>4</sub>	AC ↑	
5-HT <sub>5</sub>	AC ↓	5-HT <sub>5A</sub>
	?	5-HT <sub>5B</sub>
5-HT <sub>6</sub>	AC ↑	
5-HT <sub>7</sub>	AC ↑	

5-HT: Serotonin; AC: Adenylatcyclase; PLC: Phospholipase C; ↑: Aktivierung ; ↓: Hemmung

### 3.7.2 Das serotonerge Netzwerk im Gehirn von Säugetieren

Die Biosynthese des Neurotransmitters Serotonin im Gehirn von Säugetieren findet vorwiegend in den Raphe-Kernen statt. Wie bereits in Kapitel 3.6.2 erwähnt, projiziert der DRN hauptsächlich zum IGL, während der MRN überwiegend direkt mit dem SCN verbunden ist (Meyer-Bernstein und Morin, 1996; Miller *et al.*, 1996). Bei der Ratte gibt es weiterhin schmale Projektionen vom DRN direkt zum SCN (Moga und Moore, 1997). Durch retrograde Färbetechniken und immunhistochemische Untersuchungen konnte gezeigt werden, daß nur etwa 50% der Projektionen vom MRN zum SCN tatsächlich Serotonin als Neurotransmitter enthalten, während der serotonerge Anteil bei den vom DRN aus zum IGL projizierender Neurone nur etwa 40% beträgt. Es ist bislang noch ungeklärt, welche anderen Transmitter in den Projektionen der Raphe-Kerne bei der Übertragung zum SCN eine Rolle spielen (Meyer-Bernstein und Morin, 1996). Weitere Regionen, die vom DRN und MRN innerviert werden, sind das Tectum, das Pretectum, verschiedene Regionen des Thalamus und Hypothalamus sowie das basale Vorderhirn (Morin, 1999).

### 3.7.3 Welche Aufgaben hat Serotonin im circadianen System?

Obwohl sich in der Literatur sehr vielfältige und zum Teil auch widersprüchliche Angaben zur Wirkung des Serotonins auf das circadiane System finden lassen, kann man derzeit davon ausgehen, daß Serotonin für die Funktionsfähigkeit des circadianen Schrittmachers nicht notwendig ist. Dies ergibt sich aus den zwei wichtigen Befunden, daß Serotonin weder für die Ausbildung einer circadianen Rhythmik noch für die Synchronisation des circadianen Systems notwendig ist. Vielmehr hat Serotonin eine modulierende Wirkung, indem es die Weiterleitung und Verarbeitung photischer sowie nicht-photischer Stimuli im circadianen System beeinflusst.

Daß Serotonin nicht direkt an der Generierung der circadianen Rhythmik beteiligt ist, konnte zum Beispiel beim Hamster durch chemische Läsionen des serotonergen Systems mit Hilfe des Neurotoxins **5,7-Dihydroxytryptamin** (5,7-DHT) gezeigt werden. Bei derartig behandelten Tieren kam es zwar zu einer Verlängerung der Aktivitätsphase unter konstanter Dunkelheit, die endogene Periode blieb dabei jedoch unverändert (Smale *et al.*, 1990). Die modulierende Wirkung von Serotonin zeigt sich andererseits bei Untersuchungen im Dauerlicht. Zunehmende Lichtintensitäten führen normalerweise zu einer deutlichen Verlängerung der circadianen Periode (Aschoff, 1959; Aschoff, 1960). Diese Verlängerung war nach Läsionen der Raphe-Kerne deutlich geringer als bei intakten Tieren (Meyer-Bernstein *et al.*, 1997). Serotonin scheint also die Empfindlichkeit des circadianen Schrittmachers gegenüber Licht zu beeinflussen.

Wie bereits in den vorangegangenen Kapiteln erwähnt wurde, wird die Information nicht-photischer Stimuli über den IGL zum SCN vermittelt. Viele Befunde deuten darauf hin, daß Serotonin auch an der Vermittlung nicht-photischer Stimuli beteiligt ist. So führten Läsionen des serotonergen Systems zum Verlust der normalerweise bei Hamstern durch Triazolaminjektionen ausgelösten Phasenverschiebungen des circadianen Systems (Penev *et al.*, 1994; Cutrera *et al.*, 1994a). Weiterhin konnte gezeigt werden, daß die Applikation von Serotonin bei Hamstern zu nicht-photischen Phasenverschiebungen führt (Cutrera *et al.*, 1994b; Bobrzynska *et al.*, 1996b). Diese Befunde stehen im Einklang mit der Tatsache, daß bei intakten Tieren eine Steigerung der lokomotorischen Aktivität generell mit einer Erhöhung der Serotoninfreisetzung im Gehirn korreliert ist (Chaouloff, 1989; Jacobs *et al.*, 1990).

Aufgrund dieser Befunde läßt sich sagen, daß Serotonin im circadianen System sowohl bei der Modulierung als auch bei der Übertragung photischer sowie nicht-photischer Stimuli eine wichtige Rolle spielt, selber aber nicht an der Erzeugung der circadianen Rhythmik beteiligt ist.

### **3.7.4 Unterliegt die Freisetzung und die Wirkung von Serotonin selbst einem circadianen Rhythmus?**

Damit es zu einem phasenverschiebenden Effekt des Serotonins auf die endogene Periode kommen kann, muß dessen Wirkung auf das circadiane System zu unterschiedlichen Zeiten des circadianen Zyklus verschieden sein. Dies kann entweder durch eine zeitliche Veränderung der Rezeptorzusammensetzung auf den Zellen erreicht werden, oder die Serotoninfreisetzung bzw. Synthese selbst unterliegt einer circadianen Modulation, das heißt die Verfügbarkeit von Serotonin ist zu unterschiedlichen Phasen des circadianen Zyklus verschieden.

So ergaben *in vivo* Mikrodialyse-Messungen an intakten Hamstern, daß die extrazelluläre Serotoninkonzentration, das heißt die Freisetzung von Serotonin, im SCN einen deutlichen Tag-Nacht-Rhythmus mit einem Minimum zum Ende des Tages und einem Maximum kurz nach Einsetzen der Dunkelphase zeigt. Der Rhythmus in der Serotoninfreisetzung bleibt auch unter Dauerdunkel-Bedingungen bestehen, ist also circadian gesteuert (Dudley *et al.*, 1998). Dieser Befund steht im Einklang mit früheren Arbeiten, die zeigten, daß auch die Synthese von Serotonin (Hery *et al.*, 1982) und die intrazelluläre Konzentration von Serotonin im SCN (Cagampang *et al.*, 1993) während der Nacht deutlich höher sind als am Tag. Weiterhin gibt es auch Hinweise auf eine circadiane Rhythmik in der Wiederaufnahme von Serotonin in die präsynaptischen Endigungen und in der zellulären Antwort von SCN-Zellen auf Serotonin. Dabei findet sich auch hier das Maximum im Laufe der subjektiven Nacht (Meyer und Quay, 1976; Mason, 1986).

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß sich die phasenspezifische Wirkung von Serotonin auf das circadiane System vermutlich aus einer Kombination der circadianen Verfügbarkeit des Transmitters Serotonin und der circadian schwankenden Rezeptorkomposition der SCN-Zellen zusammensetzt.

### **3.7.5 Wie wirken sich Läsionen des serotonergen Systems auf die circadiane Rhythmik aus?**

Durch die Injektion verschiedener monoaminspezifischer Neurotoxine oder eine elektrische Koagulation des Gewebes können ganz gezielt regional begrenzte oder nahezu vollständige Läsionen serotonerger Fasern bzw. Kerngebiete verursacht werden. Solche Läsionen haben in der Regel zwar nur geringfügige, trotzdem aber deutlich sichtbare Effekte auf den circadianen Schrittmacher. So konnte bei Hamstern beispielsweise eine Verlängerung der Aktivitätsphase um bis zu zwei Stunden beobachtet werden (Morin und Blanchard, 1991; Meyer-Bernstein und Morin, 1996). Normalerweise ist die Aktivitätsphase bei Hamstern auf die Dunkelheit des Licht-Dunkel-Zyklus beschränkt. Nach Läsionen des serotonergen Systems begannen die Tiere ihre Aktivitätsphase im Mittel 30 Minuten vor dem Einsetzen der Dunkelphase und beendeten sie erst bis zu 90 Minuten nach Ende der Dunkelphase. Bemerkenswerterweise blieb die Periodenlänge dabei unverändert.

Bei einer Haltung der Tiere unter konstanter Dunkelheit wurden weder bei Hamstern (Morin und Blanchard, 1991) noch bei Mäusen (Mistlberger *et al.*, 1998) eine Verlängerung der Aktivitätsphase oder Veränderungen der circadianen Periodenlänge beobachtet. Gleichermäßen kam es auch bei Ratten unter Dauerdunkel-Bedingungen zu keiner Veränderung der circadianen Periode nach elektrolytischer Läsion des DRN (Block und Zucker, 1976). Ein deutlicher Effekt nach Läsionen des serotonergen Systems wurde bislang nur bei Ratten unter Dauerlicht beobachtet. Hier führten Läsionen des MRN zum Verlust der circadianen Rhythmik (Levine *et al.*, 1986).

Im Gegensatz zu den relativ geringen Effekten von Läsionen des serotonergen Systems auf die endogene circadiane Rhythmik, gibt es deutliche Auswirkungen solcher Läsionen auf die Wirksamkeit von nicht-photischen Stimuli. So führten chemische Läsionen mit 5,7-DHT bei Hamstern zum Verlust der phasenverschiebenden Wirkung typischer nicht-photischer Stimuli, wie Triazolam Injektionen (Cutrera *et al.*, 1994a) oder der Zugang zu einem neuen Laufrad bzw. das Einsperren in eine Tretmühle (Marchant *et al.*, 1997). Vergleichbare Effekte hatte auch die systemische Gabe von Reserpin, welches die Verfügbarkeit von Serotonin, aber auch von Dopamin und Noradrenalin im Gehirn reduziert (Penev *et al.*, 1994). Bei Mäusen führte eine Läsion der serotonergen Bahnen zum SCN ebenfalls zum Verlust der Synchronisation auf einen zweistündigen Laufradzugang (Edgar *et al.*, 1997). Es gibt aber auch eine andere Studie an Hamstern, in der sich die durch den Zugang zu einem neuen Laufrad ausgelösten Phasenverschiebungen nicht durch die Läsion des serotonergen Systems mittels 5,7-DHT unterdrücken ließen (Bobrzynska *et al.*, 1996a). Dieser Widerspruch könnte darin begründet sein, daß der Zugang zu einem neuen Laufrad einen stärkeren Zeitgeber darstellt als eine erzwungene Aktivität, da die Motivation des Tieres eine entscheidende Rolle spielt.

Trotz dieses Widerspruchs läßt sich sagen, daß Läsionen im serotonergen System die Vermittlung nicht-photischer Stimuli entscheidend beeinflussen.

### **3.7.6 Mit welchen pharmakologischen Ansätzen kann die Wirkung von Serotonin auf das circadiane System untersucht werden?**

Die Wirkung von Serotonin auf das circadiane System wurde mit Hilfe verschiedener Agonisten und Antagonisten untersucht. Dabei kamen zwei unterschiedliche Versuchsansätze zum Einsatz. Zum einen wurde untersucht, ob bestimmte Agonisten oder Antagonisten bei chronischer Applikation zu Veränderungen der endogenen Periode bzw. bei einmaliger Injektion zu Phasenverschiebungen des circadianen Schrittmachers führen. Zum anderen wurde untersucht, welchen Effekt Agonisten oder Antagonisten auf die Verarbeitung von photischen und nicht-photischen Stimuli haben.

### 3.7.6.1 Wie wirken sich Serotonin-Agonisten bzw. Serotonin-Antagonisten auf das circadiane System aus?

Viele der pharmakologischen Untersuchungen mit Serotonin-Agonisten bzw. -Antagonisten wurden an Gehirnschnitten von Ratten durchgeführt. Dabei wurden mögliche Phasenverschiebungen des circadianen Schrittmachers aufgrund der pharmakologischen Behandlung anhand der circadianen Rhythmik in der neuronalen Aktivität einzelner SCN-Neurone bestimmt (Green und Gillette, 1982; Shibata *et al.*, 1982; Groos *et al.*, 1983; Gillette, 1986). In den ersten *in vitro* Experimenten zur Untersuchung von Serotonin-Effekten auf die circadiane Rhythmik des isolierten Ratten-SCN wurde der unspezifische Serotonin-Agonist Quipazin verwendet. Bei diesem Versuchsansatz führte die Gabe von Quipazin in das Kulturmedium zu Phasenbeschleunigungen von bis zu vier Stunden während des subjektiven Tages (CT 6) und zu Phasenverzögerungen von maximal vier Stunden während der subjektiven Nacht (CT 14 und CT 18) (Prosser *et al.*, 1990; Prosser *et al.*, 1992). Die beobachteten Phasenverschiebungen konnten nicht durch die Gabe des Natrium-Kanalblockers Tetrodotoxin gehemmt werden (Prosser *et al.*, 1992). Dieser Befund spricht für eine direkte Wirkung von Quipazin auf Serotonin-Rezeptoren im SCN, da durch die Behandlung mit Tetrodotoxin eine mögliche Vermittlung über Interneurone ausgeschlossen werden kann. Im Gegensatz zu Quipazin führte die gezielte Applikation von Serotonin direkt auf den SCN nur zu Phasenbeschleunigungen während des subjektiven Tages (Medanic und Gillette, 1992). Ein ähnliches Ergebnis wie für Serotonin, also Phasenbeschleunigungen während des subjektiven Tages, aber keine Effekte während der subjektiven Nacht, wurde auch für die Gabe der Serotonin-Agonisten **8-Hydroxy-Diprophylaminotetralin** (8-OH-DPAT) bzw. **5-Carboxamidotryptamin** (5-CT) beschrieben (Medanic und Gillette, 1992). Für 8-OH-DPAT gab es allerdings in einer anderen Arbeit auch Hinweise auf geringe Phasenverzögerungen während der subjektiven Nacht (Shibata *et al.*, 1992).

Die unterschiedliche Wirkung der Serotonin-Agonisten Quipazin, 8-OH-DPAT und 5-CT könnte in ihren unterschiedlichen Affinitäten zu den einzelnen Serotonin-Rezeptoren begründet sein. So bindet Quipazin mit annähernd gleicher Affinität an alle bekannten Serotonin-Rezeptoren, während 8-OH-DPAT und 5-CT eine sehr hohe Affinität für die 5-HT<sub>7</sub> und 5-HT<sub>1A</sub> Rezeptoren aufweisen (Lovenberg *et al.*, 1993; Kawahara *et al.*, 1994). Die unterschiedliche Wirkung von Quipazin bzw. Serotonin läßt sich damit aber nicht erklären. Vermutlich spielt hierbei die Unspezifität des Serotonin-Agonisten Quipazin eine wichtige Rolle, da er auch andere monoaminergen Rezeptoren wie beispielsweise Dopamin Rezeptoren stimulieren kann.

Durch die Kombination des spezifischen Serotonin-Agonisten 8-OH-DPAT mit verschiedenen Serotonin-Antagonisten ließen sich am isolierten SCN der Ratte Hinweise dafür finden, daß die Wirkung von Serotonin über den 5-HT<sub>7</sub> Rezeptortyp vermittelt wird. In diesen Versuchen zeigte sich, daß sich die phasenverschiebende Wirkung von 8-OH-DPAT besser durch den spezifischen Serotonin-Antagonisten Ritanserin hemmen läßt, der eine hohe Affinität für den 5-HT<sub>7</sub> Rezeptortyp aufweist, als durch den spezifischen Serotonin-Antagonisten Pindolol mit hoher Affinität zu den 5-HT<sub>1A</sub> Rezeptoren (Lovenberg *et al.*, 1993). Bemerkenswert ist in



diesem Zusammenhang auch eine neuere Arbeit, in der gezeigt werden konnte, daß eine Vorbehandlung von Gehirnschnitten mit NPY die phasenverschiebende Wirkung von 8-OH-DPAT hemmt. Möglicherweise verhindert NPY dabei die intrazelluläre Zunahme von cAMP, was wiederum für den 5-HT<sub>7</sub> Rezeptortyp sprechen würde, da dieser im Gegensatz zum 5-HT<sub>1A</sub> Rezeptor die AC aktiviert (Prosser, 1998).

Eine Vielzahl der pharmakologischen Untersuchungen zur Wirkung von Serotonin auf das circadiane System wurden auch an intakten Tieren, das heißt in *in vivo* Untersuchungen durchgeführt. Im Gegensatz zu den *in vitro* Versuchen, bei denen hauptsächlich Gehirnschnitte von Ratten zum Einsatz kamen, wurden die *in vivo* Untersuchungen vorwiegend an Hamstern, Ratten und Mäusen vorgenommen.

Die *in vivo* Untersuchungen an Hamstern ergaben, daß die Applikation von Serotonin-Agonisten wie Quipazin und 8-OH-DPAT während des subjektiven Tages zu Phasenbeschleunigungen im circadianen Rhythmus führen (Bobrzynska *et al.*, 1996a; Challet *et al.*, 1998). Die an intakten Hamstern beobachteten Phasenverschiebungen waren mit maximal 80 Minuten deutlich geringer als die Phasenverschiebungen von bis zu vier Stunden, die am isolierten SCN beobachtet wurden. Trotzdem wurde die Übereinstimmung in der Wirkung von Serotonin auf das circadiane System des intakten Hamsters bzw. des isolierten Ratten-SCN oft als Hinweis auf einen vergleichbaren Wirkungsmechanismus gedeutet.

Auf den zweiten Blick ergeben sich jedoch deutliche Unterschiede zwischen den beiden Versuchsansätzen. Im Gegensatz zu den im vorherigen Absatz genannten Befunde am isolierten Ratten-SCN konnten die durch 8-OH-DPAT induzierten Phasenverschiebungen bei intakten Hamstern durch eine Vorbehandlung mit dem 5-HT<sub>1A</sub> Antagonisten Pindolol gehemmt werden (Tominaga *et al.*, 1992). Außerdem beruhen die durch Serotonin induzierten Phasenverschiebungen während des subjektiven Tages bei intakten Hamstern nicht auf einer direkten Wirkung im SCN, sondern werden –wie im nachfolgenden Kapitel noch ausführlich beschrieben wird- indirekt vermittelt.

Die unterschiedlichen Wirkungsmechanismen von Serotonin könnten natürlich auf Speziesunterschiede zwischen Ratten und Hamstern beruhen. Allerdings ergaben sich bei dem Vergleich der bisherigen Befunde an intakten Ratten mit den Ergebnissen am isolierten Ratten-SCN fast noch größere Unterschiede als beim Vergleich der *in vivo* Untersuchungen an Hamstern mit den *in vitro* Ergebnissen am isolierten Ratten-SCN. So wurde in einer älteren *in vivo* Untersuchung an Ratten berichtet, daß sowohl Quipazin als auch 8-OH-DPAT während des subjektiven Tages zu Phasenbeschleunigungen von 60–70 Minuten führen, also eine ähnliche Wirkung haben wie bei Hamstern (Edgar *et al.*, 1993). Dieser Studie widersprechen aber eine Reihe von jüngeren Untersuchungen, die zeigen, daß Quipazin und verschiedene andere Serotonin-Agonisten bei intakten Ratten nur während der subjektiven Nacht zu Phasenverschiebungen führen. Diese Phasenverschiebungen haben große Ähnlichkeit mit den Effekten von Lichtpulsen, da es zu Beginn der subjektiven Nacht zu Phasenverzögerungen und zum Ende der subjektiven Nacht zu Phasenbeschleunigungen kommt. So führte Quipazin zu

Beginn der subjektiven Nacht (CT 18) ähnlich wie Licht zu Phasenverzögerungen in der circadianen Melatoninrhythmik der Ratte (Kennaway *et al.*, 1996; Kennaway und Moyer, 1998). Vergleichbare Ergebnisse erbrachte eine Studie, in der eine vollständige PRC für Quipazin-Injektionen erstellt wurde (Kohler *et al.*, 1999). Nach dieser Untersuchung induziert Quipazin lichtähnliche Phasenverschiebungen mit maximalen Phasenverzögerungen bei CT 14 und maximalen Phasenbeschleunigungen bei CT 22. Weitere Hinweise auf eine lichtähnliche Wirkung von Quipazin ergaben sich aus dem Nachweis von c-Fos im ventrolateralen Bereich des SCN. Dieser molekulare Marker für eine Stimulation des SCN war ebenfalls nur während der frühen (Moyer *et al.*, 1997) bzw. späten subjektiven Nacht (Moyer *et al.*, 1997; Kohler *et al.*, 1999) nachzuweisen, aber nicht während des subjektiven Tages. Ein solches Expressionsmuster stimmt weitgehend mit der Expression von c-Fos nach einem Lichtpuls überein (Schwartz *et al.*, 1995; Kornhauser *et al.*, 1996a, Kornhauser *et al.*, 1996b).

Trotz des deutlichen Widerspruchs zu einer älteren Untersuchung (Edgar *et al.*, 1993) weisen die jüngeren Studien also darauf hin, daß Serotonin im circadianen System intakten Ratten an der Verarbeitung von Lichtinformation beteiligt ist.

### **3.7.6.2 Wirkt Serotonin auf direktem oder indirektem Weg auf den circadianen Schrittmacher?**

Wie in Kapitel 3.7.6.1 dargestellt wurde, führt Serotonin zu lichtähnlichen Phasenverschiebungen des circadianen Systems. Dabei stellt sich die Frage, ob es sich um einen direkten oder einen indirekten Effekt auf den circadianen Schrittmacher handelt. Diese Frage kann mit *in vitro* Versuchen nur ansatzweise geklärt werden, da es bei diesem Versuchsansatz durch die Isolation des SCN zwangsläufig zum Verlust von möglicherweise wichtigen Afferenzen bzw. Efferenzen kommt. Daher werden im Folgenden nur die bisher bekannten *in vivo* Befunde vorgestellt.

Um den Wirkungsort von Serotonin genau eingrenzen zu können, wurden bisher folgende Versuchsansätze verfolgt: Erstens lokale Applikationen von Serotonin-Agonisten bzw. -Antagonisten in bestimmte Kerngebiete, und zweitens die Freisetzung von endogenem Serotonin durch elektrische Reizungen der Raphe-Kerne oder Methamphetamin-Injektionen.

Die lokale Wirkung von Serotonin-Agonisten bzw. -Antagonisten in verschiedenen Kerngebieten wurde vorwiegend an Hamstern untersucht und ist bei Ratten noch weitgehenden unerforscht. So zeigte sich in Untersuchungen an Hamstern, daß lokale Injektionen von 8-OH-DPAT in die Nähe des SCN oder des IGL während des subjektiven Tages (CT 7) keine Auswirkungen auf die circadiane Aktivitätsrhythmik hatten. Im Gegensatz dazu führten lokale 8-OH-DPAT Injektionen in den DRN oder den MRN zum selben Zeitpunkt zu deutlichen Phasenverschiebungen nach vorne (Mintz *et al.*, 1997). Dieser Befund wurde dahingehend interpretiert, daß die phasenverschiebende Wirkung von Serotonin während des subjektiven Tages nicht direkt im SCN erfolgt, sondern indirekt über Serotonin-Rezeptoren in den Raphe-Kernen vermittelt wird. Allerdings ist in einer neueren Arbeit an Hamstern beschrieben worden,

daß nach lokalen Applikationen von 8-OH-DPAT in den SCN oder IGL zum Zeitpunkt CT 6 Phasenverschiebungen der motorischen Aktivität nach vorne beobachtet wurden (Challet *et al.*, 1998). Dieser Punkt bedarf also noch weiterer Klärung. Weiterhin wurde bei Hamstern bislang der Effekt von lokalen 5-CT Injektionen in den SCN während der subjektiven Nacht nur zu einem Zeitpunkt (CT 19) getestet (Weber *et al.*, 1998). Diese Untersuchungen ergaben keine phasenverschiebende Wirkung und bestätigten damit die *in vivo* Befunde bei Hamstern (Cutrera *et al.*, 1994b).

Für Ratten liegt bisher nur eine ältere Untersuchung vor, die zeigt, daß lokale Applikationen von 8-OH-DPAT in die Nähe des SCN zu Phasenbeschleunigungen während des subjektiven Tages führen (Edgar *et al.*, 1993). Bei Ratten konnte weiterhin gezeigt werden, daß durch lokale Verabreichung von 8-OH-DPAT in den MRN oder DRN die Futteraufnahme beeinflusst wird. Dabei kam es bei Applikationen zu Beginn der Dunkelphase zu einer verstärkten Futteraufnahme, während bei einer Applikation zum Ende der Dunkelphase eine Hemmung der Futteraufnahme zu beobachten war (Currie und Coscina, 1993).

Die induzierte Freisetzung endogenen Serotonins durch elektrische Stimulation des DRN führte bei Hamstern zu einer Zunahme der extrazellulären Serotoninkonzentration im Bereich des SCN um 62%, während nach Stimulation des MRN eine Zunahme von Serotonin im SCN von etwa 52% meßbar war (DiNardo *et al.*, 1998). Weiterhin wurde beobachtet, daß die elektrische Reizung sowohl des DRN als auch des MRN zum Zeitpunkt CT 6 zu Phasenbeschleunigungen bzw. bei CT 14 zu Phasenverzögerungen der Laufradaktivität führt (Meyer-Bernstein und Morin, 1999). Im Gegensatz dazu konnte bisher kein Effekt einer pharmakologisch induzierten Freisetzung von endogenem Serotonin nachgewiesen werden. So führten Injektionen des spezifischen 5-HT<sub>1A</sub> Antagonisten WAY 100635 in die Nähe des DRN oder MRN bei Hamstern zwar zu einem deutlichen Anstieg in der extrazellulären Serotoninkonzentration im SCN, doch hatte dieser Anstieg keine Phasenverschiebung des circadianen Aktivitätsrhythmus zur Folge (Antle *et al.*, 1998). Ebenso hatte die durch Methamphetamin-Gabe induzierte Freisetzung von Serotonin im SCN weder bei CT 14 noch bei CT 20 einen Effekt auf die circadiane Aktivitätsrhythmik. Allerdings konnte diese Behandlung lichtinduzierte Phasenverschiebungen reduzieren (Ozaki *et al.*, 1991; Ono *et al.*, 1996).

Aufgrund der Kontroversität dieser Ergebnisse kann derzeit keine eindeutige Aussage darüber gemacht werden, ob Serotonin direkt im SCN oder eher indirekt über Strukturen wie das IGL oder die Raphe-Kerne wirkt. Momentan sprechen die vorliegenden Befunde dafür, daß beide Wirkungsmechanismen parallel genutzt werden.

### 3.7.7 Welchen Einfluß hat Serotonin auf die phasenverschiebende Wirkung anderer Stimuli?

Neben den direkten Effekten von Serotonin auf den circadianen Schrittmacher gibt es weiterhin experimentelle Beweise für eine modulierende Wirkung von Serotonin auf photische Stimuli. So konnten lichtähnliche Phasenverschiebungen in der circadianen Aktivität des isolierten Hamster-SCN, die durch Stimulationen des RHT ausgelöst wurden, durch die Zugabe von Serotonin in das Kulturmedium gehemmt werden (Liou *et al.*, 1986; Rea *et al.*, 1994). Die Hypothese eines hemmenden Einflusses von Serotonin auf die Weiterleitung von Lichtinformation wurden ferner durch Ableitungen der neuronalen Aktivität des SCN *in vivo* bestätigt. Hier bewirkten Quipazin sowie eine Reihe anderer Serotonin-Agonisten eine Reduktion bzw. Hemmung der Entladungsrate von lichtempfindlichen Neuronen im SCN von Ratten (Miller und Fuller, 1990) und Hamstern (Ying und Rusak, 1994). Weitere Studien mit verschiedenen Serotonin-Agonisten und -Antagonisten deuteten darauf hin, daß die hemmende Wirkung von Serotonin im SCN des Hamsters über den 5-HT<sub>7</sub> Rezeptortyp vermittelt wird (Ying und Rusak, 1997).

Neben den experimentellen Hinweisen auf einen über 5-HT<sub>7</sub> Rezeptoren vermittelten Effekt von Serotonin gibt es aber auch eine Reihe von Studien, die dafür sprechen, daß Serotonin die Weiterleitung von photischen Stimuli über präsynaptische 5-HT<sub>1B</sub> Rezeptoren an den Terminalen des RHT hemmt. So führte die systemische Applikation von TFMPP, einem 5-HT<sub>1B</sub> spezifischen Serotonin-Agonisten bei Hamstern (Pickard *et al.*, 1996) und bei Mäusen (Pickard und Rea, 1997) zur Hemmung der durch Lichtpulse induzierten Phasenverschiebungen in der Aktivitätsrhythmik sowie zur Reduktion der c-Fos Expression im SCN. Für eine Beteiligung von präsynaptischen 5-HT<sub>1B</sub> Rezeptoren spricht weiterhin, daß dieser Rezeptortyp tatsächlich in einer hohen Dichte auf den axonalen Endigungen des RHT vorhanden ist, wie Bindungsstudien bei Ratten (Manrique *et al.*, 1993; Manrique *et al.*, 1994) und Mäusen (Boschert *et al.*, 1994) gezeigt haben. Die Anzahl dieser 5-HT<sub>1B</sub> Rezeptoren reduziert sich deutlich nach bilateraler Entfernung der Augen und der damit einhergehenden Degeneration des RHT (Pickard *et al.*, 1996; Manrique *et al.*, 1999). Außerdem wurde gezeigt, daß die Serotonin-Agonisten Quipazin, 8-OH-DPAT und TFMPP nach lokaler Applikation in den SCN bei Hamstern die Freisetzung von Glutamat hemmen und zwar unabhängig davon, ob diese durch einen Lichtpuls stimuliert war (Selim *et al.*, 1993) oder nicht (Srkalovic *et al.*, 1994). Und schließlich führte auch die durch Methamphetamin ausgelöste endogene Freisetzung von Serotonin bei Hamstern zu einer Abnahme in der lichtinduzierten Freisetzung von Glutamat im SCN sowie in der c-Fos Expression (Moriya *et al.*, 1996).

Zusammenfassend läßt sich an dieser Stelle sagen, daß für Hamster und Mäuse eine Vielzahl von Studien belegen, daß Serotonin vor allem während der subjektiven Nacht die Verarbeitung bzw. Weiterleitung von Lichtinformation hemmt. Es ist bislang noch nicht endgültig geklärt, ob dieser Effekt über präsynaptische 5-HT<sub>1B</sub> Rezeptoren oder über postsynaptische 5-HT<sub>1A/7</sub> Rezeptoren erfolgt.

Im Gegensatz dazu hat Serotonin bei Ratten einen völlig anderen Effekt auf das circadiane System. Wie bereits schon in Kapitel 3.7.6.1 dargestellt, induzieren verschiedene Serotonin-Agonisten bei der Ratte Phasenverschiebungen der circadianen Rhythmik und die Expression von c-Fos im SCN, beides Effekte, die der Wirkung eines Lichtpulses verblüffend ähnlich sind. Dieser lichtähnliche Effekt von Serotonin scheint bei Ratten über den 5-HT<sub>2C</sub> Rezeptortyp vermittelt zu sein, da er durch die Applikation von Serotonin-Agonisten wie DOI und mCPP, die jeweils eine hohe Affinität zu den 5-HT<sub>2A</sub> bzw. 5-HT<sub>2C</sub> Rezeptoren aufweisen, induziert werden kann (Kennaway und Moyer, 1998). Im Gegensatz dazu hatten weder der Serotonin-Agonist 8-OH-DPAT (ein 5-HT<sub>1A/7</sub> Rezeptor Agonist) noch die Bindung des Serotonin-Agonisten Phenylbiguanid (ein 5-HT<sub>3</sub> Rezeptor Agonist) einen Effekt auf die circadiane Melatoninrhythmik (Kennaway und Moyer, 1998). In der gleichen Studie wurde weiterhin gezeigt, daß die durch den spezifischen 5-HT<sub>2A/2C</sub> Rezeptor Agonist DOI induzierten Phasenverschiebungen in der Melatoninrhythmik durch die vorherige Gabe des spezifischen 5-HT<sub>2C</sub> Rezeptor Antagonisten Ritanserin gehemmt wurde. Daß es sich dabei um eine gezielte Wirkung über 5-HT<sub>2C</sub> Rezeptoren handelt, läßt sich daraus schließen, daß Ketanserin, ein Antagonist mit deutlich geringerer Affinität zum 5-HT<sub>2C</sub> Rezeptortyp, die DOI Effekte deutlich weniger hemmte (Zifa und Fillion, 1992; Kennaway und Moyer, 1998). Hinweise auf eine Beteiligung des 5-HT<sub>2C</sub> Rezeptortyps ergaben sich ferner durch den Nachweis von 5-HT<sub>2C</sub> Rezeptor mRNA im SCN mit Hilfe der *in situ* Hybridisierung (Hoffman und Mezey, 1989; Roca *et al.*, 1993). In einer neueren Arbeit wurde inzwischen auch durch immunhistochemische Färbungen der Nachweis von 5-HT<sub>1A</sub> und 5-HT<sub>2C</sub> Rezeptoren im SCN erbracht. In der gleichen Arbeit wurde weiterhin berichtet, daß der Nachweis eines 5-HT<sub>7</sub> Rezeptors bisher erfolglos blieb (Moyer und Kennaway, 1999). Ganz eindeutig sind die Beweise für eine Beteiligung des 5-HT<sub>2C</sub> Rezeptortyps an der Vermittlung von photischer Information jedoch nicht, da es bisher nicht gelungen ist, die Wirkung von Licht auf die circadiane Melatoninrhythmik bzw. die c-Fos Expression im SCN durch spezifische 5-HT<sub>2C</sub> Rezeptor Antagonisten wie Metergolin oder Ritanserin zu blockieren (Kennaway und Moyer, 1998).

Zusammenfassend kann man nach dem heutigen Erkenntnisstand als gesichert annehmen, daß Serotonin an den folgenden Prozessen im circadianen System von Ratten und Hamstern beteiligt ist:

- I) Bei Ratten wirkt Serotonin während der subjektiven Nacht wie ein photischer Stimulus.
- II) Bei Hamstern wirkt Serotonin während des subjektiven Tages wie ein nicht-photischer Stimulus und führt in der subjektiven Nacht zu einer Hemmung lichtinduzierter Effekte.

Aufgrund der sehr unterschiedlichen Wirkungsmechanismen von Serotonin im circadianen System von Ratten und Hamstern ist es nicht verwunderlich, sondern vielmehr zu erwarten, daß dabei ganz unterschiedliche Rezeptortypen zum Einsatz kommen.

