

Aus dem Fachbereich Medizin
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
Frankfurt am Main

betreut am
Dr. Senckenbergische Anatomie
Institut für Anatomie II
Experimentelle Neurobiologie
Direktor: Prof. Dr. Horst-Werner Korf

**Die intrinsischen und nahen extrinsischen Verbindungen des
Nucleus suprachiasmaticus bei C3H- und C57BL-Mäusen**

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin
des Fachbereichs Medizin
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
Frankfurt am Main

vorgelegt von

Dag-Hau Yim

aus Langen (Hessen)

Frankfurt am Main, 2016

Dekan:	Prof. Dr. Josef M. Pfeilschifter
Referent:	Prof. Dr. Frank Nürnberger
Korreferent:	Prof. Dr. Jochen Kaiser
Tag der mündlichen Prüfung:	24.04.2017

Für Jingyuan, Yiwei, meine Eltern und meinen Bruder Daghim

1	Inhaltsverzeichnis	4
1.1	<i>Abbildungsnachweis</i>	6
1.2	<i>Tabellennachweis</i>	7
1.3	<i>Abkürzungsverzeichnis</i>	8
2	Einleitung	10
2.1	<i>Circadiane Rhythmik</i>	10
2.2	<i>Der Nucleus suprachiasmaticus (SCN)</i>	12
2.2.1	Zytoarchitektur des Nucleus suprachiasmaticus	13
2.2.2	Chemoarchitektur des Nucleus suprachiasmaticus	13
2.2.3	Das suprachiasmatische Arginin-Vasopressin (AVP)- System	14
2.2.4	Verbindung des Nucleus suprachiasmaticus	15
2.2.4.1	Afferenten Verbindungen	15
2.2.4.2	Efferente Verbindungen	17
2.2.4.3	Kommissurale Verbindungen	20
2.2.4.4	Intranukleare Verbindungen	20
2.3	<i>Fragestellung</i>	21
3	Material und Methoden	22
3.1	<i>Haltung der Versuchstiere und Kontrolle der Haltungsbedingung</i>	22
3.2	<i>Materialgewinnung</i>	22
3.2.1	Benötigte Reagenzien für die Materialgewinnung	22
3.2.1.1	Natriumchlorid-Lösung (NaCl-Lösung)	22
3.2.1.2	Heparin-Lösung	22
3.2.1.3	Phosphatpuffer-Lösung (PB)	23
3.2.1.4	Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)	23
3.2.1.5	Paraformaldehyd (PFA)-Lösung	23
3.2.1.6	Isofluran – Narkose	24
3.2.2	Benötigte Reagenzien für die Immunzytochemie	25
3.2.2.1	Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)	25
3.2.2.2	Blocking-Lösung	25
3.2.2.3	Primärantikörper	25
3.2.2.4	Sekundärantikörper	25
3.2.2.5	Kernfärbung	26
3.2.2.6	Natriumazid (NaN ₃) – Lösung	27
3.2.2.7	Eindeckmedium	27
3.2.3	Räumliche Voraussetzung für Materialgewinnung	28

Inhaltsverzeichnis

3.2.4	Perfusionsfixierung	28
3.2.5	Materialentnahme und Fixierung	29
3.3	<i>Gewebeaufbereitung</i>	29
3.4	<i>Neurotracing - Durchführung der Studien zur Analyse der neuronalen Verbindungen</i>	31
3.4.1	Benötigte Reagenzien	31
3.4.1.1	Der Tracer - Dioctadecyl-Tetramethylindocarbocyanil (DiI)	31
3.4.2	Tracer - Applikation	32
3.5	<i>Herstellung der Gewebeschnitte</i>	33
3.5.1	Kryoprotektion	33
3.5.2	Schneidetechnik am Kryostaten	33
3.6	<i>Immunhistochemie der Gewebeschnitte</i>	35
3.6.1	Prinzip der Immunhistochemie	36
3.6.2	Färbeprotokoll	38
3.7	<i>Konfokale Mikroskopie</i>	39
4	Ergebnisse	40
4.1	<i>AVP Verteilung im Hypothalamus</i>	40
4.2	<i>AVP Verteilung im Nucleus suprachiasmaticus bei C3H und C57BL</i>	50
4.3	<i>Extrinsische Verbindungen des Nucleus suprachiasmaticus</i>	55
4.4	<i>Intrinsische Verbindungen des Nucleus suprachiasmaticus</i>	63
5	Diskussion	67
5.1	<i>Kritische Bewertung der Methodik</i>	67
5.1.1	Färbemethode	67
5.1.2	Applikationsmethode	68
5.1.2.1	Autofluoreszenz	68
5.2	<i>Nucleus suprachiasmaticus</i>	69
5.3	<i>AVP im Hypothalamus</i>	70
5.4	<i>AVP im Nucleus suprachiasmaticus</i>	72
5.5	<i>Extrinsische Verbindungen des Nucleus suprachiasmaticus</i>	73
5.6	<i>Intrinsische-/ Kommissurale Verbindungen des Nucleus suprachiasmaticus</i>	76
6	Zusammenfassung	78
7	Summary	80
8	Literaturverzeichnis	81
9	Lebenslauf	89
10	Schriftliche Erklärung	91

1.1 Abbildungsnachweis

Abb. 2.1: Lage des Nucleus suprachiasmaticus (SCN) im Koronarschnitt durch den Hypothalamus mit benachbarten Kerngebieten	12
Abb. 2.2: Primärstruktur von Vasopressin	14
Abb. 2.3: Die Hauptafferenzen zum SCN	16
Abb. 2.4: Der SCN und der Signalweg von Melatonin	18
Abb. 3.1: Ausschnitt aus der Struktur von Heparin (nach Albert Gossauer 2006)	23
Abb. 3.2: Strukturformel von 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI)	26
Abb. 3.3: Strukturformel von Natriumazid	27
Abb. 3.4: Gewebeaufbereitung	30
Abb. 3.5: Hirngewebe nach dem Zuschneiden	30
Abb. 3.6: Strukturformel von Dioctadecyl-Tetramethylindocarbocyanil (DiI)	31
Abb. 3.7: Applikationsort	32
Abb. 3.8: Shandon Coverplate	35
Abb. 3.9: Prinzip der Immunhistochemie	37
Abb. 3.10: Doppelmarkierung mit Arginin-Vasopressin und DiI-Tracer	37
Abb. 3.11: Emissionsverhalten der verwendeten Fluorophore bei den unterschiedlichen Anregungswellenlängen	39
Abb. 4.1: AVP-immunreaktive Strukturen im Hypothalamus	42
Abb. 4.2: Vasopressin Immunreaktion in der Eminentia mediana	44
Abb. 4.3: Vasopressin-positive Neurone und Fasern im medialen Bereich des Hypothalamus	46
Abb. 4.4: AVP-positive Faserverbindungen im mittleren Hypothalamus	48
Abb. 4.5: AVP-Verteilung im SCN von C3H und C57BL-Mäusen	50
Abb. 4.6: Räumliche Beziehung von Vasopressin-Neuronen im SCN	52
Abb. 4.7: DiI-Markierung im medialen SCN	56
Abb. 4.8: DiI-Markierung im dorsalen SCN	58
Abb. 4.9: Räumliche Beziehung von AVP-immunreaktiven Elementen und DiI-markierten Fasern	60
Abb. 4.10: Darstellung der Faserverbindungen nach Applikation von DiI in den SCN	64
Abb. 5.1: SCN als zentraler Zeitgeber der neuronalen Regulation der Nahrungsaufnahme	71
Abb. 5.2: Schematische Darstellung der kernnahen Verbindungen des SCN.	75
Abb. 5.3: Darstellung der kommissuralen Verbindungen des SCN	77

1.2 Tabellennachweis

Tabelle 1: Die Zielgebiete der Efferenzen des Nucl. suprachiasmaticus	19
Tabelle 2: Verwendeter Primärantikörper	25
Tabelle 3: Verwendeter Sekundärantikörper	26
Tabelle 4: Ansatz für Saccharose-Lösung	33
Tabelle 5: Färbeprotokoll für die Immunfluoreszenz-Darstellung	38

1.3 Abkürzungsverzeichnis

3V	3. Ventrikel
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
AG	Antigen
Aqua dest	Aqua destillata
mg	Milligramm
mm	Millimeter
Abb.	Abbildung
Alexa Fluor	Alexa Fluorescein
AVP	Arginin-Vasopressin
BSA	bovines Serumalbumin
Bzw./bzw	beziehungsweise
CGL	Corpus geniculatum laterale
d	Tag
Dil	1,1'-dioctadecyl-3,3,3'3'-tetramethylindocarbocyanin perchlorat
dm	dorsomedial
dy	donkey
f	fornix
GABA	Gamma-aminobutyric acid
GHT	Tractus geniculohypothalamicus
GRP	Gastrin-releasing peptide
gt	goat
h	Stunde
IgG	Immunglobulin G
IgM	Immunglobulin M
IGL	intergeniculate leaflet
ir	immunreaktiv
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
LA	Nucleus anteriorlateralis hypothalami
lat.	lateinisch
LSM	Laser-Scanning-Mikroskop

Abkürzungsverzeichnis

Max.	Maximum
ml	Milliliter
MPA	Area praeoptia medialis
MSH	Melanozyten-stimulierendes Hormon
Na ₂ HPO ₄	di-Natriumhydrogenphosphat
NaN ₃	Natriumazid
NaOH	Natriumhydroxid
Nucl.	Nucleus
NSO	Nucleus supraopticus
NPV	Nucleus paraventricularis
NPY	Neuropeptid Y
nm	Nanometer
opt	Chiasma opticum
PACAP	Pituitary adenylate cyclase-activating peptide
p.a.	pro analysi
PB	Phosphatpuffer (engl. Phosphate buffer)
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung (engl. Phosphate buffered saline)
PFA	Paraformaldehyd
PHI	Peptid Histidin-Isoleucin
pH	potentia hydrogenii
PMA	Area praemamillaris
PVN	Nucleus paraventricularis
rb	Rabbit
RHT	retinohypothalamischer Trakt
SCN	Nucleus suprachiasmaticus
SPa	Subparaventriculäre Zone
Tab.	Tabelle
VIP	Vasoaktives Intestinales Polypeptid
vl	ventrolateral
ZI	Zona incerta

2 Einleitung

2.1 Circadiane Rhythmik

Der Begriff der circadianen Rhythmik entstammt dem Wissenschaftsgebiet der Chronobiologie, einem Teilgebiet der Biologie, das sich unter anderem mit den zeitlichen und periodischen Lebensvorgängen auf zellulärer, organbezogener und gesamtorganischer Ebene befasst. Diese Rhythmik, die endogen im Organismus reguliert wird, besitzt eine Periodizität von nahezu 24 Stunden. Daher wurde der Begriff "circadian" [lat. *circa*; *dies* Tag] geprägt, der soviel wie "ungefähr ein Tag" bedeutet. Den Menschen ist dieses Phänomen des Zeitgefühls bekannt und wird im allgemeinen Sprachgebrauch als die "Innere Uhr" (Englisch: endogenous clock), bezeichnet. Wichtige Bedeutung haben diese autonomen endogenen Oszillationen für den Organismus hinsichtlich der Koordination von endokrinen, physiologischen und biochemischen Vorgängen im Organismus ¹. Ein Beispiel der Manifestation dieser täglich ablaufenden Rhythmik ist der Schlaf-Wach-Rhythmus. Aber auch unbewusste Vorgänge im Körper, wie die Variationen der Vitalparameter, z.B. Körpertemperatur, Herzfrequenz und Blutdruck, zeigen einen tageszeitlich oszillierenden Verlauf ²⁻⁴. Neben der Tageszeitenuhr sind weitere Oszillatoren bekannt, die entweder eine längere oder kürzere Periodizität aufweisen, sogenannte infradiane- (länger als die Tagesperiode) und ultradiane- (kürzer als die Tagesperiode) Rhythmen. Zuständig für die Steuerung der inneren Uhr, gewissermaßen das Uhrwerk der Tageszeitenuhr repräsentierend, ist ein neuronales Netzwerk mit Sitz im Nucleus suprachiasmaticus des Hypothalamus, dem wichtigsten circadianen Schrittmacher ⁵. Das System der Tageszeitenuhr unterliegt Einflüssen von außen und innen ⁶. Diese Einflüsse, wie beispielsweise Licht beim Tag-Nacht-Wechsel, dienen der Synchronisierung der inneren Uhr auf einen exakten 24-h-Rhythmus der dann als diurnaler Rhythmus bezeichnet wird. Dieser Mechanismus wird als Entrainment bezeichnet. Wenn kein externer Stimulus erfolgt, und somit keine Synchronisierung, dann spricht man von einer "freilaufenden" circadianen Rhythmik. Bei Untersuchungen am Menschen in speziellen Laboratorien, in denen der Mensch von der äußeren Umwelt isoliert wird und wegen der Deprivation von Uhren oder anderen Zeitindikatoren kein exogenes

Entrainment stattfindet, stellte sich heraus, dass die Innere Uhr beim Menschen weiterhin einen nahezu konstanten 24-h-Rhythmus besitzt ⁷. Bei manchen Individuen jedoch und bei verschiedenen Säugetieren kann der endogene Rhythmus jedoch deutlich kürzer oder länger als 24h sein ⁸.

2.2 Der Nucleus suprachiasmaticus (SCN)

Der Nucleus suprachiasmaticus (SCN) ist ein paariges Kerngebiet (Nucleus), lokalisiert im vorderen Hypothalamus unmittelbar dorsal der Sehbahnkreuzung (Chiasma opticum) und lateroventral des 3. Ventrikels (**Abb. 2.1**).

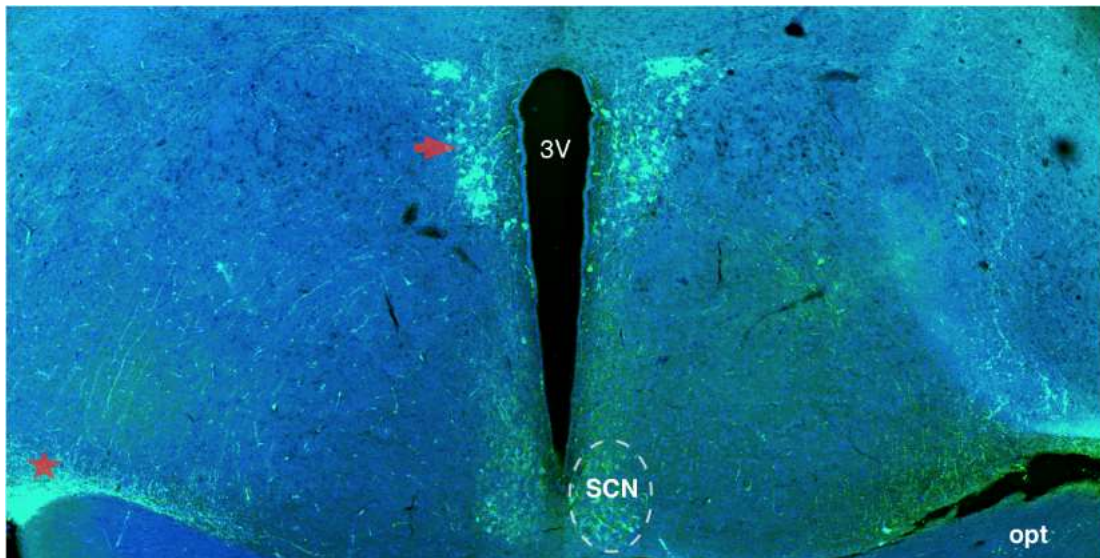


Abb. 2.1: Lage des Nucleus suprachiasmaticus (SCN) im Koronarschnitt durch den Hypothalamus mit benachbarten Kerngebieten

Verwendet wurde eine fluoreszierende anti-AVP (Arginin-Vasopressin) Färbung (grün) und Kernfärbung (blau). Angedeutet in diesem Übersichtsbild sind die zahlreichen Verbindungen zwischen den Kerngebieten. SCN: Nucleus suprachiasmaticus, 3V: 3.Ventrikel, opt: Chiasma opticum, Stern: Nucleus supraopticus, Pfeil: Nucleus paraventricularis. Vergrößerung x100

2.2.1 Zytoarchitektur des Nucleus suprachiasmaticus

Der Nucleus suprachiasmaticus ist in zwei bilateral symmetrisch angeordnete Subkerngebiete unterteilt, die jeweils aus ungefähr 10.000 Neuronen bestehen⁹. Diese Nervenzellen gehören zu den kleinsten Neuronen im Gehirnbereich (Durchmesser der Zellsomata: 7 bis 11µm)^{6,10,11}. Die Subkerngebiete werden anhand ihrer Lokalisation, Morphologie und Neuronenverteilung in einen ventrolateralen (vlSCN) und einen dorsomedialen (dmSCN) Nucleus unterteilt⁶. In der Literatur werden diese zwei Anteile auch als "Shell" [engl. Schale] und "Core" [engl. Kern] bezeichnet. Das ventrolaterale Kerngebiet entspricht dem "Core", und der dorsomediale Anteil wird der "Shell" zugeordnet^{12,13}. Die Neurone im Shell-Bereich sind morphologisch kleiner und haben weniger dendritische Verzweigungen, sie finden sich in höherer Anzahl und sind dichter gepackt als die Neuronenverbände des Core-Bereiches¹⁴. Ein nicht zu vernachlässigender Anteil im SCN sind die Astrogliazellen, die etwa 1/3 der Gesamt-zellpopulation im SCN ausmacht¹⁵. Wahrscheinlich spielen die Astrogliazellen ebenfalls eine Schlüsselrolle im lichtabhängigen Entrainment Prozess¹⁶.

2.2.2 Chemoarchitektur des Nucleus suprachiasmaticus

Nicht nur anhand seiner Morphologie kann der Neuronenkomplex des SCN beschrieben werden, sondern auch durch die Verteilung der Neurotransmitter bzw. Neuropeptide, die im Kerngebiet synthetisiert werden oder im Terminalformationen des SCN beobachtet werden können. Den größten Anteil unter den intrinsisch synthetisierten Peptiden macht das AVP (Arginin-Vasopressin) aus. AVP kommt in bis zu ca. 37% der Neurone des SCN vor, diese sind hauptsächlich im dorsomedialen Nucleus (dmSCN) lokalisiert. Viele Neurone im ventrolateralen SCN exprimieren die Peptide VIP (Vasointestinales Peptid) und PHI (Peptid Histidin-Isoleucin), ihr Anteil beträgt bis 24% der Gesamtneuronenpopulation. Neben den oben genannten Substanzen findet man noch weitere neuroaktive Substanzen, wie Calretinin, Somatostatin, GRP (Gastrin-releasing Peptid), Enkephalin, Substance P und Neurotensin^{11,14,17}.

2.2.3 Das *suprachiasmatische Arginin-Vasopressin (AVP)- System*

Arginin-Vasopressin (ADH; Synonym: Antidiuretisches Hormon) ist ein Neuropeptid bestehend aus neun Aminosäuren und einer Disulfidbrücke als Ringschluss zwischen Cystein 1 und 6.

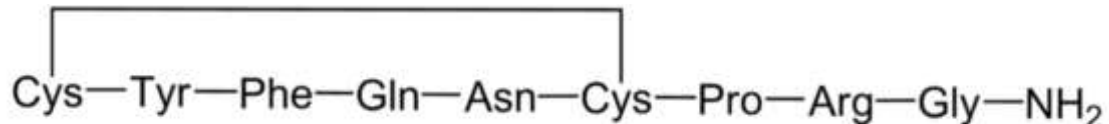


Abb. 2.2: Primärstruktur von Vasopressin

Cys=Cystein, Tyr=Tyrosin, Phe=Phenylalanin, Gln=Glutamin, Asn=Asparagin, Pro=Prolin, Arg=Arginin, Gly=Glycin

Der Name bezieht sich auf seine gefäßverengende Wirkung im Organismus (lat. Vas = Gefäß, lat. pressus = Druck) nach Gabe von pharmakologisch hohen Dosierungen. Es wird von Neuronen im Hypothalamus, insbesondere im Nucleus supraopticus und Nucleus paraventricularis, gebildet, über neuronale Verbindungen zum Hypophysenhinterlappen transportiert und dort in den Blutkreislauf abgegeben. Das Neuropeptid hat - als Folge davon - seine wichtigste Funktion in der Regulierung des Wasserhaushaltes und des Blutdrucks¹⁸. AVP ist auch das Hauptpeptid des SCN. Seine Konzentration unterliegt hier der circadianen Rhythmik. Die Aufgabe von AVP im SCN ist wahrscheinlich eine Beeinflussung der Generierung und Aufrechterhaltung der circadianen Rhythmik und der Signalweitergabe vom SCN in vegetative Zentren des Hypothalamus und des Hirnstamms¹⁹.

2.2.4 Verbindung des Nucleus suprachiasmaticus

Das neuronale Netzwerk des Nucleus suprachiasmaticus erhält eine Vielzahl von Informationen von zahlreichen Regionen des Gehirns; im Gegenzug verlassen viele fugale Verbindungen das Kerngebiet. Gleichzeitig sind prominente Verbindungen zwischen den bilateral gelegenen Kernkomplexen des SCN untereinander beschrieben.

2.2.4.1 Afferenten Verbindungen

Exogene Informationen, die zum SCN führen, haben die Funktionen modulierend auf das Kerngebiet einzuwirken und somit das Entrainment, die Synchronisation, der freilaufenden endogenen Periodizität im SCN zu induzieren. Unter den zahlreichen suprachiasmaticopetalen Verbindungen, werden drei als Hauptafferenzen definiert: Die mit Abstand wichtigste Verbindung zum SCN und essentiell für das Entrainment ist die Verbindung von der Retina zum SCN. Diese Verbindung wird als Tractus retinohypothalamicus (RHT) bezeichnet und wurde bereits 1972 erstmals bei Ratten beschrieben^{20,21}. Diese Faserverbindungen entstammen speziellen Rezeptoren der Retina und verlaufen entlang des optischen Nerven, um im Bereich der Sehbahnkreuzung (Chiasma opticum) diesen zu verlassen und dann hauptsächlich den ventrolateralen Anteil des Nucleus suprachiasmaticus zu innervieren²². Weiterhin wird eine optische Verbindung zum SCN beschrieben, die vom Corpus geniculatum laterale (CGL), hier speziell vom intergeniculären Blatt (=intergeniculate leaflet = IGL) ausgeht²³. Das IGL ist ein Bestandteil des Thalamus und besitzt die Aufgabe, bestimmte Komponenten des Seheindrucks bereits eingangsseitig zu bearbeiten. Es ist eine wichtige Schaltzentrale der optischen Information, die möglicherweise nicht an den visuellen Cortex im Großhirn weitergeleitet wird, sondern vegetativen Regelmechanismen dient. Diese Verbindung vom IGL zum SCN wird als Tractus geniculohypothalamicus bezeichnet und dient in der ersten Linie der Triggerung (Genese und Erhaltung) der circadianen Rhythmik²⁴. Die dritte Hauptafferenz - und besonders gut untersucht - sind Verbindungen aus dem Mittelhirn (Mesencephalon); sie haben ihren Ursprung in den serotonergen Raphe-Kernen⁶. Weiterhin werden afferente Verbindungen

dung zum SCN beschrieben, die aus dem limbischen System (ventrales Subiculum und infralimbischer Cortex) entstammen ¹ und ebenfalls Einfluss auf die circadiane Rhythmik nehmen. Eine weitere, räumlich relativ nahe Verbindung innerhalb des Hypothalamus beschreiben Moga et al. (1995) ²⁵. Sie visualisierten Fasererläufe aus dem Nucleus paraventricularis (NPV) zum SCN.

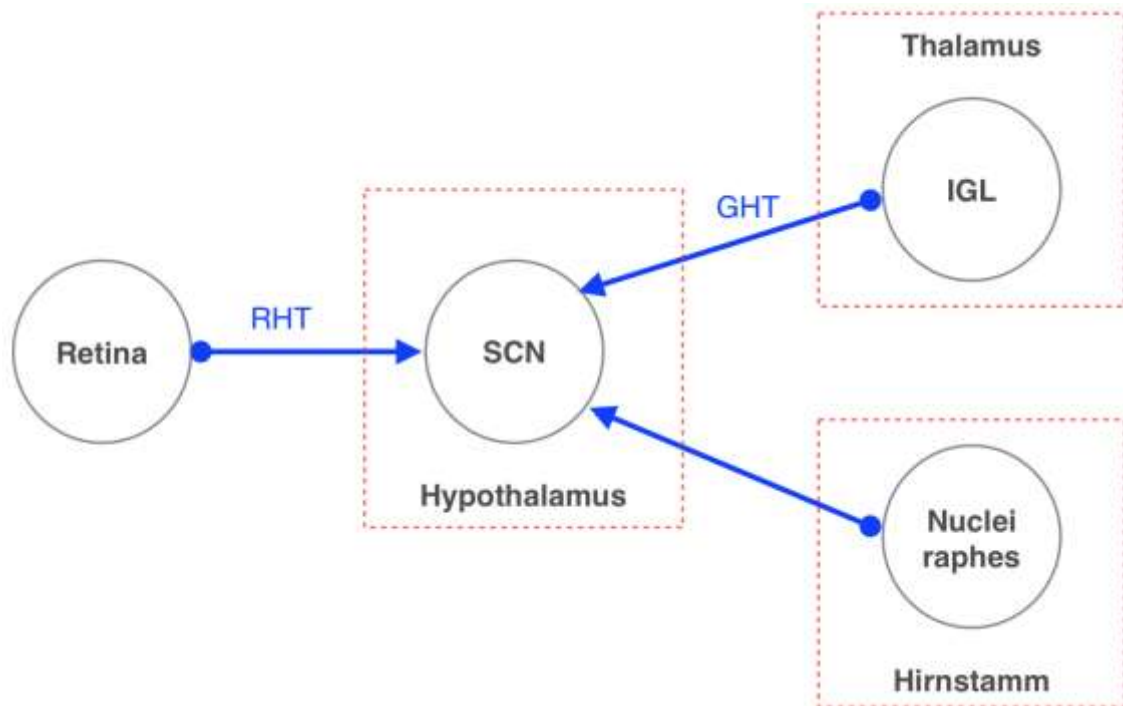


Abb. 2.3: Die Hauptafferenzen zum SCN

SCN: Nucleus suprachiasmaticus, IGL: Intergeniculäres Blatt des Corpus geniculatum laterale, RHT: Tractus retinohypothalamicus, GHT: Tractus geniculohypothalamicus

2.2.4.2 Efferente Verbindungen

Der Nucleus suprachiasmaticus besitzt eine Vielzahl von fortführenden, fugalen Verbindungen. In der Literatur wurden bisher mindestens 18 dieser Efferenzen beschrieben, die zu Strukturen in verschiedensten Teilen des Gehirns führen. Diese hohe Anzahl unterstreicht nicht nur die zentrale Bedeutung des Kerngebietes und dessen Aufgabe, sondern sie verdeutlicht auch, wie sehr der Organismus der circadianen Rhythmik unterworfen ist. Eine besonders wichtige intrahypothalamische suprachiasmaticofugale Projektion ist die Verbindung zwischen SCN und dem paraventriculären Kerngebiet (NPV) bzw. den subparaventriculären Arealen²⁶. Durch diese Verknüpfung wird eine polysynaptische Verbindungskaskade aufgebaut, die auch die Epiphyse (Pinealorgan) einschließt (**Abb. 2.4**)²⁷. Dabei werden Informationen aus dem SCN in das epithalamische Pinealorgan gesandt, die ihre Bedeutung in der Steuerung der Ausschüttung des Hormons Melatonin besitzen. Melatonin wiederum hat rückkoppelnde und modulierende Wirkung auf den SCN^{28,29}. Dies deutet die enge Verknüpfung der circadianen Sekretionsrhythmik im Pinealorgan mit der Aktivität des zentralen Rhythmusgebers an (**Abb. 2.4**). Enge Verbindungen zu liberin- oder statinsezernierenden Nervenzellverbänden lassen zahlreiche Einflüsse auf das Endokrinium vermuten³⁰. Die vom SCN ausgehenden fugalen Verbindungen wurden zusammenfassend von Watts et al. (1987)²⁶ beschrieben. Diese efferenten Bahnen zu vielen Bereichen des Gehirns sind in **Tabelle 1** zusammengestellt und zeigen die Verzahnung der circadianen Uhr im SCN mit dem Gesamthirn und deuten letzten Endes deren Bedeutung für den Organismus an. Relativ wenig ist über Unterschiede im Verschaltungsmuster des SCN bei Säugetieren bekannt, bei denen bestimmte Komponenten dieses suprachiasmatischen Verbindungsnetzwerkes fehlen. So können Mäusestämme beobachtet werden, die entweder erblindet sind oder denen die pineale Rückmeldung zum SCN über Melatonin fehlt.