### 3.8 Fragestellung und Ziele der vorliegenden Arbeit

Wie in Kapitel 3.6.2 dargestellt, wird der SCN der Säugetiere zum Einen von einer direkten serotonergen Projektion innerviert und zum Anderen wird der SCN über das IGL innerviert, welches seinerseits eine serotonerge Innervation erhält (Meyer-Bernstein und Morin, 1996; Moga und Moore, 1997). Trotz dieses gleichen Grundprinzips findet man deutliche Speziesunterschiede in der Wirkung von Serotonin zwischen Ratten und Hamstern (Kohler *et al.*, 1999). Dies liegt vermutlich darin begründet, daß bei der Ratte sowohl eine direkte Verbindung von der Retina zum DRN als auch eine direkte Verbindung vom DRN zum SCN vorhanden ist (Shen und Semba, 1994; Kawano *et al.*, 1996; Moga und Moore, 1997). Bei der Ratte besteht also prinzipiell die Möglichkeit, daß photische Information über das serotonerge System vermittelt wird. Bisherige Untersuchungen an Ratten ergaben zum Teil widersprüchliche Ergebnisse zwischen *in vitro* und *in vivo* Experimenten. So führte der Serotonin-Agonist Quipazin im *in vitro* Versuch zu Phasenbeschleunigungen während des subjektiven Tages und zu Phasenverzögerungen während der subjektiven Nacht (Prosser *et al.*, 1993). Dagegen führten Quipazininjektionen im *in vivo* Modell zu einer lichtpulsähnlichen PRC (Kohler *et al.*, 1999). Das letztgenannte Ergebnis steht zwar im Widerspruch zu einer früheren Arbeit, in der nur Phasenverschiebungen während des subjektiven Tages beobachtet wurden (Edgar *et al.*, 1993), wurden aber durch neuere Untersuchungen bestätigt, bei denen Quipazin ebenfalls eine lichtähnliche Wirkung auf die Melatoninsynthese (Kennaway *et al.*, 1996) sowie die c-Fos Expression (Moyer *et al.*, 1997) hatte.

Das erste Ziel dieser Arbeit war daher zu untersuchen, ob der phasenverschiebende Effekte von Quipazin auf einer direkten Wirkung im SCN beruht oder ob er indirekt über andere Strukturen des serotonergen Systems erfolgt. Dazu wurde Quipazin lokal in die Nähe des SCN injiziert und seine Wirkung auf die Aktivitätsrhythmik am intakten Tier bzw. die c-Fos Expression untersucht. Ein weiteres Ziel der vorliegenden Arbeit war die genauere Charakterisierung der Serotonin-Rezeptoren, die an der Vermittlung der Quipazin-Wirkung beteiligt sein könnten. Aus älteren Untersuchungen gab es bereits Hinweise auf eine Beteiligung von 5-HT<sub>1A</sub> und 5-HT<sub>7</sub> Rezeptoren an der Verarbeitung photischer Stimuli (Tominaga *et al.*, 1992; Lovenberg *et al.*, 1993; Cutrera *et al.*, 1996; Ying und Rusak, 1997). Aufgrund dieser Befunde wurde in der vorliegenden Arbeit die lokale Wirkung des spezifischen 5-HT<sub>7/1A/1B/1D</sub> Rezeptor Agonisten 5-CT in Kombination mit systemischen Injektionen der beiden Serotonin Antagonisten Pindolol (mit hoher Affinität für den 5-HT<sub>1A/1B</sub> Rezeptor) bzw. Ritanserin (mit hoher Affinität für den 5-HT<sub>7</sub> Rezeptor) untersucht.

## 4 Material und Methoden

### 4.1 Genehmigung

Alle in dieser Arbeit durchgeführten Versuche und operativen Eingriffe waren gemäß dem Tierschutzgesetz in der Fassung vom 21.03.1993 (BGBL. I S. 254) vom Regierungspräsidium Stuttgart unter dem Aktenzeichen 35-9185.81/102 genehmigt worden.

### 4.2 Versuchstiere

Für die durchgeführten Versuche wurden ausschließlich männliche Tiere des Ratteninzuchtstammes LEW/Ztm (Lewis) verwendet (Abb. 4.1). Insgesamt wurden für die verschiedenen Teilprojekte 78 Tiere eingesetzt, von denen 64 Tiere aus dem zentralen Tierlabor der Medizinischen Hochschule Hannover zugekauft wurden. Die restlichen 14 Tiere kamen aus der eigenen Nachzucht der Universität Stuttgart, deren Tiere ursprünglich ebenfalls aus dem zentralen Tierlabor der Medizinischen Hochschule Hannover stammten. Zu Beginn der Versuche waren die Tiere 9 bis 11 Wochen alt und wogen zwischen 170 - 250 Gramm.



Abb. 4.1: Bild einer Lewis Ratte

### 4.3 Haltungsbedingungen

#### 4.3.1 Haltungsbedingungen der Tiere vor den Versuchen

Vor dem Beginn der Experimente wurden die Tiere in einem Haltungsraum unter standardisierten Umweltbedingungen ( $21 \pm 1$  °C Raumtemperatur,  $50 \pm 5\%$  relative Luftfeuchtigkeit) und einem Licht-Dunkel-Wechsel von 12:12 Stunden (Licht an um 7 Uhr

MEZ, Lichtintensität auf Käfighöhe ca. 500 Lux) gehalten. Die Haltung der Tiere erfolgte in Gruppen von 2-6 Tieren in Makrolon Typ IV-Käfigen (55 x 35 x 20 cm; Länge x Breite x Höhe). Futter (Altromin 1320; Lage) und Trinkwasser (entsalzt) wurden *ad libitum* gereicht. Die Tiere wurden jede Woche in neue Käfige mit frischem Sägespaneinstreu (Altromin; Lage) umgesetzt.

### **4.3.2 Haltungsbedingungen der Tiere während der Versuche**

Die einzelnen Versuche wurden in einem separaten Tierraum durchgeführt, um Störungen von außen so gering wie möglich zu halten. Die Tiere wurden während der gesamten Versuchsdauer einzeln in Makrolon Typ IV-Käfigen gehalten, welche mit einem Laufrad ausgestattet waren. Die Laufräder mit einem Durchmesser von 35 cm und einer Laufradflächenbreite von 10 cm waren in die jeweiligen Käfigdeckel integriert. Die Tiere hatten während des Versuchs ständig freien Zugang zu Futter und Wasser, welches den Bedingungen im Haltungsraum entsprach. Das Wasser wurde alle ein bis zwei Wochen erneuert und dabei auch das Futter kontrolliert. Alle drei Wochen wurden im Zusammenhang mit der Behandlung der Tiere die Makrolonkäfige und das Einstreu ausgetauscht. Die Kontrollgänge sowie die Käfigwechsel erfolgten unter Licht-Dunkel-Bedingungen während der Lichtphase und unter Dauerdunkel-Bedingungen mit Hilfe einer schwachen Rotlichtlampe ( $\leq 0,5$  Lux; Fa. Kindermann, Berlin).

Die einzelnen Haltungskäfige waren innerhalb des Untersuchungsraumes in lichtdichten, metallenen Haltungschränken (Konstruktion der Mechanikwerkstatt der Universität Konstanz) untergebracht. Diese Metallschränke hatten eine Dimension von 49 x 200 x 73 cm (Breite x Höhe x Tiefe) und waren in vier gleich große Fächer unterteilt, so daß vier Makrolon Typ IV-Käfige eingeschoben werden konnten. Die Haltungschränke standen über flexible Kunststoffschläuche an der Oberseite mit der zentralen Belüftung des Tierraumes in Verbindung. Auf diese Weise konnten alle Tiere unter den gleichen Temperatur- und Luftfeuchtigkeitsbedingungen wie im Haltungsraum gehalten werden. Weiterhin verfügte jedes Fach über einen separaten Computeranschluß zur Registrierung der Laufradaktivität sowie eine Lichtquelle (Osram Delux EL, 7 Watt; München) direkt über dem Käfigdeckel.

In der Regel wurden die Tiere für 10 Tage unter Licht-Dunkel-Bedingungen an das Laufrad gewöhnt, bevor sie einem operativen Eingriff unterzogen wurden. Nach 8 Tagen postoperativer Beobachtung wurden die Tiere in Dauerdunkel-Bedingungen überführt.

## **4.4 Verabreichte Substanzen**

### **4.4.1 Anästhetika**

Zur Betäubung der Tiere wurde auf drei verschiedene Anästhetika zurück gegriffen. Für kurze Betäubungen zur Applikation verschiedener Substanzen wurde eine Inhalationsnarkose angewendet. Diese wurde mit Ethrane (Wirkstoff: Enfluran (2-Chlor-1,1,2-trifluorethyl-



(difluormethyl)ether); ABBOTT GmbH, Wiesbaden) durchgeführt. Für eine tiefere und länger anhaltende Anästhesie wurde eine Kombination aus dem dissoziativen Narkosemittel Kemint (Wirkstoff: Ketaminhydrochlorid, (2(2-Chlorphenyl)2-methylamino-cyclohexanohydrochlorid); ALVERTA GmbH, Neumünster) in Kombination mit dem sedativen Analgetikum Rompun® (Wirkstoff: Xylazinhydrochlorid, (2-(5,6-Dihydro-2H-1,2,4-triazin-4-ylidino)ethyl)hydrochlorid); Bayer AG, Leverkusen) intramuskulär verabreicht.

#### 4.4.2 Versuchssubstanzen

##### 4.4.2.1 Kontrollen

Für die Kontrollinjektionen wurde je nach Löslichkeitsverhalten der zu verabreichenden Substanzen entweder isotonische Kochsalzlösung (0,9%ige NaCl-Lösung; Fresenius, Bad Homburg) oder **Dimethylsulfoxid** (DMSO; Serva, Heidelberg) verwendet.

##### 4.4.2.2 Serotonin Agonisten

Im Verlauf dieser Arbeit wurden zwei verschiedene Serotonin Agonisten verwendet:

1. Quipazin (Sigma, Deisenhofen)
2. 5-Carboxamidotryptamin (5-CT; TOCRIS, Köln)

Bei Quipazin handelt es sich um einen unspezifischen Serotonin Agonisten, welcher etwa mit gleichen Affinitäten an alle bekannten Serotoninrezeptoren bindet. Im Gegensatz dazu handelt es sich bei 5-CT um einen spezifischen Serotonin Agonisten mit sehr hohen Affinitäten gegenüber den Serotoninrezeptoren 5-HT<sub>1A/1B/1D</sub> und 5-HT<sub>7</sub> (Angegebene Affinitäten (pK<sub>i</sub>-Werte) für die verschiedenen 5-HT Rezeptortypen: 5-HT<sub>1A</sub>: 9,5; 5-HT<sub>1B</sub>: 8,3; 5-HT<sub>1D</sub>: 9,2 und 5-HT<sub>7</sub>: 9,5).

##### 4.4.2.3 Serotonin Antagonisten

In einem Teilversuch wurden zwei spezifische Serotonin Antagonisten eingesetzt:

1. Ritanserin (RBI, Deisenhofen)
2. (S)-(-)-Pindolol (TOCRIS, Köln)

Ritanserin besitzt sehr hohe Affinitäten gegenüber den Serotoninrezeptoren 5-HT<sub>2B/2C</sub> und 5-HT<sub>7</sub> (Angegebene pK<sub>i</sub>-Werte: 5-HT<sub>2B</sub>: 8,3; 5-HT<sub>2C</sub>: 8,6 und 5-HT<sub>7</sub>: 7,7). Pindolol bindet dagegen mit sehr hohen Affinitäten an die Serotoninrezeptoren 5-HT<sub>1A/1B</sub> (Angegebene pK<sub>i</sub>-Werte: 5-HT<sub>1A</sub>: 7,5 und 5-HT<sub>1B</sub>: 6,8).

## 4.5 Kanülenimplantation

Alle 78 in dieser Arbeit verwendeten Tiere wurden einem operativen Eingriff unterzogen, bei dem eine chronische Kanüle in den 3. Ventrikel in die Nähe des SCN implantiert wurde. Die Operationen fanden in einem separaten Operationsraum unter antiseptischen Bedingungen statt. Die Tiere waren zum Zeitpunkt der Operation zwischen 10 und 12 Wochen alt und wogen 200 bis 280 Gramm. Etwa 20 Minuten vor dem Operationsbeginn wurden die Tiere aus den Haltungsschränken geholt und das Gewicht der Tiere bestimmt. Entsprechend ihrem Körpergewicht wurde den Tieren unter einer kurzen Inhalationsnarkose 1 ml/kg einer 10%igen Kemintlösung als Anästhetikum und 0,2 ml/kg einer 2%igen Rompunlösung<sup>®</sup> als Analgetikum und Muskelrelaxans intramuskulär injiziert. Das Eintreten der sedativen Wirkung wurde durch den sukzessiven Ausfall des Augenlid-, Zwischenzehen- und Schwanzspitzenreflexes überprüft. Um das Austrocknen der Augen aufgrund des fehlenden Lidschlags während der Narkosedauer zu vermeiden, wurden diese mit der Augensalbe Kana-Vectur<sup>®</sup> (Wirkstoff: Kanamycinmonosulfat; Boeringer Ingelheim, Ingelheim) benetzt.

Nach dem Eintreten der völligen Schmerzfreiheit wurde das Tier an der Kopfhaut rasiert und in einem stereotaktischen Apparat (Abb. 4.2) fixiert. Die Fixierung erfolgte durch zwei seitliche Ohrbalken und einem Zahnbalken (Höheneinstellung: +5 mm), welcher in der Verlängerung der Interaurallinie angebracht ist (Abb. 4.3). Während der nachfolgenden Operation wurde ständig die Atmung und das mögliche Wiedereinsetzen der unterschiedlichen Reflexe beobachtet, um gegebenenfalls die Narkose verlängern zu können.

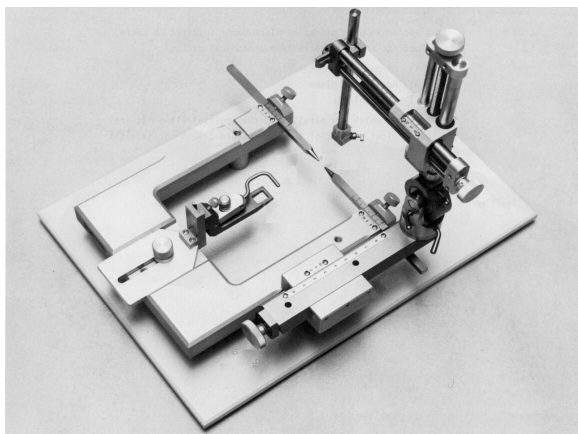


Abb. 4.2: Stereotaktischer Apparat

Aus R. K. Cooley: „Stereotaxic surgery in the rat“ (1990)

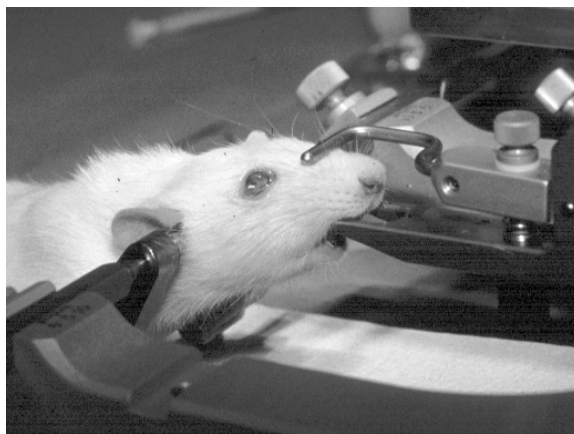


Abb. 4.3: Fixierter Rattenkopf

Fixierung des narkotisierten Tieres über Gehörgänge, Oberkiefer und Nasenbein

Der Bereich der Schnittführung wurde mit 70%igem Ethanol desinfiziert. Auf der Oberseite des Kopfes wurde mittig ein etwa 2 cm langer Schnitt beginnend in Augenhöhe bis etwa auf die Höhe der Ohren geführt. Mit einem kleinen Wundspreizer wurden die Wundränder auseinander gehalten. Nach einer mechanischen (Skalpellklinge) und flüssigen Reinigung (70%igem Ethanol) des Schädelknochens wurden die Knochennähte mit den beiden Kreuzpunkten Bregma

und Lambda sichtbar, in denen sich die horizontalen und vertikalen Knochennähte kreuzen (Abb. 4.4). Anhand des Bregmas erfolgte die genaue Vermessung der Koordinaten für die Einstichstelle der 2,5 cm langen Kanüle (Abb. 4.5). Hierzu wurde die am Stereotakter angebrachte Kanüle auf das Bregma ausgerichtet. Je nach Alter und Gewicht des Tieres (Tabelle 4.1) wurde die Kanüle von diesem Nullpunkt aus um  $1,9 \pm 0,15$  mm rostral verschoben, wodurch sie sich genau über dem SCN befand.

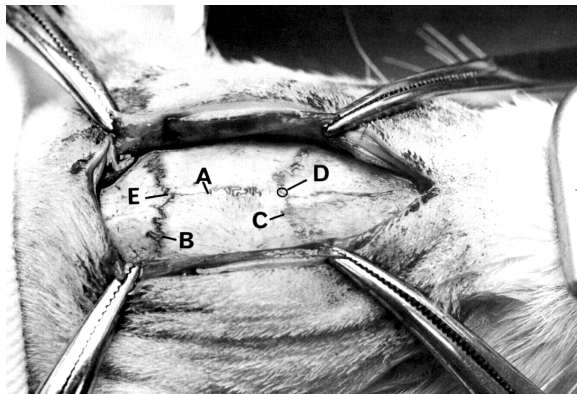


Abb. 4.4: Schädeldecke mit Knochennähten

A) Sagittal-, B) Lambdoidal-, C)  
Coronal- Naht, D) Bregma und E)  
Lambda  
Aus R. K. Cooley „Stereotaxic surgery  
in the rat“

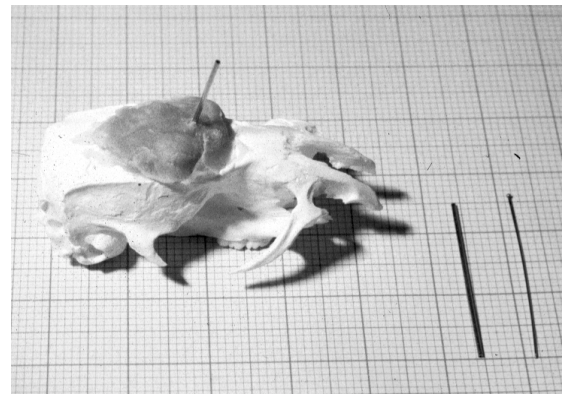


Abb. 4.5: Rattenschädel mit Kanüle

Rechts im Bild: Einzelne Kanüle und  
dazugehöriger Verschlußstößel

Tabelle 4.1: Korrelation zwischen Gewicht und Kanülenkoordinaten.

Gewicht	rostrale Verschiebung	Einführtiefe
210 – 240 g	1,75 mm	7,0 mm
241 – 270 g	1,80 mm	7,5 mm
271 – 300 g	1,90 mm	8,0 mm
ab 301 g	2,00 mm	8,0 mm

Mit Hilfe eines Trephinenbohrers wurde eine im Durchmesser etwa 2,5 mm große Knochenplatte rostral des Bregmas herausgesägt. Die herausgelöste Platte wurde vorsichtig mit einer Pinzette angehoben und mit einem Spatel von der Dura mater abgelöst, um das dicht darunter in rostracaudaler Richtung verlaufende Blutgefäß Sinus sagittalis nicht zu verletzen (Abb. 4.6). Um die genaue Einführtiefe der Kanüle zu bestimmen, wurde diese bündig auf die Dura mater über dem Blutgefäß aufgesetzt. Die Einführtiefe der Kanüle ergab sich dann aus der Höhenkoordinate minus  $8,0 \pm 1,0$  mm, ebenfalls abhängig vom Alter und Gewicht des Tieres (Tabelle 4.1). Zuvor wurden mit Hilfe eines Punktbohrers in gleichmäßigen Abständen rund um die Öffnung drei Löcher gebohrt, die mit rostfreien Schrauben versehen wurden (Abb. 4.6).

Diese Schrauben dienten als Haltepunkte für den später verwendeten Zahnzement, welcher auf der glatten Knochenoberfläche ansonsten keinen Halt gefunden hätte.

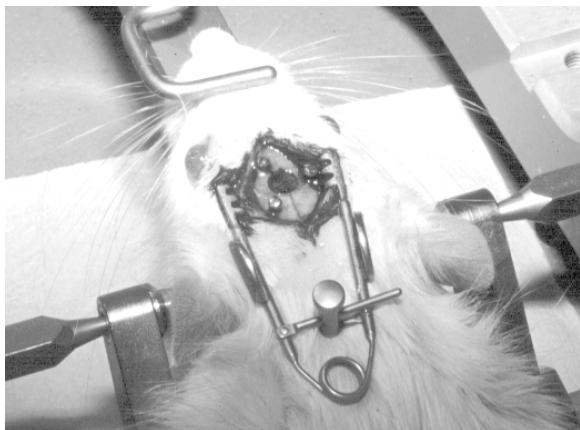


Abb. 4.6: Aufgebohrte Schädeldecke mit Schrauben (Tier befindet sich in Narkose)

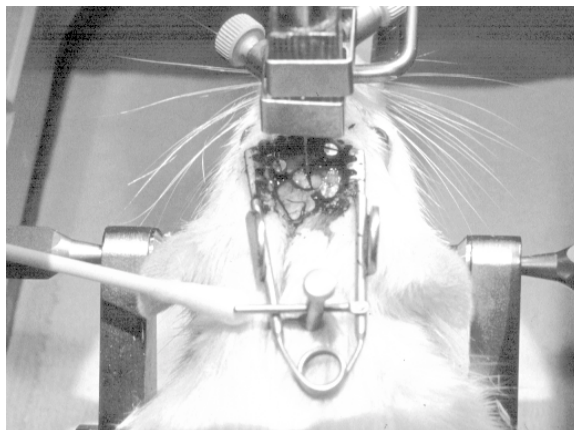


Abb. 4.7: Eingeführte Kanüle (Tier befindet sich in Narkose)

Seitlich des Blutgefäßes wurde die Dura mater mit einem kleinen Schnitt schlitzförmig geöffnet und das Gefäß zur Seite geschoben, so daß die in Position gebrachte Kanüle eingeführt werden konnte (Abb. 4.7). Die herausgesägte Knochenplatte wurde mittig geteilt und links bzw. rechts der Kanüle wieder eingesetzt. Die Kanüle wurde zusammen mit den Schrauben in Zahnzement (Paladur; Fa. Heraeus Kulzer GmbH, Wehrheim/Ts) eingebettet (Abb. 4.8). Nach kurzer Trocknungsphase wurde die Kanüle aus der Halterung gelöst, und die Wundränder entweder vernäht oder mit Wundklammern verschlossen (Abb. 4.9).



Abb. 4.8: Einzementierte Kanüle (Tier befindet sich in Narkose)

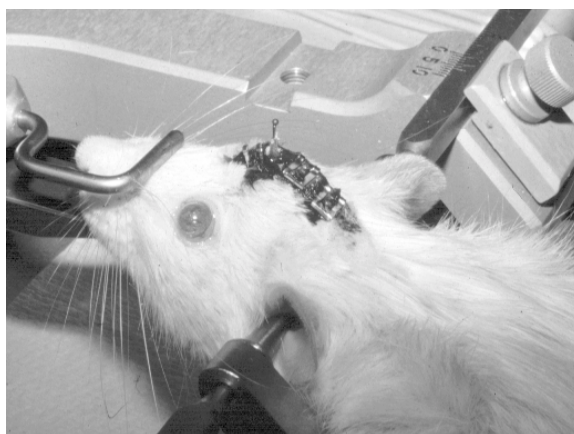


Abb. 4.9: Mit Klammern verschlossene Wunde (Tier befindet sich in Narkose)

Die Tiere wurden nach dem Eingriff zur Wärmeisolation in Zellstofftücher eingepackt und in ihren eigenen Käfig zurückgesetzt. Dort erwachten sie circa ein bis zwei Stunden nach Operationsbeginn aus der Narkose. Die Tiere kamen danach wieder in die Haltungsschränke zurück. Nach circa acht Tagen wurden die Fäden bzw. die Wundklammern entfernt, und die Tiere in Dauerdunkel Bedingungen überführt.

## 4.6 Datenregistrierung

Die Registrierung erfolgte mit Hilfe eines magnetischen Schaltkreises. Dabei führte jede volle Laufradumdrehung zu einer kurzzeitigen Schließung eines Schaltkreises zwischen einem am Laufrad angebrachten Magneten und einem in geeigneter Position am Käfig befestigten Reed-Schalter (Hamlin; Lakeland, FL, USA). Die auf diese Weise erzeugten Impulse wurden zu einem PC weitergeleitet, und als 5-Minutenwerte für jeden Laufradkäfig getrennt auf der Festplatte sowie auf einer Diskette gespeichert. Anhand dieser gesammelten Rohdaten wurde die Auswertung vorgenommen.

## 4.7 Aktogramme

Ein Aktogramm ist die graphische Darstellung der registrierten Laufradaktivität. Die aufgezeichneten 5-Minuten Werte der Laufradaktivität eines Tages werden dabei in Form von Balken nebeneinander dargestellt, wobei die Anzahl der Laufradumdrehungen proportional zur Höhe der Balken ist. Die einzelnen Tage werden senkrecht untereinander abgebildet. Zur besseren Übersicht werden normalerweise zwei dieser Laufradmuster um einen Tage versetzt nebeneinander aufgetragen, weshalb man diese Art der Darstellung auch als „double plot“ (Abb. 4.10) bezeichnet. Das für die Umwandlung der binären Datenreihen in ASCII-Files verwendete Programm TDA (Telemetrie-Daten-Auswertung) wurde von der Elektronikabteilung der Universität Konstanz geschrieben.

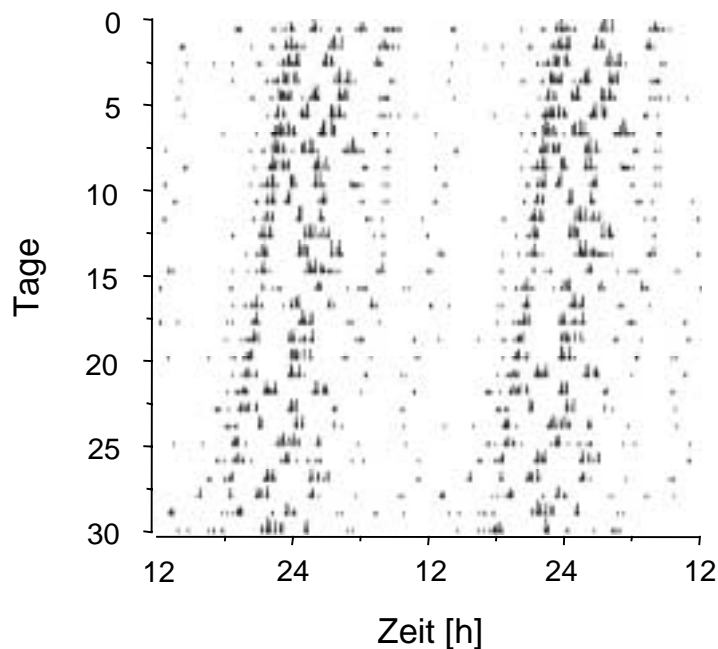


Abb. 4.10: Aktogramm (double plot)

Auf der x-Achse ist die Tageszeit, auf der y-Achse sind die Versuchstage aufgetragen.

## 4.8 Injektionen

Die erste Injektion fand bei allen Versuchsteilen jeweils zwei Wochen nach der Überführung ins Dauerdunkel statt. Die dann folgenden Injektionen erfolgten im Abstand von drei Wochen. Alle Injektionen wurden unter schwachem Rotlicht durchgeführt. Zur Bestimmung des Injektionszeitpunktes am Tag der Behandlung wurde erst für jedes Tier der Beginn der Aktivitätsphase (Circadiane Zeit (CT) 12) mit Hilfe einer gezeichneten Linie durch die letzten  $15 \pm 5$  Aktivitätsbeginne bestimmt (Abb. 4.11). Die Behandlungszeitpunkte wurden dann entsprechend berechnet.

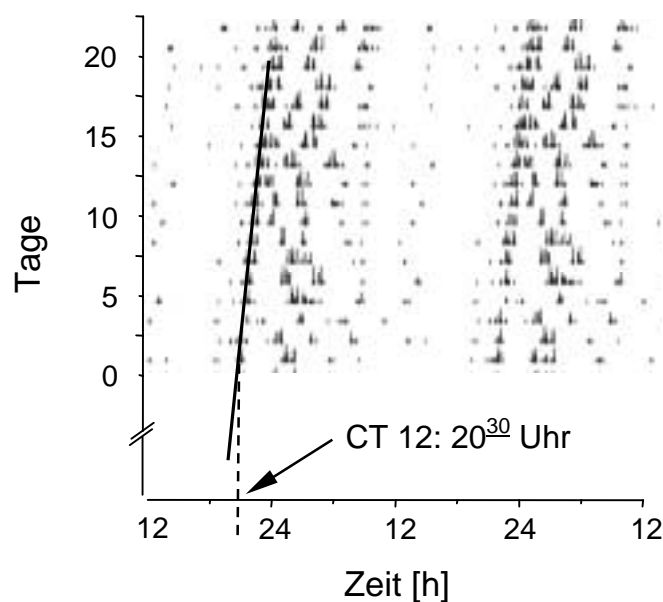


Abb. 4.11: Bestimmung des Aktivitätsbeginns.

Auf der x-Achse ist die Tageszeit, auf der y-Achse sind die Versuchstage aufgetragen. Zur Bestimmung des Aktivitätsbeginns am Behandlungstag wird eine Linie durch die letzten  $15 \pm 5$  Aktivitätsbeginne gelegt. Die Schnittstelle am Tag 0 mit der x-Achse ergibt die Uhrzeit des Aktivitätsbeginns.

Die Tiere erhielten abhängig vom jeweiligen Versuchsansatz entweder nur eine lokale Substanzapplikation oder eine zweifache Injektion bestehend aus einer subcutanen Injektion gefolgt von einer um 15 Minuten zeitlich versetzten lokalen Injektion. Für die subcutanen Injektionen wurden die Tiere mit einer Hand fixiert, mit der anderen wurde die zu verabreichende Substanz mittels einer 1ml Einmal-Spritze (Becton-Dickinson; Madrid, Spanien) mit einer 26 G Kanüle (Servopharma GmbH; Wesel) unter das Nackenfell verabreicht. Für die lokalen Applikationen wurden die Tiere in eine kurze Inhalationsnarkose (Ethrane) versetzt. Während der Betäubung wurde der Verschlußstößel der Kanüle entfernt, und die zu verabreichende Substanz mit Hilfe einer 5 $\mu$ l Hamilton Spritze (Hamilton Bonaduz AG; Bonaduz, Schweiz), die mit einer 2,5 cm langen, rostfreien Nadel (Gauge: 30) versehen war, injiziert (Abb. 4.12). Die Injektionsgeschwindigkeit betrug ca. 1 $\mu$ l/5 sec. Nach der Injektion wurde die Kanüle durch den Stößel wieder verschlossen.





Abb. 4.12: Demonstration einer lokalen Applikation.

## 4.9 Immunhistochemie

### 4.9.1 Gehirnpräparation

Für die histologischen Untersuchungen, sowie zur Überprüfung des Kanülensitzes war es nötig, die Gehirne zu fixieren und zu präparieren. Dafür wurden die Tiere 2,5 Stunden nach den verschiedenen Vorbehandlungen (vergleiche Kapitel 4.10) perfundiert. Dazu wurden sie mit Ethrane betäubt. Nach Eintritt des Atemstillstands wurde der Brustraum geöffnet, und das Herz freigelegt. Mit einer Kanüle wurde in die linke Hauptkammer eingestochen und das gesamte Blutkreislaufsystem über eine Zahnradschleife für circa 10 min mit einer 4 °C kalten PBS-Heparin-Lösung (Phosphatgepufferte-0,9%ige-Kochsalzlösung mit 0.1% Heparin, (Fa.Sigma; Deisenhofen)) durchspült. Das Heparin verhinderte dabei eine mögliche Blutgerinnung. Die Durchströmgeschwindigkeit betrug etwa 20 ml/min. Durch einen kleinen Schnitt in der rechten Vorkammer konnten das Blut und die Perfusionslösung ungehindert auslaufen. Mit PBS-Heparin-Lösung wurde so lange perfundiert, bis die austretende Lösung blutfrei erschien. Anschließend wurde das blutfreie Tier zur Fixierung des Gewebes mit 4 °C kalter 4%iger PBS-Formalin-Lösung (Phosphatgepufferte-0,9%ige-Kochsalzlösung-Paraformaldehyd-Lösung, pH 7,4) durchströmt, bis eine völlige Genicksteife eingetreten war. Durch die Reaktion des Formalins mit dem Gewebe wird in der Regel ein kurzzeitig auftretendes Muskelzittern ausgelöst. Dies kann als Zeichen für eine erfolgreiche Perfusion angesehen werden. Nach der anschließenden Dekapitation wurde das Schädeldach freigelegt und nach dem Herausziehen der Kanüle der Schädelknochen mit einer Knochenzange entfernt. Nach der Durchtrennung aller Gehirnnerven wurde das Gehirn entnommen und für weitere 12 Stunden bei 4 °C in PBS-

Formalin-Lösung nachfixiert. Anschließend wurden die Gehirne für mindestens 30 Stunden zur Cryoprotektion in einer 30%igen Glukoselösung bei 4 °C aufbewahrt.

#### **4.9.2 Herstellung der Gehirnschnitte**

Zur Herstellung der Schnitte wurden die Gehirne aus der Zuckerlösung entnommen und das Kleinhirn abgetrennt. Die Gehirne wurden dann mit der Schnittfläche auf mit Tissue-Freezing-Medium (Jung, Leica, Nussloch) überzogene Probenhalter gesetzt und in einem Mikrotom (Frigocut; Jung, Leica Instruments GmbH, Nussloch) bei einer Temperatur von -24 °C angefroren und für weitere 15 Minuten durchgekühlt. Die Gehirne wurden anschließend in 25 µm dicke Schnitte geschnitten, die mit einer Pinzette vom Messer aufgenommen und in ein mit PBST (PBS + 0,2%iger Triton-X-100-Lösung (Sigma, Deisenhofen)) gefülltes Auffanggefäß überführt wurden. Anhand des optischen Chiasmas fand eine grobe Orientierung über die Lage des SCN statt. Pro Gehirn wurden im Durchschnitt 26 Schnitte aufgenommen.

#### **4.9.3 c-Fos Proteinfärbung**

Alle Färbungen wurden im „free floating“ Verfahren durchgeführt. Gefärbt wurde entweder mit der Avidin-Biotin-Methode oder mit fluoreszierenden Farbstoffen. Nach einem ersten Waschschrift in PBST wurden alle Schnitte mit dem Primärantikörper c-Fos-Ab-5 (Ab-5; Calbiochem, Bad Soden) über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Nach erneutem Waschen in PBST wurde ein Teil der Schnitte einer üblichen ABC-Färbemethode (Vectastain<sup>®</sup> ABC-Kit; Linaris, Bettingen) unterzogen. Als Peroxidasesubstrat wurde **3,3'Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid** (DAB; Sigma, Deisenhofen) verwendet. Nach nochmaligem Waschen in destilliertem Wasser wurden die Schnitte auf mit Gelantine beschichtete Objektträger (Supra-Frost; Roth, Karlsruhe) aufgezogen und nach dem Trocknen mit dem Einbettmedium Histo-Kit (Roth, Karlsruhe) eingedeckelt. Der andere Teil der Schnitte wurde mit dem Sekundärantikörper gekoppelten Fluoreszenzfarbstoff Cy<sup>TM</sup>3 (Dianova, Hamburg) bei Raumtemperatur inkubiert. Nach erneutem Waschen mit PBS wurden die Schnitte auf polarisierte Objektträger (Roth, Karlsruhe) aufgezogen. Als Einbettmedium wurde DAKO<sup>®</sup> Fluoreszenz Einbettmedium (DAKO Diagnostik GmbH, Hamburg) verwendet.