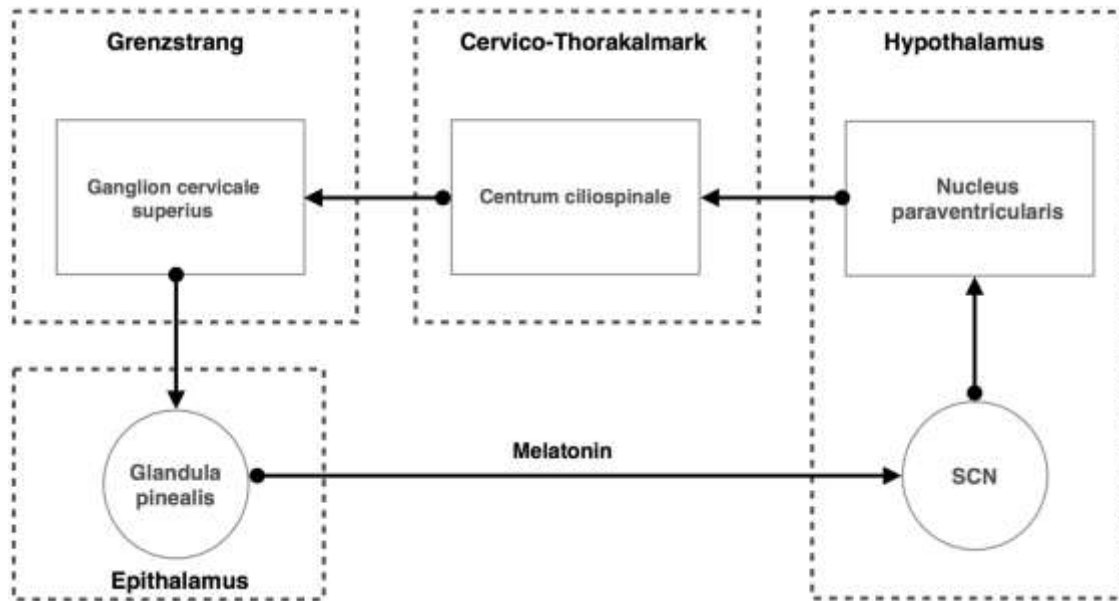


Abb. 2.4: Der SCN und der Signalweg von Melatonin

Schematische Darstellung der komplexen polysynaptischen Verschaltung vom SCN im Hypothalamus bis zum Pinealorgan (Epiphyse) des Epithalamus und der hormonellen Feedbackschleife zurück zum SCN.

Tabelle 1: Die Zielgebiete der Efferenzen des Nucl. supra-chiasmaticus

Ziel-Kerngebiet	Lokalisation im Gehirn
Nucleus septalis intermediolateralis	Tiefes medianes Telencephalon
Epiphyse	Epithalamus
Nucl. parataenialis	Thalamus
Corpus geniculatum laterale	
Nucl. paraventricularis thalami	
Area hypothalamica anterior et posterior	Hypothalamus
Area praeoptica medialis (MPA)	
Area praemamillaris (PMA)	
Nucl. anteroventralis periventricularis	
Nucl. dorsomedialis	
Nucl. paraventricularis hypothalami (PVN)	
Nucl. supraopticus	
Nucl. ventromedialis	
Bereich nahe Nucl. arcuatus	
Zona incerta (ZI)	
Subparaventriculäre Zone (SPa)	
Nucl. praetectalis	Mittelhirn
periaquäduktales Grau	Hirnstamm

2.2.4.3 Kommissurale Verbindungen

Zu der großen Anzahl der extrinsischen Verbindungen findet man darüber hinaus auch Verbindungen zwischen den beiden bilateral angeordneten suprachiasmatischen Kernanteilen. Bisher sind wenige Verbindungen zwischen dem linken und dem rechten Kerngebiet beschrieben. Tracer-Studien zeigten Hinweise auf eine doppelläufige Verbindung^{32,33}. Aus immunhistologischen Untersuchungen konnte geschlossen werden, dass es sich um AVP- und VIP-haltige Fasern handelt³⁴. Neue elektrophysiologische Untersuchungen haben gezeigt und bestätigen letztendlich, dass über diese bilaterale Verbindung die Erregung eines Kerngebietes zu einer messbaren synaptisch evozierten Reaktion des kontralateralen Kerngebietes führt. Diese synchronisierende gegenseitige Aktivierung zwischen den beiden Kernanteilen wird hauptsächlich über den Neurotransmitter Glutamat vermittelt³⁵. Obwohl in der Vergangenheit gezeigt wurde, dass beide Kerngebiete unabhängig voneinander arbeiten³⁶ und jeder für sich einen Rhythmus generieren kann³⁷, führt eine Schädigung eines der beiden Kernanteile zu Veränderungen der freilaufenden Periodik³⁸.

2.2.4.4 Intranukleare Verbindungen

Die beiden anatomischen Untereinheiten Shell und Core konnten bereits anatomisch beschrieben werden, jedoch sind die Verbindungen innerhalb des SCN kaum bekannt. Allerdings ist nachgewiesen, dass die beiden genannten Untereinheiten direkt miteinander verknüpft sind³³. Diese intrinsische Verknüpfung ist unabdingbar für eine regelrechte Synchronisierung der zellulär erzeugten circadianen Rhythmik^{39,40}.

Bisher ist, wie durch die vorhergehende Ausführung belegt, das neuronale Verschaltungsmuster des SCN nur in relativ groben Zügen bekannt. Insbesondere fehlen Angaben zur suprachiasmatischen Einbindung in die nahe hypothalamische Umgebung und zu dessen intrinsischen Verschaltungen. Die genauere Analyse dieser Verbindungen scheint daher ein lohnendes Ziel im Hinblick auf die Wirkungsweise des SCN innerhalb des Hypothalamus zu sein.

2.3 Fragestellung

Mit dieser Arbeit sollen die nahen fugalen und petalen Verbindungen des Nucleus suprachiasmaticus anhand von Tracer Untersuchungsverfahren näher charakterisiert werden. Dabei sollen insbesondere folgende Fragen geklärt werden.

1. Wie sind die efferenten und afferenten Faserverläufe vom SCN in ihrem Verlauf organisiert?
2. Bestehen qualitative Unterschiede zwischen den intrinsischen und den nahen extrinsischen Faserverläufen im- und um den SCN?
3. Sind Unterschiede im chemoarchitektonischen Profil im SCN unterschiedlicher Mäusestämme erkennbar?

3 Material und Methoden

3.1 Haltung der Versuchstiere und Kontrolle der Haltungsbedingung

Es wurden insgesamt 10 weibliche nicht trüchtige Laboratoriumsmäuse (*Mus musculus*) vom Typ C3H/HeNCrI und C57BL/6NCrI zu Versuchszwecken verwendet. Die Mäuse waren zum Zeitpunkt der Lieferung 6 Wochen alt und stammten vom Züchter Charles River (Sulzfeld, Germany). Die Mäuse wurden in Gruppen zu jeweils 5 Tieren des gleichen Zuchtstamms pro Käfig (Makrolonkäfig) gehalten. Die Versuchskammern, in die die Käfige eingestellt wurden, waren konstant auf etwa 20°C Umgebungstemperatur eingestellt. Eine Schaltuhr war zuständig für einen 12 Stunden hell-dunkel Zyklus. Die Zeitgeber-Zeit, zu der das Licht angeschaltet wurde, war 07:00 Uhr. Futter (Altromin Control diet for Rats/Mice) wie auch Wasser stand ihnen ad libitum zur Verfügung. Um die Tiere zu zähmen (Stressvermeidung bei der späteren Materialgewinnung), wurden die Mäuse mehrmals täglich aus dem Käfig aufgenommen und vorsichtig gestreichelt.

3.2 Materialgewinnung

3.2.1 Benötigte Reagenzien für die Materialgewinnung

3.2.1.1 Natriumchlorid-Lösung (NaCl-Lösung)

Als Träger- und Spülschubstanz wurde eine sterile 0,9%ige Kochsalzlösung (Braun, Melsungen, Germany) verwendet. Es handelt sich dabei um eine Lösung in der Zusammensetzung 9g NaCl p.a in 1000 ml Aqua ad iniectabilia (pyrogenfrei).

3.2.1.2 Heparin-Lösung

Jeweils 500ml der 0,9%igen NaCl-Lösung wurde mit 5000 Einheiten unfraktioniertem Heparin (Ratiopharm, Ulm, Germany) versetzt. Dieser Volumenansatz war ausreichend für die Untersuchung an 10 Mäusen.

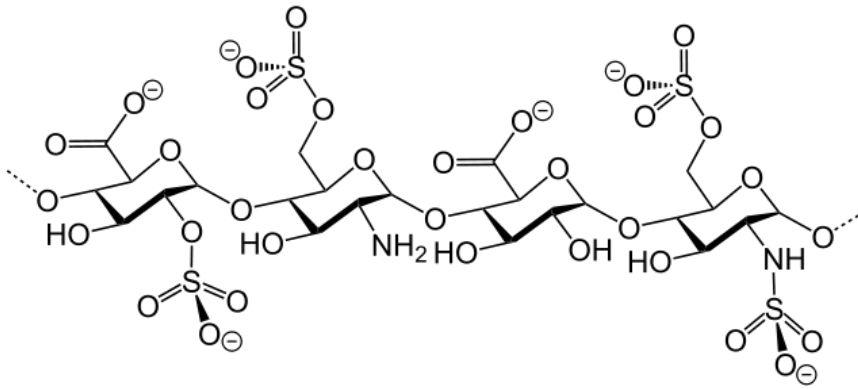


Abb. 3.1: Ausschnitt aus der Struktur von Heparin (nach Albert Gossauer 2006)

3.2.1.3 Phosphatpuffer-Lösung (PB)

Es wurde eine 0,2 M Pufferstammlösung aus $22,72 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1} \text{ Na}_2\text{HPO}_4$ und $5,4 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1} \text{ KH}_2\text{PO}_4$ in Aqua dest. hergestellt. Der pH-Wert wurde unter pH-Meter-Kontrolle durch Zugabe von 0,2 molarer KH_2PO_4 - oder Na_2HPO_4 -Lösung auf 7,4 eingestellt.

3.2.1.4 Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)

Es wurde eine 0,2 M Pufferstammlösung aus $9 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1} \text{ NaCl}$ -, $0,54 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1} \text{ KH}_2\text{PO}_4$ -, $22,72 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1} \text{ Na}_2\text{HPO}_4$ und Aqua dest. hergestellt. Der pH-Wert wurde unter pH-Meter-Kontrolle mit HCL oder NaOH auf 7,4 eingestellt.

3.2.1.5 Paraformaldehyd (PFA)-Lösung

Paraformaldehyd ist ein Polymer aus mehr als zehn manifesten polymerisierten Formaldehydmolekülen. Zur Herstellung von 500ml einer 4%igen PFA-Lösung wurden 20g Paraformaldehyd in 250ml aqua dest. unter ständigem Rühren und bei einer max. Temperatur 60°C aufgelöst. Durch Zugabe weniger Tropfen einer 1N NaOH-Lösung wurde die Depolymerisation beschleunigt. Anschließend wurde die Lösung mit 250ml 0,2M PB aufgefüllt und abfiltriert. Der pH betrug 7,4.

3.2.1.6 Isofluran – Narkose

Für die Gewinnung des Hirnmaterials wurde Isofluran, ein volatiles Anästhetikum aus der Gruppe der Flurane mit guter hypnotischer, muskelrelaxierender und analgetischer Wirkung genutzt ⁴¹. Dabei wurde das Fertigpräparat Forene (abbVie, Wiesbaden, Deutschland) aus dem Arzneimittelbereich verwendet.

3.2.2 Benötigte Reagenzien für die Immunzytochemie

3.2.2.1 Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)

Es wurde eine 0,02 M Pufferstammlösung aus 9 g·l⁻¹ NaCl -, 0,54 g·l⁻¹ KH₂PO₄-, 2,27 g·l⁻¹ Na₂HPO₄ und Aqua dest. hergestellt. Der pH-Wert wurde unter pH-Meter-Kontrolle mit HCL oder NaOH auf 7,4 eingestellt.

3.2.2.2 Blocking-Lösung

Verwendet wurde eine 5%ige BSA (Bovine-Serumalbumin) –Blocklösung, hergestellt aus 0,05 g·ml⁻¹ BSA in 0,02 M PBS.

3.2.2.3 Primärantikörper

Der Primärantikörper Anti-AVP dient dem Nachweis des Neuropeptids Vasopressin (AVP). Der AVP-Antikörper ist ein polyklonaler Antikörper, der im Kaninchen hergestellt wurde.

Tabelle 2: Verwendeter Primärantikörper

Antigen	Wirt	Bezugsquelle	Verdünnung
Arginin-Vasopressin (AVP)	Rabbit (rb)	Labor Prof.Nürnberger	1:1000

3.2.2.4 Sekundärantikörper

Die Sekundärantikörper sind Fluorophor-gekoppelte mono- bzw. polyklonale Immunglobuline vom IgG Typ. Sie waren industriell bereits mit Alexa Fluor® 488-gekoppelt (= Fluoreszein-Isothiocyanat-Konjugat) und konnten durch selektive Lichtanregung mit einer Wellenlänge von 480 nm zu Lichtemission angeregt werden. Sie emittierten dabei grünes Licht einer Wellenlänge von 510 bis 530 nm.

Tabelle 3: Verwendeter Sekundärantikörper

IgG	Wirt	Bezugsquelle	Verdünnung
Alexa Fluor® 488 donkey Anti-rabbit	Donkey (dy)	Molecular Probes, USA-Oregon	1:200

3.2.2.5 Kernfärbung

Für die korrekte Abgrenzung der Kerngebiete, in denen AVP oder Dil-Fasern markiert waren, wurde eine DAPI-Kernfärbung angeschlossen. DAPI (= 4',6-Diamidin-2-phenylindol) ist eine Fluoreszenzfarbe mit der Eigenschaft, spezifisch die DNA in den Zellkernen anzufärben⁴². Die spektrale Eigenschaft dieser Kernfärbung besitzt eine Emission im blauen Farbbereich bei 461nm und einem Absorptionsmaximum von 358nm (**Abb. 3.11**).

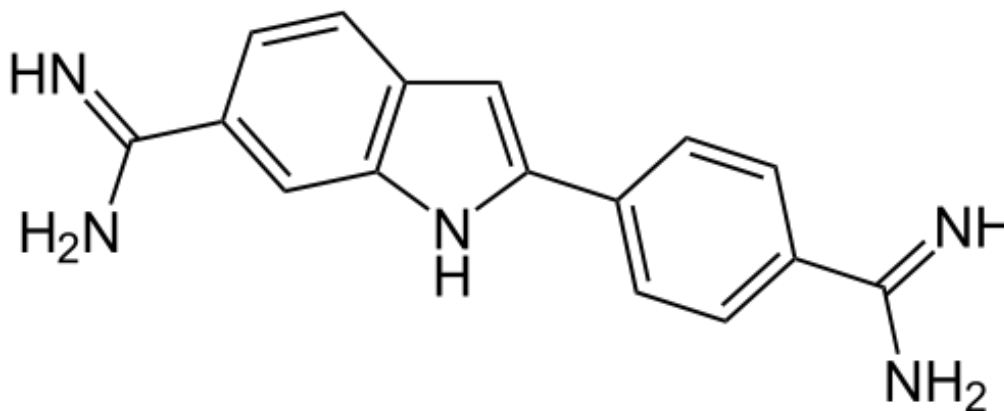


Abb. 3.2: Strukturformel von 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI)

3.2.2.6 Natriumazid (NaN_3) – Lösung

Bei Natriumazid handelt es sich um ein Natriumsalz der Stickstoffwasserstoffsäure. Natriumazid verhindert das Wachstum von Mikroorganismen, insbesondere das von Bakterien ⁴⁷. Die biologische Wirkung beruht auf einer Störung des Elektronentransports innerhalb der Atmungskette. Die Stammlösung enthielt $15\mu\text{l}$ NaN_3 pro ml des Lösungsmittels H_2O .