#### 4.10 Versuchsdurchführung

In der Abb. 4.13 ist zur Übersicht exemplarisch ein vollständiges Aktogramm eines Tieres mit den einzelnen Behandlungsschritten dargestellt.

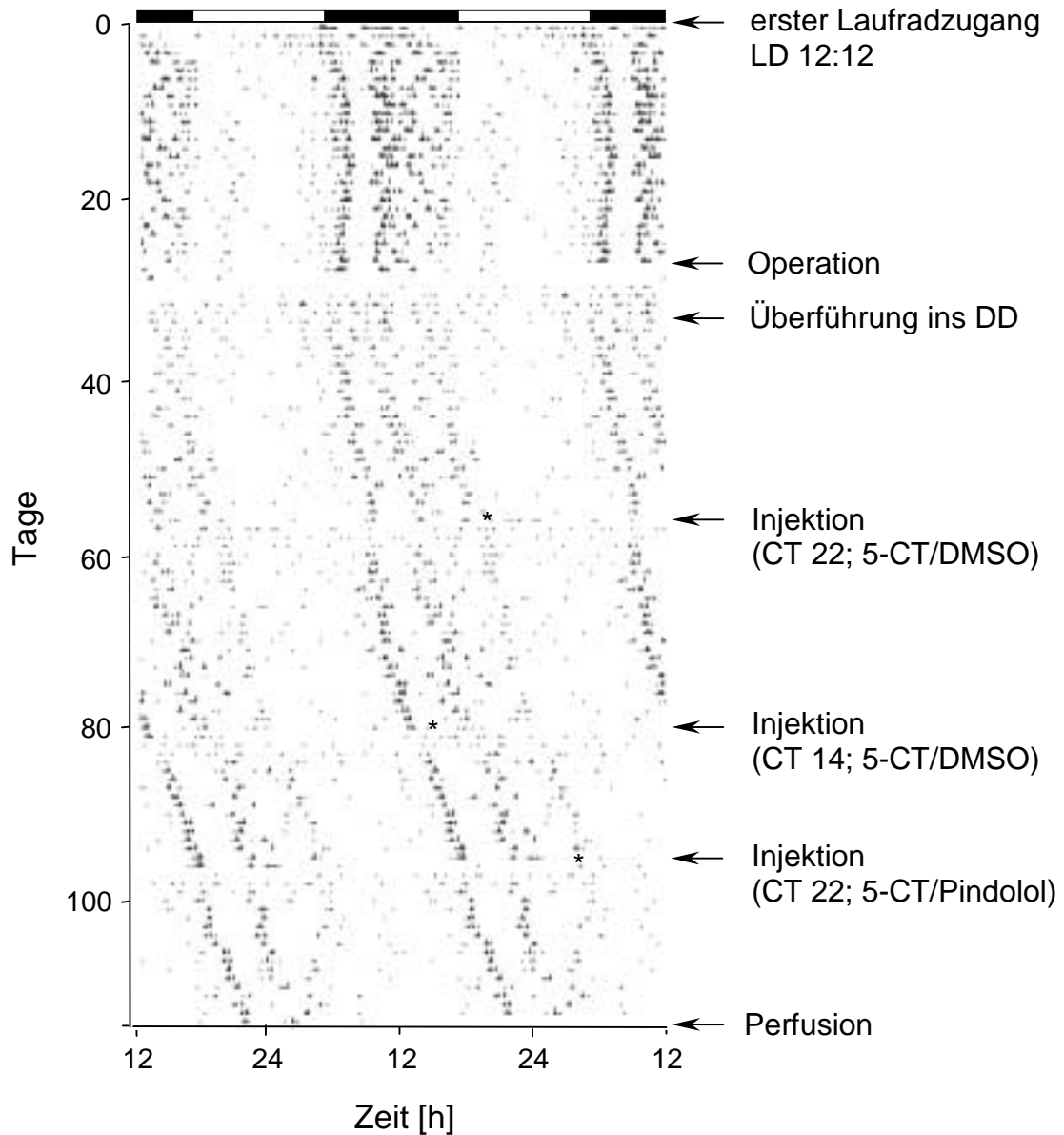


Abb. 4.13: Vollständiges Aktogramm eines Tieres

Auf der x-Achse ist die Zeit, auf der y-Achse sind die Tage aufgetragen. Der Licht-Dunkel-Wechsel zu Beginn der Aufzeichnung ist durch die schwarzen (Dunkelphase) und weißen (Lichtphase) Balken symbolisiert. Die Pfeile auf der rechten Seite markieren einzelne Behandlungen. Die Sternchen repräsentieren die Injektionszeitpunkte. LD: Licht-Dunkel-Wechsel, DD: Dauerdunkel.

#### **4.10.1 Lokale Applikation von Quipazin**

##### **4.10.1.1 Auswirkungen auf den circadianen Aktivitätsrhythmus**

Um die phasenverschiebende Wirkung von lokalen Quipazininjektionen auf den circadianen Aktivitätsrhythmus zu bestimmen wurde eine Phasen-Antwort-Kurve erstellt. Dazu wurden insgesamt 32 Tiere zu 6 unterschiedlichen circadianen Zeitpunkten (CT 2, CT 6, CT 10, CT 14, CT 18 und CT 22) untersucht.

Die eingesetzten Tiere erhielten im Durchschnitt 3-4 Injektionen, die im Abstand von 3 Wochen erfolgten. Die Tiere wurden dabei alternierend entweder mit Quipazin (0,5µg/kg, Arbeitskonzentration 50µg/ml) oder mit 0,9%iger Kochsalzlösung (10µl/kg) zu einem der 6 untersuchten Zeitpunkte behandelt.

##### **4.10.1.2 Effekte auf die c-Fos Expression**

Die Untersuchungen zur lokalen Wirkung von Quipazin auf die c-Fos Expression im SCN wurden auf die circadianen Zeitpunkte CT 14 und CT 22 beschränkt, da zu diesen Zeitpunkten die größten Phasenverschiebungen im Aktivitätsrhythmus beobachtet werden konnten.

Die Tiere wurden 2,5 Stunden nach einer Injektion von Quipazin oder Kochsalzlösung wie unter 4.9.1 beschrieben getötet und perfundiert. Nach der Aufbereitung der Gehirne (s. 4.9.2) wurden die Gehirnschnitte mit Hilfe einer Fluoreszenzfärbung (s. 4.9.3) angefärbt. Die Schnitte wurden anschließend einer quantitativen Auswertung, so wie sie im Kapitel 4.11.2 beschrieben ist, unterzogen.

#### **4.10.2 5-CT- Injektionen in Kombination mit Antagonisten**

##### **4.10.2.1 Auswirkungen auf den circadianen Aktivitätsrhythmus**

In diesem Versuchsteil wurden die Zeitpunkte CT 14 und CT 22 herausgegriffen, da bei diesen Quipazin die stärksten Phasenverschiebungen nach vorne und Phasenverschiebungen nach hinten auslöste.

Alle 46 in diesem Experiment eingesetzten Tiere erhielten maximal drei der in Tabelle 4.2 beschriebenen Behandlungen zur Bestimmung des Einflusses auf die circadiane Aktivität:

Tabelle 4.2: Behandlungen zur Bestimmung des Aktivitätsrhythmus.

Behandlung		Injektionszeitpunkt		Dosierung	
Subcutan	lokal	CT 14	CT 22	subcutan	Lokal
DMSO	+ Kochsalz	x	x	)*	)*
DMSO	+ 5-CT	x	x	)*	0,1 mg/kg <sup>2</sup>
Ritanserlin	+ 5-CT	n.u.	x	5 mg/kg <sup>1</sup>	0,1 mg/kg <sup>2</sup>
Ritanserlin	+ Kochsalz	n.u.	x	5 mg/kg <sup>1</sup>	)*
Pindolol	+ 5-CT	n.u.	x	10 mg/kg <sup>1</sup>	0,1 mg/kg <sup>2</sup>
Pindolol	+ Kochsalz	n.u.	x	10 mg/kg <sup>1</sup>	)*

)\* reine Trägersubstanz; n.u.: nicht untersucht

<sup>1</sup> gelöst in DMSO; verabreichtes Volumen: 1 ml/kg

<sup>2</sup> gelöst in Kochsalzlösung; verabreichtes Volumen: 10 µl/kg

#### 4.10.2.2 Effekte auf die c-Fos Expression

In diesem Versuchsteil wurde nur der Zeitpunkt CT 22 untersucht, da zu diesem die größten Phasenverschiebungen zu beobachten waren. Die Tiere wurden 2,5 Stunden nach einer der Behandlungen aus Tabelle 4.3 wie unter 4.9.1 beschreiben getötet und perfundiert. Nach der Aufbereitung der Gehirne (s. 4.9.2) wurden die Schnitte einer DAB-Färbung (s. 4.9.3) unterzogen. Die Induktion von c-Fos wurde quantitativ mit der unter 4.11.2 beschriebenen Vorgehensweise ausgewertet.

Tabelle 4.3: Behandlungen zur Bestimmung der c-Fos Induktion

Behandlung		Dosierung	
DMSO (s.c.)	+ Kochsalz (i.c.v.)	)*	)*
DMSO (s.c.)	+ 5-CT (i.c.v.)	)*	0,1 mg/kg <sup>2</sup> (i.c.v.)
Ritanserlin (s.c.)	+ 5-CT (i.c.v.)	5 mg/kg <sup>1</sup> (s.c.)	0,1 mg/kg <sup>2</sup> (i.c.v.)
Ritanserlin (s.c.)	+ Kochsalz (i.c.v.)	5 mg/kg <sup>1</sup> (s.c.)	)*
Pindolol (s.c.)	+ 5-CT (i.c.v.)	10 mg/kg <sup>1</sup> (s.c.)	0,1 mg/kg <sup>2</sup> (i.c.v.)
Einstündiger Lichtpuls bei 500 Lux			

)\* reine Trägersubstanz; s.c.: subcutan; i.c.v.: intracerebroventricular

<sup>1</sup> gelöst in DMSO; verabreichtes Volumen: 1 ml/kg

<sup>2</sup> gelöst in Kochsalzlösung; verabreichtes Volumen: 10 µl/kg

## 4.11 Auswertung

### 4.11.1 Aktogramme

Die Bestimmung der durch die Behandlungen ausgelösten Phasenverschiebungen des circadianen Aktivitätsrhythmus erfolgten anhand der Aktogramme. In diese Aktogramme wurde nach Augenmaß jeweils eine Linie durch den Aktivitätsbeginn der letzten 14 Tage vor und der Tage 4-15 nach einer Behandlung gelegt. Der Abstand zwischen diesen beiden Geraden am Tag der Injektion ergab die Größe der Phasenverschiebung (Abb. 4.14). Aufgrund der natürlichen Variation des Laufradpatterns wurden nur Phasenverschiebungen berücksichtigt, die mehr als 15 Minuten betragen.

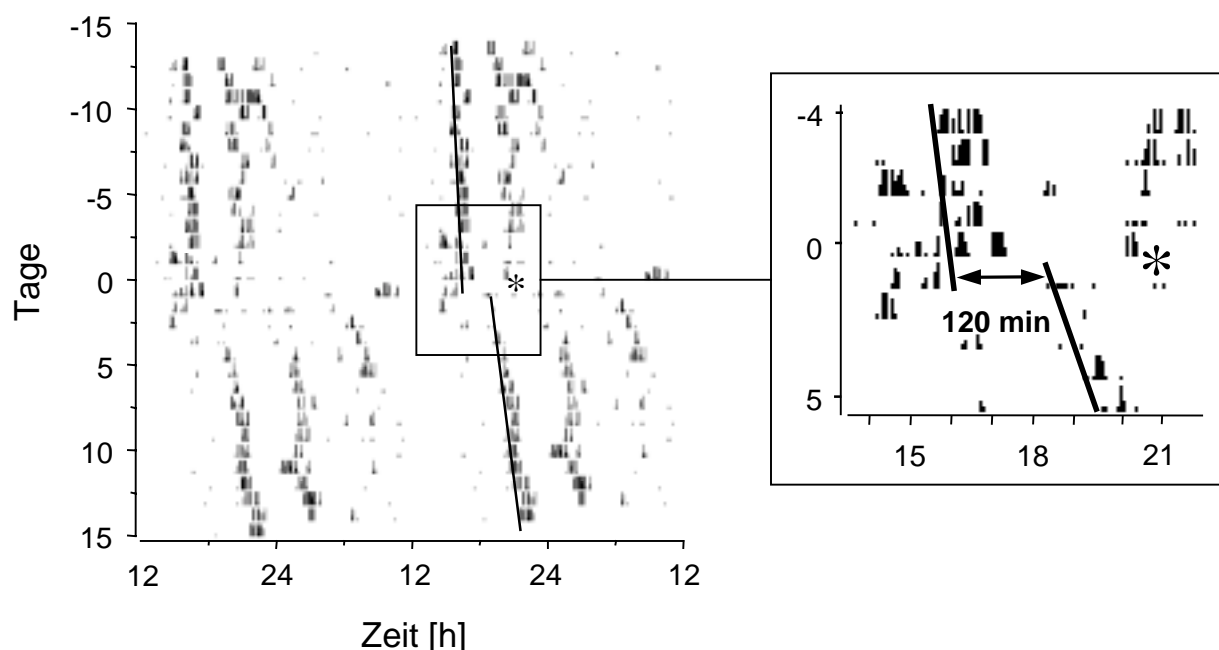


Abb. 4.14: Aktogramm (double plot)

Auf der x-Achse ist die Tageszeit, auf der y-Achse sind die Versuchstage aufgetragen. Die Größe einer Phasenverschiebung am Tag 0 wird durch den Abstand der beiden Geraden durch die Aktivitätsbeginne vor und nach einer Behandlung (durch Stern markiert) bestimmt.

### 4.11.2 Gehirnschnitte

Die Auswertung der immunhistochemisch gefärbten Schnitte erfolgte an einem Durchlichtmikroskop der Marke Olympus (Olympus AX 70; Olympus Optical Co. GmbH, Hamburg). Über eine 3CCD Color Video Camera (Power HAD; Sony Deutschland GmbH, Köln) konnten die Bilder auf einen PC eingeladen werden. Mit Hilfe des Bildanalyseprogrammes AnalySIS<sup>®</sup> 3.0 (Soft Imaging System GmbH, Münster) wurden die Bilder unabhängig vom Mikroskop bearbeitet. Alle Schnitte wurden mit einer 100fachen Vergrößerung aufgenommen und weiter bearbeitet.

#### 4.11.2.1 Auswertung der DAB-Färbungen

Die immunhistochemischen DAB-Färbungen aus dem Versuchsteil 4.10.2.2 wurden quantitativ ausgewertet. Pro Gehirn wurden zwischen 22 und 26 Schnitte untersucht. Davon wurden dann die 20 Schnitte mit der höchsten c-Fos Expression für die statistische Auswertung ausgesucht. Die Behandlung mit einem Lichtpuls sowie die 5-CT Injektionen führten zu sehr ausgeprägten c-Fos Expressionen, die sich hauptsächlich auf den ventrolateralen Bereich des SCN beschränkten. Bedingt durch die Schnittdicke kam es dabei zur Überlagerung einzelner Zellkörper bis hin zu größeren Zellclustern. Eine quantitative Auswertung durch Auszählen der einzelnen gefärbten Zellen erschien deshalb nicht sinnvoll, da oft eine Einzelerkennung nicht möglich war. Es wurde daher eine Methode etabliert, durch die die Gesamtfläche der c-Fos immunreaktiven Zellkörper innerhalb des SCN bestimmt werden konnte. Zur Überprüfung dieser Methode wurde an drei Gehirnen der Zusammenhang zwischen Zellzahl und gefärbter Fläche untersucht. Wie in Abb. 4.15 A – C gezeigt ist, korreliert die Fläche eng mit der Anzahl der Zellkörper. In Abb. 4.15 D sind die drei Trendlinien ohne Einzelwerte dargestellt.

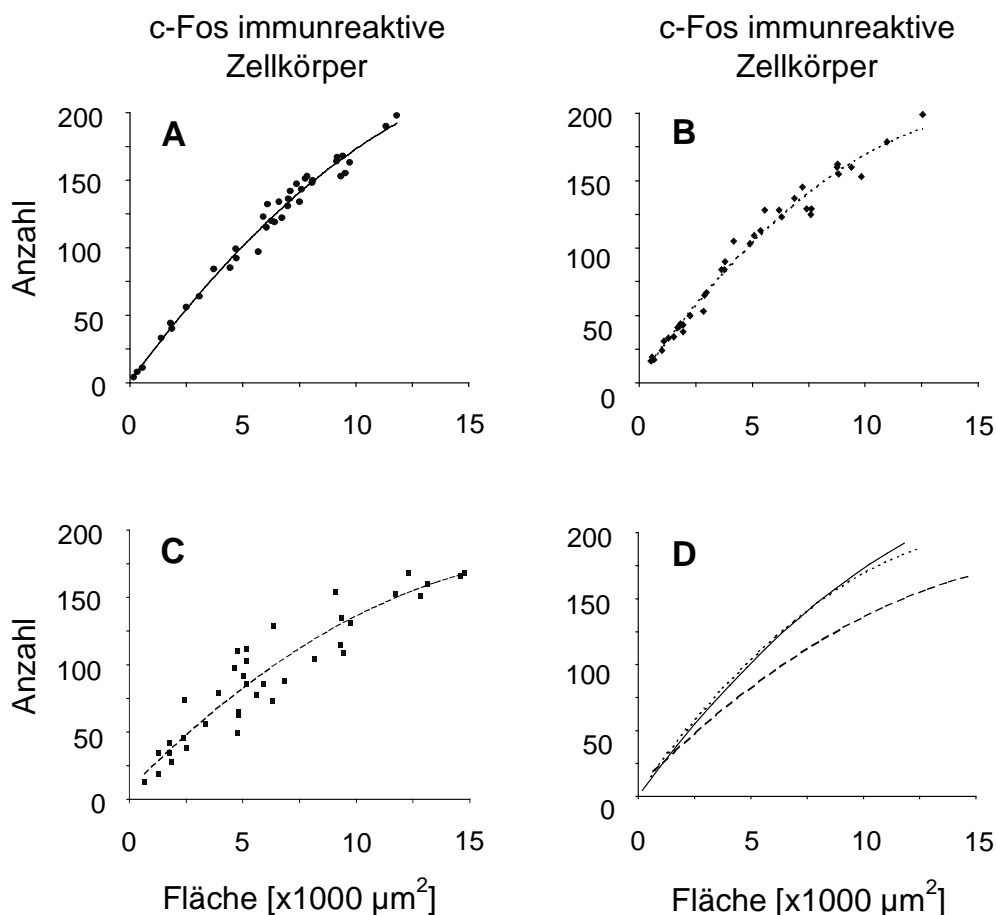


Abb. 4.15: Korrelation zwischen der Anzahl gefärbter Zellkörper und Fläche.

Die Korrelation zwischen der Anzahl c-Fos immunreaktiver Zellkörper und Fläche wurde anhand der c-Fos Expression nach einem Lichtpuls bestimmt. In den Abbildungen A – C sind jeweils die Einzelwerte von 14 Schnitten dreier Gehirne mit Trendlinie dargestellt. In Abbildung D sind die einzelnen Trendlinien der drei Gehirne ohne die Einzelwerte abgebildet.

Für die Bestimmung der Fläche wurde das Originalbild (Abb. 4.16) in einem ersten Schritt in ein Grauwertbild (Abb. 4.17) umgewandelt.

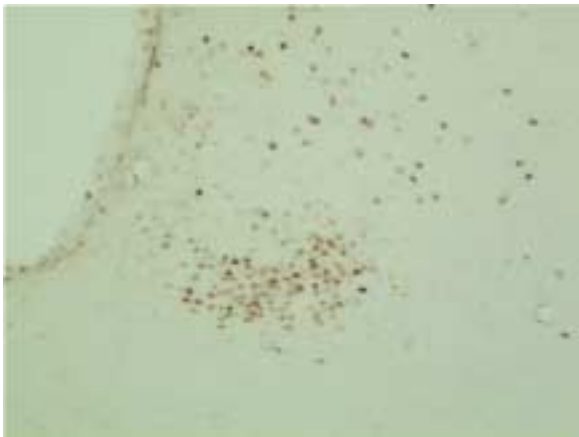


Abb. 4.16: Originalbild

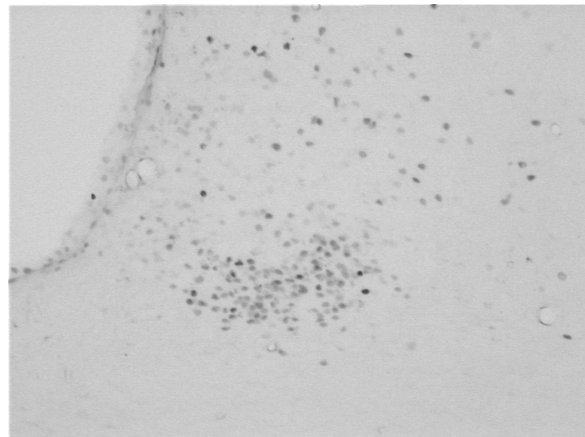


Abb. 4.17: Grauwertbild des Originalbilds

Dieses Grauwertbild wurde einer Shading Korrektur unterzogen und anschließend mit einer Kontrastmaximierung verstärkt (Abb. 4.18). Mit der Shading Korrektur können Störungen im Bildhintergrund korrigiert werden, welche z.B. durch unregelmäßige Hintergrundfärbungen oder ungleichmäßiges Ausleuchten des Bildobjekts bei der Aufnahme entstanden sind. Mit einem definierten Rahmen (260 x 400  $\mu\text{m}$ ), welcher um den SCN gelegt wurde, konnte der auszuwertende Bereich bestimmt werden. Innerhalb dieses Rahmens wurde mit Hilfe einer Schwellwertsetzung der Grauwert bestimmt, bei dem weitgehend alle c-Fos immunreaktiven Zellkörper markiert waren (

Abb. 4.19). Dieser Schwellwert wurde manuell für jeden Schnitt neu bestimmt.

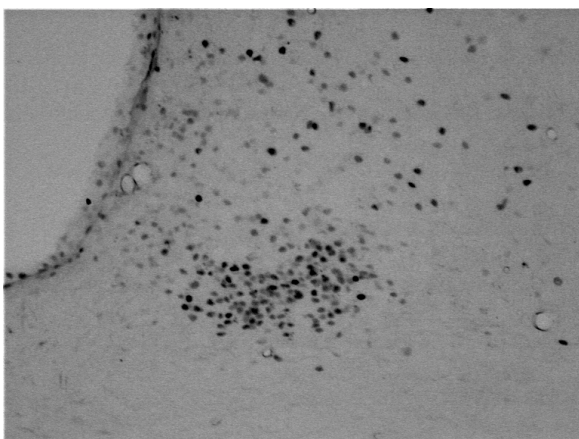


Abb. 4.18: Bild nach Shading Korrektur und Kontrastmaximierung

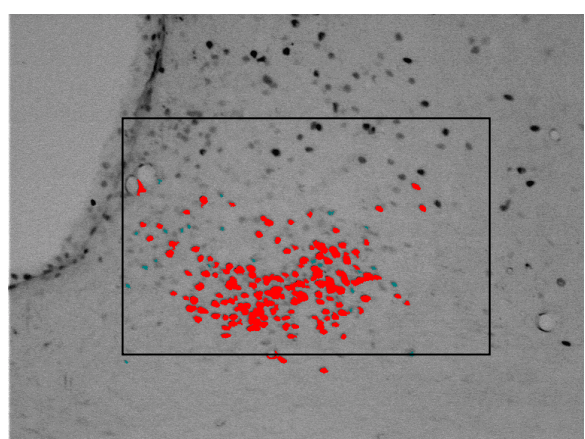


Abb. 4.19: Bild nach Schwellwertsetzung mit definiertem Rahmen

Bereiche, die aufgrund ihres Grauwertes mit einbezogen wurden, jedoch keine gefärbten Zellkörper darstellten, konnten anschließend manuell entfernt werden. Durch eine vorgegebene Mindestgröße wurden Markierungen, die für Zellkerne zu klein waren, automatisch herausgerechnet. Weiterhin konnten nicht mit einbezogene, gefärbte Zellen nachträglich markiert werden. Diese so bearbeiteten Flächen (Abb. 4.20) wurden in einem weiteren Schritt nur als Umrandungen dargestellt (Abb. 4.21), um eine nochmalige Kontrolle zu haben, ob alle gefärbten Zellen markiert wurden. Das Bildanalysesystem berechnete anschließend automatisch die so bestimmte Fläche in  $\mu\text{m}^2$ .

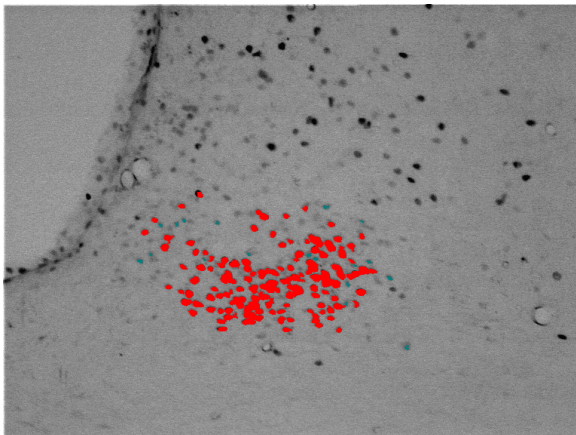


Abb. 4.20: Bild nach manueller Bearbeitung

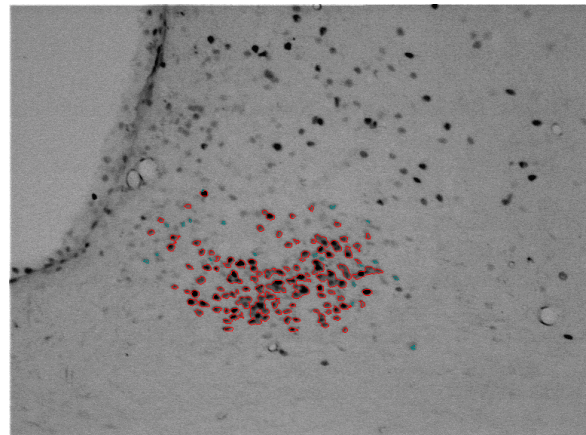


Abb. 4.21: Fertig bearbeitetes Bild

#### 4.11.2.2 Auswertung der Fluoreszenzfärbungen

Die Fluoreszenzfärbungen aus dem Versuchsteil 4.10.1.2 wurden quantitativ ausgewertet. Pro Gehirn wurden 14 Schnitte untersucht. Aufgrund der geringen Anzahl an Gehirnen wurde keine statistische Analyse durchgeführt. Die Auswertung beschränkt sich auf die Angabe des Mittelwertes über alle Schnitte  $\pm$  Standardabweichung.

Wie unter 4.11.2.1 beschrieben wurde auch hier die durch die c-Fos immunreaktiven Zellkörper gefärbte Fläche bestimmt und nicht die Anzahl. Zur Auswertung wurde die oben im Detail vorgestellte Methode (s. 4.11.2.1) mit einer Modifizierung verwendet. Wegen des dunklen Hintergrunds bei der Fluoreszenzfärbung mußte das aus dem Originalbild erstellte Grauwertbild in einem weiteren Zwischenschritt in ein inverses Bild umgewandelt werden.

### **4.11.3 Statistische Analyse**

Für die statistische Analyse der Daten wurde das Statistikprogramm Statistica (Stat Soft Inc.; Tulsa, OK, USA) verwendet. Ergebnisse unterschiedlich behandelte Gruppen wurden über eine Varianzanalyse (ANOVA) miteinander verglichen. Ergab die ANOVA signifikante Effekte oder Interaktionen wurde zum Vergleich der Mittelwerte post hoc ein Duncan's multiple range Test angewendet. Alle Unterschiede, die ein Signifikanzniveau von  $p \leq 0,05$  aufwiesen, wurden als signifikant angesehen.



## 5 Ergebnisse

### 5.1 Versuchsteil I: Lokale Applikation von Quipazin

#### 5.1.1 Überprüfung des Treffbereichs

Die Platzierung der chronischen Kanülen wurde anhand der histologischen Schnitte überprüft. Bei allen untersuchten Tieren endete die Kanüle im Treffbereich. Aufgrund dieses Ergebnisses wurden alle für diesen Versuchsteil verabreichten Injektionen in die Auswertung einbezogen.

#### 5.1.2 Auswirkungen auf den circadianen Aktivitätsrhythmus

Die lokale Wirkung von Quipazin wurde zu 6 unterschiedlichen circadianen Zeitpunkte (CT 2, 6, 10, 14, 18 und 22) untersucht. In der Abb. 5.1 sind repräsentative Aktogramme für jeweils eine Quipazin- und eine Kontrollinjektion für die Zeitpunkte CT 14 und CT 22 dargestellt.

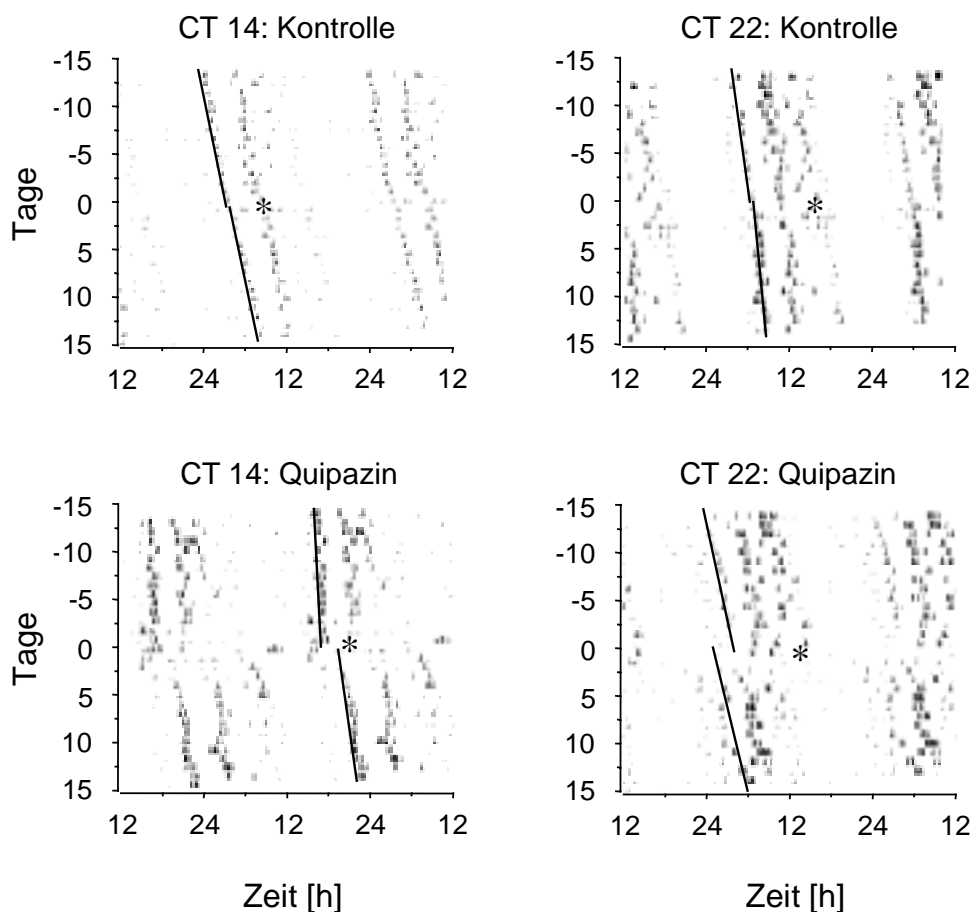


Abb. 5.1: Repräsentative Aktogramme der Laufradaktivität

Gezeigt sind jeweils 15 Tage vor und 15 Tage nach einer Kontrollinjektion (oben) und einer Quipazinbehandlung (unten) zu den Zeitpunkten CT 14 und CT 22. Die Sternchen markieren den Zeitpunkt der Behandlung. Die Größe der Phasenverschiebung wurde anhand des Abstands der eingezeichneten Linien durch den Aktivitätsbeginn ermittelt.

Die lokale Applikation des unspezifischen Serotonin Agonisten Quipazin führte abhängig vom circadianen Zeitpunkt zu Phasenverschiebungen des circadianen Aktivitätsrhythmus (Tabelle 5.2 und Abb. 5.2). Die ANOVA ergab eine signifikante Abhängigkeit des Behandlungseffekts vom circadianen Zeitpunkt (Tabelle 5.1). Der post hoc durchgeführte Duncan's multiple range Test ergab, daß es zwischen den behandelten Tieren und der Kontrollgruppe zum Zeitpunkt CT 14 zu statistisch signifikanten Phasenverschiebungen nach hinten und zum Zeitpunkt CT 22 zu statistisch signifikanten Phasenverschiebungen nach vorne kam. Zu den Zeitpunkten CT 2, CT 6, CT 10 und CT 18 kam es zu keinen statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den behandelten Tieren und der entsprechenden Kontrollgruppe. Weiterhin ergab sich ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den behandelten Tiergruppen zu den Zeitpunkten CT 14 und CT 22.

Tabelle 5.1: Varianzanalyse Phasenverschiebung

Zweifaktorielle Varianzanalyse			
Parameter: Phasenverschiebung			
Faktor/Interaktion	Freiheitsgrade	F-Wert	p
Zeitpunkt	1/60	0,07	n.s.
Behandlung	5/60	11,10	0,00
Zeitpunkt • Behandlung	5/60	3,39	0,01

Faktor Zeitpunkt: CT 2, 6, 10, 14, 18 und 22

Faktor Behandlung: Quipazin; Kochsalz

p = Signifikanzniveau; n.s.: nicht signifikant.

Tabelle 5.2: Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung der Phasenverschiebungen in Minuten für alle untersuchten Zeitpunkte. Positive Werte geben Phasenverschiebungen nach vorne, negative Werte Phasenverschiebungen nach hinten an.

	Phasenverschiebung [min]					
	CT 2	CT 6	CT 10	CT 14	CT 18	CT 22
Quipazin	19 $\pm$ 31 n = 8	-4 $\pm$ 12 n = 8	10 $\pm$ 24 n = 7	-62 $\pm$ 31 <sup>1</sup> n = 8	-34 $\pm$ 33 n = 8	52 $\pm$ 34 <sup>1</sup> n = 9
Kontrolle	9 $\pm$ 17 n = 4	0 $\pm$ 0 n = 4	0 $\pm$ 0 n = 4	-26 $\pm$ 29 <sup>1</sup> n = 4	0 $\pm$ 0 n = 4	13 $\pm$ 25 <sup>1</sup> n = 4

<sup>1</sup> Signifikanter Unterschied zwischen Quipazin- und Kontrollinjektion  
n = Anzahl der Meßwerte

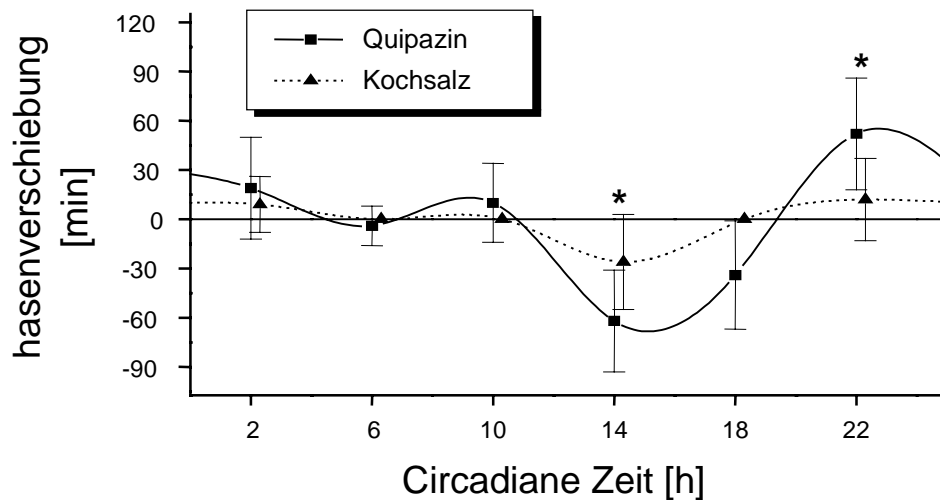


Abb. 5.2: Phasenverschiebungen nach lokaler Quipazininjektion

Angegeben sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung der Phasenverschiebungen nach Quipazin- und Kontrollinjektionen. Die Richtung und Stärke der Phasenverschiebung ist abhängig vom Zeitpunkt und der Art der Injektion. Signifikante Unterschiede zwischen Quipazin- und Kontrollinjektionen sind durch Sternchen gekennzeichnet.