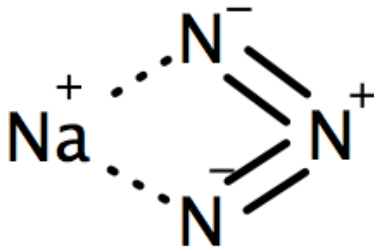


Abb. 3.3: Strukturformel von Natriumazid

3.2.2.7 Eindeckmedium

Verwendet wurde ein fluoreszenzgeeignetes Eindeckmedium (Fluorescence Mounting Medium, DAKO, Germany) mit der Eigenschaft der besseren Visualisierung und des verzögerten Ausbleichens der Proben ⁴³.

3.2.3 Räumliche Voraussetzung für Materialgewinnung

Die Mäuse wurden über einen Zeitraum von drei aufeinander folgenden Tagen zur gleichen Mittagszeit getötet. Dabei wurde auf eine strenge räumliche Trennung zwischen Haltung und Tötung geachtet, um eine olfaktorisch bedingte Beeinflussung der noch in den Käfigen gehaltenen Tiere zu vermeiden.

3.2.4 Perfusionsfixierung

Zunächst wurden die Mäuse individuell in einem räumlichen getrennten Bereich gebracht und in eine Inhalationskammer mit bereits verdampften Isofluran gelegt und narkotisiert. Die Exposition in der Kammer dauerte bis zu dem Zeitpunkt des Einsetzens der Schnappatmung bei den Tieren. Um die Sedierungstiefe der Tiere zu bewerten, wurde ein mechanisch induzierter Schmerzreiz direkt nach Entnahme aus der Kammer gesetzt. Dabei zeigte sich die erforderliche Sedierungstiefe durch den kompletten Verlust der Abwehrreaktion. Die Tiere wurden auf einer Arbeitsfläche aus Styropor in Rückenlage, also in Bauchseite nach oben, fixiert. Die weitere Zufuhr von Isofluran erfolgte über eine Atemmaske. Sodann wurde der Thorax mit der stumpfen Branche einer Schere eröffnet. Dies erfolgte durch einen Querschnitt entlang der unteren Thoraxapertur und zwei Längsschnitte entlang der Medioclaviculärlinien.

Die nun mobilisierte vordere Thoraxwand konnte nach cranial aufgeklappt werden, sodass das Herz exponiert war. Nach Aufsuchen des linken Ventrikels erfolgte die Insertion einer Venenverweilkanüle der Größe 21 Gauge (Braun, Melsungen, Germany) von der Herzspitze aus in die linke Herzkammer. Über die Kanüle wurde isotonische 0,9%ige Natriumchlorid-Lösung mit 5000 Einheiten Heparin (s.o.) zugeführt. Um die Perfusion zu ermöglichen, wurde der rechte Vorhof aufgesucht und eröffnet, um das Blut aus dem Kreislauf zu spülen. Diese genannten Arbeitsschritte erfolgten in weniger als 30 Sekunden.

Die Tropfgeschwindigkeit für die Perfusion betrug in etwa zwei Tropfen pro Sekunde. Das aus dem rechten Vorhof austretende Blut / Perfusat wurde mit einem Vakuum, erzeugt durch eine elektrische Pumpe, abgesaugt. Sobald die aus dem rechten Vorhof austretende Flüssigkeit nahezu klar erschien, wurde durch Umle-

gen eines Dreivegehahns die NaCl/Heparin-Perfusion gestoppt und die Perfusion mit eisgekühlter 4%iger Paraformaldehyd-Lösung gestartet. Die Tropfgeschwindigkeit war ebenfalls auf etwa zwei Tropfen pro Sekunde eingestellt. Die Perfusionsdauer betrug etwa 5 Minuten.

3.2.5 Materialentnahme und Fixierung

Nach erfolgreicher Perfusion folgte das Herauspräparieren des Gehirns aus dem Schädel. Dabei wurde die Maus zunächst mit einer Schere dekapitiert und anschließend der hintere Kopfbereich vom Fell befreit. Der Schädel wurde mit einer kleinen Knochenzange vom Foramen occipitale major aus sukzessiv eröffnet und die Calvaria entfernt. Nach Freilegung der gesamten Dorsalseite des Gehirns erfolgte die Präparation der basalen Abschnitte des Gehirns und das Ablösen der Hirnnerven von der Schädelbasis. Dabei wurde jeder Hirnnerv einzeln aufgesucht und abgetrennt. Die Präparation des frontalen Abschnitts erfolgte mit einer Pinzettenschere um den Sehnerv bzw. das Chiasma opticum von der Schädelbasis zu lösen. Das freigelegte Gehirn wurde dann in einem Glasgefäß mit 30ml PFA-Lösung (s.o.) aufgefangen und über Nacht im Kühlschrank bei 7°C nachfixiert.

3.3 Gewebeaufbereitung

Die in PFA fixierten Gehirne wurden auf eine Arbeitsplatte überführt und mit Stecknadeln so fixiert, dass die Hirnbasis nach oben zeigte (**Abb. 3.4**). Es folgte die Inspektion des Präparats auf Fixierungsqualität wie auch auf Präparationschäden. Danach wurde die Sehbahnkreuzung (Chiasma opticum) aufgesucht. Mit einer Rasierklinge erfolgte ein Schnitt in der Koronarebene durch das zentrale Chiasma opticum hindurch. Ebenso wurde das hintere Drittel des Gehirns durch einen Frontalschnitt entfernt um das senkrechte Aufstellen (bezogen auf die Längsachse des Gehirns) auf der Arbeitsfläche zu ermöglichen (**Abb. 3.5**). Die Inspektion der Schnitte erfolgte unter Lupenvergrößerung mit einem Operationsmikroskop (OPMI 1-FR, Carl Zeiss, Germany).

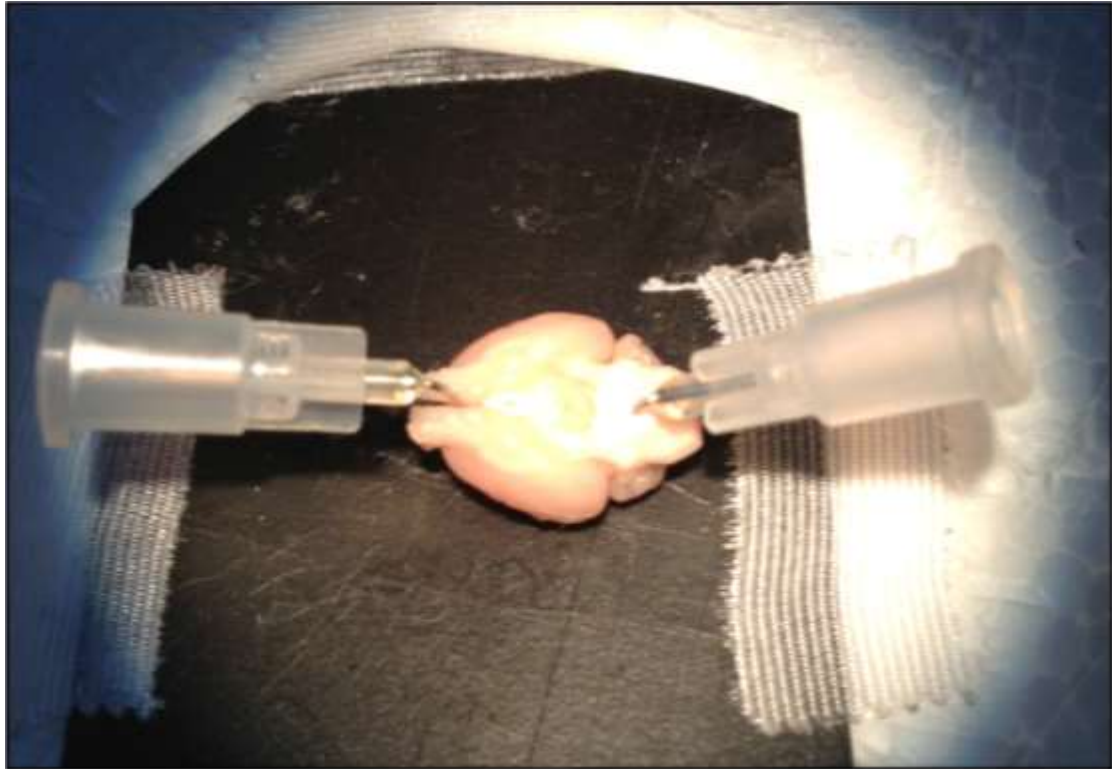


Abb. 3.4: Gewebeaufbereitung

Die Gehirne wurden auf eine Styroporplatte (Arbeitsplatte) mit zwei Nadeln fixiert. Dabei erfolgte unter Vergrößerung das Aufsuchen des Zielgebietes und das Anfertigen der Frontalschnitte mit Hilfe einer Rasierklinge.



Abb. 3.5: Hirngewebe nach dem Zuschneiden

3.4 Neurotracing - Durchführung der Studien zur Analyse der neuronalen Verbindungen

3.4.1 Benötigte Reagenzien

3.4.1.1 Der Tracer - Dioctadecyl-Tetramethylindocarbocyanil (DiI)

Um die Verläufe der neuronalen Verbindungen des SCN darzustellen, wurde in das Hirngewebe DiI (=1,1'-dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindocarbocyanin perchlorat) appliziert. Bei DiI (Invitrogen, Carlsbad, USA) handelt es sich um eine extrem lipophile Substanz. Sie hat die Eigenschaft, sowohl in fixiertem als auch in vitalem neuronalem Gewebe aufgenommen zu werden und innerhalb der Lipidphase von Zellmembranen (so entlang von axonalen Fortsätzen) retrograd und anterograd zu diffundieren⁴⁴⁻⁴⁶. Aufgrund der molekularen Organisation der erhaltenen konjugierten Doppelbindungen dieser Substanz emittiert sie ein orangefarbenes Licht mit einer Wellenlänge von $\lambda=565\text{nm}$ bei einer Anregung mit $\lambda=550\text{nm}$.

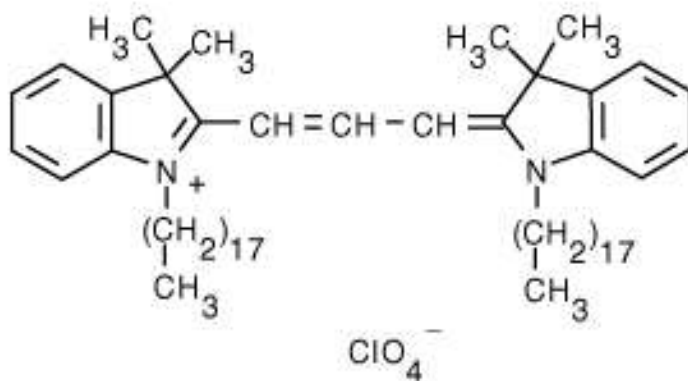


Abb. 3.6: Strukturformel von Dioctadecyl-Tetramethylindocarbocyanil (**DiI**) (Invitrogen 2014)

3.4.2 Tracer - Applikation

Unter lichtmikroskopischer Vergrößerung erfolgte die Applikation des Tracers entweder in den peri- bzw. paraventrikulären Bereich zum 3. Ventrikel oder direkt in den SCN (**Abb. 3.7**). Die Entnahme eines Dil-Kristalls geschah unter Zuhilfenahme einer feinen Punktionsnadel (TeWa®) der Größe 30 Gauge. Alle nachfolgenden Schritte wurden unter Lupenkontrolle (Operationsmikroskop, s.o.) vorgenommen. Der Kristall wurde unter leichtem Druck in das Hirngewebe hinein punktiert. Nach der Applikation erfolgte die Inkubation (Dil-Diffusion) im Wärmeschrank bei 37°C. Dazu befand sich jedes Gehirn in einem gesonderten Behälter, der mit 30ml 0,1M PB-Lösung und 450µl NaN₃ gefüllt war. Die Dauer der Inkubation betrug unter diesen Bedingungen 3 Wochen bei einer Diffusionsgeschwindigkeit des Tracers im lipophilen Gewebe von 0,2 - 0,6 mm · d⁻¹ ⁴⁸.

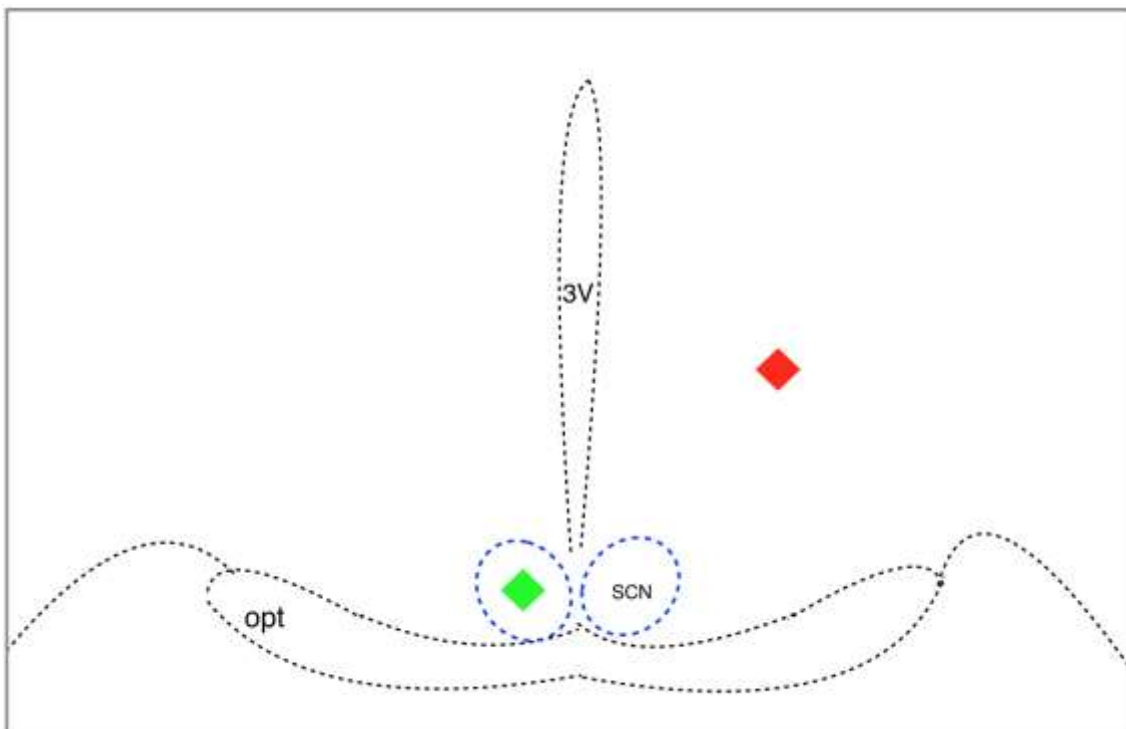


Abb. 3.7: Applikationsort

Die Applikation erfolgte unter Lupenvergrößerung in den peri- bzw. paraventrikulären Bereich des Hypothalamus (rote Raute) oder in eine der bilateralen SCN-Komponenten (grüne Raute). 3V: 3. Ventrikel, opt: Chiasma opticum.

3.5 Herstellung der Gewebeschnitte

3.5.1 Kryoprotektion

Nach der dreiwöchigen Inkubationsdauer wurden die Hirnpräparate zunächst mit 0,1M PB-Lösung gespült, auf Raumtemperatur gebracht und anschließend in aufsteigender Saccharose-Lösung inkubiert. Beginnend in 30ml einer 10%-Saccharose Lösung für zwei Stunden folgte die weitere Inkubation für 6 Stunden in 30ml einer 20%-Saccharose-Lösung und zuletzt für mindestens 24 Stunden in 30ml einer 30%-Saccharose Lösung. Dabei war das Absinken der Präparate auf den Boden ein Zeichen für die vollständige Infiltration mit Saccharose und für hinreichenden Gefrierschutz. Dieser war notwendig, um die Zellstruktur beim Gefrieren für das Kryostatschneiden zu erhalten und nicht durch Bildung größerer Kristalle zu zerstören.

Tabelle 4: Ansatz für Saccharose-Lösung

Konzentration	Gesamtlösung	Saccharose Menge	0,1M PB Lösung
10%	30ml	3g	30ml
20%	30ml	6g	30ml
30%	30ml	9g	30ml

3.5.2 Schneidetechnik am Kryostaten

Im Anschluss wurden die Präparate mit Trockeneis schockgefroren. Die gefrorenen Gewebeblöcke wurden mit Tissue-Tek® (O.C.T, USA) auf die kryostatspezifische Probehalter aufgefroren, wobei auf exakte Ausrichtung der Frontalebene geachtet wurde. Die Präparate wurden hauptsächlich in der Koronarebene mit dem Kryostat-Mikrotom (CM 3050, Leica, Germany) geschnitten. Die Schnittstärke der Präparate betrug 18µm. Dabei zeigte sich mit folgenden Einstellungen sehr gute Schnittergebnisse:

Kammertemperatur = -24°C ; Objekttemperatur = -22°C bis -23°C . Aufgefangen wurden die Präparate auf beschichtete Objektträger (Thermo-Scientific). Die Präparate wurden im Anschluss im Kühlschrank bei -30°C bis zur weiteren Bearbeitung gelagert.

3.6 Immunhistochemie der Gewebeschnitte

Alle Gewebeschnitte wurden unter Nutzung der indirekten Fluoreszenzimmunhistochemie angefärbt. Dabei fanden alle Arbeiten in lichtgeschützten und abgedunkelten Räumen statt. Auf die Objektträger wurden zunächst spezielle Inkubationsdeckplatten gezogen (Shandon Coverplate, Thermo Scientific, USA). Die Kombination aus Objektträger mit Deckplatte wurde in einem dafür vorgesehenen Halteapparat in einem Auffangbecken eingesteckt. Diese Deckplatten-Methode diente der Einsparung von Reagenzien und der gleichmäßigen Inkubation der Schnitte. Die hinzu pipettierten Lösungen befanden sich in einem Kapillarspalt zwischen Objektträger, zu färbendem Schnitt und den Inkubationsplatten; das Volumen dieses Spaltraums umfasste ca. 200 μ l.

Mit dieser Hilfsplatte konnte eine Antikörper-sparende gleichmäßige Inkubation

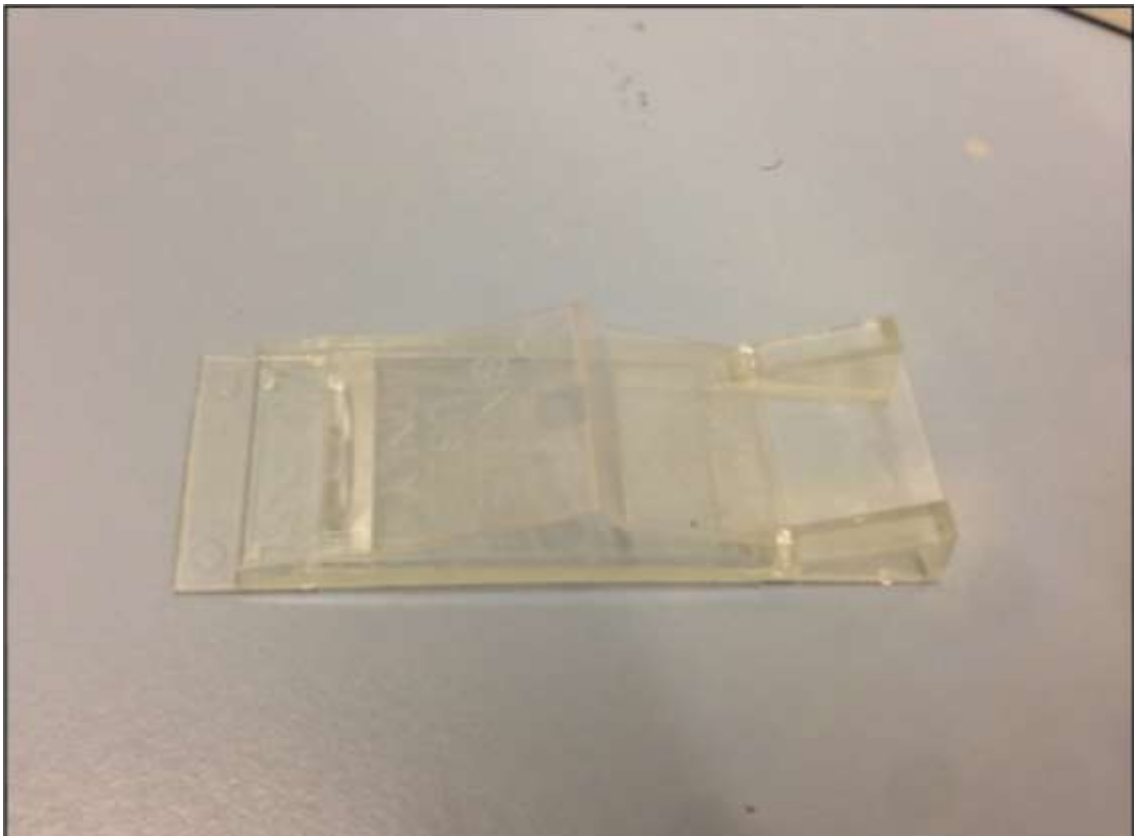


Abb. 3.8: Shandon Coverplate

der Präparate erreicht werden.

3.6.1 Prinzip der Immunhistochemie

Die Analyse der AVP-Verteilung der verschiedenen Kerngebiete, die Dil gefärbte Faserprofile aufwiesen, erfolgte mit Hilfe immunzytochemischer Methodik. Das Prinzip der Immunzytochemie basiert auf dem Nachweis von spezifischen Antikörperbindungen am peptidergen Antigen im Schnittpräparat ⁴⁹. An den Komplex aus spezifischen Primärantikörper und Peptidantigen wird dann ein zweiter Antikörper, welcher gegen das Fc-Ende des Primärantikörpers gerichtet ist, gebunden. Dieser Sekundärantikörper kann nun wiederum mit einem Farbstoff (direkt sichtbar oder fluoreszierend), einem Enzym für die Katalyse von Farbreaktionen oder als Brückenantikörper für komplexere Färbungssysteme fungieren. In der vorliegenden Arbeit wurden ausschließlich Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelte Sekundärantikörper verwendet und der Nachweis erfolgte auf lichtmikroskopischer Ebene direkt mit dem Fluoreszenzmikroskop oder dem Laser-Scanning Mikroskop ⁵⁰.

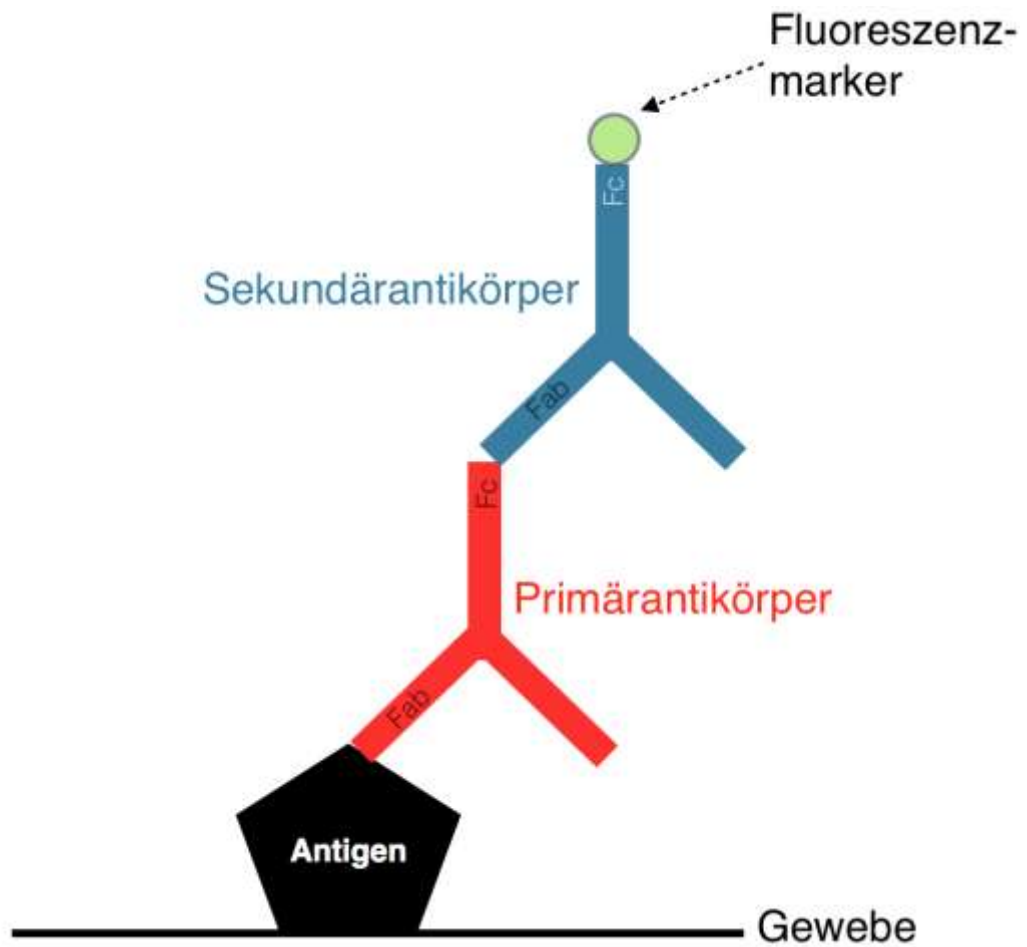


Abb. 3.9: Prinzip der Immunhistochemie

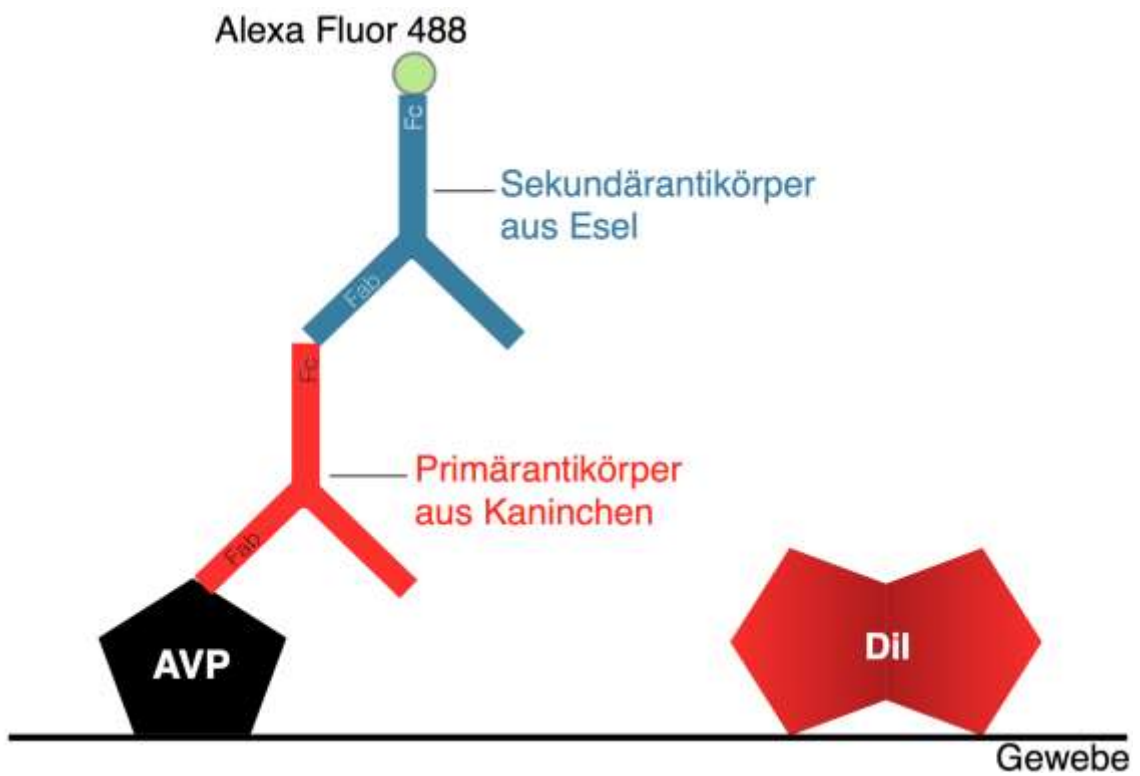


Abb. 3.10: Doppelmarkierung mit Arginin-Vasopressin und Dil-Tracer

3.6.2 Färbeprotokoll

Tabelle 5: Färbeprotokoll für die Immunfluoreszenz-Darstellung

	Schritt	Reagenz	Zeit
1	Rehydrierung	0,02M PBS	3 x 5 min
2	Blockung unspezifischer Bindungsstellen (200µl / Objektträger)	BSA-Lösung	30 min
3	1. Inkubation mit Primär-AK (200µl / Objektträger)	Primärantikörper-Lösung	24 h
4	Waschen	0,02M PBS	3 x 5 min
5	2. Inkubation mit Sekundär-AK (200µl / Objektträger)	Sekundärantikörper-Lösung	60 min
6	Waschen	0,02M PBS	3 x 5 min
7	Kernfärbung (200µl / Objektträger)	DAPI-Lösung	5 min
8	Waschen	0,02M PBS	3 x 5 min
9	Eindeckeln	DAKO-Lösung	
10	Lagerung im Dunkeln bei 4°C		Tage - Wochen

3.7 Konfokale Mikroskopie

Die Auswertung der Gewebeproben wurde mit einem Laser-Scanning-Mikroskop (LSM; Olympus Fluorview 1000 mit Software FV10-ASW) durchgeführt. Die Anregung der Fluoreszenz erfolgte durch einen Helium-Neon Laser (Wellenlänge 543nm), Argon Laser (Wellenlänge 458 bis 515nm) und eine near-UV Laser (Wellenlänge 405nm). Somit konnten die Fluorophore Alexa Fluor 488 gekoppelten Sekundärantikörper, die Dil-Fasern und die DAPI-Kernfärbung angeregt und deren Emissionslicht digitalisiert werden (**Abb. 3.11**). Anschließend erfolgte die Nachbearbeitung der Bilder mit dem Bildbearbeitungsprogramm GIMP und Optics Pro 8® (DxO Labs, USA) unter Mac OSX.