### 5.1.3 Auswirkungen auf die c-Fos Expression

Die quantitative Auswertung der Gehirnschnitte nach einer Behandlungs- bzw. Kontrollinjektion zum Zeitpunkten CT 22 ergab eine deutlich Zunahme der c-Fos immunreaktiver Zellkörper nach Verabreichung von Quipazin. Eine Quipazininjektion führte zum Zeitpunkt CT 22 zu einer etwa 10fach höheren c-Fos Expression gegenüber der Kontrollinjektion mit Kochsalz (Tabelle 5.3). In der Abb. 5.3 sind exemplarische Fluoreszenzfärbungen für eine Kontroll- und Behandlungsinjektion zum Zeitpunkt CT 22 abgebildet.

Für den Zeitpunkt CT 14 stand für jede Behandlungsgruppe nur je ein Gehirn für die Auswertung zur Verfügung. Weiterhin war aufgrund des schlechten Zustands der Gehirne ein Ausmessen der Fläche nicht möglich, weshalb nur eine qualitative Abschätzung vorgenommen wurde. Diese ergab eine Zunahme der c-Fos Expression etwas um den Faktor 5.

Tabelle 5.3: Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung der durch das c-Fos Protein angefärbten Fläche in einem SCN Schnitt.

Behandlung	gefärbte Fläche in $\mu\text{m}^2$ $\pm$ Standardabweichung	Anzahl der Meßwerte	Anzahl der Gehirne
Kochsalz	$372 \pm 61$	14	2
Quipazin	$3654 \pm 368$	14	2

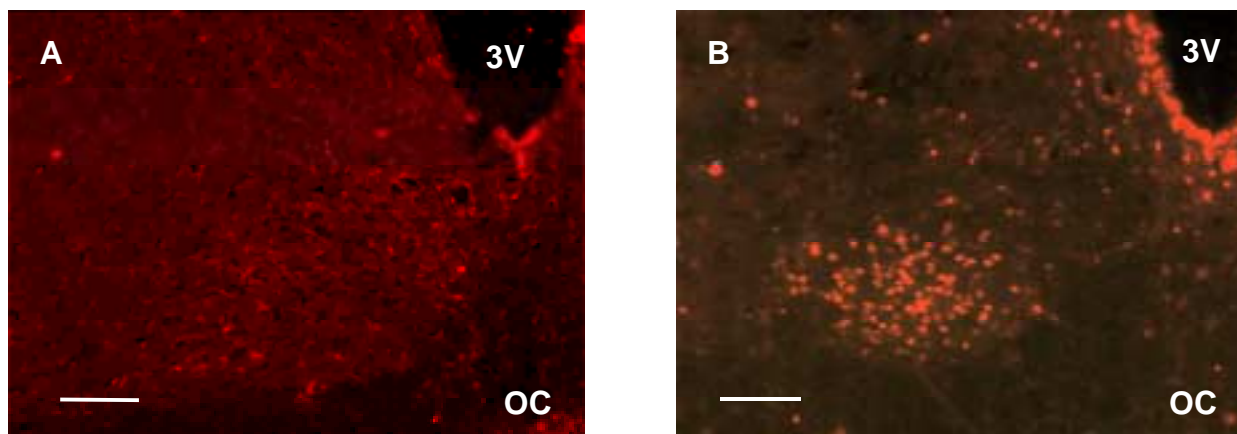


Abb. 5.3: Exemplarische c-Fos Immunfluoreszenzfärbungen nach einer Kontroll- (A) und einer Quipazininjektion (B) zum Zeitpunkt CT 22.

Die c-Fos Färbung erfolgte 2,5 Stunden nach der Behandlung. OC: Optisches Chiasma; 3V: dritter Ventrikel; horizontaler Balken: 100 $\mu\text{m}$ .

## 5.2 Versuchsteil II: 5-CT-Injektionen in Kombination mit Antagonisten

### 5.2.1 Überprüfung des Treffbereichs

Die Plazierung der chronischen Kanülen wurde anhand der histologischen Schnitte überprüft. Bei allen untersuchten Tieren endete die Kanüle im angestrebten Treffbereich in der Nähe des SCN. Aufgrund dieses Ergebnisses wurden alle in diesem Versuchsteil verabreichten Injektionen in die Auswertung einbezogen.

### 5.2.2 Auswirkungen auf den circadianen Aktivitätsrhythmus

In diesem Versuchsteil wurden die in der Tabelle 5.4 aufgeführten Behandlungen durchgeführt. In der Abb. 5.4 sind repräsentative Aktogramme für jede Behandlung zum Zeitpunkt CT 22 abgebildet.

Tabelle 5.4: Behandlungen zur Bestimmung der Auswirkung auf den Aktivitätsrhythmus.

Behandlung		Injektionszeitpunkt	
subcutan	lokal	CT 14	CT 22
DMSO	+ Kochsalz	x	x
DMSO	+ 5-CT	x	x
Ritanserin	+ 5-CT	n.u.	x
Ritanserin	+ Kochsalz	n.u.	x
Pindolol	+ 5-CT	n.u.	x
Pindolol	+ Kochsalz	n.u.	x

n.u.: nicht untersucht

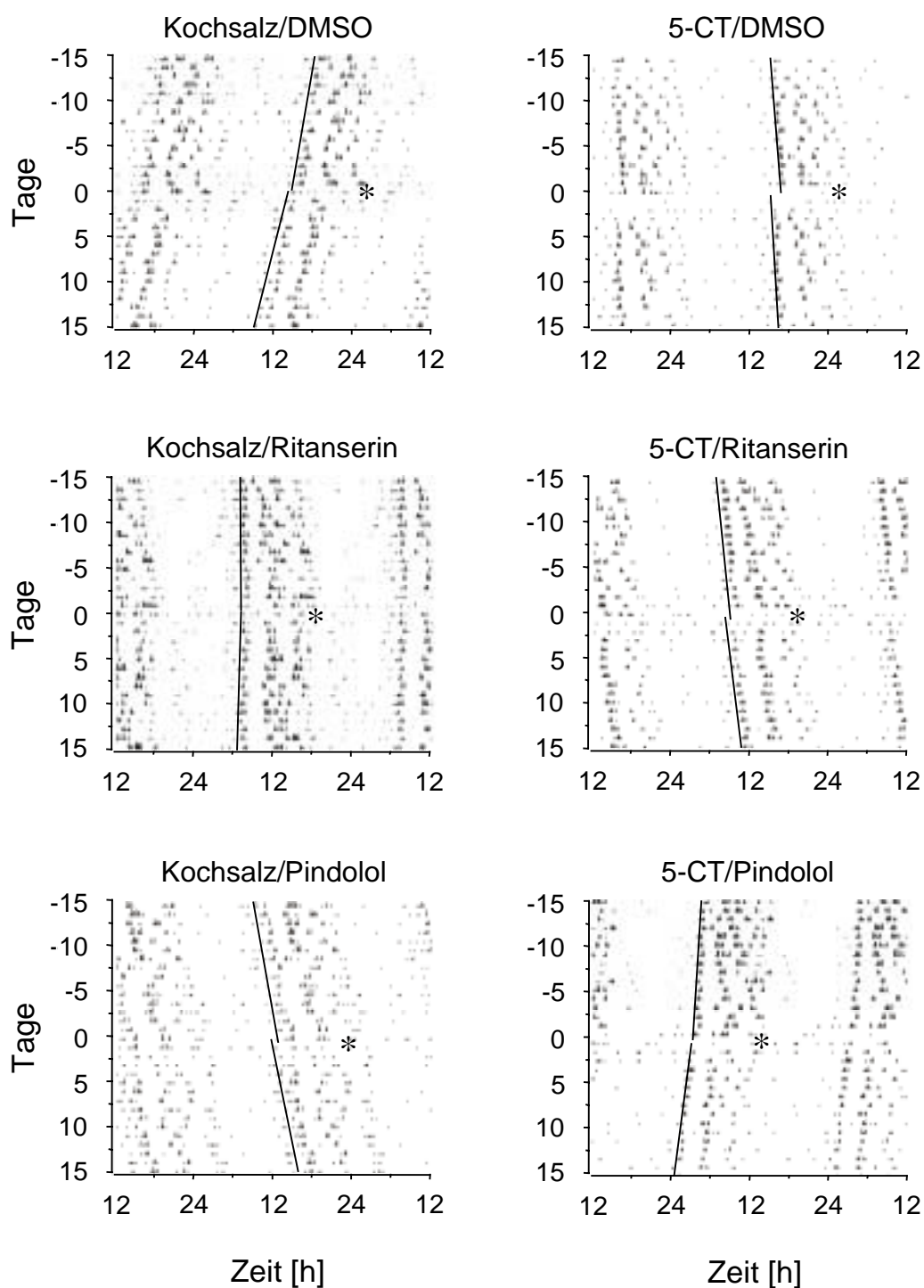


Abb. 5.4: Repräsentative Aktogramme der Laufradaktivität zum Zeitpunkt CT 22.

Gezeigt sind jeweils 15 Tage vor und 15 Tage nach einer Behandlung. Die Sternchen markieren den Zeitpunkt der Behandlung. Die Größe der Phasenverschiebung wurde anhand des Abstands der eingezeichneten Linien durch den Aktivitätsbeginn ermittelt.

In Abb. 5.5 sind die Ergebnisse der Injektionen zum Zeitpunkt CT 14 im Vergleich zu den gleichen Behandlungen zum Zeitpunkt CT 22 dargestellt. Die lokale Applikation von 5-CT führte zum Zeitpunkt CT 14 zu Phasenverschiebungen nach hinten und bei CT 22 zu Phasenverschiebungen nach vorne. Bei den Kontrollinjektionen mit Kochsalz kam es bei beiden Zeitpunkten zu keiner deutlichen Phasenverschiebung. Die ANOVA ergab eine signifikante Abhängigkeit des Behandlungseffekts und vom circadianen Zeitpunkt ( $F_{\text{Behandlung/circadiane Zeit}}(1, 21) = 31,00; p \leq 0,01$ ). Der anschließend durchgeführte Duncan's multiple range Test ergab sowohl signifikante Unterschiede zwischen der Behandlungs- und der Kontrollgruppe des gleichen Zeitpunkts sowie signifikante Unterschiede bei den behandelten Tieren zwischen den untersuchten Zeitpunkten. Die Kontrollgruppen unterschieden sich dagegen nicht signifikant zwischen den beiden untersuchten Zeitpunkten. In Tabelle 5.5 sind die jeweiligen Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung und die Ergebnisse der ANOVA zusammengefasst.

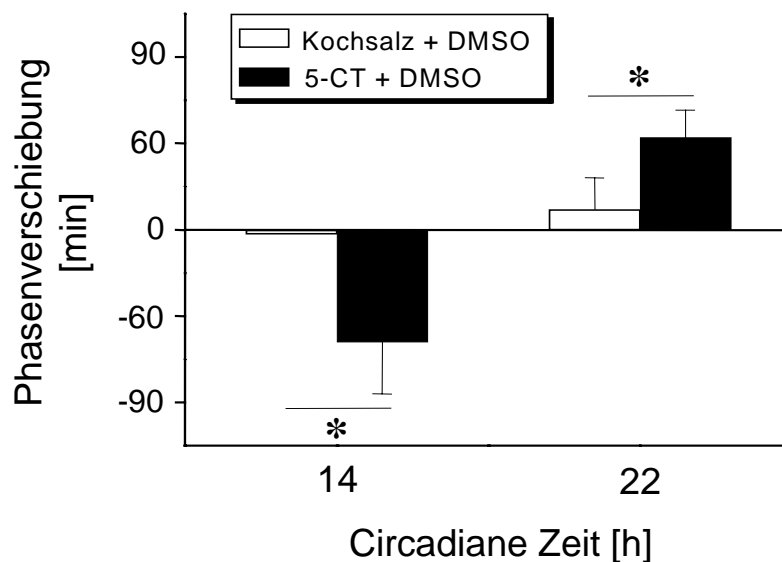


Abb. 5.5: Phasenverschiebungen nach lokalen 5-CT Injektionen

Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung der Phasenverschiebungen nach Doppelinjektionen von DMSO + 5-CT bzw. DMSO + Kochsalz zum Zeitpunkt CT 14 bzw. CT 22. Richtung und Stärke der Phasenverschiebung sind abhängig vom Zeitpunkt und der Art der Injektion. Signifikante Unterschiede innerhalb eines Zeitpunkts sind mit Sternchen gekennzeichnet.

Tabelle 5.5.: Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung und die Ergebnisse der ANOVA.

Behandlung	Injektionszeitpunkt	
	CT 14	CT 22
Kochsalz + DMSO	$-3 \pm 0$ min n = 3	$14 \pm 22$ min n = 6
5-CT + DMSO	$-78 \pm 36$ min n = 7	$64 \pm 19$ min n = 14

$F_{\text{Zeitpunkt}} (1, 21) = 47,73; p = 0,00;$

$F_{\text{Behandlung}} (1, 21) = 2,68; \text{ nicht signifikant}$

$F_{\text{Zeitpunkt/Behandlung}} (1; 21) = 31,26; p = 0,00$

In der Tabelle 5.6 sind die Phasenverschiebungen zusammengefaßt, die durch die verschiedenen Doppelinjektionen zum Zeitpunkt CT 22 hervorgerufen wurden. Die ANOVA ergab einen signifikanten Behandlungseffekt ( $F_{5, 52} = 13,99; p \leq 0,01$ ). Der post hoc durchgeführte Duncan's multiple range Test ergab folgende signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Mittelwerten: Die Behandlung mit DMSO in Kombination mit 5-CT führte zu signifikanten Phasenverschiebungen nach vorne gegenüber allen anderen Injektionskombinationen. Zwischen den Kontrolltieren (DMSO/Kochsalz) und den entweder mit Ritanserin/Kochsalz oder Pindolol/Kochsalz behandelten Tieren ergaben sich keine signifikanten Unterschiede. Die Kombinationsinjektionen Ritanserin/5-CT und Pindolol/5-CT führten beide zu einer starken Hemmung der normalerweise durch DMSO/5-CT ausgelösten Phasenverschiebungen nach vorne, so daß sich signifikante Unterschiede gegenüber dieser Behandlung ergaben. Die Injektionen mit Ritanserin/5-CT ergaben gegenüber den Behandlungen Ritanserin/Kochsalz und Pindolol/Kochsalz keine signifikanten Unterschiede.

Tabelle 5.6: Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung der durch die verschiedenen Kombinationsinjektionen ausgelösten Phasenverschiebungen.

Phasenverschiebung [min]					
Behandlung					
DMSO/ Kochsalz	DMSO/ 5-CT	Ritanserin/ Kochsalz	Ritanserin/ 5-CT	Pindolol/ Kochsalz	Pindolol/ 5-CT
$14 \pm 23^2$ N = 6	$57 \pm 14^1$ n = 14	$6 \pm 20^2$ n = 12	$17 \pm 22^2$ n = 16	$3 \pm 8^2$ n = 5	$10 \pm 15^2$ n = 5

<sup>1</sup> signifikant unterschiedlich gegenüber <sup>2</sup>  
n = Anzahl der Meßwerte



### 5.2.3 Auswirkungen auf die c-Fos Expression

Die quantitative Auswertung der durch die jeweiligen Behandlungen induzierten c-Fos Expression wurde anhand von immunhistochemischen DAB-Färbungen durchgeführt. In der Abb. 5.6 ist für jede in diesem Versuchsteil durchgeführte Behandlung exemplarisch eine immunhistochemische Färbung abgebildet. In der Tabelle 5.7 und Abb. 5.7 sind die Ergebnisse der quantitativen Analyse der c-Fos Expression zusammengefaßt. Die einfaktorielle Varianzanalyse ergab einen signifikanten Effekt für den Faktor Behandlung ( $F_{5, 27} = 29,00$ ;  $p \leq 0,01$ ). Zum Nachweis signifikanter Unterschiede zwischen den einzelnen Mittelwerten erfolgte post hoc ein Duncan's multiple range Test. Die mit DMSO und Kochsalz behandelten Kontrolltiere zeigten dabei eine signifikant kleinere Fläche c-Fos immunreaktiver Zellkörper gegenüber allen anderen Behandlungen. Die höchste c-Fos Expression wurde nach einem Lichtpuls (1h bei 500 Lux) beobachtet. Die gemessene Fläche unterschied sich signifikant zu allen anderen Behandlungen. Die lokale Applikation von 5-CT führte zwar zu einer deutlichen Steigerung der c-Fos Expression, war jedoch signifikant kleiner als die nach einem Lichtpuls. Weiterhin ergaben sich signifikante Unterschiede gegenüber den Behandlungen Kochsalz/Ritanserin, Pindolol/5-CT und DMSO/Kochsalz. Doppelinjektionen mit den Antagonisten Ritanserin oder Pindolol zusammen mit 5-CT unterschieden sich nicht signifikant voneinander, zeigten aber eine signifikant größere Fläche der c-Fos immunreaktiven Zellkörper gegenüber der Kontrollgruppe. Im Gegensatz zu Ritanserin/5-CT zeigt Pindolol/5-CT weiterhin einen statistisch signifikanten Unterschied gegenüber der c-Fos Expression nach einer Behandlung mit DMSO/5-CT. Die Injektion von Ritanserin/Kochsalz führte zwar zu einer signifikant höheren c-Fos Expression gegenüber der Kontrollgruppe, war aber gleichzeitig signifikant geringer gegenüber den durch DMSO/5-CT, Ritanserin/5-CT und Lichtpuls ausgelösten c-Fos Expressionen. Der Vergleich mit der durch Pindolol/5-CT ausgelösten c-Fos Expression ergab keinen signifikanten Unterschied.

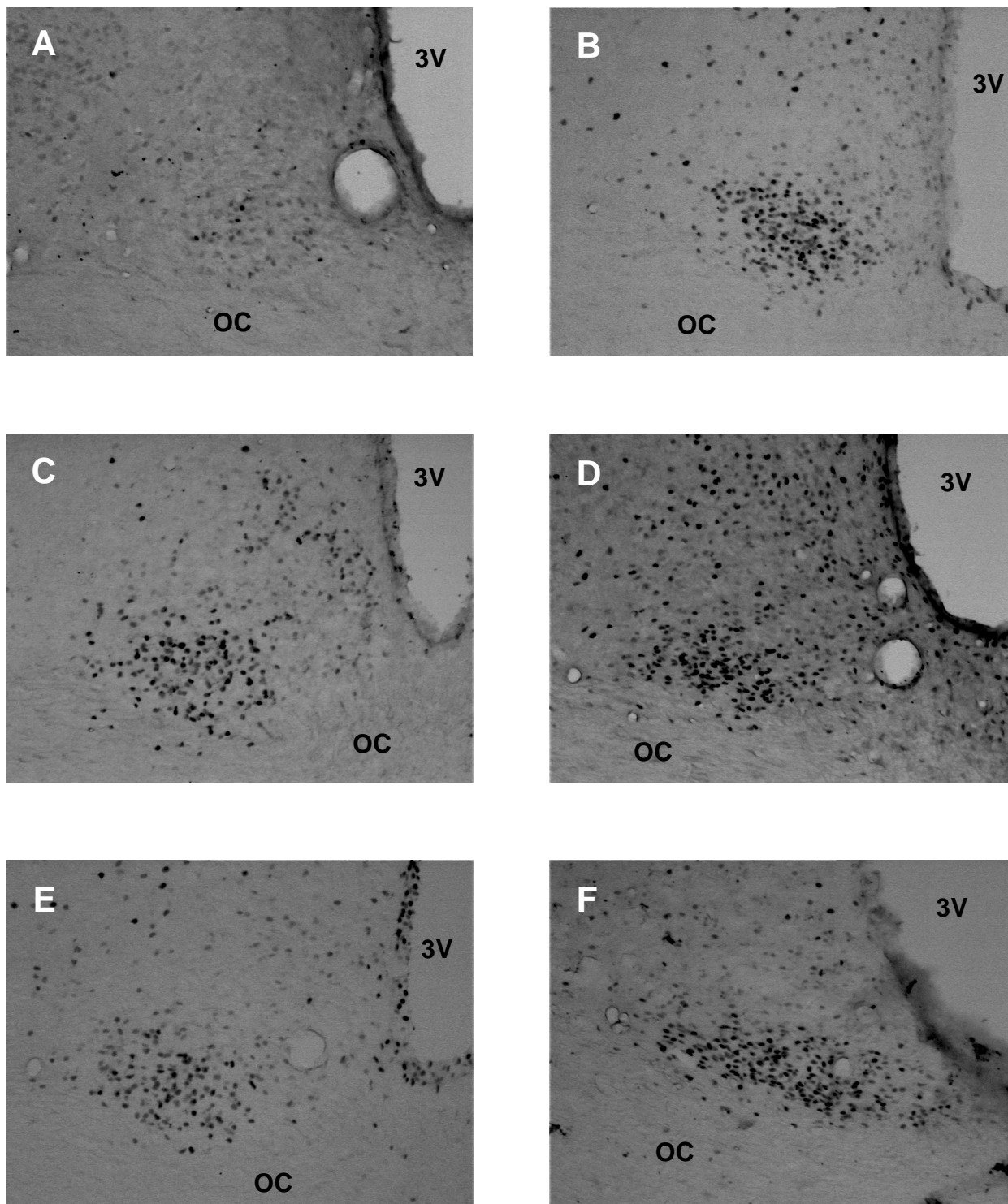


Abb. 5.6: Repräsentative Beispiele für c-Fos immunhistochemische Färbungen des SCN nach verschiedenen Behandlungen

Die Tiere in den Abbildungen A bis E erhielten folgende Injektionen: A: DMSO/Kochsalzlösung; B: DMSO/5-CT; C: Ritanserin/Kochsalz; D: Ritanserin/5-CT und E: Pindolol/5-CT. Das Tier in Abbildung F erhielt einen 60 minütigen Lichtpuls. Alle Tiere wurden 2,5 Stunden nach der Behandlung getötet.

3V: dritter Ventrikel; OC: Optisches Chiasma

Tabelle 5.7: Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung der durch das c-Fos Protein angefärbten Fläche im SCN nach unterschiedlichen Behandlungen.

Behandlung	gefärbte Fläche in $\mu\text{m}^2$ $\pm$ Standardabweichung	Anzahl der Gehirne	Signifikanzen*
DMSO/Kochsalz	23058 $\pm$ 6331	5	a
DMSO/5-CT	159487 $\pm$ 28951	7	b
Ritanserin/Kochsalz	92589 $\pm$ 22346	7	c
Ritanserin/5-CT	136335 $\pm$ 48365	7	b, d
Pindolol/5-CT	109783 $\pm$ 17474	3	c, d
Lichtpuls	242862 $\pm$ 11602	4	e

\* Gruppen mit gleichem Buchstaben sind nicht signifikant unterschiedlich

Pro Gehirn wurde die Gesamtfläche der gefärbten Zellekörper im SCN über 20 Schnitte á 25  $\mu\text{m}$  bestimmt.

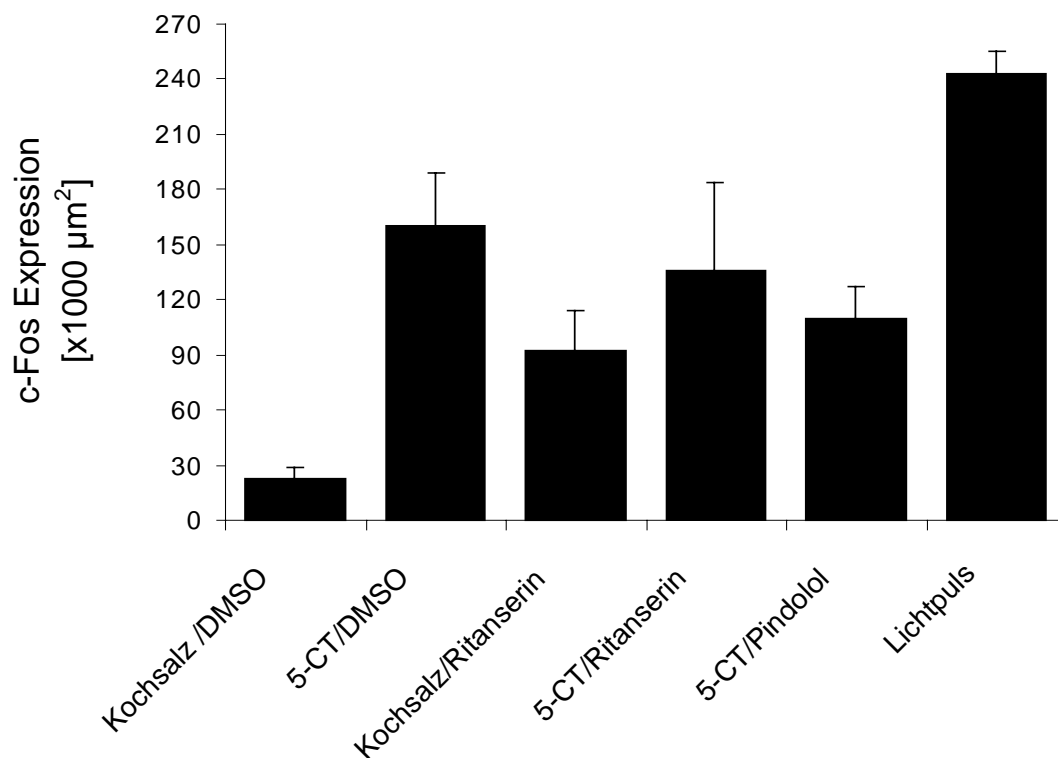


Abb. 5.7: Fläche der c-Fos immunreaktiven Zellkörper

Auf der x-Achse sind die unterschiedlichen Behandlungen, auf der y-Achse ist die Fläche der c-Fos Expression aufgetragen

In der Abb. 5.8 ist beispielhaft die räumliche Verteilung der c-Fos Expression innerhalb des SCN in rostral-caudaler Richtung für drei unterschiedliche Behandlungen graphisch dargestellt. Untersucht wurden drei Bereiche mit je 7 aufeinander folgenden Schnitten. In der Tabelle 5.8 sind für die unterschiedlichen Behandlungen die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung für jeden der drei Bereiche zusammengestellt. Die ANOVA ergab eine signifikante Abhängigkeit des Behandlungseffekts und des SCN-Bereichs ( $F_{\text{Behandlung/SCN-Bereich}}(4, 26) = 5,02; p \leq 0,01$ ). Zur Bestimmung signifikanter Unterschiede wurde post hoc der Duncan's multiple range Test angewendet. Dieser ergab innerhalb der Behandlungsgruppen Lichtpuls und 5-CT/DMSO je einen signifikanten Unterschied in der c-Fos Expression zwischen dem rostralen und medianen SCN-Bereich sowie zwischen dem medianen und caudalen SCN-Bereich. Zwischen den c-Fos Expressionen im rostralen und caudalen SCN-Bereich ergaben sich keine signifikanten Unterschiede. Innerhalb der Behandlung mit DMSO/Kochsalz ergaben sich keine signifikanten Unterschiede. Im rostralen SCN-Bereich ergab sich in der c-Fos Expression ein signifikanter Unterschied zwischen den Behandlungen mit einem Lichtpuls oder mit 5-CT/Kochsalz gegenüber der Kontrolle, aber nicht zwischen einem Lichtpuls und einer 5-CT/DMSO Behandlung. Innerhalb des medianen und caudalen Bereichs des SCN ergaben sich sowohl signifikante Unterschiede in der c-Fos Expression zwischen den Behandlungen mit einem Lichtpuls oder mit 5-CT/DMSO und der Kontrollgruppe als auch zwischen den behandelten Gruppen. Im medianen Bereich des SCN führte die Behandlung mit einem Lichtpuls gegenüber der Behandlung mit 5-CT/DMSO zu einer ca. 81% höheren c-Fos Expression. Im caudalen SCN-Bereich war die c-Fos Expression nach einem Lichtpuls ca. 49% höher als nach einer Behandlung mit 5-CT/DMSO.

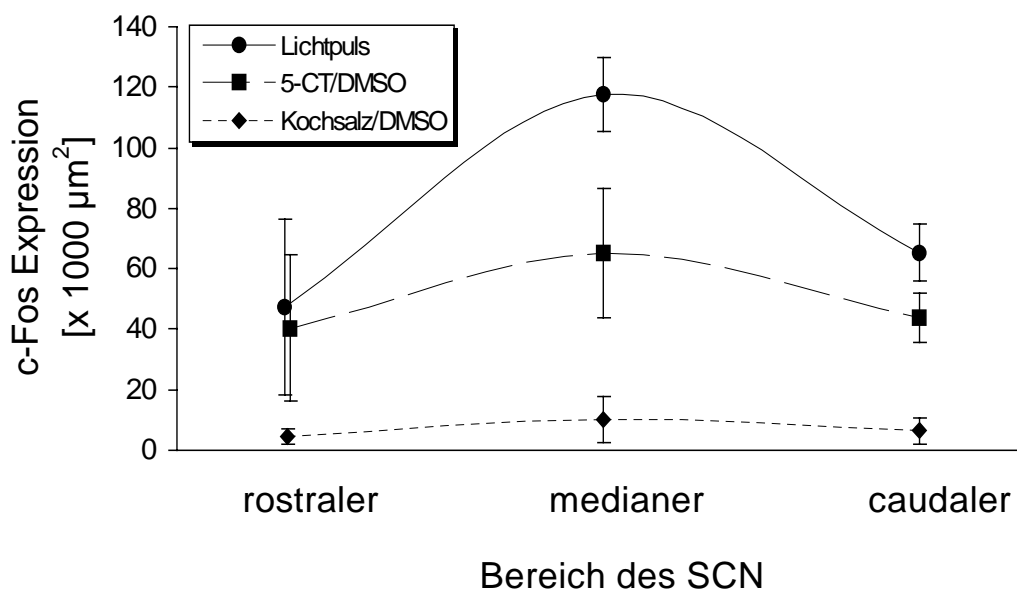


Abb. 5.8: Räumliche Verteilung der c-Fos Expression innerhalb des SCN.

Auf der x-Achse sind die unterschiedlichen Bereiche, auf der y-Achse die entsprechende c-Fos Expression aufgetragen. Pro Bereich wurde die Gesamtfläche der gefärbten Zellkörper im SCN über 7 Schnitte à 25 µm bestimmt

Tabelle 5.8: c-Fos Expression in verschiedenen Bereichen des SCN

Behandlung	gefärbte Fläche in $\times 100 \mu\text{m}^2 \pm$ Standardabweichung			n
	rostraler	medianer Bereich	caudaler	
DMSO/Kochsalz	$47 \pm 25$	$102 \pm 75$	$64 \pm 44$	5
DMSO/5-CT	$404 \pm 241$	$650 \pm 213$	$437 \pm 81$	7
Lichtpuls	$471 \pm 290$	$1177 \pm 123$	$654 \pm 93$	4

n = Anzahl der Gehirne

In der Abb. 5.9 sind die Ergebnisse der Phasenverschiebungen (Tabelle 5.6) den entsprechenden c-Fos Expressionen (Tabelle 5.7) gegenübergestellt. Die Abbildung zeigt, daß die Kombinationsinjektion aus DMSO/5-CT sowohl zu einer eindeutigen Phasenverschiebung als auch zu einer starken c-Fos Expression führte. Es ist ebenfalls zu erkennen, daß die Kontrollinjektionen mit DMSO/Kochsalz weder eine größere Phasenverschiebung noch eine eindeutig erhöhte c-Fos Expression auslösten. Im Gegensatz dazu zeigt die Gegenüberstellung von Phasenverschiebungen und c-Fos Expressionen der Injektionen Ritanserin/5-CT, Pindolol/5-CT und Ritanserin/Kochsalz, daß alle drei Behandlungen zu keinen größeren Phasenverschiebungen führten, jedoch eine eindeutige Erhöhung der c-Fos Expression zur Folge hatten.

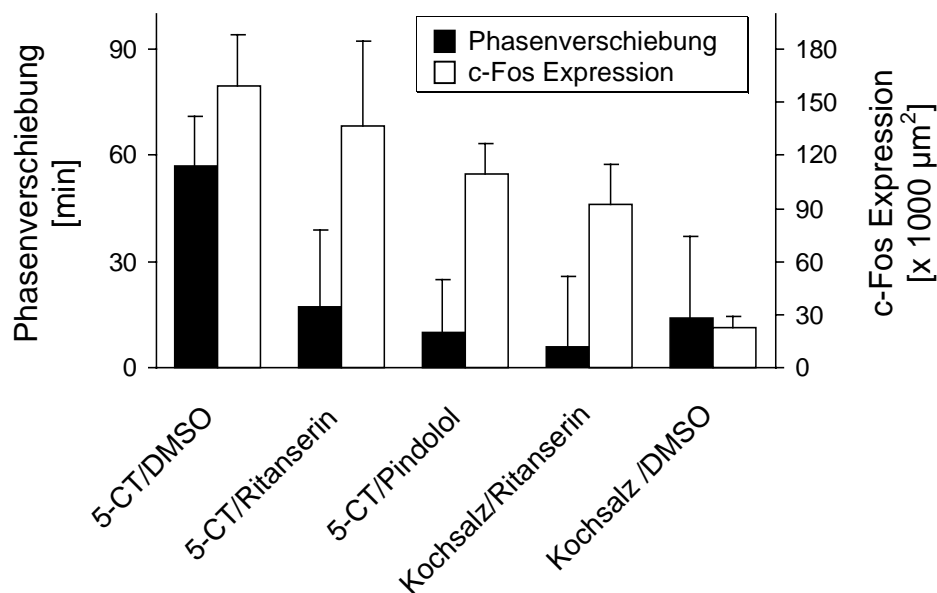


Abb. 5.9: Phasenverschiebungen und c-Fos Expression im Vergleich.

Für jede Behandlungsart ist die Phasenverschiebung  $\pm$  Standardabweichung (Werte: Tabelle 5.6) und die entsprechende c-Fos Expression  $\pm$  Standardabweichung (Werte: Tabelle 5.7) abgebildet. Auf der linken Skala ist für die schwarzen Balken die Stärke der Phasenverschiebung in Minuten aufgetragen. Auf der rechten Skala ist für die weißen Balken die Gesamtfläche der c-Fos immunreaktiver Zellkörper im SCN aufgetragen.