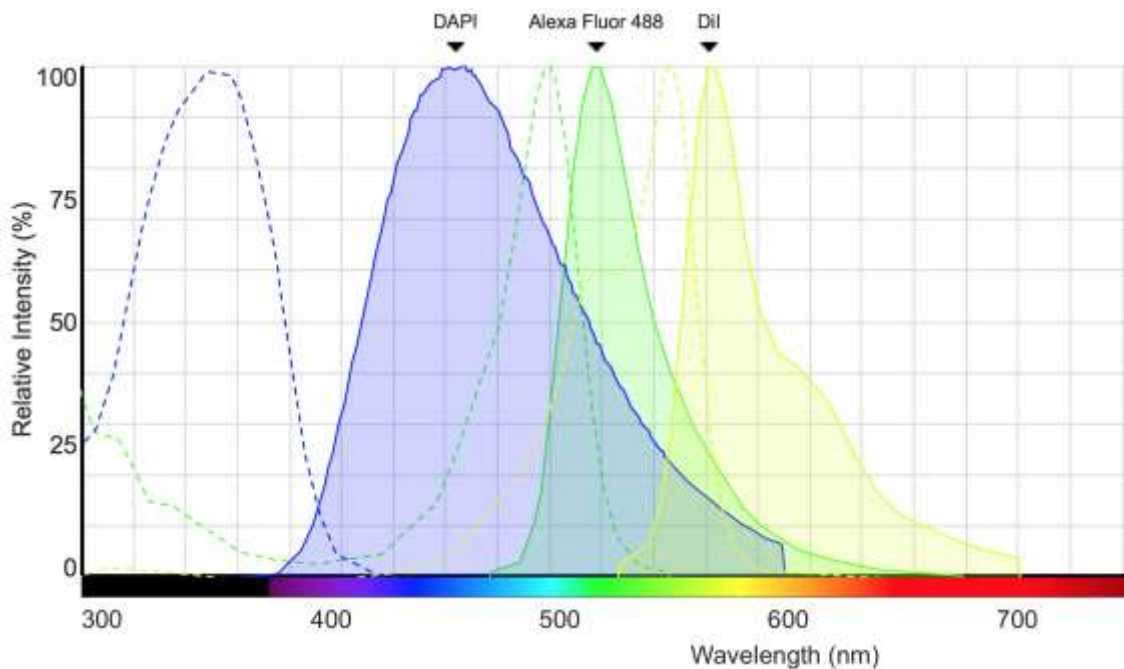


Abb. 3.11: Emissionsverhalten der verwendeten Fluorophore bei den unterschiedlichen Anregungswellenlängen

Grafische Darstellung der Anregungs- (gestrichelte Linien) und Emissionswellenlängen (durchgezogene Linien) für die verwendeten Fluorophore.

4 Ergebnisse

4.1 AVP Verteilung im Hypothalamus

Die vasopressinhaltigen Neurone wurden in den folgenden Kerngebieten und Regionen immunzytochemisch nachgewiesen: Nucleus suprachiasmaticus (**Abb. 4.1 D-F, D1-D3**), Nucleus supraopticus (**Abb. 4.1 G-I**), Nucleus paraventricularis (**Abb. 4.1 A; B; C**), Nucleus periventricularis (**Abb. 4.3 D**), Area hypothalamica lateralis und in wenigen Zellsomata der lateralen Portion des Nucl. paraventricularis, die der Zona incerta genähert ist (**Abb. 4.4 A; D**). Von diesen Kerngebieten zeigen sich eine Vielzahl von Projektionen zu den Kerngebieten untereinander aber auch Verbindungen zu anderen Teilen des Hypothalamus. Nicht für alle tingierten Fasern konnte die Ursprungsneurone eindeutig bestimmt werden. Eine Differenzierung zwischen efferenten und afferenten Fasern war nicht möglich (**Abb. 4.4 A; C**).

Die Neurone im Nucleus paraventricularis zeigen eine vergleichsweise diskrete Verteilung mit komplexen Faserverläufen zwischen den AVP-positiven Neuronen innerhalb des Kerngebietes (**Abb. 4.1 B-C**). Hingegen sind im SCN die AVP-positiven Neurone eng gepackt, und aufgrund des geringen Kalibers sind die interneuronalen AVP immunreaktiven Verknüpfungen innerhalb des Kerngebietes weniger deutlich (**Abb. 4.1 E1-F1**). Im lateroventralen Bereich des Hypothalamus und dorsal des lateralen Chiasma opticum imponiert der Nucleus supraopticus (**Abb. 4.3 G-H**). Dessen Neurone sind eng gepackt und aufgrund der teilweise stark positiven Immunfärbung für AVP war die Sichtbarkeit der AVP-immunreaktiven Fasern innerhalb des Kerngebietes eingeschränkt. Im weiter caudal gelegenen Abschnitten des Hypothalamus findet sich die Eminentia mediana mit ihrer zweischichtigen Organisation. Der ventrikelnahen Bereich, die Zona interna (**Abb. 4.2 B**), besitzt hohe Faserdichte, die ventral gelegene Zona externa dagegen nur geringe Faserdichte. Beide Schichten stehen über AVP-immunreaktive Fasern miteinander in Verbindung (**Abb. 4.2 A-B**).

Die Untersuchungen zeigten auch, dass sich dorsolateral des Chiasma opticum ein Bereich mit vielen eingestreuten Vasopressin-positiven Neuronen befindet (**Abb. 4.3 B**), die den Nucleus suprachiasmaticus umgeben (**Abb. 4.3 B**). Dieses

Gebiet zählt zum anterolateralen Teil des Nucleus hypothalamicus (LA) und besitzt ein Netzwerk aus teilweise diffus und kaum verfolgbaren AVP-positiven Faserfortsätzen und Zellsomata. Die Pfeilspitze in **Abb. 4.3 A** deutet wie bereits in **Abb. 4.1** beschrieben auf den Nucleus supraopticus hin. Weiterhin sehr nah am dritten Ventrikel (**Abb. 4.3 C-D**) sind einige wenige magnozellige AVP-positive Neurone gelegen, die enge Beziehung zum Ependym besitzen; sie lassen sich dem Nucleus periventricularis zuordnen. Darin enthaltene Fasern scheinen, wie auch die Organisation der Neurone, einen strikten periventrikulären Verlauf zu haben (**Abb. 4.3 D**). Die Begrenzung des Nucl. periventricularis ist durch gestrichelte Umrandung der Abbildung angedeutet. Eine weitere sehr dichte Anhäufung von vasopressinhaltigen Neuronen findet man dorsal des Nucleus arcuatus (**Abb. 4.3 E-F**). Dieses Kerngebiet ist ventrolateral des dritten Ventrikels lokalisiert und reicht bis an die Medianlinie. Der Nucleus arcuatus ist im Frontalschnitt kuppelartig bzw. bogenartig organisiert, wobei die Vasopressin-immunreaktiven Neurone des Nucl. supraopticus nicht-Vasopressin tingierte Nucl. Arcuatus-Neurone umschließen (**Abb. 4.3 E**). Exemplarisch sind in (**Abb. 4.3 F**) AVP-positive Neurone mit einem Pfeil markiert. Die gestrichelte Umrandung zeigt die Grenze des Nucleus arcuatus. Weit lateral des 3. Ventrikels findet man ein Areal von weniger dicht gelagerte AVP-immunreaktiven Neuronen, die eine laterale Portion des Nucleus paraventricularis zuzuordnen sind (**Abb. 4.3 H**). Eine genaue Betrachtung der Faserverbindungen im Hypothalamus (**Abb. 4.4 A**) zeigt eine deutliche Organisation der Faserverläufe. AVP-positive Fasern vom Nucleus paraventricularis projizieren in den lateralen Bereich des Hypothalamus (**Abb. 4.4 B**) und bilden ein undurchsichtiges und sehr dichtes Netzwerk aus Fasern im Bereich des Hypothalamus lateralis (**Abb. 4.4 C**). Teilweise finden sich Fasern und einige wenige Neurone im äußeren latero-dorsalen Bereich des Hypothalamus bzw. im pre-thalamischen Bereich der Zona incerta (**Abb. 4.4 D**, Pfeil), die als laterale Portion des Nucleus paraventricularis anzusehen sind. Weiterhin sind im ventralen Bereich des Hypothalamus viele Fasern nachweisbar, die durch das retrochiasmale Areal (**Abb. 4.4 E**) hindurchziehen und mit dem lateralen Hypothalamus im Verbindung stehen; diese tragen zum dichten vasopressinergen Netzwerk im Hypothalamus lateralis bei.

Abb. 4.1: AVP-immunreaktive Strukturen im Hypothalamus

A-C Nucl. paraventricularis. **D-F** Nucl. suprachiasmaticus. **D₁-F₁** Vergrößerung der Inserts aus D-F. **G-I** Nucl. supraopticus. Stern= 3.Ventrikel, Dreieck = Chiasma opticum. Vergrößerung A-C, D₁-F₁, G-I=x200, D-F =x100. merge = Superposition von AVP und DAPI-Färbung

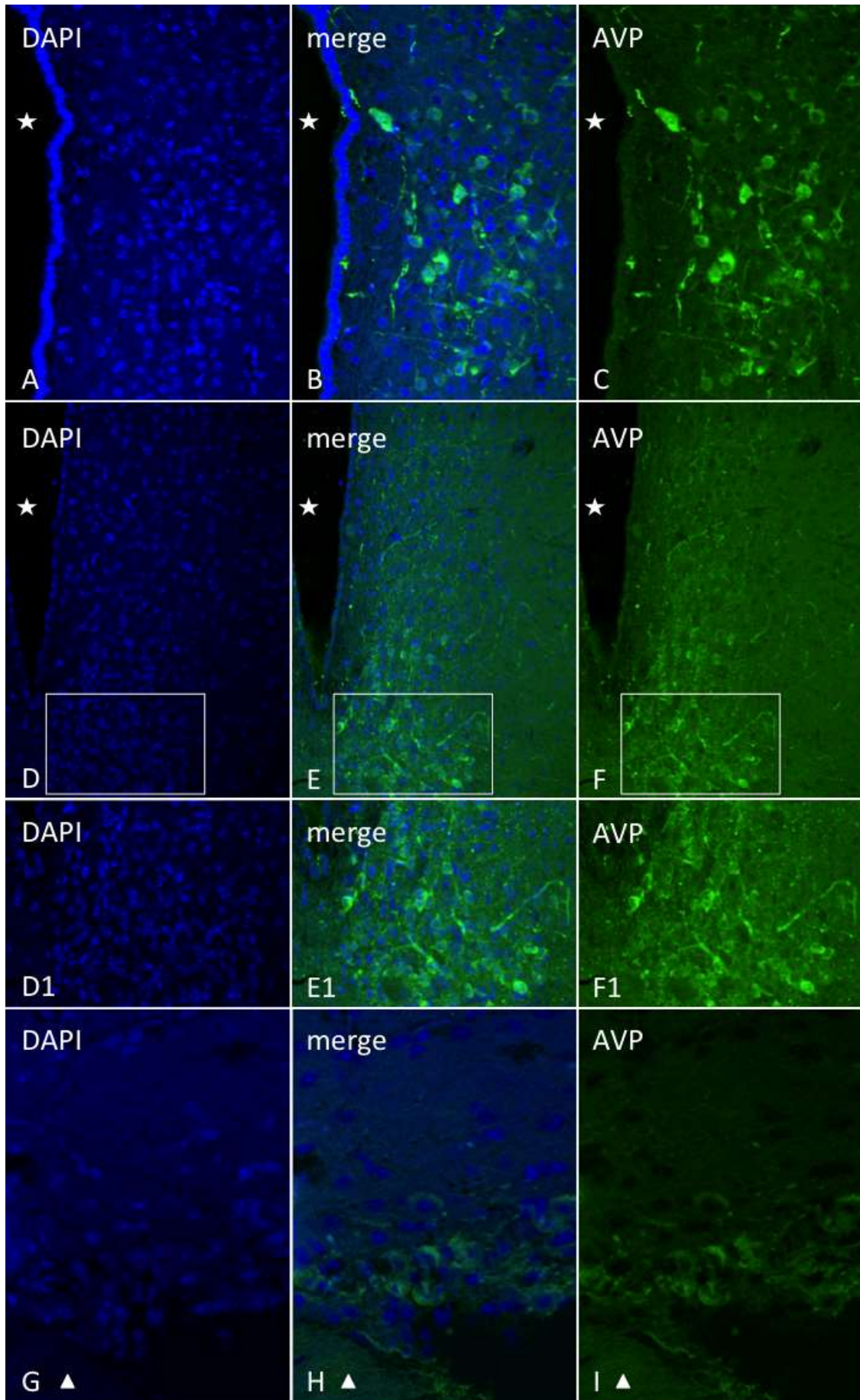


Abb. 4.2: Vasopressin Immunreaktion in der Eminentia mediana

A-C: Eminentia mediana. ZI = Zona interna. ZE = Zona externa. Stern = 3. Ventrikelz-
Pfeile = AVP-immunreaktive Fasern, die zwischen ZI und ZE verlaufen. merge = Super-
position von AVP und DAPI-Färbung. Vergrößerung: A-C = x200