## 6 Diskussion

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Wirkung des Neurotransmitters Serotonin im circadianen System der Ratte vertiefend zu untersuchen. Die besondere Aufmerksamkeit galt dabei der Frage, ob die phasenverschiebende Wirkung verschiedener Serotonin-Agonisten direkt durch serotonerge Projektionen zum SCN vermittelt wird (Versuchsteil I).

Weitere Untersuchungen mit verschiedenen Serotonin-Agonisten und -Antagonisten sollten dann klären, welche möglichen Rezeptortypen an der Vermittlung der Serotoninwirkung beteiligt sind (Versuchsteil II).

### 6.1 Versuchsteil I: Lokale Applikation von Quipazin

In diesem Versuchsteil wurde zum einen die phasenverschiebende Wirkung intraventrikulärer Injektionen von Quipazin zu sechs unterschiedlichen Zeitpunkten untersucht und eine PRC erstellt. Zum anderen wurde die Auswirkung einer lokalen Quipazinapplikation auf die c-Fos Expression im SCN zu den Zeitpunkten CT 14 und CT 22 bestimmt. Dabei zeigte sich, daß Quipazininjektionen in die Nähe des SCN zu Beginn der subjektiven Nacht (CT 14) zu Phasenverzögerungen und zum Ende der subjektiven Nacht (CT 22) zu Phasenbeschleunigungen führten. Während des subjektiven Tages wurden keine Phasenverschiebungen beobachtet. Die aus den sechs Zeitpunkten erstellte PRC zeigt somit den typischen Verlauf einer photischen PRC (Daan und Pittendrigh, 1976; Pittendrigh und Daan, 1976b; Pittendrigh, 1981). Weiterhin induzierten die lokalen Quipazininjektionen während der subjektiven Nacht (CT 14 und CT 22) eine c-Fos Expression im ventrolateralen Bereich des SCN, wie sie auch für photische Stimuli beschrieben wurde (Rea, 1989; Schwartz *et al.*, 1996; Kornhauser *et al.*, 1996a; Kornhauser *et al.*, 1996b). Die starke Übereinstimmung zwischen der phasenverschiebenden und c-Fos induzierenden Wirkung von Quipazin mit der Wirkung photischer Stimuli deutet darauf hin, daß Serotonin bei der Ratte an der Verarbeitung photischer Stimuli beteiligt ist. Weiterhin kann aufgrund der vorliegenden Befunde auf eine direkte Wirkung von Quipazin im Bereich des SCN geschlossen werden, da bei den lokalen Applikationen eine Beteiligung anderer Strukturen wie beispielsweise des IGL und der Raphe-Kerne weitgehend ausgeschlossen werden kann.

Die in dieser Arbeit gezeigte lichtähnliche Wirkung lokaler Quipazininjektionen steht im Einklang mit einer früheren Untersuchung an Ratten, in der ebenfalls lichtähnliche Phasenverschiebungen nach systemischen Quipazininjektionen zu den gleichen Zeitpunkten beschrieben wurden (Kohler *et al.*, 1999). Weiterhin stimmen die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchung mit den Befunden früherer Arbeiten an Ratten darin überein, daß auch nach systemischen Injektionen von Quipazin während der subjektiven Nacht (CT 14 (Moyer *et al.*, 1997) und CT 22 (Kohler *et al.*, 1999) eine c-Fos Expression im ventralen Bereich des SCN beobachtet wurde. Aber auch die in anderen Arbeiten beschriebene lichtähnliche Wirkung verschiedener Serotonin-Agonisten wie Quipazin, DOI und mCPP auf die Melatoninrhythmik

(Moyer *et al.*, 1997; Kennaway und Moyer, 1998) paßt zu den in dieser Arbeit gezeigten Befunden.

Neben diesen übereinstimmenden Arbeiten, die für eine photische Wirkung von Serotonin bei der Ratte sprechen, gibt es eine Vielzahl von *in vivo* Untersuchungen an Hamstern (Tominaga *et al.*, 1992; Rea *et al.*, 1994; Cutrera *et al.*, 1994b; Colecchia *et al.*, 1996; Bobrzynska *et al.*, 1996b; Mintz *et al.*, 1997; Penev *et al.*, 1997) und Ratten (Edgar *et al.*, 1993), die eher für eine nicht-photische Wirkung von Serotonin im circadianen System sprechen. Diese Schlußfolgerung basiert auf der Tatsache, daß Serotonin-Agonisten in all diesen Arbeiten zu Phasenverschiebungen des circadianen Systems während des subjektiven Tages führten und somit typischen nicht-photischen Stimuli glichen. So führten beispielsweise die Injektionen des Serotonin-Agonisten 8-OH-DPAT bei Hamstern im *in vivo* Versuch zu Phasenbeschleunigungen während des subjektiven Tages (CT 6, CT 7 und CT 8) (Cutrera *et al.*, 1994b; Bobrzynska *et al.*, 1996b; Mintz *et al.*, 1997) und zu kleinen Phasenverzögerungen zum Ende des subjektiven Tages (CT 11) (Cutrera *et al.*, 1994b). Weitere Hinweise auf eine nicht-photische Wirkung von Serotonin ergaben sich aus Untersuchungen an Hamstern und Mäusen, in denen die Wirkung von Licht durch eine vorherige Applikation verschiedener Serotonin-Agonisten gehemmt wurden (Rea *et al.*, 1994; Pickard *et al.*, 1996; Pickard und Rea, 1997) bzw. durch den Serotonin-Antagonisten NAN-190 verstärkt wurde (Rea *et al.*, 1995). So konnte beispielsweise bei Hamstern gezeigt werden, daß sich lichtinduzierte Phasenverschiebungen in der Aktivitätsrhythmik durch vorherige Applikationen von 8-OH-DPAT, einem 5-HT<sub>1A/7</sub> spezifischen Rezeptor Agonisten, mit zunehmender Dosierung reduzieren bzw. vollständig hemmen lassen (Rea *et al.*, 1994; Penev *et al.*, 1997). Umgekehrt führten Applikationen des Serotonin-Antagonisten NAN-190 zu einer Verstärkung von lichtinduzierten Phasenverschiebungen (CT 14 und CT 19) auf bis zu 250% (Rea *et al.*, 1995). Bei Hamstern wurde weiterhin gezeigt, daß der hemmende Effekt von Serotonin-Agonisten wie 8-OH-DPAT oder TFMPP, einem 5-HT<sub>1B</sub> spezifischen Agonisten, auf einer lokalen Wirkung im Bereich des SCN beruht (Weber *et al.*, 1998). Aber auch bei Mäusen gibt es Hinweise dafür, daß die Hemmung von lichtinduzierten Phasenverschiebungen durch die lokale Wirkung von Serotonin direkt im SCN erfolgt. Die Wirksamkeit von TFMPP deutet weiterhin darauf hin, daß Serotonin auch über präsynaptische Rezeptoren wirkt (Pickard *et al.*, 1996; Pickard und Rea, 1997).

Neben der Hemmung von lichtinduzierten Phasenverschiebungen in der circadianen Aktivitätsrhythmik führten Serotonin-Agonisten auch zu einer deutlichen Reduktion der normalerweise durch Lichtpulse induzierten c-Fos Expression im SCN (Selim *et al.*, 1993; Glass *et al.*, 1994; Moriya *et al.*, 1996; Pickard und Rea, 1997) sowie zur Reduktion der Glutamatausschüttung an den synaptischen Endigungen des RHT. Die Reduktion der Glutamatausschüttung ist nach dem derzeitigen Erkenntnisstand auf eine Aktivierung der auf den Endigungen des RHT sitzenden 5-HT<sub>1B</sub> Rezeptoren zurückzuführen. Dabei kommt es aufgrund der Aktivierung dieser Rezeptoren vermutlich zu einer Hemmung der AC und dadurch



zu einer verminderten Freisetzung der mit Glutamat gefüllten Vesikel an den synaptischen Endigungen des RHT (Selim *et al.*, 1993; Pickard und Rea, 1997).

Es bleibt also festzuhalten, daß Serotonin bei Hamstern sowohl an der Verarbeitung nicht-photischer Phasenverschiebungen beteiligt ist und zusätzlich die Wirkung photischer Stimuli reduzieren bzw. hemmen kann.

Diese doch sehr widersprüchliche Wirkung von Serotonin bei Hamstern und Mäusen einerseits und Ratten andererseits läßt sich teilweise durch Speziesunterschiede erklären. Einer der wichtigsten Unterschiede zwischen den Spezies findet sich dabei in den anatomischen Strukturen des circadianen Systems. So wurde bei Ratten nicht nur eine direkte Verbindung von der Retina zum DRN (Shen und Semba, 1994; Kawano *et al.*, 1996), sondern auch eine schmale Projektion vom DRN zum SCN nachgewiesen (Moga und Moore, 1997). Aufgrund dieser beiden Projektionen, die bei Hamstern nach dem derzeitigen Wissensstand nicht vorhanden sind (Morin, 1994; Meyer-Bernstein und Morin, 1996; Morin und Meyer-Bernstein, 1999), wäre es theoretisch möglich, daß das serotonerge System bei Ratten an der Weiterleitung bzw. Verarbeitung photischer Stimuli beteiligt ist. Neben diesen anatomischen Divergenzen zwischen den Spezies fand man weiterhin auch deutliche Unterschiede in der Wirkung verschiedener Transmitter, die aus den synaptischen Endigungen des RHT freigesetzt werden. Beim Hamster ist der RHT nicht nur ausreichend sondern auch notwendig für eine Synchronisation des endogenen Schrittmachers auf einen Licht-Dunkel-Wechsel (Moore und Lenn, 1972; Moore und Klein, 1974; Johnson *et al.*, 1988c). Neben den Neurotransmittern Aspartat, Substanz P und PACAP spielt vor allem die exzitatorische Aminosäure Glutamat bei der Vermittlung von Information vom RHT zum SCN eine wichtige Rolle (Meijer *et al.*, 1988; Shirakawa und Moore, 1994; Ebling, 1996). So führten Lichtpulse während der subjektiven Nacht bei Ratten (Liou *et al.*, 1986; Ebling, 1996) und Hamstern (Glass *et al.*, 1993) zu einer erhöhten Glutamatfreisetzung im Bereich des SCN.

Trotz diesen Übereinstimmungen unterscheiden sich Ratten und Hamster offensichtlich in der Wichtigkeit des Transmitters Glutamat für die photische Synchronisation. Bei Hamstern führten lokale Injektionen des Glutamat-Agonisten NMDA in die Nähe des SCN zu lichtähnlichen Phasenverschiebungen in der Aktivitätsrhythmik (Mintz und Albers, 1997). Im Gegensatz dazu wurden bei Ratten nach NMDA Behandlungen keine lichtähnlichen Effekte in der Melatoninrhythmik beobachtet (Rowe und Kennaway, 1996). Weiterhin ließ sich bei Hamstern die Wirkung von Licht auf das circadiane System durch die vorherige Gabe des Glutamat-Antagonisten MK-801 vollständig hemmen, und zwar sowohl die lichtinduzierten Phasenverschiebungen der Aktivität (Colwell *et al.*, 1990) und der Melatoninrhythmik (Colwell *et al.*, 1991) als auch die lichtinduzierte c-Fos Expression im SCN (Abe *et al.*, 1991). Bei der Ratte dagegen führte die Vorbehandlung mit MK-801 zu keiner deutlichen Reduktion oder Hemmung lichtinduzierter Phasenverschiebungen in der Aktivitäts- und Melatoninrhythmik (Rowe und Kennaway, 1996). Es kann daher nicht ausgeschlossen werden, daß die

Synchronisation auf photische Stimuli bei Ratten und Hamstern über unterschiedliche Projektionen und Transmitter erfolgt, zumal bei Ratten die anatomischen Voraussetzungen für eine indirekte Vermittlung über die Raphe-Kerne gegeben ist. Weiterhin weisen die eben genannten Befunde bei Ratten eher auf eine untergeordnete Rolle des Neurotransmitters Glutamat bei der Verarbeitung photischer Reize hin, da auch trotz einer Blockade der NMDA Rezeptoren eine Synchronisation auf einen Licht-Dunkel-Wechsel beobachtet werden konnte. Wie im weiteren noch gezeigt wird, scheint bei Ratten neben Glutamat auch Serotonin an der Verarbeitung und Modulation photischer Reize beteiligt zu sein.

Ein weiterer Unterschied zwischen den Spezies Ratte und Hamster findet sich auf der zellulären Ebene des SCN. So wurden für Ratten und Hamster sehr unterschiedliche Reaktionen einzelner SCN-Neurone nach Applikation von Serotonin-Agonisten beschrieben. Beim Hamster führte die Gabe von Serotonin-Agonisten *in vivo* zu einer dosisabhängigen Reduktion der spontanen und lichtinduzierten neuronalen Aktivität bei 90% der SCN-Neurone, während lediglich 10% der SCN-Neurone eine Steigerung in der neuronalen Aktivität zeigten (Ying und Rusak, 1994). Demgegenüber führte die Behandlung des isolierten Ratten-SCN mit Serotonin-Agonisten zu einer Hemmung von 28% bis maximal 75% der lichtinduzierten neuronalen Aktivität von SCN-Neuronen, während es bei bis zu 25% der Zellen zu einer zusätzlichen Aktivierung kam (Nishino und Koizumi, 1977; Huang und Pan, 1993). In einem *in vivo* Ansatz bei Ratten wurde sogar eine 38%tige Steigerung in der neuronalen Aktivität von SCN-Neuronen nach Gabe des Serotonin-Agonisten Quipazin beschrieben (Miller und Fuller, 1990).

Während nun die widersprüchlichen Befunde zwischen den genannten Spezies weitgehend auf die geschilderten anatomischen und neurophysiologischen Unterschiede in der Zellantwort sowie auf die unterschiedliche Wirkung des Neurotransmitters Glutamat zurück zu führen sind, sind die kontroversen Befunde innerhalb der Spezies Ratte weitaus schwieriger zu begründen. Erschwerend kommt dabei hinzu, daß es sowohl Unterschiede innerhalb der *in vivo* als auch zwischen den bisherigen *in vivo* und *in vitro* Versuchen gibt.

Wie bereits dargelegt, bestätigen die Befunde der vorliegenden Arbeit eine Reihe anderer *in vivo* Untersuchungen an Ratten, die alle zeigen, daß Serotonin-Agonisten zu lichtähnlichen Phasenverschiebungen in der Aktivität, der Melatoninrhythmik und der c-Fos Expression im SCN führen (Kennaway *et al.*, 1996; Moyer *et al.*, 1997; Kohler *et al.*, 1999). Diesen Befunden steht nun eine ältere Arbeit mit vollständig anderen Ergebnissen gegenüber (Edgar *et al.*, 1993). In dieser Arbeit wurde beschrieben, daß sowohl systemische Injektionen des Serotonin-Agonisten Quipazin als auch lokale Mikroinjektionen von 8-OH-DPAT in den SCN Phasenverschiebungen in der Aktivitätsrhythmik induzieren, die denen typischer nicht-photischer Stimuli gleichen, das heißt es wurden Phasenbeschleunigungen während des subjektiven Tages (CT 6) beobachtet, aber keine Wirkung in der subjektiven Nacht (CT 18). Dieser Widerspruch ist allerdings nur schwer zu erklären. Eine mögliche Erklärung wäre, daß in den einzelnen Untersuchungen unterschiedliche Rattenstämme eingesetzt wurden. Diese Begründung ist aber recht unwahrscheinlich. Zum einen wurde in den Untersuchungen der

Arbeitsgruppe von Kennaway der gleiche Rattenausuchtstamm eingesetzt (Kennaway *et al.*, 1996; Moyer *et al.*, 1997), zum anderen ergab eine Untersuchung an drei verschiedenen Ratteninzuchtstämmen keine Unterschiede in der lichtähnlichen Wirkung durch den Serotonin-Agonisten Quipazin (Kohler *et al.*, 1999). Weiterhin dürften Unterschiede in der Art und Dosis der Applikation zwischen der vorliegenden Arbeit und der Untersuchung von Edgar *et al.* (1993) nur von geringer Bedeutung sein. Dieser Schluß ergibt sich daraus, daß in den Arbeiten von Edgar *et al.* (1993) und Kohler *et al.* (1999) jeweils die gleichen Mengen des Serotonin-Agonisten Quipazin eingesetzt wurden und in beiden Versuchsansätzen die systemischen Injektionen intraperitoneal erfolgten, weshalb dosisabhängige Effekte und unterschiedliche Wirkorte nicht für die verschiedenen Wirkungen verantwortlich gemacht werden können. Es kann allerdings nicht ausgeschlossen werden, daß Quipazin von unterschiedlichen Herstellern trotz gleicher Konzentration eine unterschiedliche Wirkung zeigt. Durch die Befunde der lokalen Applikation in der hier vorliegenden Arbeit konnte weiterhin gezeigt werden, daß es sich um eine lokale Wirkung des Serotonin-Agonisten Quipazin im Bereich des SCN handelt, da die Mitwirkung anderer Strukturen wie dem IGL oder den Raphe-Kernen weitgehend ausgeschlossen werden kann.

Eine weitere Erklärung für die kontroversen Ergebnisse von Edgar *et al.* (1993) ergibt sich aus der ungewöhnlich hohen Variabilität in den zum Zeitpunkt CT 6 beobachteten Phasenverschiebungen. So findet man Einzelwerte zwischen 15 bis 150 Minuten, die zusammen eine mittlere Phasenbeschleunigung von circa 70 Minuten ergaben. Würde man nur den Extremwert von 150 Minuten aus der Berechnung herausnehmen, so käme es zu einer deutlichen Reduktion der mittleren Phasenverschiebung auf einen Wert, der ohne weiteres mit den Phasenverschiebungen aus der Arbeit von Kohler *et al.* (1999) zum Zeitpunkt CT 6 für Quipazin aber auch für die Kochsalzinjektionen der Kontrollgruppe vergleichbar wäre. Sowohl in der vorliegenden Arbeit als auch in den Untersuchungen von Kohler *et al.* (1999) traten auch bei den mit Kochsalz behandelten Kontrollgruppen zum Zeitpunkt CT 6 Phasenbeschleunigungen auf. Es muß daher angenommen werden, daß diese Phasenverschiebungen nicht direkt auf die Wirkung von Quipazin zurückzuführen sind, sondern daß bereits die Behandlung mit dem damit verbundenen Erregungszustand der Tiere ausreicht, eine Phasenbeschleunigung in der Größenordnung von maximal 40 Minuten auszulösen.

In der Arbeit von Edgar *et al.* (1999) wurde weiterhin eine deutlich signifikante Periodenverkürzung nach Quipazininjektionen zum Zeitpunkt CT 6 beschrieben, die so weder in der Arbeit von Kohler *et al.* (1999) noch in der vorliegenden Studie beobachtet wurde. Solche Periodenveränderungen führen aber nachweislich zu einer Beeinflussung und erschwerten Auswertung von Phasenverschiebungen (Mrosovsky, 1996).

Mit den oben genannten Argumenten lassen sich zwar die widersprüchlichen Befunde zur systemischen Wirkung von Quipazin bei Ratten erklären, nicht aber die ebenfalls divergenten Befunde zur lokalen Wirkung von Quipazin in der vorliegenden Arbeit bzw. der von Edgar et al. (1993) mit 8-OH-DPAT. So beobachteten Edgar et al. (1993) deutliche Phasenbeschleunigungen während des subjektiven Tages (CT 6) nach lokalen Injektionen von 8-OH-DPAT in die Nähe des SCN, während in der vorliegenden Arbeit keine Phasenverschiebungen nach lokalen Quipazinapplikationen zum gleichen Zeitpunkt beobachtet wurden. Dieser Unterschied ließe sich zwar leicht mit dem unterschiedlichen Wirkungsprofil von Quipazin und 8-OH-DPAT erklären. Allerdings hatten systemische Injektionen von 8-OH-DPAT in anderen Untersuchungen ebenfalls keine phasenverschiebende Wirkung während des subjektiven Tages (Kennaway et al., 1996; Moyer et al., 1997).

Es zeigt sich also, daß die hier zusammengefaßten Argumente nur eine unzureichende Erklärung für die Kontroversität der Befunde anderer *in vivo* Studien gegenüber der Arbeit von Edgar et al. (1993) geben können. Da bisher keine weitere *in vivo* Studie an Ratten bekannt ist, bei der Serotonin Phasenverschiebungen während des subjektiven Tages induzieren konnte, es aber gleichzeitig mehrere Studien gibt, die zu ganz anderen Ergebnissen gekommen sind, muß man davon ausgehen, daß der Befund von Edgar et al. (1993) nicht reproduzierbar ist.

In der Literatur findet man nun aber nicht nur unterschiedliche Befunde zwischen verschiedenen *in vivo* Studien, sondern auch eine ganze Vielzahl kontroverser Ergebnisse zwischen den bisherigen *in vivo* und *in vitro* Untersuchungen an Ratten. Diese Unterschiede müssen nun noch im Einzelnen diskutiert werden:

Alle *in vitro* Untersuchungen am isolierten Ratten-SCN stimmen darin überein, daß Serotonin (Medanic und Gillette, 1992) und verschiedene Serotonin-Agonisten (Prosser et al., 1990; Prosser et al., 1992; Shibata et al., 1992; Prosser et al., 1993) während des subjektiven Tages zu Phasenverschiebungen in der circadianen Rhythmik der neuronalen Aktivität führten. Nicht einheitlich sind dagegen die bisherigen *in vitro* Befunde bezüglich möglicher Phasenverschiebungen während der subjektiven Nacht. So zeigte eine frühe Untersuchung nach Applikationen von Quipazin Phasenverzögerungen während der subjektiven Nacht (CT 15-CT 18) (Prosser et al., 1990), die bei nachfolgenden Untersuchungen der gleichen Arbeitsgruppe mit mehr spezifischen Serotonin-Agonisten wie 8-OH-DPAT nicht reproduziert werden konnten (Prosser et al., 1992; Prosser et al., 1993). Allerdings ergab eine andere Untersuchung mit 8-OH-DPAT durchaus Hinweise auf kleine, aber signifikante Phasenverzögerungen in der subjektiven Nacht (Shibata et al., 1992). Abgesehen von diesen kleinen Unterschieden ergaben die *in vitro* Untersuchungen am isolierten Ratten-SCN eine verblüffende Übereinstimmung mit den *in vivo* Untersuchungen an Hamstern. In beiden experimentellen Ansätzen führten verschiedene Serotonin-Agonisten zu Phasenverschiebungen während des subjektiven Tages, die denen von nicht-photischen Stimuli gleichen. Diese auf den ersten Blick gleiche Wirkung wird aber durch unterschiedliche neuronale Mechanismen vermittelt.

Bei intakten Hamstern beruhen die phasenverschiebenden Effekte von Serotonin während des subjektiven Tages auf einer indirekten Wirkung in den Raphe-Kernen bzw. im IGL (Mintz *et al.*, 1997). Dies zeigten Untersuchungen mit Mikroinjektionen, bei denen Phasenverschiebungen nur nach lokalen Applikationen von Serotonin in die Raphe-Kerne beobachtet wurden, nicht aber nach lokalen Injektionen in den SCN des Hamsters. Außerdem ließen sich die durch lokale Injektionen von 8-OH-DPAT in den DRN induzierten Phasenverschiebungen durch die vorherige Applikation von GABA-Antagonisten in die Nähe des SCN hemmen. Dies zeigt, daß die Wirkung von Serotonin bei Hamstern über eine Aktivierung von GABAergen Projektionen vom IGL zum SCN erfolgen muß. Im isolierten SCN der Ratte muß die phasenverschiebende Wirkung der verschiedenen Serotonin-Agonisten hingegen direkt an den SCN-Neuronen erfolgen und es ist daher umso verblüffender, daß sich diese Wirkung so deutlich von der in intakten Ratten unterscheidet. In jedem Fall unterscheidet sich aber die phasenverschiebende Wirkung von Serotonin im isolierten SCN der Ratte deutlich von den neueren Befunden an intakten Ratten.

Neben den im *in vitro* Versuch durch Serotonin-Agonisten ausgelösten Phasenverschiebungen in der neuronalen Aktivität der SCN-Neurone zeigten sich aber auch Veränderungen in der Menge der *c-fos* mRNA sowie des c-Fos Proteins nach einer Behandlung mit Serotonin-Agonisten. So fand man im *in vitro* Experiment Hinweise darauf, daß die *c-fos* mRNA Menge während des subjektiven Tages höher ist als in der subjektiven Nacht (Prosser *et al.*, 1994). Weiterhin zeigte sich, daß es nach Gabe des Serotonin-Agonisten Quipazin in das Kulturmedium während des subjektiven Tages zu einer Abnahme der *c-fos* mRNA Menge im dorsomedialen Bereich kam, während die *c-fos* mRNA Menge im ventrolateralen Bereich unverändert blieb. Im Laufe der subjektiven Nacht führten die Quipazininjektionen dagegen weder im ventrolateralen noch im dorsomedialen Bereich des SCN zu einer Veränderung in der *c-fos* mRNA Menge (Prosser *et al.*, 1994). Für die intakte Ratte gibt es zwar keine vergleichbaren Untersuchungen zur Wirkung von Serotonin-Agonisten auf die *c-fos* mRNA, wohl aber einige Studien, darunter auch die Befunde der vorliegenden Arbeit, die die Wirkung des Serotonin-Agonisten Quipazin auf die Expression des c-Fos Proteins im SCN beschreiben. Dabei zeigte sich, daß systemische Injektionen des Serotonin-Agonisten Quipazin *in vivo* sowohl in der frühen subjektiven Nacht (CT 15) (Moyer *et al.*, 1997) als auch in der späten subjektiven Nacht (CT 22) (Kohler *et al.*, 1999) zu einer deutlichen c-Fos Expression im ventrolateralen Bereich des SCN führen. Im Gegensatz dazu kam es im Laufe des subjektiven Tages (CT 6) zu keiner Erhöhung in der basalen c-Fos Expression im SCN (Moyer *et al.*, 1997; Kohler *et al.*, 1999).

Beim Vergleich der *in vitro* und der *in vivo* Studien an Ratten muß allerdings berücksichtigt werden, daß im ersten Fall die *c-fos* mRNA und im zweiten Fall das c-Fos Protein untersucht wurde und daher eine gewisse Zeitverzögerung zwischen Transkription und Translation mit einberechnet werden muß. Aus verschiedenen Untersuchungen weiß man, daß die *c-fos* mRNA

etwa 30 Minuten nach einem Stimulus ihren Maximalwert erreicht und innerhalb von zwei Stunden wieder auf den Basalwert abfällt. Das Maximum des c-Fos Proteins wird hingegen erst etwa zwei Stunden nach einem Stimulus erreicht (Aronin *et al.*, 1990; Sutin und Kilduff, 1992; Schwartz *et al.*, 1994; Hastings, 1995). Aber trotz Berücksichtigung dieser Zeitdifferenz ändert sich nichts an den widersprüchlichen Befunden, daß Serotonin-Agonisten den circadianen Schrittmacher der Ratte im *in vitro* Versuch nur während des subjektiven Tages beeinflussen, im *in vivo* Versuch dagegen nur während der subjektiven Nacht.

Wie läßt sich nun aber erklären, daß Serotonin-Agonisten im *in vitro* Versuch eher nicht-photische Phasenverschiebungen auslösen, während *in vivo* eher lichtähnliche Wirkungen beobachtet wurden? Eine Ursache für die kontroversen Befunde könnte in der Intaktheit des circadianen Schrittmachers liegen. So wird bei *in vivo* Versuchen der circadiane Schrittmacher in seiner physiologischen Umgebung untersucht, das heißt er ist Teil eines komplexen neuronalen Systems mit einer Vielzahl von Efferenzen und Afferenzen. Im *in vitro* Versuch kommt es dagegen aufgrund der Isolation des SCN zur weitgehenden Zerstörung aller Efferenzen und Afferenzen, wodurch es zwangsläufig zum Verlust hemmender und aktivierender afferenter Endigungen kommen muß. Insbesondere ist davon auszugehen, daß durch die Isolation des SCN der in der Regel hemmende Einfluß wegfällt, welcher im SCN durch die Freisetzung der Transmitter NPY und GABA aus den Terminalen des GHT verursacht wird. Dies belegen die folgenden Befunde:

I) Im *in vitro* Experiment wurden in der Regel Phasenverschiebungen in der Größenordnung von bis zu vier Stunden beobachtet (Gillette, 1986; Prosser und Gillette, 1989; Shibata *et al.*, 1992; Prosser *et al.*, 1993), während in *in vivo* Experimenten an Ratten und Hamstern selten Phasenverschiebungen von mehr als zwei Stunden auftraten (Meyer *et al.*, 1993; Kennaway *et al.*, 1996; Moyer *et al.*, 1997; Kohler *et al.*, 1999)

II) Ferner gibt es Hinweise darauf, daß es im *in vitro* Modell zu einem höheren cAMP Spiegel (Prosser und Gillette, 1991), einer erhöhten Ausschüttung von Vasopressin (Earnest und Sladek, 1986) und einem erhöhten Glukoseverbrauch (Schwartz *et al.*, 1980; Newman *et al.*, 1992) kommt.

III) Und schließlich sind die in *in vitro* Versuchen induzierten Phasenverschiebungen in der Regel innerhalb einer circadianen Periode abgeschlossen (McArthur *et al.*, 1991; Prosser *et al.*, 1993), während im *in vivo* Experiment meist mehrere Tage benötigt werden, bis sich der circadiane Rhythmus wieder stabilisiert hat (Pittendrigh, 1981; Meyer *et al.*, 1993).

Aufgrund dieser Unterschiede zwischen *in vitro* und *in vivo* Untersuchungen des circadianen Schrittmachers lassen sich gleich mehrere Hypothesen formulieren, um die kontroversen Befunde bezüglich der Wirkung von Quipazin zu erklären.

So wäre es beispielsweise denkbar, daß die im *in vitro* Versuch während des subjektiven Tages beobachteten nicht-photischen Phasenverschiebungen im *in vivo* Versuch deshalb nicht auftreten, weil bei der intakten Ratte die Wirkung von Quipazin durch die gleichzeitige Wirkung

anderer Transmitter gehemmt oder aufgehoben wird. Daß eine solche Interaktion verschiedener Transmitter durchaus möglich ist, ergibt sich aus einer neueren Studie am isolierten SCN, die zeigt, daß die im *in vitro* Versuch durch Quipazin induzierten Phasenverschiebungen bei gleichzeitiger Applikation von NPY deutlich reduziert sind (Prosser, 1998). Zum anderen wäre es denkbar, daß die beim intakten Tier während der subjektiven Nacht beobachteten lichtähnlichen Phasenverschiebungen im *in vitro* Experiment deshalb nicht auftreten, weil sie indirekt über Serotonin-Rezeptoren im IGL oder in den Raphe-Kernen vermittelt werden. Dem isolierten SCN der Ratte fehlen diese Kerngebiete und ihre Projektionen zum SCN, weshalb auch keine entsprechende Wirkung von Quipazin nachzuweisen ist. Diese Hypothese wird durch die Befunde der vorliegenden Arbeit widerlegt, da die Wirksamkeit der lokalen Quipazin-injektion zeigt, daß die lichtähnliche Wirkung direkt in der Nähe des SCN erfolgt. Eine mögliche Erklärung für diesen Widerspruch wäre, daß es im isolierten SCN der Ratte aufgrund der Präparation zu einer veränderten Zusammensetzung oder Anzahl der postsynaptisch lokalisierten Serotonin-Rezeptoren kommt. Allerdings gibt es bislang keine konkreten Evidenzen für solche Veränderungen in der Rezeptorzusammensetzung oder Dichte. Sehr viel wahrscheinlicher ist deshalb die letzte Hypothese, daß nämlich die lichtähnliche Wirkung von Quipazin über präsynaptische Serotonin-Rezeptoren erfolgt, die die Freisetzung anderer Transmitter aus den Terminalen des RHT oder GHT modulieren. So wäre es beispielsweise denkbar, daß Quipazin über 5-HT<sub>3</sub> Rezeptoren wirkt. Dieser Rezeptortyp wurde bereits in verschiedenen Arealen des Rattengehirns nachgewiesen und induziert die Freisetzung von Transmittern über einen Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration (Nayak *et al.*, 1999). Speziell im SCN wurde der 5-HT<sub>3</sub> Rezeptor bisher allerdings nicht nachgewiesen. Es wäre aber theoretisch möglich, daß ein solcher 5-HT<sub>3</sub> Rezeptor an den terminalen Endigungen des RHT die Freisetzung von Glutamat induziert und somit die lichtähnliche Wirkung von Quipazin auf das circadiane System vermittelt, zumindest für die Aktivitätsrhythmik.

Die Hypothese einer 5-HT<sub>3</sub> Rezeptor vermittelten Glutamatausschüttung im SCN birgt nur leider folgendes Problem: Ein solcher präsynaptischer Mechanismus müßte auch im isolierten Ratten-SCN aktivierbar sein. Dies zeigen eine Reihe von *in vitro* Untersuchungen, bei denen die Freisetzung von Glutamat durch präsynaptische 5-HT<sub>1B</sub> Rezeptoren auf den Terminalen des RHT reduziert bzw. blockiert wurden (Selim *et al.*, 1993; Moriya *et al.*, 1996; Pickard *et al.*, 1996; Pickard und Rea, 1997). Somit bleibt noch eine letzte Hypothese offen, um die unterschiedliche Wirkung von Quipazin *in vivo* und *in vitro* zu erklären: Die lichtähnliche Wirkung von Quipazin bei intakten Ratten könnte auch darauf beruhen, daß Quipazin über präsynaptische 5-HT<sub>1B</sub> Rezeptoren auf den Terminalen des GHT die Freisetzung der Transmitter NPY und/oder GABA reduziert und somit den inhibierenden Einfluß dieser Transmitter verringert bzw. aufhebt. Für diese Hypothese spricht zum einen, daß bereits 5-HT<sub>1B</sub> Rezeptoren im SCN nachgewiesen wurden (Boschert *et al.*, 1994) und zum anderen, daß ein solcher Mechanismus im isolierten SCN der Ratte nicht mehr funktionsfähig wäre, da die tonische Freisetzung der Transmitter NPY und GABA aus den Terminalen des GHT fehlt.

Aus den oben genannten Argumenten ergaben sich also zwei alternative Hypothesen für die lichtähnliche Wirkung von Quipazin bei intakten Ratten:

- I) Quipazin wirkt *in vivo* und *in vitro* über die Bindung an postsynaptische Serotonin-Rezeptoren, welche direkt auf den Neuronen des SCN lokalisiert sind. Im *in vitro* Experiment kommt es durch den Verlust von afferenten Projektionen zur Veränderung in der Art bzw. Dichte dieser Serotonin-Rezeptoren, so daß die normalerweise an intakten Ratten in der subjektiven Nacht zu beobachtenden Phasenverschiebungen nicht mehr ausgelöst werden können. Dafür reagiert der isolierte SCN der Ratte während des subjektiven Tages empfindlicher.
  
- II) Quipazin wirkt über die Bindung an präsynaptische 5-HT<sub>1B</sub> Rezeptoren auf den Terminalen des GHT und reduziert so die hemmende Wirkung der Transmitter NPY und GABA. Dieser präsynaptische Mechanismus ist im isolierten SCN nicht mehr vorhanden.

Eine abschließende Betrachtung der in diesem Versuchsteil gewonnenen Erkenntnisse zeigt, daß lokale Applikationen des Serotonin-Agonisten Quipazin in die Nähe des SCN zu lichtähnlichen Effekten führen. Diese Effekte äußern sich in lichtähnlichen Phasenverschiebungen in der Laufradaktivität und in der c-Fos Expressionen im ventrolateralen Bereich des SCN. Dies deutet darauf hin, daß Serotonin im circadianen System der Ratte an der Weiterleitung bzw. Verarbeitung photischer Information beteiligt ist. Weiterhin konnte durch die vorliegende Arbeit gezeigt werden, daß der Serotonin-Agonist Quipazin direkt oder zumindest über afferente Endigungen in der unmittelbaren Nähe des SCN wirkt.

Aussagen über die genaue Lokalisation und die beteiligten Serotoninrezeptortypen ließen sich mit diesem Versuchsansatz nicht machen, wurden aber im zweiten Teil der vorliegenden Studie näher untersucht. Die dabei gewonnenen Erkenntnisse werden im folgenden Kapitel näher diskutiert.



## 6.2 Versuchsteil II: Lokale Applikation von 5-CT in Kombination mit den Antagonisten Pindolol und Ritanserin

Im zweiten Teil der vorliegenden Studie wurde versucht, durch den Einsatz spezifischer Serotonin-Agonisten und -Antagonisten zu klären, welche Rezeptortypen an der Vermittlung der lichtähnlichen Wirkung von Quipazin beteiligt sind. Dazu wurde ein pharmakologischer Ansatz gewählt, der bereits in früheren Untersuchungen an Hamstern (Ying und Rusak, 1997) bzw. am isolierten SCN der Ratte (Lovenberg *et al.*, 1993) eingesetzt worden war, um zwischen den pharmakologisch recht ähnlichen 5-HT<sub>1A</sub> bzw. 5-HT<sub>7</sub> Rezeptortypen zu unterscheiden. Die Untersuchungen wurden auf die Zeitpunkte CT 14 und CT 22 beschränkt, da systemische und lokale Applikationen von Quipazin zu diesen Zeitpunkten die größten Phasenverschiebungen in der circadianen Laufradaktivität auslösten.

Die vorliegenden Untersuchungen ergaben, daß lokale Applikationen von 5-CT, einem Serotonin-Agonisten mit relativ hoher Affinität für 5-HT<sub>7</sub>, 5-HT<sub>2C</sub> sowie 5-HT<sub>1A/1B</sub> Rezeptoren (Lovenberg *et al.*, 1993) Phasenverzögerungen zum Zeitpunkt CT 14 und Phasenbeschleunigungen zum Zeitpunkt CT 22 auslösten, so wie es bereits für Quipazin gezeigt worden war. Ferner führten die lokalen 5-CT Injektionen zum Zeitpunkt CT 22 zu einer deutlichen c-Fos Expression im ventrolateralen SCN. Dies zeigt, daß die lichtähnliche Wirkung des unspezifischen Serotonin-Agonisten Quipazin im circadianen System der Ratte tatsächlich über Serotoninrezeptoren vermittelt ist und nicht etwa durch die aufgrund von Quipazin ebenfalls aktivierten Dopamin Rezeptoren. Weitere Untersuchungen zum Zeitpunkt CT 22 ergaben, daß sich die phasenverschiebende Wirkung der lokalen 5-CT Injektionen durch Pindolol, einem 5-HT<sub>1A/1B</sub> spezifischen Serotonin-Antagonisten, sowie durch Ritanserin, einem 5-HT<sub>2C/7</sub> spezifischen Antagonisten, vollständig hemmen ließen. Die entsprechenden Untersuchungen zur c-Fos Expression kamen dagegen zu einem unerwarteten anderen Ergebnis. Die durch 5-CT induzierte c-Fos Expression wurde durch die vorherige Applikation des 5-HT<sub>1A/1B</sub> spezifischen Antagonisten Pindolol nur um 32% reduziert, durch den 5-HT<sub>2C/7</sub> spezifischen Antagonisten Ritanserin sogar nur um 15%.

Auf den ersten Blick erlauben diese Ergebnisse keine eindeutige Aussage über die an der Wirkung von Quipazin oder 5-CT beteiligten Rezeptortypen, da die phasenverschiebende Wirkung von 5-CT durch beide Antagonisten weitgehend gleich stark reduziert bzw. gehemmt wurde. Auf den zweiten Blick wird jedoch deutlich, daß es für jeden der hier vorgestellten Befunde eine plausible Erklärung gibt, wenn man berücksichtigt, daß die eingesetzten Serotonin-Agonisten und -Antagonisten nicht hochspezifisch für nur einen einzigen Rezeptortyp sind. Für das bessere Verständnis der zum Teil recht komplexen Interaktionen an den verschiedenen 5-HT Rezeptortypen werden an dieser Stelle die einzelnen 5-HT Rezeptoren im circadianen System der Ratte bzw. des Hamsters kurz vorgestellt. Dabei muß allerdings berücksichtigt werden, daß die Nachweise der unterschiedlichen 5-HT Rezeptortypen mit immunhistologischen oder autoradiographischen Methoden ausschließlich an Ratten gemacht

wurden. Weiterhin wurden eine Vielzahl der bisherigen pharmakologischen *in vitro* Untersuchungen an Gehirnschnitten von Ratten durchgeführt, wohingegen die meisten *in vivo* Untersuchungen zur Wirkung von Serotonin im circadianen System bisher an Hamstern erfolgten. Das bedeutet, daß die im vorherigen Kapitel bereits ausführlich dargestellten Unterschiede zwischen den *in vivo* Befunden bei Hamstern und Ratten und den *in vitro* Befunden am isolierten Ratten-SCN weiterhin berücksichtigt werden müssen, was die Interpretation der Ergebnisse zusätzlich erschwert. Daher beschränkt sich die nachfolgende Diskussion -wo immer möglich- nur auf Befunde an Ratten.

Durch *in situ* Hybridisierung wurden im SCN der Ratte die mRNAs für 5-HT<sub>1A</sub> und 5-HT<sub>1B</sub> Rezeptoren (Prosser *et al.*, 1993; Roca *et al.*, 1993) sowie für 5-HT<sub>2C</sub> (Hoffman und Mezey, 1989; Roca *et al.*, 1993) und 5-HT<sub>7</sub> Rezeptoren (Gustafson *et al.*, 1996) nachgewiesen. Ferner wurden 5-HT<sub>2C</sub> und 5-HT<sub>2A</sub> Rezeptoren immunhistochemisch gezeigt (Moyer und Kennaway, 1999). In der gleichen Arbeit wurde aber auch beschrieben, daß es nicht gelungen war, im Bereich des SCN immunhistochemisch den 5-HT<sub>7</sub> Rezeptortyp nachzuweisen. Eine mögliche Erklärung hierfür wäre die geringe Empfindlichkeit des verwendeten Antikörpers gegen den 5-HT<sub>7</sub> Rezeptor, da es auch in anderen hypothalamischen Bereichen zu keiner Anfärbung kam, obwohl in diesen Gebieten die 5-HT<sub>7</sub> mRNA nachgewiesen werden konnte (Moyer und Kennaway, 1999). 5-HT<sub>1A</sub> Rezeptoren sind in der Regel postsynaptisch lokalisiert und führen über die Hemmung der AC zu einer Inhibition des entsprechenden Neurons. 5-HT<sub>2C</sub> Rezeptoren sind ebenfalls postsynaptisch lokalisiert und führen über die Aktivierung von Inositoltriphosphat zu einer Aktivierung der entsprechenden Neurone. Des weiteren sind 5-HT<sub>7</sub> Rezeptoren postsynaptisch lokalisiert und lösen ebenfalls über eine Aktivierung der AC eine Aktivierung der entsprechenden Neurone aus. Ferner wurde durch *in vitro* Untersuchungen am isolierten SCN der Ratte gezeigt, daß die Aktivierung des 5-HT<sub>7</sub> Rezeptors auch eine Inhibition von GABA<sub>A</sub> Rezeptoren zur Folge hat, das heißt der inhibierende Effekt von GABA auf die gleiche Zelle wird reduziert (Kawahara *et al.*, 1994). 5-HT<sub>1B</sub> Rezeptoren sind dagegen überwiegend präsynaptisch lokalisiert und können die Transmitterfreisetzung aus den jeweiligen synaptischen Endigungen hemmen. Nach dem derzeitigen Erkenntnisstand sind 5-HT<sub>1B</sub> Rezeptoren im SCN auf den Endigungen des RHT, des GHT sowie auf den serotonergen Projektionen der Raphe-Kerne (Manrique *et al.*, 1994; Manrique *et al.*, 1998; Manrique *et al.*, 1999) lokalisiert. Weiterhin wird in die nachfolgende Diskussion der 5-HT<sub>3</sub> Rezeptortyp mit einbezogen, für dessen Existenz im SCN bislang allerdings noch keine Evidenzen vorliegen. Jedoch wurden 5-HT<sub>3</sub> Rezeptoren bisher schon in vielen Regionen des Rattengehirns nachgewiesen (Nayak *et al.*, 1999). Sie sind in der Regel präsynaptisch lokalisiert und können die Freisetzung von Neurotransmittern, wie beispielsweise Glutamat, aus den terminalen Endigungen der jeweiligen Projektion induzieren. Abschließend muß berücksichtigt werden, daß die Wirkung von systemisch verabreichten Serotoninagonisten auf das circadiane System nicht nur über 5-HT Rezeptoren direkt im SCN, sondern auch über 5-HT Rezeptoren im IGL oder in den Raphe-Kernen erfolgen kann. Während die spezifischen Rezeptortypen im IGL noch unbekannt sind,



### *Mögliche Wirkungsmechanismen von 5-CT*

Wie bereits am Anfang des Kapitels erwähnt, führten die lokalen Applikationen des Serotoninagonisten 5-CT zu den Zeitpunkten CT 14 und CT 22 zu Phasenverschiebungen in der Laufradaktivität und zum Zeitpunkt CT 22 zu einer c-Fos Expression im ventrolateralen Bereich des SCN. 5-CT hat eine relativ hohe Affinität für 5-HT<sub>7</sub> Rezeptoren, deren Aktivierung über die Stimulation der AC zu einem Anstieg des intrazellulären cAMP-Spiegels führt. Dies wiederum induziert die Phosphorylierung verschiedener Kinasen, die dann beispielsweise über die Phosphorylierung des konstitutiven Transkriptionsfaktors CREB die Transkription des *c-fos* Gens einleiten. Wie in Kapitel 3.6.3 ausführlich dargelegt, ist das c-Fos Protein einer von mehreren Transkriptionsfaktoren, die durch die Aktivierung bisher unbekannter Zielgene an der Phasenverschiebung des circadianen Systems beteiligt sind (Kornhauser *et al.*, 1996a; Kornhauser *et al.*, 1996b). Die Aktivierung von 5-HT<sub>7</sub> Rezeptoren hätte außerdem die Hemmung von GABA<sub>A</sub> Rezeptoren zur Folge, so daß mögliche hemmende Einflüsse des Transmitters GABA ebenfalls reduziert würden. Neben der sehr hohen Affinität für die 5-HT<sub>7</sub> Rezeptoren ( $pK_i = 9.5$ ) bindet 5-CT aber auch mit relativ hohen Affinitäten an 5-HT<sub>1A/1B</sub> ( $pK_i = 8.3 - 9.5$ ) und an 5-HT<sub>2C</sub> ( $pK_i = 6.2$ ) Rezeptoren. So wäre es denkbar, daß 5-CT durch Bindung an 5-HT<sub>1A</sub> Rezeptoren gleichzeitig eine Inaktivierung der AC und damit einen Abfall des intrazellulären cAMP-Spiegels verursacht. Durch die Bindung an 5-HT<sub>2C</sub> Rezeptoren käme es dagegen wiederum zu einer Aktivierung des SCN-Neurons, diesmal über die Aktivierung des Inositoltriphosphatweges und die anschließende Freisetzung von Kalzium aus dem endoplasmatischen Reticulum. Außerdem wäre es denkbar, daß 5-CT über die Bindung an präsynaptische 5-HT<sub>1B</sub> Rezeptoren die Freisetzung von NPY und GABA aus den Terminalen des GHT bzw. die Freisetzung von Serotonin aus den Projektionen der Raphe-Kerne reduziert. Die präsynaptische Hemmung der endogenen Serotoninfreisetzung ist aber vermutlich zu vernachlässigen, da der SCN aufgrund der lokalen Applikation von 5-CT bereits einer sehr hohen Konzentration eines Serotonin-Agonisten ausgesetzt ist. Die präsynaptische Hemmung der endogenen NPY und GABA Freisetzung könnte aber durchaus zu einer weiteren Aktivierung der SCN-Neurone beitragen, da der normalerweise hemmende Einfluß dieser Transmitter reduziert wird. Und schließlich wäre es denkbar, daß 5-CT durch die Bindung an präsynaptische 5-HT<sub>3</sub> Rezeptoren auf den Terminalen des RHT die Freisetzung von Glutamat induziert, welches dann über eine Bindung an NMDA Rezeptoren ebenfalls zur Aktivierung der SCN-Neurone führen könnte. Allerdings ist es gut möglich, daß die über die 5-HT<sub>3</sub> Rezeptoren induzierte Ausschüttung von Glutamat durch die gleichzeitige Bindung an 5-HT<sub>1B</sub> Rezeptoren auf dem RHT wieder aufgehoben wird.

Die in der vorliegenden Arbeit zum Zeitpunkt CT 22 durch 5-CT Applikationen induzierte c-Fos Expression im SCN zeigt aber in jedem Fall, daß 5-CT insgesamt zu einer Aktivierung von SCN-Neuronen führt, das heißt der Effekt von 5-CT beruht überwiegend auf der Bindung an postsynaptische 5-HT<sub>2C</sub> oder 5-HT<sub>7</sub> Rezeptoren und/oder präsynaptische 5-HT<sub>1B</sub> Rezeptoren an den Terminalen des GHT.

*Mögliche Wirkungsmechanismen von 5-CT in Kombination mit Pindolol*

Wie die Befunde der vorliegenden Arbeit weiterhin zeigten, konnte die Wirkung von lokalen 5-CT Injektionen zum Zeitpunkt CT 22 durch die vorherige systemische Applikation des Serotonin-Antagonisten Pindolol reduziert bzw. gehemmt werden. Dabei wurde die phasenverschiebende Wirkung von 5-CT auf die Laufradaktivität vollständig gehemmt, während die c-Fos Expression nur um 32% reduziert wurde. Wie läßt sich nun aber erklären, daß Pindolol zwar eine vollständige Hemmung der 5-CT induzierten Phasenverschiebungen bewirkt, nicht aber eine vollständige Hemmung der c-Fos Expression?

Pindolol hat eine hohe Affinität zu 5-HT<sub>1A</sub> ( $pK_i = 7.5$ ) und 5-HT<sub>1B</sub> Rezeptoren ( $pK_i = 6.8$ ). Die Bindung von Pindolol an die auf den SCN-Neuronen lokalisierten 5-HT<sub>1A</sub> Rezeptoren hat vermutlich keine großen Auswirkungen. Möglicherweise wird dabei der durch Pindolol über 5-HT<sub>1A</sub> Rezeptoren ausgelöste hemmende Effekte durch die stärkeren aktivierenden Effekte von 5-CT über die 5-HT<sub>2C</sub> und die 5-HT<sub>7</sub> Rezeptoren mehr als wett gemacht. Da Pindolol nur eine relativ geringe Affinität für die 5-HT<sub>2C</sub> und 5-HT<sub>7</sub> Rezeptoren hat, ist davon auszugehen, daß 5-CT an diesen beiden Rezeptoren weiterhin wirksam ist, was auch die deutliche c-Fos Expression im SCN erklären würde. Auch die Bindung des systemisch verabreichten Pindolols an 5-HT<sub>1A</sub> Autorezeptoren in den Raphe-Kernen hat vermutlich nur geringe Auswirkungen. Durch die Blockade dieser Rezeptoren könnte ein normalerweise die endogene Serotoninfreisetzung hemmender Feedback-Mechanismus gehemmt werden. Dies sollte zu einer vermehrten Freisetzung von Serotonin an den Endigungen der efferenten Projektionen der Raphe-Kerne führen. Allerdings ist zu erwarten, daß die lokale Applikation von 5-CT in die Nähe des SCN einen wesentlich stärkeren Effekt hat als die zusätzliche Steigerung in der Freisetzung endogenen Serotonins.

Pindolol bindet ferner mit hoher Affinität an 5-HT<sub>1B</sub> Rezeptoren, die normalerweise die Freisetzung der Transmitter GABA und NPY aus den Terminalen des GHT und die Freisetzung von Serotonin aus den Projektionen der Raphe-Kerne reduzieren bzw. hemmen. Die Blockade dieser Rezeptoren durch Pindolol hätte eine vermehrte Freisetzung von NPY, GABA und Serotonin zur Folge. Die Freisetzung von NPY und GABA führt bekanntlich zu einer Hemmung der SCN-Neurone, die im Falle von GABA auf einem Chlorid-Einstrom beruht und somit nicht über intrazelluläre Signaltransduktionskaskaden vermittelt wird. Insofern könnte durch die vermehrte Ausschüttung von GABA eine Hemmung der SCN-Neurone erfolgen, die sich nicht in der c-Fos Expression widerspiegelt. Dies stellt somit einen ganz wesentlichen Unterschied zur alleinigen Applikation von 5-CT dar und ist vermutlich die Ursache dafür, daß es bei gleichzeitiger Applikation von Pindolol trotz einer c-Fos Expression zu keiner Phasenverschiebung in der Aktivitätsrhythmik kam. Schließlich wäre es denkbar, daß Pindolol aufgrund seiner hohen Affinität zu 5-HT<sub>1B</sub> Rezeptoren den hemmenden Effekt dieser Rezeptoren an den Terminalen des RHT aufhebt. Dies könnte eventuell dazu führen, daß die Wirkung von 5-CT am 5-HT<sub>3</sub> Rezeptor überwiegt und dadurch Glutamat an den Endigungen des RHT ausgeschüttet wird. Diese Hypothese muß aber mit einer gewissen Vorsicht betrachtet

werden, da es bislang noch keine experimentellen Beweise für die Existenz eines 5-HT<sub>3</sub> Rezeptors im SCN noch für eine durch ihn vermittelte Freisetzung von Glutamat gibt.

#### *Mögliche Wirkungsmechanismen von 5-CT in Kombination mit Ritanserin*

Die Vorbehandlung mit dem Serotonin-Antagonisten Ritanserin führte ebenfalls zu einer deutlichen Hemmung der phasenverschiebenden Wirkung von 5-CT zum Zeitpunkt CT 22, aber nur zu einer leichten Reduktion (-15%) der durch 5-CT allein induzierten c-Fos Expression. Bemerkenswert ist in diesem Zusammenhang aber auch, daß bereits die alleinige systemische Injektion von Ritanserin zu einer deutlichen c-Fos Expression geführt hat. Diese durch Ritanserin induzierte c-Fos Expression entsprach etwa 58% der allein durch 5-CT induzierten Menge und war signifikant höher als der Basalwert der Kontrollgruppe, der in dieser Studie circa 15% betrug. Wie läßt sich nun diese allein durch Ritanserin induzierte c-Fos Expression erklären?

Ritanserin hat eine hohe Affinität zu 5-HT<sub>2C</sub> (pK<sub>i</sub> = 8.6) und 5-HT<sub>7</sub> Rezeptoren (pK<sub>i</sub> = 7.7). Es ist also davon auszugehen, daß es diese Rezeptortypen auf den SCN-Neuronen blockiert und so den möglicherweise aktivierenden Einfluß von endogen vorhandenem Serotonin reduziert. Aufgrund dieser Wirkung von Ritanserin wäre also genau das Gegenteil zu erwarten, daß es nämlich zu einer deutlichen Hemmung der SCN-Neurone kommt. Ritanserin hat nun aber auch eine geringe Affinität für 5-HT<sub>1A</sub> und 5-HT<sub>1B</sub> Rezeptoren und könnte daher den möglicherweise inhibierenden Effekt von endogen vorhandenem Serotonin reduzieren bzw. hemmen. Dadurch könnte das Gleichgewicht zwischen aktivierenden und hemmenden Effekten auf die AC aufgehoben werden, was wiederum zu einer Erhöhung der intrazellulären cAMP Konzentration und somit auch zu einer c-Fos Expression führen könnte. Da Ritanserin systemisch verabreicht wurde, müssen auch die Serotonin-Rezeptoren in den Raphe-Kernen bzw. im IGL berücksichtigt werden. So könnte die Blockade der 5-HT<sub>1A</sub> Autorezeptoren in den Raphe-Kernen zu einer verstärkten Freisetzung von endogenem Serotonin an den Terminalen der serotonergen Projektionen im SCN führen. Durch die gleichzeitige Bindung von Ritanserin an 5-HT<sub>1B</sub> Rezeptoren auf den synaptischen Endigungen dieser Projektionen würde eine weitere mögliche Hemmung der Serotinausschüttung unterbunden. Es ist also denkbar, daß es durch den Wegfall der inhibierenden Feedback-Mechanismen zu einer erhöhten endogenen Ausschüttung von Serotonin im SCN kommt, welches dann beispielsweise durch Bindung an 5-HT<sub>2C</sub> Rezeptoren (für die Ritanserin eine geringere Affinität hat als für die 5-HT<sub>7</sub> Rezeptoren) eine Aktivierung der AC auslösen und damit eine c-Fos Expression induzieren könnte. Gleichermäßen wäre denkbar, daß Ritanserin die bisher nicht näher charakterisierten 5-HT Rezeptoren im IGL blockiert und so die endogene Freisetzung von NPY und GABA aus den Terminalen des GHT reduziert bzw. blockiert. Eine solche Reduktion normalerweise inhibierender Transmitter könnte ebenfalls eine Aktivierung der SCN-Neurone zur Folge haben. Und schließlich wäre denkbar, daß Ritanserin die 5-HT<sub>1B</sub> Rezeptoren an den Terminalen des RHT stärker blockiert als die 5-HT<sub>3</sub> Rezeptoren. Dadurch könnte endogen vorhandenes

Serotonin durch die stärkere Bindung an den 5-HT<sub>3</sub> Rezeptor die Freisetzung von Glutamat induzieren, welches über die Stimulation der NMDA Rezeptoren zu einer c-Fos Expression im SCN führt. Es muß an dieser Stelle aber einschränkend gesagt werden, daß es bislang für alle oben vorgestellten Hypothesen keine experimentellen Evidenzen gibt. Insofern sind alle Betrachtungen über die mögliche Wirkung von Ritanserin rein spekulativ.

Nichtsdestotrotz zeigen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit, daß bereits Ritanserin allein zu einer deutlichen c-Fos Expression im SCN führte. Bei der gleichzeitigen lokalen Applikation von 5-CT wurde die c-Fos Expression um etwa die Hälfte erhöht und entsprach dann 85% der sonst nach alleiniger 5-CT Applikation beobachteten maximalen c-Fos Expression. Die zusätzlich induzierte c-Fos Expression nach einer gleichzeitigen Applikation von 5-CT läßt sich nun dadurch erklären, daß 5-CT aufgrund seiner hohen Affinität zu 5-HT<sub>2C</sub> Rezeptoren und aufgrund der hohen Konzentration im Bereich des SCN vermutlich die durch Ritanserin nur sehr schwach besetzten 5-HT<sub>2C</sub> Rezeptoren durch die Verdrängung des Ritanserins aktiviert und so eine zusätzliche c-Fos Expression induziert. Ferner wäre aber auch denkbar, daß 5-CT die durch Ritanserin ebenfalls nur schwach besetzten präsynaptischen 5-HT<sub>1B</sub> Rezeptoren aktiviert und so die Freisetzung von GABA und NPY (möglicherweise auch 5-HT) aus den entsprechenden Terminalen reduziert, falls diese nicht bereits schon -wie oben ausgeführt- durch die Wirkung von Ritanserin im IGL reduziert ist.

#### *Zusammenfassende Diskussion*

Zusammenfassend läßt sich also sagen, daß sich für jeden Befund der vorliegenden Arbeit zum Teil gleich mehrere Erklärungen finden lassen, die aber oft sehr spekulativ sind. Dies liegt insbesondere daran, daß es bislang keine wirklich hoch spezifischen Serotonin-Agonisten bzw. -Antagonisten gibt. Vielmehr haben die eingesetzten Substanzen in der Regel ein recht breites Wirkungsspektrum und beeinflussen je nach Dosierung auch Rezeptoren, für die sie nur eine geringe Affinität haben. Verbindliche Aussagen über die Beteiligung spezieller Rezeptortypen sind daher nur möglich aufgrund von pharmakokinetischen Versuchsansätzen, das heißt durch den Vergleich von Dosis-Wirkungskurven. Außerdem muß bei der Interpretation der Befunde berücksichtigt werden, daß die c-Fos Expression im SCN ein sehr unspezifisches Signal ist und keinerlei Rückschlüsse auf die besondere Funktion der betroffenen SCN-Neurone zuläßt. So wäre es durchaus denkbar, daß sich die einzelnen SCN-Neurone in ihrer Rezeptorausstattung unterscheiden und deshalb die durch Ritanserin allein verursachte c-Fos Expression in einer ganz anderen Gruppe von SCN-Neuronen auftritt wie die c-Fos Expression nach Applikation von 5-CT. Das oben vorgestellte Modell muß daher nicht für jedes SCN-Neuron gelten, sondern kann nur ganz allgemein einen Eindruck von den möglichen Mechanismen innerhalb des SCN vermitteln. Trotz dieser Einschränkung ergaben sich aus den vorliegenden Untersuchungen eine Reihe sehr interessanter Befunde, die jetzt abschließend noch einmal kurz angesprochen werden sollen.

Ein wichtiges Ergebnis der vorliegenden Arbeit war, daß es bei den verschiedenen pharmakologischen Ansätzen durchaus zu einer deutlichen c-Fos Expression im SCN kam, nicht aber zu einer Phasenverschiebung in der Aktivitätsrhythmik. Wie bereits ausführlich dargestellt besteht eine mögliche Erklärung für diesen Befund darin, daß die alleinige Behandlung mit 5-CT neben der direkten Wirkung auf die SCN-Neurone auch eine Reduktion in der Freisetzung von NPY und GABA aus den Terminalen des GHT bewirkt. Bei der Kombination von 5-CT mit Pindolol bzw. Ritanserin bleibt die Ausschüttung von NPY und GABA dagegen unverändert hoch oder wird eventuell noch weiter gesteigert. Speziell durch GABA könnte es unabhängig von der c-Fos Expression zu einer Inhibition der SCN-Neurone kommen, die dann mögliche Phasenverschiebungen des circadianen Systems verhindert. Alternativ wäre es denkbar, daß durch NPY und/oder GABA andere Signaltransduktionskaskaden oder IEGs inhibiert werden, die für die Auslösung einer Phasenverschiebung notwendig sind. Es gibt in der Literatur bislang nur wenige Beispiele dafür, daß eine c-Fos Expression im SCN nicht zwangsläufig mit einer Phasenverschiebung des circadianen Systems einhergehen muß. So konnte an auf eine „skeleton photoperiod“ synchronisierten Mäusen gezeigt werden, daß es bei beiden Lichtpulsen zu einer c-Fos Expression im SCN kommt, sich die Tiere aber nur mit Hilfe eines der beiden Lichtpulse synchronisieren (Schwartz *et al.*, 1996). Eine andere Studie an Ratten zeigte, daß es aufgrund einer Kochsalzinjektion oder eines Käfigwechsels zwar zu einer geringen c-Fos Expression kommt, die aber nicht mit einer Phasenverschiebung in der Aktivitätsrhythmik einhergeht (Edelstein und Amir, 1995). Diese Befunde sind wichtig, weil sie zeigen, daß man sich bei Untersuchungen zur Wirkung von Transmittern auf das circadiane System oder bei der Analyse von intrazellulären Signaltransduktionskaskaden innerhalb der SCN-Neurone nicht allein auf den molekularen Marker c-Fos verlassen darf.

Betrachtet man die vorliegende Untersuchungen im Zusammenhang mit anderen *in vivo* Befunden bei der Ratte, so wird deutlich, daß es bei der Ratte offensichtlich mehrere Wege gibt, über die photische Information den SCN erreicht. Eine wichtige Projektion erfolgt über den RHT und die Freisetzung von Glutamat im SCN (Ebling, 1996). Neben Glutamat scheint aber auch Serotonin an der Vermittlung von photischer Information beteiligt zu sein. So gibt es inzwischen verschiedene Hinweise darauf, daß sich die durch Lichtpulse induzierte c-Fos Expression im SCN der Ratte durch die systemische Applikation von MK-801, einem NMDA Rezeptor-Antagonisten, nur teilweise (20-30%) hemmen läßt (Mikkelsen *et al.*, 1995; Poeggeler *et al.*, 1995). Leider geht aus den Arbeiten nicht hervor, welchen Effekt die Applikation von MK-801 auf die lichtinduzierten Phasenverschiebungen hat. Es ist deshalb nicht geklärt, ob die Behandlung mit MK-801 überhaupt Auswirkungen auf das circadiane System hat. Weitere Hinweise für eine Vermittlung von Lichtinformation über das serotonerge System stammen von Untersuchungen, in denen die serotonerge Übertragung blockiert wurde. So ergab eine Untersuchung daß die durch einen Lichtpuls induzierte c-Fos Expression im SCN der Ratte bei systemischer Applikation des Serotonin-Antagonisten NAN-190 um 30% reduziert war (Recio



*et al.*, 1996). Zu einem ähnlichen Ergebnis kam eine aktuelle Untersuchung, die zeigt, daß die chemische Läsion des serotonergen Systems mittels DL-p-chlorophenylalamin die lichtinduzierte c-Fos Expression im SCN um 42% reduziert (Moyer und Kennaway, 2000). Hierzu paßt auch, daß die durch die Applikation verschiedener Serotonin-Agonisten induzierte c-Fos Expression im SCN der Ratte bei verschiedenen Versuchsansätzen immer deutlich geringer war als die maximale c-Fos Expression nach einem längeren Lichtpuls (Moyer *et al.*, 1997; Kennaway und Moyer, 1998; Kohler *et al.*, 1999). Dies zeigt, daß Glutamat und Serotonin vermutlich zu annähernd gleichen Teilen an der lichtinduzierten c-Fos Expression im SCN der Ratte beteiligt sind. Dabei bleibt aber noch völlig offen, ob beide Transmitter an den gleichen SCN-Neuronen angreifen und die additive Wirkung gewissermaßen auf der zellulären Ebene der einzelnen SCN-Neurone erfolgt oder ob unterschiedliche Populationen von SCN-Neuronen jeweils separat durch einen der beiden Transmitter aktiviert werden. Gleichermäßen ist bislang noch unklar, welche Auswirkungen dies auf den circadianen Schrittmacher hat. Bewiesen ist bislang nur, daß auch die über Serotonin vermittelte Wirkung bei der Ratte ausreicht, um eine lichtähnliche Phasenverschiebung in der Laufradaktivität (Kohler *et al.*, 1999) und in der Melatoninrhythmik (Kennaway *et al.*, 1996; Moyer *et al.*, 1997; Kennaway und Moyer, 1999) auszulösen. Vermutlich ist auch die nur über Glutamat vermittelte Wirkung auf das circadiane System ausreichend, um Phasenverschiebungen zu vermitteln. Diese Vermutung ergibt sich aus einer Vielzahl älterer Untersuchungen, die zeigten, daß chemische oder elektrolytische Läsionen des serotonergen Systems keine dramatischen Auswirkungen auf die photische Synchronisation des circadianen Schrittmachers hatten (Morin und Blanchard, 1991; Meyer-Bernstein und Morin, 1996).

Dies führt zu der letzten und abschließenden Frage, wie Serotonin im SCN der Ratte wirkt. Verschiedene Untersuchungen von Kennaway und Mitarbeitern lassen vermuten, daß zumindest die Wirkung von Serotonin auf die circadiane Melatoninrhythmik durch einen 5-HT<sub>2A/2C</sub> Rezeptortyp vermittelt ist (Kennaway und Moyer, 1998; Kennaway und Moyer, 1999; Moyer und Kennaway, 1999). Hierzu paßt allerdings nicht so recht der jüngste Befund aus der gleichen Arbeitsgruppe, daß sich der lichtähnliche Effekt von DOI, einem recht spezifischen 5-HT<sub>2A/2C</sub> Agonist, durch die vorherige Applikation des NMDA-Antagonisten MK-801 hemmen läßt und zwar sowohl die c-Fos Expression als auch die Phasenverschiebungen in der Melatoninrhythmik (Kennaway und Moyer, 1999). Dieser Befund deutet vielmehr darauf hin, daß Serotonin nur über die Freisetzung von Glutamat wirkt. Diese Freisetzung von Glutamat könnte einerseits über glutamaterge Neurone direkt im SCN erfolgen, sie könnte andererseits aber auch über den bereits mehrfach erwähnten präsynaptischen 5-HT<sub>3</sub> Rezeptor auf den Terminalen des RHT erfolgen. Hierzu würde auch der jüngste Befund aus der hiesigen Arbeitsgruppe passen, daß sich die lichtähnliche Wirkung von Quipazin durch Erblindung der Tiere komplett unterdrücken läßt (Wollnik, 2000). Durch die Entfernung der Augen gehen zwangsläufig auch die Projektionen des RHT zum SCN und somit auch die serotonininduzierte Freisetzung von Glutamat zugrunde.

Wie bereits im ersten Teil der Diskussion ausführlich dargelegt, gibt es aber wichtige Argumente gegen die Beteiligung eines präsynaptischen 5-HT<sub>3</sub> Rezeptors. Zum einen fehlen bislang jegliche Hinweise für die Existenz eines solchen Rezeptortyps im SCN der Ratte und zum anderen müßte ein solcher Mechanismus auch im isolierten SCN der Ratte aktivierbar sein, das heißt er müßte auch bei *in vitro* Untersuchungen zu lichtähnlichen Phasenverschiebungen führen.

Somit bleibt nur die Hypothese, daß Serotonin über präsynaptische 5-HT<sub>1B</sub> Rezeptoren an den Terminalen des GHT die Freisetzung der inhibierenden Transmitter GABA und NPY reduziert. Da das IGL ebenfalls durch glutamaterge Projektionen von der Retina innerviert wird und systemische Applikationen von MK-801 bekanntlich auch zu deutlichen Veränderungen im Stoffwechsel von Dopamin und Serotonin führen (Lodge und Johnson, 1990) wäre es durchaus denkbar, daß die Erblindung bzw. MK 801-Injektionen zu Veränderungen im IGL führen, die die Wirkung von Serotonin aufheben. Diese Hypothese ließe sich leicht durch gezielte Läsionen des IGL überprüfen.

### 6.3 Schlußfolgerungen

Durch die in der vorliegenden Studie gewonnenen Ergebnisse wurden zum einen die bisherigen Studien anderer Arbeitsgruppen untermauert und zum anderen die derzeitige Vorstellungen von der Bedeutung des Serotonins im circadianen System der Ratte erweitert.

Aufgrund der in dieser Arbeit beobachteten Wirkungen verschiedener Serotonin-Agonisten und -Antagonisten konnten folgende Schlußfolgerungen gezogen werden:

- I) Serotonin spielt bei der Übertragung und Verarbeitung photischer Stimuli im circadianen System der Ratte eine entscheidende Rolle. Dies belegen die lichtähnliche Wirkung verschiedener Serotonin-Agonisten auf die circadiane Aktivitätsrhythmik und die c-Fos Expression im ventrolateralen Bereich des SCN.
  