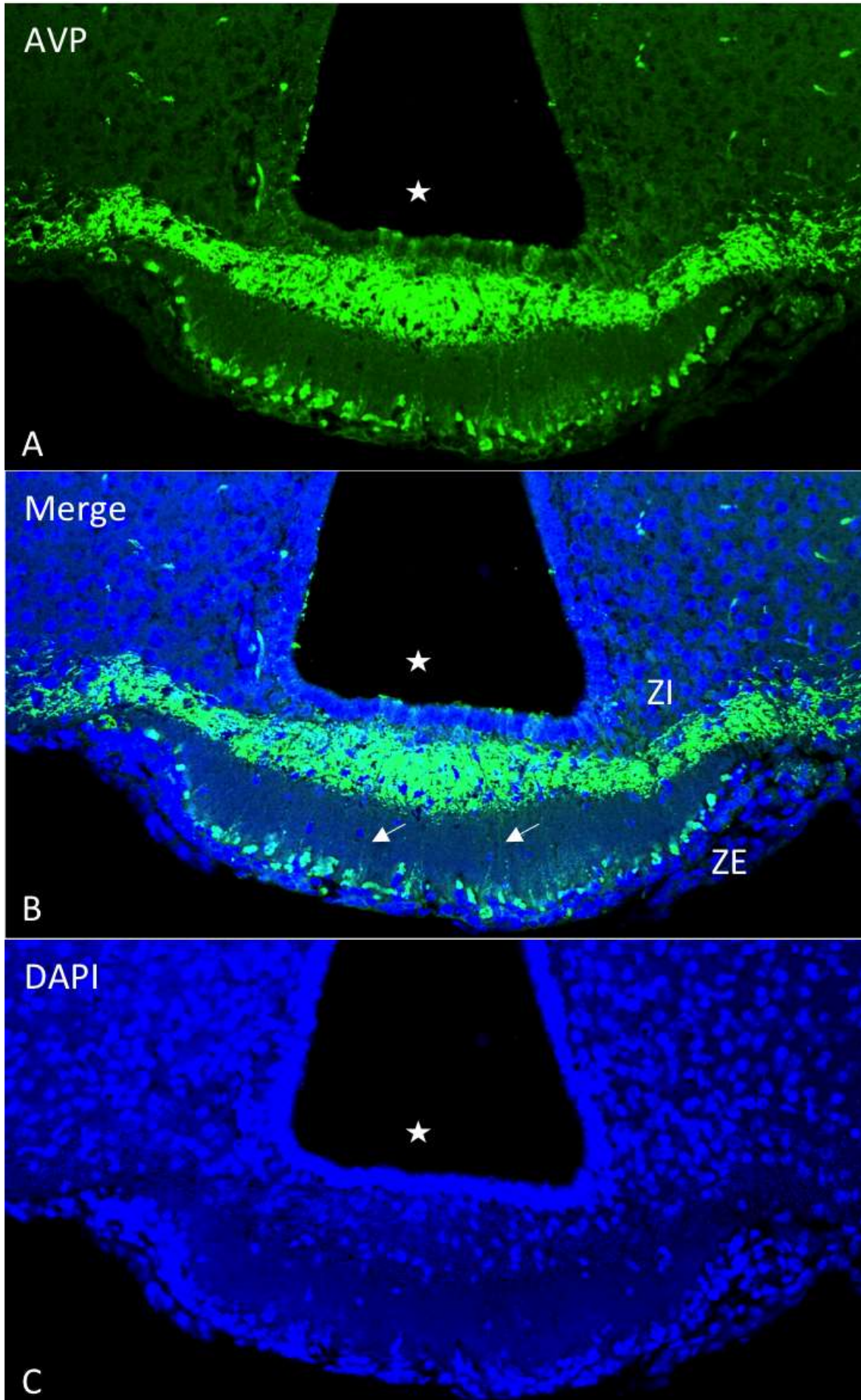


Abb. 4.3: Vasopressin-positive Neurone und Fasern im medialen Bereich des Hypothalamus

A Übersicht im anterioren Abschnitt des mittleren Hypothalamus. **B** Ausschnitt aus A mit Nucl. supra-chiasmaticus (SCN). **C** zentrale Abschnitte des mittleren Hypothalamus. **D** Ausschnitt aus C mit Nucl. periventricularis. **E** posteriorer Abschnitt des mittleren Hypothalamus. **F** Ausschnitt aus E mit Nucl. arcuatus. **G** wie E jedoch mit Insert für Nucl. paraventricularis. **H** Nucl. paraventricularis. Stern = 3. Ventrikel. Pfeile = AVP-immunreaktive Perikarya. merge = Superposition von AVP und DAPI-Färbung. Vergrößerung: A,C,E,G = x100, B,D,H = x200, F = x400.

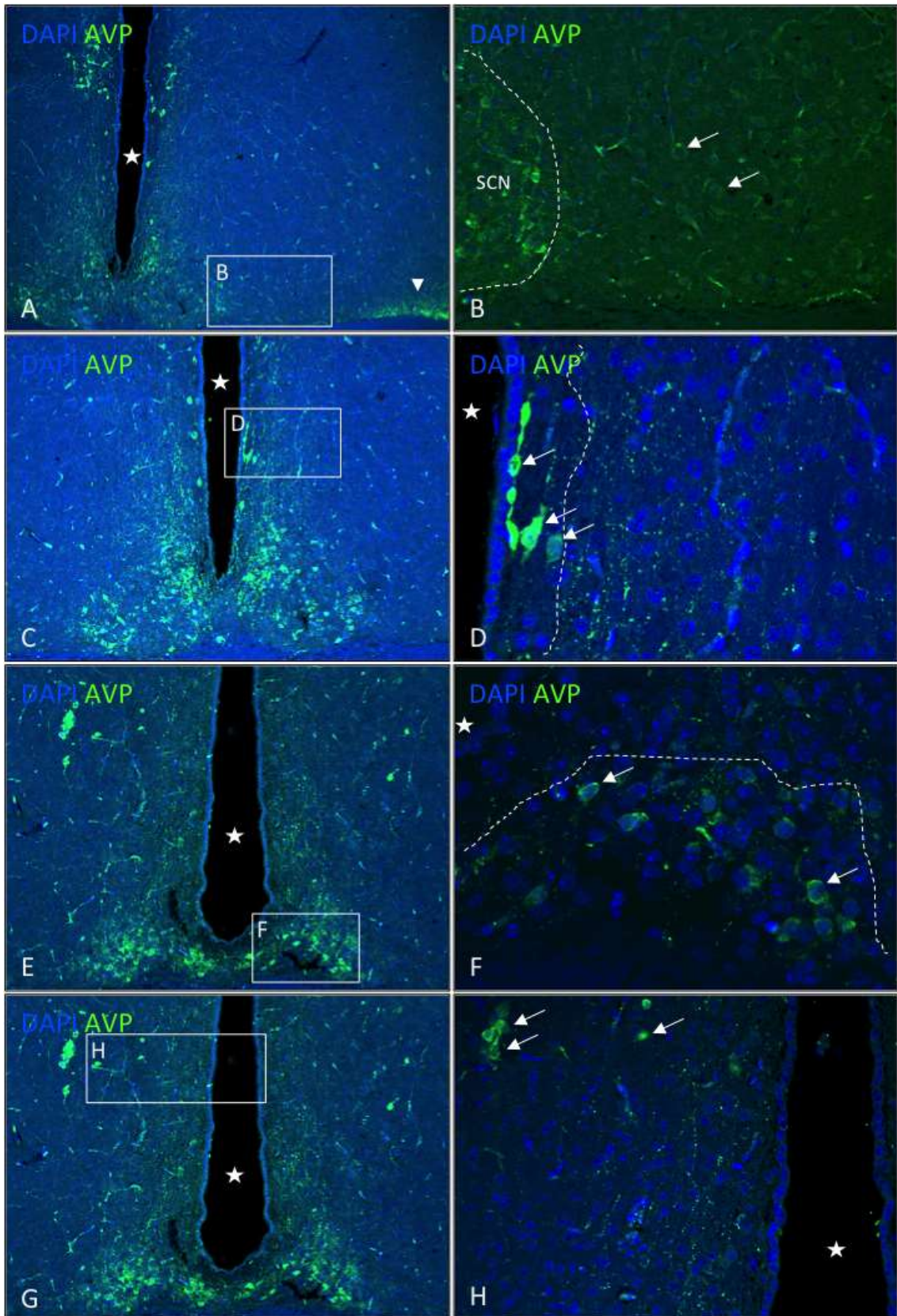
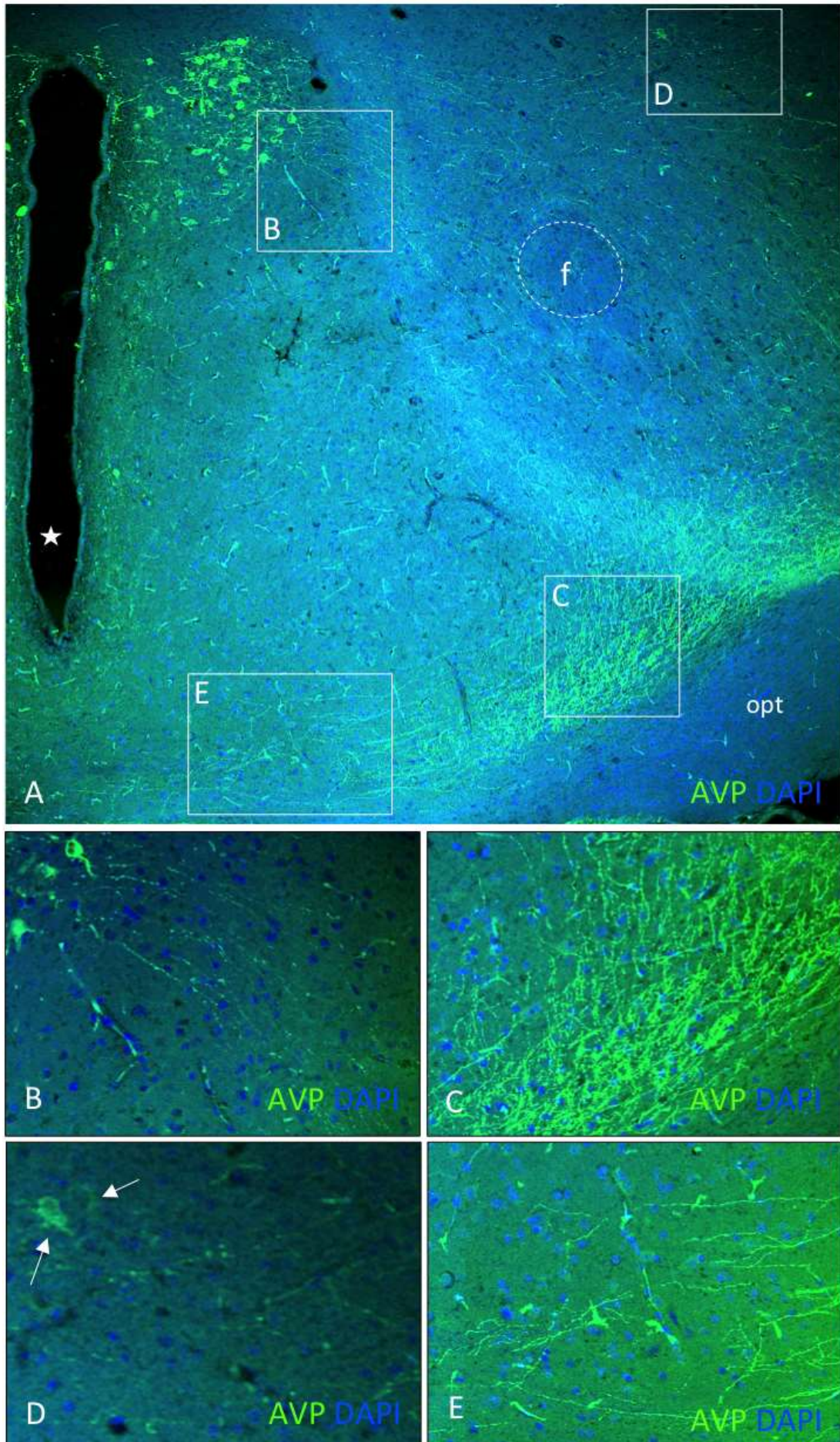


Abb. 4.4: AVP-positive Faserverbindungen im mittleren Hypothalamus

A Übersicht im posterioren Abschnitt des mittleren Hypothalamus. **B** Ausschnitt aus A mit Nucl. paraventricularis. **C** Ausschnitt aus A mit Darstellung eines komplexen Faser-Netzwerks. **D** Ausschnitt aus A mit vasopressinergen Fasern und Perikaryen im latero-dorsalen Bereich des Hypothalamus. **E** Ausschnitt aus A mit Darstellung von vasopressinergen Fasern im retrochiasmatischen Areal. Stern = 3. Ventrikel, f = fornix. Vergrößerung A,D=x100, B-C,E = x200



4.2 AVP Verteilung im Nucleus suprachiasmaticus bei C3H und C57BL

Vasopressin positive Neurone wurden bereits in der Einleitung als wichtige Elemente des SCN beschrieben. Die immunzytochemische Untersuchung des Kerngebietes zeigt den bekannten zytoarchitektonischen Aufbau des SCN, der keinen wesentlichen Unterschied zwischen den C3H-Mäusen und C57BL-Mäusen erkennen lässt. Im medialen und medio-ventralen Bereich findet sich eine hohe Dichte von Vasopressin-immunreaktiven Neuronen, die eng am 3. Ventrikel angelagert sind (**Abb. 4.5 / Abb. 4.6**). Weiterhin lässt sich im dorso-lateralen Randgebiet des Kerngebietes ebenfalls eine Gruppe von Vasopressin positiven Neuronen beobachten. Diese Gruppe ist weniger dicht gelagert und die Anzahl tingierter Neurone ist weitaus geringer als in der medialen Gruppe. Zwischen beiden untersuchten Mäusestämmen konnten leichte Unterschiede in der Verteilung von AVP-immunreaktiven-Perikaryen verzeichnet werden. Obwohl sich in beiden Stämmen, im medialen wie auch im lateralen Abschnitt, AVP-Perikaryen nachweisen ließen, zeigte nur der C3H-Stamm eine deutliche Strukturierung in zwei Neuronengruppen (**Abb. 4.5 A1, C**). Hingegen waren bei C57BL-Mäusen die Vasopressin-immunreaktiven-Neurone im Kerngebiet eher diffus verstreut und das Vasopressin nicht so stark tingiert (**Abb. 4.5 B1, D**). In beiden Stämmen ist der zentrale Bereich des SCN weitgehend frei von Vasopressin-immunreaktiven Neuronen.