- II) Die ebenfalls lichtähnlichen Effekte der lokale Applikationen belegen, daß die Wirkung von Serotonin direkt im Bereich des SCN erfolgen muß. Allerdings konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht geklärt werden, ob es sich um eine direkte Wirkung an den SCN-Neuronen selbst handelt, oder ob die Wirkung über präsynaptische Rezeptoren auf den Endigungen afferenter Projektionen im Bereich des SCN vermittelt wird. Möglicherweise wirkt Serotonin über eine Kombination aus direkten und indirekten Mechanismus.
  
- III) Durch den Einsatz des Serotonin-Agonisten 5-CT in Kombination mit den Serotonin-Antagonisten Pindolol und Ritanserin wurden weiterhin Hinweise dafür gefunden, daß eine c-Fos Expression im SCN nicht zwangsläufig mit einer Phasenverschiebung in der Aktivitätsrhythmik einhergehen muß. Die in dieser Studie gewonnenen Ergebnisse deuten vielmehr darauf hin, daß es neben der Aktivierung von c-Fos noch andere IEGs oder Aktivierungsmechanismen gibt, deren gleichzeitige Induktion erst zu Phasenverschiebungen führt.



## 7 Ausblick

Mit Hilfe der in dieser Arbeit entwickelten Modellvorstellung zur Lokalisation und Wirkung der verschiedenen Serotonin Rezeptortypen konnten alle Effekte nach Applikation der unterschiedlichen Serotonin-Agonisten und -Antagonisten im circadianen System der Ratte zufriedenstellend erklärt werden. Jedoch setzt dieses Modell gewisse Bedingungen voraus, für die es bisher noch keine experimentellen Beweise gibt. So wurde zum einen angenommen, daß die Freisetzung der Transmitter NPY und GABA an den Terminalen des GHT kontinuierlich erfolgt und durch die Freisetzung von Serotonin im SCN über präsynaptische 5-HT<sub>1B</sub> Rezeptoren gehemmt werden kann. Zum anderen wurde davon ausgegangen, daß es keine basale Glutamatausschüttung an den axonalen Endigungen des RHT gibt, sondern diese erst durch die Stimulation der RHT-Neurone ausgelöst wird. Eine weitere Spekulation war die Annahme eines 5-HT<sub>3</sub> Rezeptortyps auf den axonalen Endigungen des RHT. Des Weiteren wurde vorausgesetzt, daß sich die endogene Serotoninausschüttung durch den systemischen Einsatz der verschiedenen Serotonin Antagonisten deutlich verändert.

Durch weitere Untersuchungen wäre daher zu klären, ob die Freisetzung der Transmitter NPY, GABA, Glutamat und Serotonin im Bereich des SCN konstant ist oder ob sie einer endogenen Rhythmik unterliegt, und wie sich die Konzentration der jeweiligen Transmitter nach photischen bzw. serotonergen Stimuli verändert. Für die Klärung dieser Frage wäre der Einsatz der *in vivo* Mikrodialyse eine gut geeignete Methode. Durch diesen methodischen Ansatz hätte man zum einen den Vorteil, daß die Messung sehr lokal im SCN oder im IGL durchgeführt werden könnte. Zum anderen wäre es möglich, den Verlauf der Freisetzung einzelner Transmitter unter konstanten Bedingungen bzw. ihre Veränderung aufgrund einer bestimmten Behandlung über einen längeren Zeitraum zu messen. Ein weiterer geeigneter Versuchsansatz wäre die gezielte Ausschaltung bestimmter Kerngebiete wie beispielsweise des IGLs oder der Raphe-Kerne. Durch die Läsion solcher Strukturen hätte man die Möglichkeit zu klären, ob die serotonergen Effekte über postsynaptische 5-HT Rezeptoren auf den SCN-Neuronen selbst erfolgen, oder ob sie über präsynaptische Rezeptoren auf den afferenten Projektionen anderer Strukturen vermittelt werden.



## 8 Literaturverzeichnis

- Abe, H., Rusak, B. and Robertson, H.A. (1991). Photic induction of Fos protein in the suprachiasmatic nucleus is inhibited by the NMDA receptor antagonist MK-801. *Neuroscience Letters*, 127, 9-12.
- Aghajanian, G.K. and Wang, R.Y. (1987). Physiology and pharmacology of central serotonergic neurons. In M. A. Lipton, A. Dimascio, & K. F. Killam (Eds.), *Psychopharmacology: A Generation of Progress*. New York: Raven Press, 171-183.
- Aguilar-Roblero, R., García-Hernández, F., Aguilar, R., Arankowsky-Sandoval, G. and Drucker-Colín, R. (1986). Suprachiasmatic nucleus transplants function as an endogenous oscillator only in constant darkness. *Neuroscience Letters*, 69, 47-52.
- Albers, H.E. and Ferris, C.F. (1984). Neuropeptide Y: Role in light-dark cycle entrainment of hamster circadian rhythms. *Neuroscience Letters*, 50, 163-168.
- Antle, M.C., Dudley, T., Glass, J.D. and Mistlberger, R. (1998). The 5-HT<sub>1a</sub> Antagonist WAY 100635 increases endogenous 5HT release in hamster SCN: Effects on circadian phase and response to a nonphotic Zeitgeber. *Society for Research on Biological Rhythms Abstracts*, 6, 75.
- Armstrong, S.M. (1989). Melatonin and circadian control in mammals. *Experientia*, 45, 932-938.
- Aronin, N., Sagar, S.M., Sharp, F.R. and Schwartz, W.J. (1990). Light regulates expression of a Fos-related protein in rat suprachiasmatic nuclei. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 87, 5959-5962.
- Aronson, B.D., Johnson, K.A., Liu, Q. and Dunlap, J.C. (1992). Molecular analysis of the Neurospora clock: cloning and characterization of the frequency and period-4 genes. *Chronobiology International*, 9(3), 231-239.
- Aschoff, J. (1954). Zeitgeber der tierischen Tagesperiodik. *Naturwissenschaften*, 41(3), 5-56.
- Aschoff, J. (1959). Periodik licht- und dunkelaktiver Tiere unter konstanten Umgebungsbedingungen. *Pflügers Archiv*, 270, 9.
- Aschoff, J. (1960). Exogenous and endogenous components in circadian rhythms. *Cold Spring Harbor Symposia of Quantitative Biology*, 25, 11-28.
- Aschoff, J. (1963). Comparative Physiology: Diurnal Rhythms. *Annual Reviews of Physiology*, 25, 581-600.
- Aschoff, J. (1969). Phasenlage der Tagesperiodik in Abhängigkeit von Jahreszeit und Breitengrad. *Ökologia*, 3, 125-165.
- Azmitia, E.C. and Segal, M. (1978). An autoradiographic analysis of the differential ascending projections of the dorsal and median raphe nuclei in the rat. *The Journal of Comparative Neurology*, 179, 641-668.
- Barnes, N.M. and Sharp, T. (1999). A review of central 5-HT receptors and their function. *Neuropharmacology*, 38(8), 1083-1152.

- Barrington, J., Jarvis, H., Redman, J.R. and Armstrong, S.M. (1993). Limited effect of three types of daily stress on rat free-running locomotor rhythms. *Chronobiology International*, 10(6), 410-419.
- Biello, S.M., Golombek, D.A. and Harrington, M.E. (1997). Neuropeptide Y and glutamate block each other's phase shifts in the suprachiasmatic nucleus in vitro. *Neuroscience*, 77(4), 1049-1057.
- Biello, S.M., Janik, D. and Mrosovsky, N. (1994). Neuropeptide Y and behaviorally induced phase shifts. *Neuroscience*, 62(1), 273-279.
- Block, M. and Zucker, I. (1976). Circadian rhythms of rat locomotor activity after lesions of the midbrain raphe nuclei. *Journal of Comparative Physiology A*, 109, 235-247.
- Bobrzynska, K.J., Godfrey, M.H. and Mrosovsky, N. (1996b). Serotonergic stimulation and nonphotic phase-shifting in hamsters. *Physiology and Behavior*, 59(2), 221-230.
- Bobrzynska, K.J., Vrang, N. and Mrosovsky, N. (1996a). Persistence of nonphotic phase shifts in hamsters after serotonin depletion in the suprachiasmatic nucleus. *Brain Research*, 741(1-2), 205-214.
- Boess, F.G. and Martin, I.L. (1994). Molecular biology of 5-HT receptors. *Neuropharmacology*, 33(3-4), 275-317.
- Bos, N.P.A. and Mirmiran, M. (1990). Circadian rhythms in spontaneous neuronal discharges of the cultured suprachiasmatic nucleus. *Brain Research*, 511, 158-162.
- Boschert, U., Amara, D.A., Segu, L. and Hen, R. (1994). The mouse 5-hydroxytryptamine<sub>1B</sub> receptor is localized predominantly on axon terminals. *Neuroscience*, 58(1), 167-182.
- Boulos, Z. and Rusak, B. (1982). Circadian phase response curves for dark pulses in the hamster. *Journal of Comparative Physiology A*, 146, 411-417.
- Bravo, R. (1990). Growth factor inducible genes in fibroblasts. In A. Habenicht (Ed.), *Growth Factors, Differentiation Factors and Cytokines*. Berlin: Springer-Verlag, 324-343.
- Cagampang, F.R.A., Yamazaki, S., Otori, Y. and Inouye, S.-I.T. (1993). Serotonin in the raphe nuclei: Regulation by light and an endogenous pacemaker. *NeuroReport*, 4, 49-52.
- Calzá, L., Giardino, L., Zanni, M., Velardo, A., Parchi, P. and Marrama, P. (1990). Daily changes of neuropeptide Y-like immunoreactivity in the suprachiasmatic nucleus of the rat. *Regulatory Peptides*, 27, 127-137.
- Card, J.P., Brecha, N., Karten, H.J. and Moore, R.Y. (1981). Immunocytochemical localization of vasoactive intestinal polypeptide-containing cells and processes in the suprachiasmatic nucleus of the rat: light and electron microscopic analysis. *Journal of Neuroscience*, 1(11), 1289-1303.
- Card, J.P. and Moore, R.Y. (1989). Organization of lateral geniculate-hypothalamic connections in the rat. *The Journal of Comparative Neurology*, 284, 135-147.
- Carter, D.A. and Murphy, D. (1989). Diurnal rhythm of vasopressin mRNA species in the rat suprachiasmatic nucleus: independence of neuroendocrine modulation and maintenance in explant culture. *Molecular Brain Research*, 6, 233-239.



- Challet, E., Scarbrough, K., Penev, P.D. and Turek, F.W. (1998). Roles of suprachiasmatic nuclei and intergeniculate leaflets in mediating the phase-shifting effects of a serotonergic agonist and their photic modulation during subjective day. *Journal of Biological Rhythms*, 13(5), 410-421.
- Chaouloff, F. (1989). Physical exercise and brain monoamines: A review. *Acta Physiologica Scandinavica*, 137, 1-13.
- Cloudsley-Thompson, J.L. (1960). Adaptive functions of circadian rhythms. *Cold Spring Harbor Symposia of Quantitative Biology*, 25, 345-355.
- Coindet, J., Chouvet, G. and Mouret, J. (1975). Effects of lesions of the suprachiasmatic nuclei on paradoxical sleep and slow wave sleep circadian rhythms in the rat. *Neuroscience Letters*, 1, 243-247.
- Colecchia, E.F., Penev, P.P., Zee, P.C. and Turek, F.W. (1996). Phase-shifting effects of a serotonin agonist in tau mutant hamsters. *Brain Research*, 730, 227-231.
- Colwell, C.S., Max, M., Hudson, D. and Menaker, M. (1991). Excitatory amino acid receptors may mediate the effects of light on the reproductive system of the golden hamster. *Biology of Reproduction*, 44(4), 604-608.
- Colwell, C.S., Ralph, M.R. and Menaker, M. (1990). Do NMDA receptors mediate the effects of light on circadian behavior? *Brain Research*, 523, 117-120.
- Currie, P.J. and Coscina, D.V. (1993). Diurnal variations in the feeding response to 8-OH-DPAT injected into the dorsal or median raphe. *NeuroReport*, 4(9), 1105-1107.
- Cutrera, R.A., Kalsbeek, A. and Pévet, P. (1994a). Specific destruction of serotonergic afferents to the suprachiasmatic nuclei prevents triazolam-induced phase advances of hamster activity rhythms. *Behavioural Brain Research*, 62, 21-28.
- Cutrera, R.A., Ouarour, A. and Pévet, P. (1994b). Effects of the 5-HT<sub>1A</sub> receptor agonist 8-OH-DPAT and other non-photoc stimuli on the circadian rhythm of wheel-running activity in hamsters under different constant conditions. *Neuroscience Letters*, 172, 27-30.
- Cutrera, R.A., Saboureau, M. and Pévet, P. (1996). Phase-shifting effect of 8-OH-DPAT, a 5-HT<sub>1A</sub>/5-HT<sub>7</sub> receptor agonist, on locomotor activity in golden hamster in constant darkness. *Neuroscience Letters*, 210, 1-4.
- Daan, S. and Pittendrigh, C.S. (1976). A functional analysis of circadian pacemakers in nocturnal rodents II. The variability of phase response curves. *Journal of Comparative Physiology A*, 106, 253-266.
- Dark, J. and Asdourian, D. (1975). Entrainment of the rat's activity rhythm by cyclic light following lateral geniculate nucleus lesions. *Physiology and Behavior*, 15, 295-301.
- de Mairan, J.J. (1729). Observation botanique. *Histoire de l'Academie Royale des Sciences*, 35-36.
- Decavel, C. and van den Pol, A.N. (1990). GABA: A dominant neurotransmitter in the hypothalamus. *Journal of Comparative Neurology*, 302, 1019-1037.

- DiNardo, L.A., Dudley, T.E. and Glass, J.D. (1998). Pharmacological and electrical manipulations of median and dorsal raphe activity: Effects on 5-HT release in hamster SCN. *Society for Research on Biological Rhythms Abstracts*, 6, 79.
- Dudley, T.E., DiNardo, L.A. and Glass, J.D. (1998). Endogenous regulation of serotonin release in the hamster suprachiasmatic nucleus. *Journal of Neuroscience*, 18(13), 5045-5052.
- Dunlap, J.C. (1999). Molecular bases for circadian clocks. *Cell*, 96, 271-290.
- Earnest, D.J., Iadarola, M., Yeh, H.H. and Olschowka, J.A. (1990). Photic regulation of c-fos expression in neural components governing the entrainment of circadian rhythms. *Experimental Neurology*, 109, 353-361.
- Earnest, D.J. and Sladek, C.D. (1986). Circadian rhythms of vasopressin release from individual rat suprachiasmatic explants in vitro. *Brain Research*, 382, 129-133.
- Ebling, F.J.P. (1996). The role of glutamate in the photic regulation of the suprachiasmatic nucleus. *Progress in Neurobiology*, 50(2-3), 109-123.
- Edelstein, K. and Amir, S. (1995). Non-photic manipulations induce expression of Fos protein in the suprachiasmatic nucleus and intergeniculate leaflet in the rat. *Brain Research*, 690, 254-258.
- Edelstein, K. and Amir, S. (1999). The role of the intergeniculate leaflet in entrainment of circadian rhythms to a skeleton photoperiod. *Journal of Neuroscience*, 19(1), 372-380.
- Edgar, D.M., Miller, J.D., Prosser, R.A., Dean, R.R. and Dement, W.C. (1993). Serotonin and the mammalian circadian system: II. Phase-shifting rat behavioral rhythms with serotonergic agonists. *Journal of Biological Rhythms*, 8(1), 17-31.
- Eichler, V.B. and Moore, R.Y. (1974). The primary and accessory optic systems in the golden hamster, *Mesocricetus auratus*. *Acta Anatomica*, 89(3), 359-371.
- Gillespie, C.F., Huhman, K.L., Babagbemi, T.O. and Albers, H.E. (1996). Bicuculline increases and muscimol reduces the phase-delaying effects of light and VIP/PHI/GRP in the suprachiasmatic region. *Journal of Biological Rhythms*, 11(2), 137-144.
- Gillespie, C.F., Mintz, E.M., Marvel, C.L., Huhman, K.L. and Albers, H.E. (1997). GABA<sub>A</sub> and GABA<sub>B</sub> agonists and antagonists alter the phase-shifting effects of light when microinjected into the suprachiasmatic region. *Brain Research*, 759(2), 181-189.
- Gillette, M.U. (1986). The suprachiasmatic nuclei: Circadian phase-shifts induced at the time of hypothalamic slice preparation are preserved in vitro. *Brain Research*, 379, 176-181.
- Ginty, D.D., Glowacka, D., Bader, D.S., Hidaka, H. and Wagner, J.A. (1991). Induction of immediate early genes by Ca<sup>2+</sup> influx requires cAMP-dependent protein kinase in PC12 cells. *Journal of Biological Chemistry*, 266(26), 17454-17458.
- Glass, J.D., Hauser, U.E., Randolph, W.W., Rea, M.A. and De Vries, M.J. (1993). *In vivo* microdialysis of 5-hydroxyindoleacetic acid and glutamic acid in the hamster suprachiasmatic nuclei. *American Zoologist*, 33, 212-218.
- Glass, J.D., Selim, M. and Rea, M.A. (1994). Modulation of light-induced c-Fos expression in the suprachiasmatic nuclei by 5-HT<sub>1A</sub> receptor agonists. *Brain Research*, 638, 235-242.

- Green, D.J. and Gillette, R. (1982). Circadian rhythm of firing rate recorded from single cells in the rat suprachiasmatic brain slice. *Brain Research*, 245, 198-200.
- Groos, G.A., Mason, R. and Meijer, J. (1983). Electrical and pharmacological properties of the suprachiasmatic nuclei. *Federation Proceedings*, 42, 2790-2795.
- Grosse, J., Loudon, A.S. and Hastings, M.H. (1995). Behavioural and cellular responses to light of the circadian system of tau mutant and wild-type Syrian hamsters. *Neuroscience*, 65(2), 587-597.
- Gustafson, E.L., Durkin, M.M., Bard, J.A., Zgombick, J. and Branchek, T.A. (1996). A receptor autoradiographic and in situ hybridization analysis of the distribution of the 5-HT<sub>7</sub> receptor in rat brain. *British Journal of Pharmacology*, 117, 657-666.
- Halberg, F. (1959). Physiologic 24-hour periodicity; general and procedural considerations with reference to the adrenal cycle. *Zeitschrift für Vitamin-, Hormon- und Fermentforschung*, 10, 225-296.
- Hannibal, J., Ding, J.M., Chen, D., Fahrenkrug, J., Larsen, P.J., Gillette, M.U. and Mikkelsen, J.D. (1997). Pituitary adenylate cyclase-activating peptide (PACAP) in the retinohypothalamic tract: a potential daytime regulator of the biological clock. *Journal of Neuroscience*, 17(7), 2637-2644.
- Harrington, M.E., Nance, D.M. and Rusak, B. (1985). Neuropeptide Y immunoreactivity in the hamster geniculo-suprachiasmatic tract. *Brain Research Bulletin*, 15, 465-472.
- Harrington, M.E. and Rusak, B. (1986). Lesions of the thalamic intergeniculate leaflet alter hamster circadian rhythms. *Journal of Biological Rhythms*, 1(4), 309-325.
- Hastings, M. (1995). Circadian rhythms: peering into the molecular clockwork. *Journal of Neuroendocrinology*, 7(5), 331-340.
- Hastings, M.H., Mead, S.M., Vindlacheruvu, R.R., Ebling, F.J.P., Maywood, E.S. and Grosse, J. (1992). Non-photic phase shifting of the circadian activity rhythm of Syrian hamsters: The relative potency of arousal and melatonin. *Brain Research*, 591, 20-26.
- Hendrickson, A.E., Wagoner, N. and Cowan, W.M. (1972). An autoradiographic and electron microscopic study of retinohypothalamic connections. *Zeitschrift für Zellforschung*, 135, 1-26.
- Hery, M., Faudon, M., Dusticier, G. and Hery, F. (1982). Daily variations in serotonin metabolism in the suprachiasmatic nucleus of the rat: influence of oestradiol impregnation. *Journal of Endocrinology*, 94(2), 157-166.
- Hickey, T.L. and Spear, P.D. (1976). Retinogeniculate projections in hooded and albino rats: an autoradiographic study. *Experimental Brain Research*, 24(5), 523-529.
- Hoffman, B.J. and Mezey, E. (1989). Distribution of serotonin 5-HT<sub>1C</sub> receptor mRNA in adult rat brain. *FEBS Letters*, 247(2), 453-462.
- Hoyer, D., Clarke, D.E., Fozard, J.R., Hartig, P.R., Martin, G.R., Mylecharane, E.J., Saxena, P.R. and Humphrey, P.P. (1994). International Union of Pharmacology classification of receptors for 5- hydroxytryptamine (Serotonin). *Pharmacological Reviews*, 46(2), 157-203.

- Hoyer, D. and Martin, G.R. (1996). Classification and nomenclature of 5-HT receptors: A comment on current issues. *Behavioural Brain Research*, 73, 263-268.
- Huang, S.-K. and Pan, J.-T. (1993). Potentiating effects of serotonin and vasoactive intestinal peptide on the action of glutamate on suprachiasmatic neurons in brain slices. *Neuroscience Letters*, 159, 1-4.
- Hughes, P. and Dragunow, M. (1995). Induction of immediate-early genes and the control of neurotransmitter-regulated gene expression within the nervous system. *Pharmacological Reviews*, 47(1), 133-178.
- Huhman, K.L., Marvel, C.L., Gillespie, C.F., Mintz, E.M. and Albers, H.E. (1997). Tetrodotoxin blocks NPY-induced but not muscimol-induced phase advances of wheel-running activity in Syrian hamsters. *Brain Research*, 772(1-2), 176-180.
- Inouye, S.-I.T. and Kawamura, H. (1979). Persistence of circadian rhythmicity in a mammalian hypothalamic "island" containing the suprachiasmatic nucleus. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 76(11), 5962-5966.
- Inouye, S.-I.T. and Kawamura, H. (1982). Characteristics of a circadian pacemaker in the suprachiasmatic nucleus. *Journal of Comparative Physiology A*, 146, 153-160.
- Inouye, S.-I.T., Shinohara, K., Tominaga, K., Takeuchi, J., Nagasaki, H., Isobe, Y., Fukuhara, C., Otori, Y., Yang, J., Champang, F.R.A., Yamazaki, S. and Tokumasu, A. (1993). Circadian rhythms in peptides and their precursor messenger RNAs in the suprachiasmatic nucleus. In Y. Oomura & K. Nagai (Eds.), *New Functional Aspects of the Suprachiasmatic Nucleus of the Hypothalamus*: John Libbey & Company, Ltd., 219-233.
- Jacobs, B.L., Wilkinson, L.O. and Fornal, C.A. (1990). The role of brain serotonin. A neurophysiologic perspective. *Neuropsychopharmacology*, 3(5-6), 473-479.
- Janik, D., Mikkelsen, J.D. and Mrosovsky, N. (1995). Cellular colocalization of Fos and neuropeptide Y in the intergeniculate leaflet after nonphotic phase-shifting events. *Brain Research*, 698, 137-145.
- Janik, D. and Mrosovsky, N. (1992). Gene expression in the geniculate induced by a nonphotic circadian phase shifting stimulus. *NeuroReport*, 3, 575-578.
- Janik, D. and Mrosovsky, N. (1994). Intergeniculate leaflet lesions and behaviorally-induced shifts of circadian rhythms. *Brain Research*, 651, 174-182.
- Jiang, Z.-G., Allen, C.N. and North, R.A. (1995). Presynaptic inhibition by baclofen of retinohypothalamic excitatory synaptic transmission in rat suprachiasmatic nucleus. *Neuroscience*, 813-819.
- Johnson, C.H. (1990). *An atlas of phase response curves for circadian and circatidal rhythms*: Dept. of Biology, Vanderbilt University, Nashville TN.
- Johnson, R.F., Moore, R.Y. and Morin, L.P. (1988c). Loss of entrainment and anatomical plasticity after lesions of the hamster retinohypothalamic tract. *Brain Research*, 460(2), 297-313.

- Johnson, R.F., Morin, L.P. and Moore, R.Y. (1988a). Retinohypothalamic projections in the hamster and rat demonstrated using cholera toxin. *Brain Research*, 462, 301-312.
- Johnson, R.F., Smale, L., Moore, R.Y. and Morin, L.P. (1988b). Lateral geniculate lesions block circadian phase-shift responses to a benzodiazepine. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 85, 5301-5304.
- Kawahara, F., Saito, H. and Katsuki, H. (1994). Inhibition by 5-HT<sub>7</sub> receptor stimulation of GABA<sub>A</sub> receptor-activated current in cultured rat suprachiasmatic neurones. *Journal of Physiology (Lond)*, 478(Pt 1), 67-73.
- Kawano, H., Decker, K. and Reuss, S. (1996). Is there a direct retina-raphé-suprachiasmatic nucleus pathway in the rat? *Neuroscience Letters*, 212, 143-146.
- Kennaway, D.J. and Moyer, R.W. (1998). Serotonin 5-HT<sub>2c</sub> agonists mimic the effect of light pulses on circadian rhythms. *Brain Research*, 806, 257-270.
- Kennaway, D.J. and Moyer, R.W. (1999). MK-801 administration blocks the effects of a 5-HT(2A/2C) agonist on melatonin rhythmicity and c-fos induction in the suprachiasmatic nucleus. *Brain Research*, 845(1), 102-106.
- Kennaway, D.J., Rowe, S.A. and Ferguson, S.A. (1996). Serotonin agonists mimic the phase shifting effects of light on the melatonin rhythm in rats. *Brain Research*, 737, 301-307.
- Kilduff, T.S., Landel, H.B., Nagy, G.S., Sutin, E.L., Dement, W.C. and Heller, H.C. (1992). Melatonin influences Fos expression in the rat suprachiasmatic nucleus. *Molecular Brain Research*, 16, 47-56.
- Klein, D.C., Moore, R.Y. and Reppert, S.M. (1991). *Suprachiasmatic Nucleus: The Mind's clock*. Oxford: Oxford University Press.
- Kohler, M., Kalkowski, A. and Wollnik, F. (1999). Serotonin agonist quipazine induces photic-like phase shifts of the circadian activity rhythm and c-Fos expression in the rat suprachiasmatic nucleus. *Journal of Biological Rhythms*, 14(2), 131-140.
- Konopka, R.J. and Benzer, S. (1971). Clock mutants of *Drosophila melanogaster*. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 68(9), 2112-2116.
- Kornhauser, J.M., Ginty, D.D., Greenberg, M.E., Mayo, K.E. and Takahashi, J.S. (1996b). Light entrainment and activation of signal transduction pathways in the SCN. *Progress in Brain Research*, 111, 133-146.
- Kornhauser, J.M., Mayo, L.E. and Takahashi, J.S. (1996a). Light, immediate-early genes, and circadian rhythms. *Behavior Genetics*, 26(3), 221-240.
- Kornhauser, J.M., Nelson, D.E., Mayo, K.E. and Takahashi, J.S. (1990). Photic and circadian regulation of c-fos gene expression in the hamster suprachiasmatic nucleus. *Neuron*, 5, 127-134.
- Kornhauser, J.M., Nelson, D.E., Mayo, K.E. and Takahashi, J.S. (1992). Regulation of jun-B messenger RNA and AP-1 activity by light and a circadian clock, *Science*, 1581-1584.

- Lehman, M.N., Silver, R., Gladstone, W.R., Kahn, R.M., Gibson, M. and Bittman, E.L. (1987). Circadian rhythmicity restored by neural transplant. Immunocytochemical characterization of the graft and its integration with the host brain. *Journal of Neuroscience*, 7(6), 1626-1638.
- Levine, J.D., Rosenwasser, A.M., Yanovsky, J.A. and Adler, N.T. (1986). Circadian activity rhythms in rats with midbrain raphe lesions. *Brain Research*, 384, 240-249.
- Liou, S.Y., Shibata, S., Iwasaki, K. and Ueki, S. (1986). Optic nerve stimulation-induced increase of release of  $^3\text{H}$ -glutamate and  $^3\text{H}$ -aspartate but not  $^3\text{H}$ -GABA from the suprachiasmatic nucleus in slices of rat hypothalamus. *Brain Research Bulletin*, 16, 527-531.
- Liu, C., Weaver, D.R., Strogatz, S.H. and Reppert, S.M. (1997). Cellular construction of a circadian clock: Period determination in the suprachiasmatic nuclei. *Cell*, 91(6), 855-860.
- Lodge, D. and Johnson, K.M. (1990). Noncompetitive excitatory amino acid receptor antagonists. *Trends in Pharmacological Science*, 11(2), 81-86.
- Lovenberg, T.W., Baron, B.M., de Lecea, L., Miller, J.D., Prosser, R.A., Rea, M.A., Foye, P.E., Racke, M., Slone, A.L., Siegel, B.W., Danielson, P.E., Sutcliffe, J.G. and Erlander, M.G. (1993). A novel adenylyl cyclase-activating serotonin receptor (5-HT<sub>7</sub>) implicated in the regulation of mammalian circadian rhythms. *Neuron*, 11, 449-458.
- Manrique, C., Bosler, O., Becquet, D., Héry, F., Faudon, M. and Francois-Bellan, A.M. (1998). Post-lesion up-regulation of 5-HT<sub>1B</sub> binding sites in the suprachiasmatic nucleus may be reversed after spontaneous or graft-induced serotonin reinnervation. *Brain Research*, 788, 332-336.
- Manrique, C., Francis-Bellan, A.M., Segu, L., Becquet, D., Héry, M., Faudon, M. and Héry, F. (1994). Impairment of serotonergic transmission is followed by adaptive changes in 5-HT<sub>1B</sub> binding sites in the rat suprachiasmatic nucleus. *Brain Research*, 663, 93-100.
- Manrique, c., Héry, F., Faudon, M. and Francois-Bellan, A.M. (1999). Indirect evidence for an association of 5-HT<sub>1B</sub> binding sites with retinal and geniculate axon terminals in the rat suprachiasmatic nucleus. *Synapse*, 33, 314-323.
- Manrique, C., Segu, L., Héry, F., Héry, M., Faudon, M. and Francois-Bellan, A.M. (1993). Increase of central 5-HT<sub>1B</sub> binding sites following 5,7-dihydroxytryptamine axotomy in the adult rat. *Brain Research*, 632, 345-348.
- Marchant, E.G. and Mistlberger, R.E. (1996). Entrainment and phase shifting of circadian rhythms in mice by forced treadmill running. *Physiology and Behavior*, 60(2), 657-663.
- Marchant, E.G., Watson, N.V. and Mistlberger, R.E. (1997). Both neuropeptide Y and serotonin are necessary for entrainment of circadian rhythms in mice by daily treadmill running schedules. *Journal of Neuroscience*, 17(20), 7974-7987.
- Mason, R. (1986). Circadian variation in sensitivity of suprachiasmatic and lateral geniculate neurones to 5-hydroxytryptamine in the rat. *Journal of Physiology*, 377, 1-13.
- McArthur, A.J., Gillette, M.U. and Prosser, R.A. (1991). Melatonin directly resets the rat suprachiasmatic circadian clock in vitro. *Brain Research*, 565, 158-161.

- Mead, S., Ebling, F.J.P., Maywood, E.S., Humby, T., Herbert, J. and Hastings, M.H. (1992). A nonphotic stimulus causes instantaneous phase advances of the light-entrainable circadian oscillator of the Syrian hamster but does not induce the expression of c-fos in the suprachiasmatic nuclei. *Journal of Neuroscience*, 12(7), 2516-2522.
- Medanic, M. and Gillette, M.U. (1992). Serotonin regulates the phase of the rat suprachiasmatic circadian pacemaker in vitro only during the subjective day. *Journal of Physiology*, 450, 629-642.
- Meerlo, P. and Daan, S. (1998). Aggressive and sexual social stimuli do not phase shift the circadian temperature rhythm in rats. *Chronobiology International*, 15, 231-240.
- Meijer, J.H. and Rietveld, W.J. (1989). Neurophysiology of the suprachiasmatic circadian pacemaker in rodents. *Physiological Reviews*, 69(3), 671-707.
- Meijer, J.H., van der Zee, E.A. and Dietz, M. (1988). Glutamate phase shifts circadian rhythms in hamsters. *Neuroscience Letters*, 86, 177-183.
- Menaker, M. (1959). Endogenous rhythms of body temperature in hibernating bats. *Nature*, 184(4694), 1251-1252.
- Meyer, D.C. and Quay, W.B. (1976). Hypothalamic and suprachiasmatic uptake of serotonin in vitro: twenty- four-hour changes in male and proestrous female rats. *Endocrinology*, 98(5), 1160-1165.
- Meyer, E.L., Harrington, M.E. and Rahmani, T. (1993). A phase-response curve to the benzodiazepine chlordiazepoxide and the effect of geniculo-hypothalamic tract ablation. *Physiology and Behavior*, 53, 237-243.
- Meyer-Bernstein, E.L., Blanchard, J.H. and Morin, L.P. (1997). The serotonergic projection from the median raphe nucleus to the suprachiasmatic nucleus modulates activity phase onset, but not other circadian rhythm parameters. *Brain Research*, 755(1), 112-120.
- Meyer-Bernstein, E.L. and Morin, L.P. (1996). Differential serotonergic innervation of the suprachiasmatic nucleus and the intergeniculate leaflet and its role in circadian rhythm modulation. *Journal of Neuroscience*, 16(6), 2097-2111.
- Meyer-Bernstein, E.L. and Morin, L.P. (1999). Electrical stimulation of the median or dorsal raphe nuclei reduces light-induced FOS protein in the suprachiasmatic nucleus and causes circadian activity rhythm phase shifts. *Neuroscience*, 92(1), 267-279.
- Mikkelsen, J.D., Larsen, P.J., Mick, G., Vrang, N., Ebeling, F.J.P., Maywood, E.S., Hastings, M.H. and Møller, M. (1995). Gating of retinal inputs through the suprachiasmatic nucleus: Role of excitatory neurotransmission. *Neurochemistry International*, 27(3), 263-272.
- Mikkelsen, J.D., Vrang, N. and Mrosovsky, N. (1998). Expression of Fos in the circadian system following nonphotic stimulation. *Brain Research Bulletin*, 47(4), 367-376.
- Miller, J.D. and Fuller, C.A. (1990). The response of suprachiasmatic neurons of the rat hypothalamus to photic and serotonergic stimulation. *Brain Research*, 515, 155-162.
- Miller, J.D., Morin, L.P., Schwartz, F.J. and Moore, R.Y. (1996). New insights into the mammalian circadian clock. *Sleep*, 19(8), 641-667.

- Mintz, E.M. and Albers, H.E. (1997). Microinjection of NMDA into the SCN region mimics the phase shifting effect of light in hamsters. *Brain Research*, 758(1-2), 245-249.
- Mintz, E.M., Gillespie, C.F., Marvel, C.L., Huhman, K.L. and Albers, H.E. (1997). Serotonergic regulation of circadian rhythms in Syrian hamsters. *Neuroscience*, 79(2), 563-569.
- Mistlberger, R.E., Bossert, J.M., Holmes, M.M. and Marchant, E.G. (1998). Serotonin and feedback effects of behavioral activity on circadian rhythms in mice. *Behavioural Brain Research*, 96(1-2), 93-99.
- Moga, M.M. and Moore, R.Y. (1997). Organization of neural inputs to the suprachiasmatic nucleus in the rat. *The Journal of Comparative Neurology*, 389, 508-534.
- Möhler, H., Schoch, P. and Richards, J.G. (1986). GABA/benzodiazepine receptor complex: function, structure and location. In R. Levi-Montalcini (Ed.), *Molecular Aspects of Neurobiology*. Berlin: Springer-Verlag, 91-96.
- Moore, R.Y. (1973). Retinohypothalamic projection in mammals: a comparative study. *Brain Research*, 49(2), 403-409.
- Moore, R.Y. (1992). The fourth C.U. Ariens Kappers lecture. The organization of the human circadian timing system. *Progress in Brain Research*, 93, 99-115.
- Moore, R.Y. (1996). Neural control of the pineal gland. *Behavioural Brain Research*, 73(1-2), 125-130.
- Moore, R.Y. and Card, J.P. (1994). Intergeniculate leaflet: An anatomically and functionally distinct subdivision of the lateral geniculate complex. *The Journal of Comparative Neurology*, 344, 403-430.
- Moore, R.Y. and Eichler, V.B. (1972). Loss of a circadian adrenal corticosterone rhythm following suprachiasmatic nucleus lesions in the rat. *Brain Research*, 42, 201-206.
- Moore, R.Y., Halaris, A.E. and Jones, B.E. (1978). Serotonin neurons of the midbrain raphe: Ascending projections. *The Journal of Comparative Neurology*, 180, 417-438.
- Moore, R.Y. and Klein, D.C. (1974). Visual pathways and the central neural control of a circadian rhythm in pineal serotonin N-acetyltransferase activity. *Brain Research*, 71, 17-33.
- Moore, R.Y. and Lenn, N.J. (1972). A retinohypothalamic projection in the rat. *The Journal of Comparative Neurology*, 146, 1-14.
- Moore, R.Y. and Speh, J.C. (1993). GABA is the principal neurotransmitter of the circadian system. *Neuroscience Letters*, 150(1), 112-116.
- Moore, R.Y., Speh, J.C. and Card, J.P. (1995). The retinohypothalamic tract originates from a distinct subset of retinal ganglion cells. *Journal of Comparative Neurology*, 352(3), 351-366.
- Moore-Ede, M.C., Sulzman, F.M. and Fuller, C.A. (1982). *The Clock That Times Us*, Cambridge MA: Harvard Press.
- Morgan, J.I. and Curran, T. (1991). Stimulus-transcription coupling in the nervous system: involvement of the inducible proto-oncogenes fos and jun. *Annual Reviews of Neuroscience*, 14, 421-451.
- Morin, L.P. (1994). The circadian visual system. *Brain Research*, 647, 102-127.



- Morin, L.P. (1999). Serotonin and the regulation of mammalian circadian rhythmicity. *Annual Reviews of Medicine*, 31(1), 12-33.
- Morin, L.P. and Blanchard, J. (1991). Depletion of brain serotonin by 5,7-DHT modifies hamster circadian rhythm response to light. *Brain Research*, 566, 173-185.
- Morin, L.P. and Meyer-Bernstein, E.L. (1999). The ascending serotonergic system in the hamster: comparison with projections of the dorsal and median raphe nuclei. *Neuroscience*, 91(1), 81-105.
- Moriya, T., Yamanouchi, S., Fukushima, T., Shimazoe, T., Shibata, S. and Watanabe, S. (1996). Involvement of 5-HT<sub>1A</sub> receptor mechanisms in the inhibitory effects of methamphetamine on photic responses in the rodent suprachiasmatic nucleus. *Brain Research*, 740(1-2), 261-267.
- Moyer, R.W. and Kennaway, D.J. (1999). Immunohistochemical localization of serotonin receptors in the rat suprachiasmatic nucleus. *Neuroscience Letters*, 271, 147-150.
- Moyer, R.W. and Kennaway, D.J. (2000). Serotonin depletion decreases light induced c-fos in the rat suprachiasmatic nucleus. *NeuroReport*, 11(05), 1021-1024.
- Moyer, R.W., Kennaway, D.J., Ferguson, S.A. and Dijkstra, Y.P. (1997). Quipazine and light have similar effects on c-fos induction in the rat suprachiasmatic nucleus. *Brain Research*, 765, 337-342.
- Mrosovsky, N. (1988). Phase response curves for social entrainment. *Journal of Comparative Physiology A*, 162, 35-46.
- Mrosovsky, N. (1996). Methods of measuring phase shifts: Why I continue to use an Aschoff Type II procedure despite the skepticism of referees. *Chronobiology International*, 13(5), 387-392.
- Mrosovsky, N., Reeb, S.G., Honrado, G.I. and Salmon, P.A. (1989). Behavioural entrainment of circadian rhythms. *Experientia*, 45, 696-702.
- Murakami, N. and Takahashi, K. (1983). Circadian rhythm of adenosine-3', 5'-monophosphate content in suprachiasmatic nucleus (SCN) and ventromedial hypothalamus (VMH) in the rat. *Brain Research*, 276, 297-304.
- Nayak, S.V., Ronde, P., Spier, A.D., Lummis, S.C. and Nichols, R.A. (1999). Calcium changes induced by presynaptic 5-hydroxytryptamine-3 serotonin receptors on isolated terminals from various regions of the rat brain. *Neuroscience*, 91(1), 107-117.
- Newman, G.C., Hospod, F.E., Patlak, C.S. and Moore, R.Y. (1992). Analysis of in vitro glucose utilization in a circadian pacemaker model. *Journal of Neuroscience*, 12(6), 2015-2021.
- Nishino, H. and Koizumi, K. (1977). Response of neurons in the suprachiasmatic nuclei of the hypothalamus to putative transmitters. *Brain Research*, 120, 167-172.
- O'Connor, J.J. and Kruk, Z.L. (1994). Effects of 21 days treatment with fluoxetine on stimulated endogenous 5-hydroxytryptamine overflow in the rat dorsal raphe and suprachiasmatic nucleus studied using fast cyclic voltammetry in vitro. *Brain Research*, 640, 328-335.

- Okamoto, S., Okamura, H., Miyake, M., Takahashi, Y., Takagi, S., Akagi, Y., Fukui, K., Okamoto, H. and Ibata, Y. (1991). A diurnal variation of vasoactive intestinal peptide (VIP) mRNA under a daily light-dark cycle in the rat suprachiasmatic nucleus, *Histochemistry*, 525-528.
- Ono, M., Watanabe, A., Matsumoto, Y., Fukushima, T., Nishikawa, Y., Moriya, T., Shibata, S. and Watanabe, S. (1996). Methamphetamine modifies the photic entraining responses in the rodent suprachiasmatic nucleus via serotonin release. *Neuroscience*, 72(1), 213-224.
- Ouyang, Y., Andersson, C.R., Kondo, T., Golden, S.S. and Johnson, C.H. (1998). Resonating circadian clocks enhance fitness in cyanobacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 95(15), 8660-8664.
- Ozaki, N., Nakahara, D., Kasahara, Y. and Nagatsu, T. (1991). The effect of methamphetamine on serotonin and its metabolite in the suprachiasmatic nucleus. A microdialysis study. *Journal of Neural Transmission*, 86, 175-179.
- Penev, P.D., Turek, F.W., Wallen, E.P. and Zee, P.C. (1997). Aging alters the serotonergic modulation of light-induced phase advances in golden hamsters. *American Journal of Physiology*, 272(2), R509-R513.
- Penev, P.D., Zee, P.C. and Turek, F.W. (1994). Monoamine depletion blocks triazolam-induced phase advances of the circadian clock in hamsters. *Brain Research*, 637, 255-261.
- Peters, R.V., Aronin, N. and Schwartz, W.J. (1996). c-Fos expression in the rat intergeniculate leaflet: photic regulation, co-localization with Fos-B, and cellular identification. *Brain Research*, 728(2), 231-241.
- Pickard, G.E. (1982). The afferent connections of the suprachiasmatic nucleus of the golden hamster with emphasis on the retinohypothalamic projection. *Journal of Comparative Neurology*, 211(1), 65-83.
- Pickard, G.E. (1985). Bifurcating axons of retinal ganglion cells terminate in the hypothalamic suprachiasmatic nucleus and the intergeniculate leaflet of the thalamus. *Neuroscience Letters*, 55(2), 211-217.
- Pickard, G.E. (1989). Entrainment of the circadian rhythm of wheel-running activity is phase shifted by ablation of the intergeniculate leaflet. *Brain Research*, 494(1), 151-154.
- Pickard, G.E., Ralph, M.R. and Menaker, M. (1987). The intergeniculate leaflet partially mediates effects of light on circadian rhythms. *Journal of Biological Rhythms*, 2(1), 35-56.
- Pickard, G.E. and Rea, M.A. (1997). TFMPP, a 5HT<sub>1B</sub> receptor agonist, inhibits light-induced phase shifts of the circadian activity rhythm and c-FOS expression in the mouse suprachiasmatic nucleus. *Neuroscience Letters*, 231, 95-98.
- Pickard, G.E., Weber, E.T., Scott, P.A., Riberdy, A.F. and Rea, M.A. (1996). 5HT<sub>1B</sub> receptor agonists inhibit light-induced phase shifts of behavioral circadian rhythms and expression of the immediate-early gene c-fos in the suprachiasmatic nucleus. *Journal of Neuroscience*, 16(24), 8208-8220.

- Pittendrigh, C.S. (1954). On temperature independence in the clock system controlling emergence time in *Drosophila*. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 40, 1018-1029.
- Pittendrigh, C.S. (1981). Circadian systems: Entrainment. In J. Aschoff (Ed.), *Handbook of Behavioral Neurobiology: Biological Rhythms*. New York: Plenum Press, 95-124.
- Pittendrigh, C.S. and Caldarola, P.C. (1973). General homeostasis of the frequency of circadian oscillations. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 70(9), 2697-2701.
- Pittendrigh, C.S. and Daan, S. (1976a). A functional analysis of circadian pacemakers in nocturnal rodents I. The stability and lability of spontaneous frequency. *Journal of Comparative Physiology A*, 106, 223-251.
- Pittendrigh, C.S. and Daan, S. (1976b). A functional analysis of circadian pacemakers in nocturnal rodents. IV. Entrainment: Pacemaker as a clock. *Journal of Comparative Physiology A*, 106, 291-331.
- Poeggeler, B.H., Barlow-Walden, L.R., Reiter, R.J., Saarela, S., Menendez-Pelaez, A., Yaga, K., Manchester, L.C., Chen, L.D. and Tan, D.X. (1995). Red-light-induced suppression of melatonin synthesis is mediated by N-methyl-D-aspartate receptor activation in retinally normal and retinally degenerate rats. *Journal of Neurobiology*, 28(1), 1-8.
- Prosser, R.A. (1998). Neuropeptide Y blocks serotonergic phase shifts of the suprachiasmatic circadian clock in vitro. *Brain Research*, 808(1), 31-41.
- Prosser, R.A., Dean, R.R., Edgar, D.M., Heller, H.C. and Miller, J.D. (1993). Serotonin and the mammalian circadian system: I. In vitro phase shifts by serotonergic agonists and antagonists. *Journal of Biological Rhythms*, 8(1), 1-16.
- Prosser, R.A. and Gillette, M.U. (1989). The mammalian circadian clock in the suprachiasmatic nuclei is reset in vitro by cAMP. *Journal of Neuroscience*, 9(3), 1073-1081.
- Prosser, R.A. and Gillette, M.U. (1991). Cyclic changes in cAMP concentration and phosphodiesterase activity in a mammalian circadian clock studied in vitro. *Brain Research*, 568, 185-192.
- Prosser, R.A., Heller, H.C. and Miller, J.D. (1992). Serotonergic phase shifts of the mammalian circadian clock: Effects of tetrodotoxin and high  $Mg^{2+}$ . *Brain Research*, 573, 336-340.
- Prosser, R.A., Macdonald, E.S. and Heller, H.C. (1994). *c-fos* mRNA in suprachiasmatic nuclei in vitro shows a circadian rhythm and responds to a serotonergic agonist. *Molecular Brain Research*, 25, 151-156.
- Prosser, R.A., Miller, J.D. and Heller, H.C. (1990). A serotonin agonist phase-shifts the circadian clock in the suprachiasmatic nuclei in vitro. *Brain Research*, 534, 336-339.
- Ralph, M.R., Foster, R.G., Davis, F.C. and Menaker, M. (1990). Transplanted suprachiasmatic nucleus determines circadian period. *Science*, 247, 975-978.
- Ralph, M.R., Hurd, M.W., Takeuchi, J., Melo, L., Mathur, A. and Golombek, D.A. (1996). Regulation and integration in the mammalian circadian system. *Progress in Brain Research*, 111, 191-203.

- Ralph, M.R. and Menaker, M. (1985). Bicuculline blocks circadian phase delays but not advances. *Brain Research*, 325, 362-365.
- Ralph, M.R. and Menaker, M. (1989). GABA regulation of circadian responses to light. I. Involvement of GABA<sub>a</sub>-benzodiazepine and GABA<sub>b</sub> receptors. *Journal of Neuroscience*, 9(8), 2858-2865.
- Rea, M.A. (1989). Light increases Fos-related protein immunoreactivity in the rat suprachiasmatic nuclei. *Brain Research Bulletin*, 23, 577-581.
- Rea, M.A., Barrera, J., Glass, J.D. and Gannon, R.L. (1995). Serotonergic potentiation of photic phase shifts of the circadian activity rhythm. *NeuroReport*, 6, 1289-1292.
- Rea, M.A., Glass, J.D. and Colwell, C.S. (1994). Serotonin modulates photic responses in the hamster suprachiasmatic nuclei. *Journal of Neuroscience*, 14(6), 3635-3642.
- Recio, J., Pévet, P. and Masson-Pévet, M. (1996). Serotonergic modulation of photically induced increase in melatonin receptor density and fos immunoreactivity in the suprachiasmatic nuclei of the rat. *Journal of Neuroendocrinology*, 8(11), 839-845.
- Reebs, S.G. and Mrosovsky, N. (1989). Effects of induced wheel running on the circadian activity rhythms of Syrian hamsters: Entrainment and phase response curve. *Journal of Biological Rhythms*, 4(1), 39-48.
- Richter, C.P. (1967). Sleep and activity: Their relation to the 24-hour clock, *Association for Research in Nervous and Medical Disease. Sleep and Altered States of Consciousness*. Baltimore: The Williams & Wilkins Company, 8-29.
- Roca, A.L., Weaver, D.R. and Reppert, S.M. (1993). Serotonin receptor gene expression in the rat suprachiasmatic nuclei. *Brain Research*, 608, 159-165.
- Rosenwasser, A.M. and Adler, N.T. (1986). Structure and function in circadian timing systems: evidence for multiple coupled circadian oscillators. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 10, 431-448.
- Rowe, S.A. and Kennaway, D.J. (1996). Effect of NMDA receptor blockade on melatonin and activity rhythm responses to a light pulse in rats. *Brain Research Bulletin*, 41(6), 351-358.
- Rusak, B. (1977). Involvement of the primary optic tracts in mediation of light effects on hamster circadian rhythms. *Journal of Comparative Physiology*, 118, 165-172.
- Rusak, B., Meijer, J.H. and Harrington, M.E. (1989). Hamster circadian rhythms are phase-shifted by electrical stimulation of the geniculo-hypothalamic tract. *Brain Research*, 493, 283-291.
- Rusak, B., Robertson, H.A., Wisden, W. and Hunt, S.P. (1990). Light pulses that shift rhythms induce gene expression in the suprachiasmatic nucleus. *Science*, 248, 1237-1240.
- Saavedra, J.M., Palkovits, M., Brownstein, M.J. and Axelrod, J. (1974). Serotonin distribution in the nuclei of the rat hypothalamus and preoptic region. *Brain Research*, 77(1), 157-165.
- Sawaki, Y., Nihonmatsu, I. and Kawamura, H. (1984). Transplantation of the neonatal suprachiasmatic nuclei into rats with complete bilateral suprachiasmatic lesions. *Neuroscience Research*, 1, 67-72.

- Schwartz, W.J., Aronin, N., Takeuchi, J., Bennett, M.R. and Peters, R.V. (1995). Towards a molecular biology of the suprachiasmatic nucleus: Photic and temporal regulation of c-fos gene expression. *Seminars in the Neurosciences*, 7, 53-60.
- Schwartz, W.J., Davidsen, L.C. and Smith, C.B. (1980). In vivo metabolic activity of a putative circadian oscillator, the rat suprachiasmatic nucleus. *Journal of Comparative Neurology*, 189(1), 157-167.
- Schwartz, W.J., Peters, R.V., Aronin, N. and Bennett, M.R. (1996). Unexpected c-fos gene expression in the suprachiasmatic nucleus of mice entrained to a skeleton photoperiod. *Journal of Biological Rhythms*, 11(1), 35-44.
- Schwartz, W.J., Takeuchi, J., Shannon, W., Davis, E.M. and Aronin, N. (1994). Temporal regulation of light-induced fos and fos-like protein expression in the ventrolateral subdivision of the rat suprachiasmatic nucleus. *Neuroscience*, 58, 573-583.
- Selim, M., Glass, J.D., Hauser, U.E. and Rea, M.A. (1993). Serotonergic inhibition of light-induced fos protein expression and extracellular glutamate in the suprachiasmatic nuclei. *Brain Research*, 621, 181-188.
- Shen, H. and Semba, K. (1994). A direct retinal projection to the dorsal raphe nucleus in the rat. *Brain Research*, 635, 159-168.
- Sheng, M. and Greenberg, M.E. (1990). The regulation and function of c-fos and other immediate early genes in the nervous system. *Neuron*, 4(4), 477-85.
- Shibata, S. and Moore, R.Y. (1993). Neuropeptide Y and optic chiasm stimulation affect suprachiasmatic nucleus circadian function in vitro. *Brain Research*, 615, 95-100.
- Shibata, S., Oomura, Y., Kita, H. and Hattori, K. (1982). Circadian rhythmic changes of neural activity in the suprachiasmatic nucleus of the rat hypothalamic slice. *Brain Research*, 247, 154-158.
- Shibata, S., Tsuneyoshi, A., Hamada, T., Tominaga, K. and Watanabe, S. (1992). Phase-resetting effect of 8-OH-DPAT, a serotonin<sub>1a</sub> receptor agonist, on the circadian rhythm of firing rate in the rat suprachiasmatic nuclei in vitro. *Brain Research*, 582, 353-356.
- Shinohara, K., Isobe, Y., Takeuchi, J. and Inouye, S.-I., T. (1991). Circadian rhythms of somatostatin-immunoreactivity in the suprachiasmatic nucleus of the rat. *Neuroscience Letters*, 129, 59-62.
- Shirakawa, T. and Moore, R.Y. (1994). Responses of rat suprachiasmatic nucleus neurons to substance P and glutamate in vitro. *Brain Research*, 642(1-2), 213-220.
- Smale, L., Blanchard, J., Moore, R.Y. and Morin, L.P. (1991). Immunocytochemical characterization of the suprachiasmatic nucleus and the intergeniculate leaflet in the diurnal ground squirrel, *Spermophilus lateralis*. *Brain Research*, 563(1-2), 77-86.
- Smale, L., Michels, K.M., Moore, R.Y. and Morin, L.P. (1990). Destruction of the hamster serotonergic system by 5,7-DHT: Effects on circadian rhythm phase, entrainment and response to triazolam. *Brain Research*, 515, 9-19.

- Smith, R.D., Inouye, S.-I.T. and Turek, F.W. (1989). Central administration of muscimol phase shifts the mammalian circadian clock. *Journal of Comparative Physiology A*, 164, 805-814.
- Srkalovic, G., Selim, M., Rea, M.A. and Glass, J.D. (1994). Serotonergic inhibition of extracellular glutamate in the suprachiasmatic nuclear region assessed using in vivo brain microdialysis. *Brain Research*, 656, 302-308.
- Steinbusch, H.W.M. (1981). Distribution of serotonin-immunoreactivity in the central nervous system of the rat-cell bodies and terminals. *Neuroscience*, 6(4), 557-618.
- Stephan, F.K. and Zucker, I. (1972). Circadian rhythms in drinking behavior and locomotor activity of rats are eliminated by hypothalamic lesions. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 69(6), 1583-1586.
- Sutin, E.L. and Kilduff, T.D. (1992). Circadian and light-induced expression of immediate early gene mRNAs in the rat suprachiasmatic nucleus. *Molecular Brain Research*, 15, 281-290.
- Takahashi, J.S. and Hoffman, M. (1994). Molecular biological clocks. *American Scientist*, 83, 158-165.
- Takahashi, Y., Okamura, H., Yanaihara, N., Hamada, S., Fujita, S. and Ibata, Y. (1989). Vasoactive intestinal peptide immunoreactive neurons in the rat suprachiasmatic nucleus demonstrate diurnal variation. *Brain Research*, 497, 374-377.
- Takatsuji, K., Miguel-Hidalgo, J.J. and Tohyama, M. (1991). Substance P-immunoreactive innervation from the retina to the suprachiasmatic nucleus in the rat. *Brain Research*, 568(1-2), 223-229.
- Takeuchi, J., Golombeck, D.A. and Ralph, M.R. (1995). Microinjection of double-stranded DNA oligonucleotide containing AP-1 sequence blocks light-induced phase advance of hamster circadian rhythms. *Soc. Neuroscience Abstracts.*, 21, 1677.
- Tominaga, K., Shibata, S., Hamada, T. and Watanabe, S. (1994). GABA<sub>A</sub> receptor agonist muscimol can reset the phase of neural activity rhythm in the rat suprachiasmatic nucleus in vitro. *Neuroscience Letters*, 166, 81-84.
- Tominaga, K., Shibata, S., Ueki, S. and Watanabe, S. (1992). Effects of 5-HT<sub>1A</sub> receptor agonists on the circadian rhythm of wheel-running activity in hamsters. *European Journal of Pharmacology*, 214, 79-84.
- van den Pol, A.N. (1980). The hypothalamic suprachiasmatic nucleus of rat: intrinsic anatomy. *Journal of Comparative Neurology*, 191, 661-702.
- van den Pol, A.N. and Tsujimoto, K.L. (1985). Neurotransmitters of the hypothalamic suprachiasmatic nucleus: Immunocytochemical analysis of 25 neuronal antigens, *Neuroscience*, 1049-1086.
- von Frisch, K. (1950). Die Sonne als Kompass im Leben der Bienen, *Experientia*, 210-221.
- Watts, A.G. (1991). The efferent projections of the suprachiasmatic nucleus: anatomical insights into the control of circadian rhythms. In D. C. Klein, R. Y. Moore, & S. M. Reppert (Eds.), *Suprachiasmatic Nucleus: The Mind's Clock*. New York: Oxford University Press, 77-106.

- Watts, A.G. and Swanson, L.W. (1987). Efferent projections of the suprachiasmatic nucleus: II. Studies using retrograde transport of fluorescent dyes and simultaneous peptide immunohistochemistry in the rat. *The Journal of Comparative Neurology*, 258, 230-252.
- Watts, A.G., Swanson, L.W. and Sanchez-Watts, G. (1987). Efferent projections of the suprachiasmatic nucleus: I. Studies using anterograde transport of *Phaseolus vulgaris* leucoagglutinin in the rat. *The Journal of Comparative Neurology*, 258, 204-229.
- Weber, E.T., Gannon, R.L. and Rea, M.A. (1998). Local administration of serotonin agonists blocks light-induced phase advances of the circadian activity rhythm in the hamster. *Journal of Biological Rhythms*, 13(3), 209-218.
- Welsh, D.K., E., L.D., Meister, M. and Reppert, S.M. (1995). Individual neurons dissociated from rat suprachiasmatic nucleus express independently phased circadian firing rhythms. *Neuron*, 14, 697-706.
- Wollnik, F. (2000). Characterization of serotonergic pathways and receptor subtypes in the circadian system of rats. *Society for Research on Biological Rhythms Abstracts*.
- Wollnik, F., Brysch, W., Uhlmann, E., Gillardon, F., Bravo, R., Zimmermann, M., Schlingensiepen, K.H. and Herdegen, T. (1995). Block of c-Fos and JunB expression by antisense oligonucleotides inhibits light-induced phase shifts of the mammalian circadian clock. *European Journal of Neuroscience*, 7, 388-393.
- Wurtmann, R.J. (1966). Ambiguities in the use of the term circadian. *Science*, 156, 104.
- Ying, S.W. and Rusak, B. (1997). 5-HT<sub>7</sub> receptors mediate serotonergic effects on light-sensitive suprachiasmatic nucleus neurons. *Brain Research*, 755(2), 246-54.
- Ying, S.-W. and Rusak, B. (1994). Effects of serotonergic agonists on firing rates of photically responsive cells in the hamster suprachiasmatic nucleus. *Brain Research*, 651, 37-46.
- Zhang, Y. and Van Reeth, O. (1993). Fos protein expression in the circadian clock is not associated with phase shifts by a nonphotic stimulus, triazolam. *Neuroscience Letters*, 164, 203-208.
- Zifa, E. and Fillion, G. (1992). 5-Hydroxytryptamine receptors. *Pharmacological Reviews*, 44(3), 401-58.





## 9 Anhang

### 9.1 Lösungen

#### Chemikalien

Bis auf Heparin (Sigma; Deisenhofen, Deutschland) wurden alle für die Herstellung der Lösungen verwendeten Chemikalien ausschließlich von der Firma Merck (Darmstadt, Deutschland) bezogen.

#### Phosphatgepufferte-0,9%ige-Kochsalzlösung (PBS):

NaCl	8 g/l
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> O alternativ Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 2H <sub>2</sub> O	1,14 g/l alternativ 1,442 g/l
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,2 g/l
KCl	0,2 g/l

Alle Substanzen wurden der Reihenfolge nach in destilliertem Wasser gelöst

#### Phosphatgepufferte-0,9%ige-Kochsalzlösung mit Triton (PBST):

NaCl	8 g/l
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> O alternativ Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 2H <sub>2</sub> O	1,14 g/l alternativ 1,442 g/l
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,2 g/l
KCl	0,2 g/l
Triton-X-100	0,2 ml/l

Alle Substanzen wurden der Reihenfolge nach in destilliertem Wasser gelöst

#### Perfusionslösungen:

Spüllösung: PBS + 0,1 g/l Heparin

Fixierlösung: • 500 ml destilliertes Wasser auf 60-70 °C erwärmen

- 40 g Paraformaldehyd zugeben und bis zur völligen Auflösung rühren
- tropfenweise 40%ige NaOH-Lösung zugeben, bis Lösung klar erscheint
- auf 4 °C abkühlen und abfiltrieren
- 500 ml PBS-Lösung zugeben und pH-Wert auf 7,2-7,4 einstellen

#### Lösung zur Objektträgerbeschichtung:

Gelatinepulver	5 g/l
Kalium-Chrom-III-Sulfat	0,5 g/l

Destilliertes Wasser auf 60-70 °C erwärmen und Substanzen unter ständigem Rühren lösen. Staubfreie Objektträger kurz eintauchen, abtropfen und 30-40 min antrocknen lassen. Vorgang wiederholen. Objektträger bei 50 °C 2-3 Tage trocknen.

## 9.2 Färbeprotokolle

### ABC-Färbemethode:

- Gewebe nach Entnahme für 24 h bei 4 °C in Fixierlösung nachfixieren
- Gewebe für mindestens 48 h in PBS mit 30% Succrose bei 4 °C lagern
- Gewebe schneiden und in PBS auffangen
- Primären Antikörper mit PBST verdünnen (Verdünnung für AP-5: 1:10000)
- Schnitte 48 h bei 4 °C oder 24 h bei Raumtemperatur mit primärem Antikörper inkubieren
- Schnitte 2 x 30 min (oder 3 x 15 min) in PBST waschen
- Schnitte für 45 min mit Sekundärintikörper bei 37°C inkubieren  
(Angabe für VECTASTAIN ABC-Peroxidase Kit)
- Schnitte 2 x 30 min (oder 3 x 15 min) in PBST waschen
- Schnitte für 45 min mit ABC-Komplex bei 37 °C inkubieren  
(Angabe für VECTASTAIN ABC-Peroxidase Kit)
- Schnitte 30 min (oder 2 x 10 min) in PBST waschen
- Schnitte 30 min (oder 2 x 10 min) in PBS waschen
- DAB-Färbereaktion (Für DAB-Tabletten von Sigma: Pro 100 ml PBS 3 Tabletten)  
Färbedauer: bis eine leichte bräunliche Färbung sichtbar wird (zwischen 2 und 15 min)
- Schnitte mindestens 4 x 5 min in aqua bidest waschen
- Schnitte auf beschichtete Objektträger aufziehen und ein Tag trocknen lassen
- Schnitte mit DePeX eindeckeln und 2 - 3 Tage trocknen lassen

### Fluoreszenz-Färbemethode:

- Gewebe nach Entnahme für 24 h bei 4 °C in Fixierlösung nachfixieren
- Gewebe für mindestens 48 h in PBS mit 30% Succrose bei 4 °C lagern
- Gewebe schneiden und in PBS auffangen
- Primären Antikörper mit PBST verdünnen (Verdünnung für AP-5: 1:10000)
- Schnitte 48 h bei 4 °C oder 24 h bei Raumtemperatur mit primärem Antikörper inkubieren
- Schnitte 2 x 30 min (oder 3 x 15 min) in PBST waschen
- 2 h bei 37 °C mit Sekundärintikörper gekoppeltem Fluoreszenzfarbstoff CY<sup>TM</sup>3 inkubieren  
(Verdünnung: 1:100)
- Schnitte 30 min (oder 2 x 10 min) in PBS waschen
- Schnitte auf beschichtete Objektträger aufziehen und umgehend mit Fluoreszenz-Einbettmedium eindeckeln, um eine Austrocknung der Schnitte zu vermeiden

## Danksagung

Als ich Anfang des Jahres 1997 mit dieser Arbeit begann, war ich mir bei weitem nicht im Klaren darüber, auf wieviele helfende Hände ich im Laufe der Zeit angewiesen sein würde, um das nun hier vorliegende Werk in einer angemessenen Zeit vollenden zu können. Damit meine ich nicht nur die Personen, die mir mit Rat und Tat zur Seite standen und mir bei der praktischen Arbeit hilfsbereit unter die Arme griffen, sondern auch all diejenigen, die dafür gesorgt haben, daß ich sowohl in Konstanz als auch später hier in Stuttgart eine Arbeitsatmosphäre vorfand, in der ich mich einfach „pudelwohl“ fühlte.

Allen diesen Personen sei mein ganz, ganz herzlicher Dank ausgesprochen.

Nachstehend möchte ich explizit noch einige Personen namentlich erwähnen, ohne deren Mithilfe diese Arbeit wohl nie zustande gekommen wäre bzw. ich immer noch an der Ausarbeitung der Versuchsplanung sitzen würde.

Mein besonderer Dank geht daher zunächst an Frau Prof. Franziska Wollnik, welche es mir überhaupt erst ermöglichte, die für die Arbeit notwendigen Experimente durchzuführen, indem sie mir einen Platz in Ihrer Arbeitsgruppe zur Verfügung stellte. Nicht nur daß Sie mir in der gesamten Zeit mit Ihrer unermüdlichen Hilfsbereitschaft bei der Ausarbeitung von Experimenten und der Durchsicht meiner Manuskripte, deren kritische Betrachtung viel Zeit und Geduld in Anspruch nahm, 100%tig zur Seite stand, sondern sie hat es mir auch im Laufe der Zeit mehrfach ermöglicht an Tagungen sowohl im In- als auch im Ausland teilzunehmen. Dafür noch einmal ganz herzlichen Dank Franziska!

Weiterhin gilt mein Dank meinem ehemaligen Zimmernachbarn Markus Kohler, mit dem sich im Laufe der Zeit viele feste morgendliche „Rituale“ eingeschlichen haben, wie beispielsweise das Zusammenspiel beim Kaffee kochen. Vor allem unterstützte er mich aber mit vielen wertvollen Tips und seinen anregenden Gesprächen und kritischen Betrachtungen über die Inhalte verschiedener Papers. Als er im Oktober 1999 der Uni den Rücken kehrte, um in der freien Wirtschaft zu arbeiten, hinterließ er neben einem leeren Stuhl im Büro für mich auch eine schmerzhaft Erfahrung, da ich feststellen mußte, daß mir ein wichtiger Diskussionspartner verloren gegangen war.

Ich weiß nicht wie oft ich diesen Hilfeschrei von mir gab: „Stefaaan!! Hiilfe! Was macht der Rechner denn nun schon wieder???“ Es vergingen meistens kaum 5 Minuten als hinter mir die Stimme von Stefan Nitschke auftauchte und meinte: „Kein Problem!! Hab alles im Griff.“ Und siehe da, wenige Minuten später lief die Mühle weiter, als ob nichts gewesen wäre. Stefan, einen ganz großen Dank an Dich, hättest Du mir nicht ständig aus meinen „Computerkrisen“ geholfen, würde diese Arbeit wohl nur als handschriftliches Manuskript vorliegen.

Einen ganz herzlichen Dank Auch an die beiden TAs Angeline Votteler und Silvia Sättele, die mich bei meinen ganzen c-Fos Färbungen tatkräftig unterstützten.

Weiterhin möchte ich Jens Nagel und Holger Fuchs einen großen Dank aussprechen. Zum einen haben sie sich als Fehlerdetektive durch die vorliegende Arbeit geschlichen, zum anderen zeigten sie einen ähnlichen Aktivitätsrhythmus wie ich ihn habe, so daß ich doch viele Abende nicht alleine im Institut verbringen mußte, und daher der Gefahr der Vereinsamung entgehen konnte.

Nicht vergessen möchte ich unseren Tierpfleger Harald Feuchter, der doch an manchem Morgen vor riesigen Stapeln schmutziger Käfige stand, obwohl er am abend den letzten Käfig geputzt hatte. Danke Harald.

Zwar zum Schluß, aber mit Sicherheit nicht zuletzt bedanke ich mich besonders bei meinen Eltern, die mir das Biologiestudium überhaupt ermöglicht hatten und mir somit erst die Chance gaben, diese Arbeit anzufertigen. Dafür noch einmal ganz herzlichen Dank an Euch beide!

## Lebenslauf

Name: Kalkowski  
Vorname: Andreas  
Geburtsdatum: 17.03.1969  
Geburtsort: Radolfzell am Bodensee  
Eltern: Dieter Kalkowski  
Ursula Kalkowski geb. Walk

### Schulbesuch:

1975-1979 Tegginger Grund- und Hauptschule, Radolfzell  
1979-1989 Evangelische Internatsschule Schloß Gaienhofen e.V.  
Ambrosius-Blarer-Gymnasium, Gaienhofen  
Abschluß: Allgemeine Hochschulreife

### Wehrdienst:

1989-1990 In Immendingen

### Studium:

1990-1991 Studium der Verwaltungswissenschaften an der Universität Konstanz  
Abschluß: Ohne Abschluß  
1991-1996 Studium der Biologie an der Universität Konstanz  
Abschluß: Diplom-Biologe  
1997 Wissenschaftlicher Angestellter der Fakultät für Biologie an der  
Universität Konstanz  
Seit 1997 Wissenschaftlicher Angestellter am Biologischen Institut der  
Universität Stuttgart  
1997-2000 Dissertation am Biologischen Institut der Universität Stuttgart