Abb. 4.5: AVP-Verteilung im SCN von C3H und C57BL-Mäusen

A Koronarschnitt durch den ventromedialen Hypothalamus im Bereich des zentralen SCN (gestrichelter Kreis) bei C3H-Maus. **B** wie A mit Schnitt durch den SCN (gestrichelter Kreis) bei C57BL-Maus. **A1** Ausschnitt aus A mit Nucl. suprachiasmaticus der C3H-Maus. **B1** Ausschnitt aus B mit Nucl. suprachiasmaticus der C57BL-Maus. **C** wie A1 nur mit AVP-Färbung. **D** wie B1 nur mit AVP-Färbung. Stern = 3. Ventrikel, Vergrößerung: A-B=x100, A1-B1 und C-D = x400

Ergebnisse

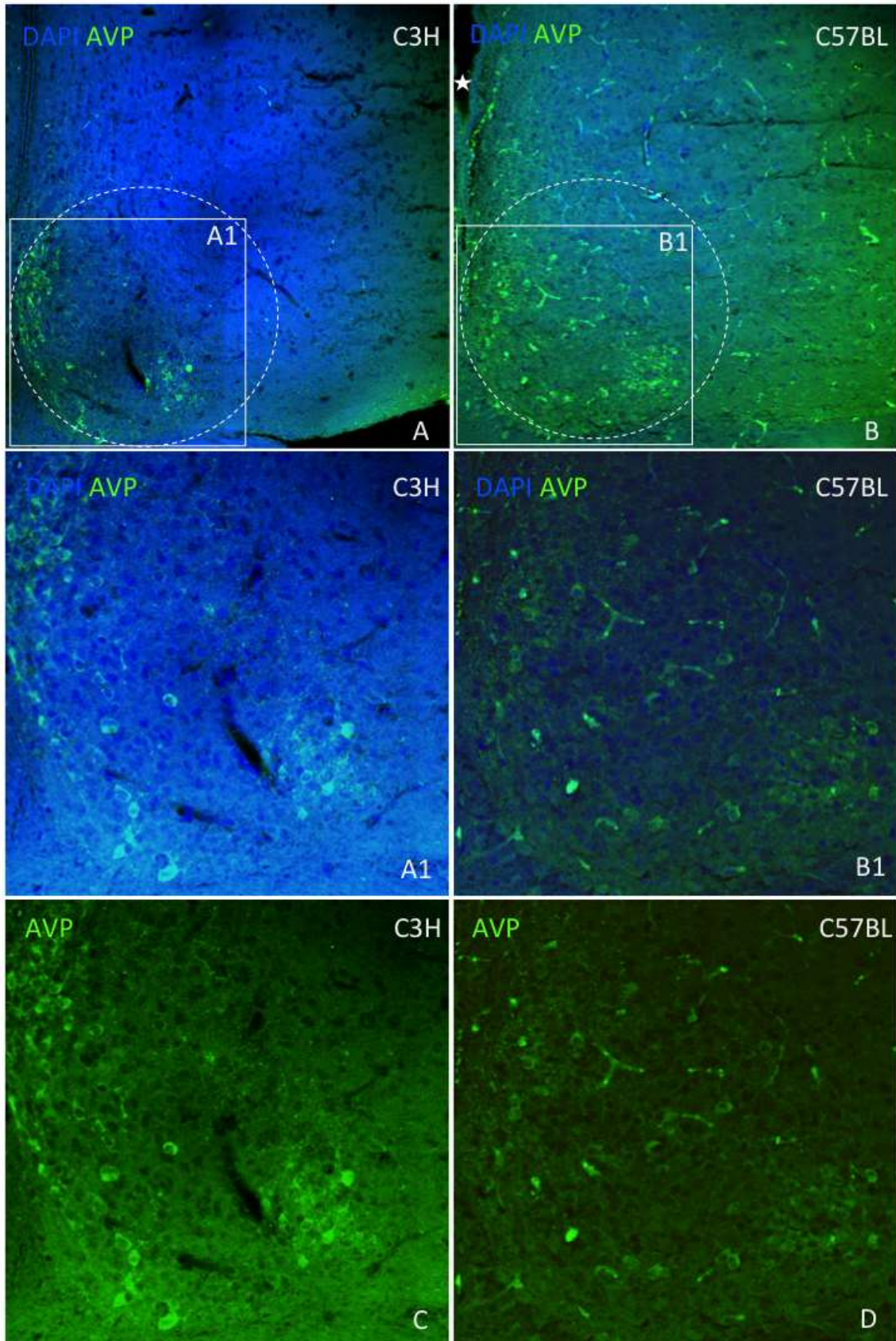
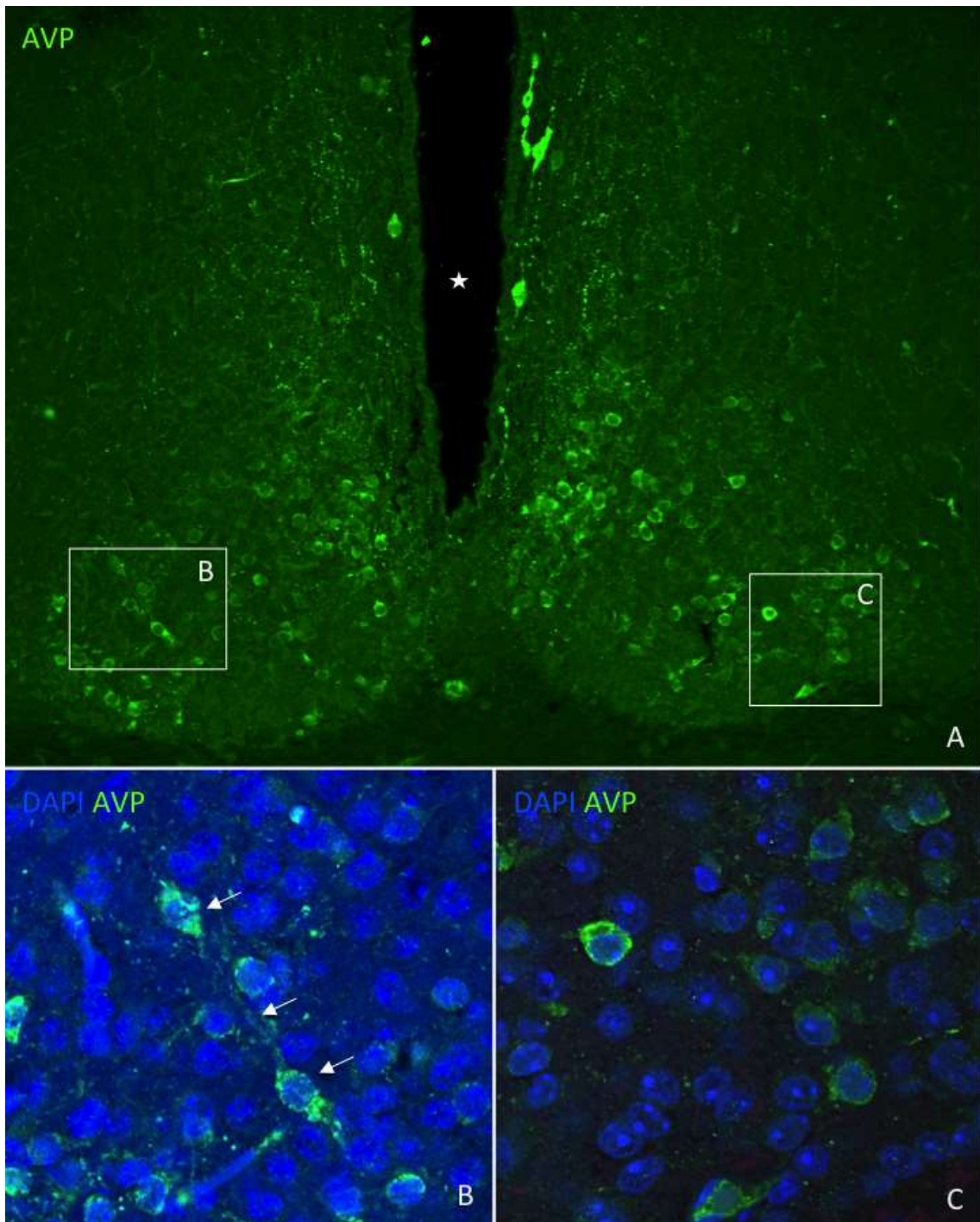


Abb. 4.6: Räumliche Beziehung von Vasopressin-Neuronen im SCN

A Übersichtsaufnahme Hypothalamusbereich mit Darstellung beider SCN. **B** Ausschnitt aus A mit Darstellung AVP-IR-Perikaryen in enger Beziehung zueinander im lateralen Bereich des SCN. **C** Ausschnitt aus A mit Darstellung AVP-IR-Perikaryen im lateralen SCN mit bei geringerer Dichte der Perikaryen. Stern = 3. Ventrikel. Pfeil = AVP immunreaktive Fasern, die AVP immunreaktive Perikaryen verbinden. Vergrößerung: A = x200, B-C = x600.



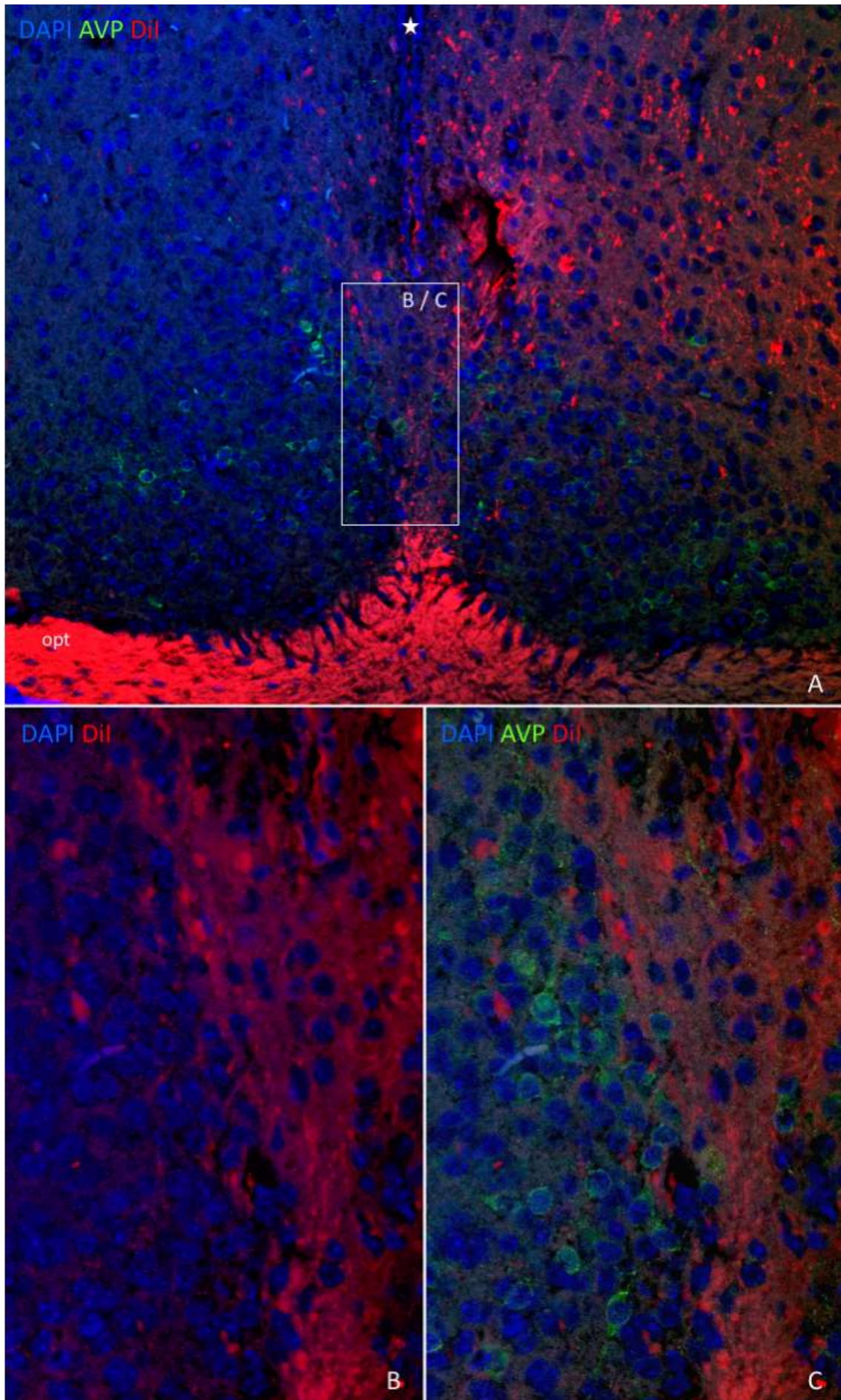
Wie in den Immunfluoreszenzbildern (**Abb. 4.6**) gezeigt wurde, waren die Fortsätze der Vasopressin-immunreaktiven Neurone im SCN wenig prominent. Die Übersichtsaufnahme (**Abb. 4.6 A**) vermittelt nochmals einen Eindruck von der Verteilung der Vasopressin-immunreaktiven Neurone im SCN. In der Vergrößerung (**Abb. 4.6 B**) des linken SCN sind zwei Neurone zu erkennen, die eine enge Faserbeziehung aufweisen. Sehr deutlich ist die nahe räumliche Beziehung der AVP-immunreaktiven Neurone im Kerngebiet mit nur kleinkalibrigen Faserverbindung in das umgebende Neuropil (**Abb. 4.6 C**).

4.3 Extrinsische Verbindungen des Nucleus suprachiasmaticus

Die Tracer-Studien mit Hilfe Dil zeigten, dass Verbindungen aus dem SCN heraus ihren Weg hauptsächlich dicht am Ependym des 3. Ventrikels über den periventriculären Kernbereich finden (**Abb. 4.7 B,C**). Dil stellt hier eine markante Kondensierung der Faserprofile dar. Außerdem fanden sich zahlreiche Nachweise des Tracers im dorsolateralen Bereich des SCN und vereinzelte Nachweise im zentralen Bereich des Kerngebietes (**Abb. 4.7 A**). Außerhalb des Kerngebietes ist die Darstellung diskreter, kleinkalibriger Dil-positiver Fasern möglich, jedoch ist anhand der genutzten Methodik keine Unterscheidung der Afferenzen oder Efferenzen möglich. Innerhalb des Kerngebietes war es möglich, die Strukturen darzustellen, die den Farbstoff aufnahmen.

Abb. 4.7: Dil-Markierung im medialen SCN

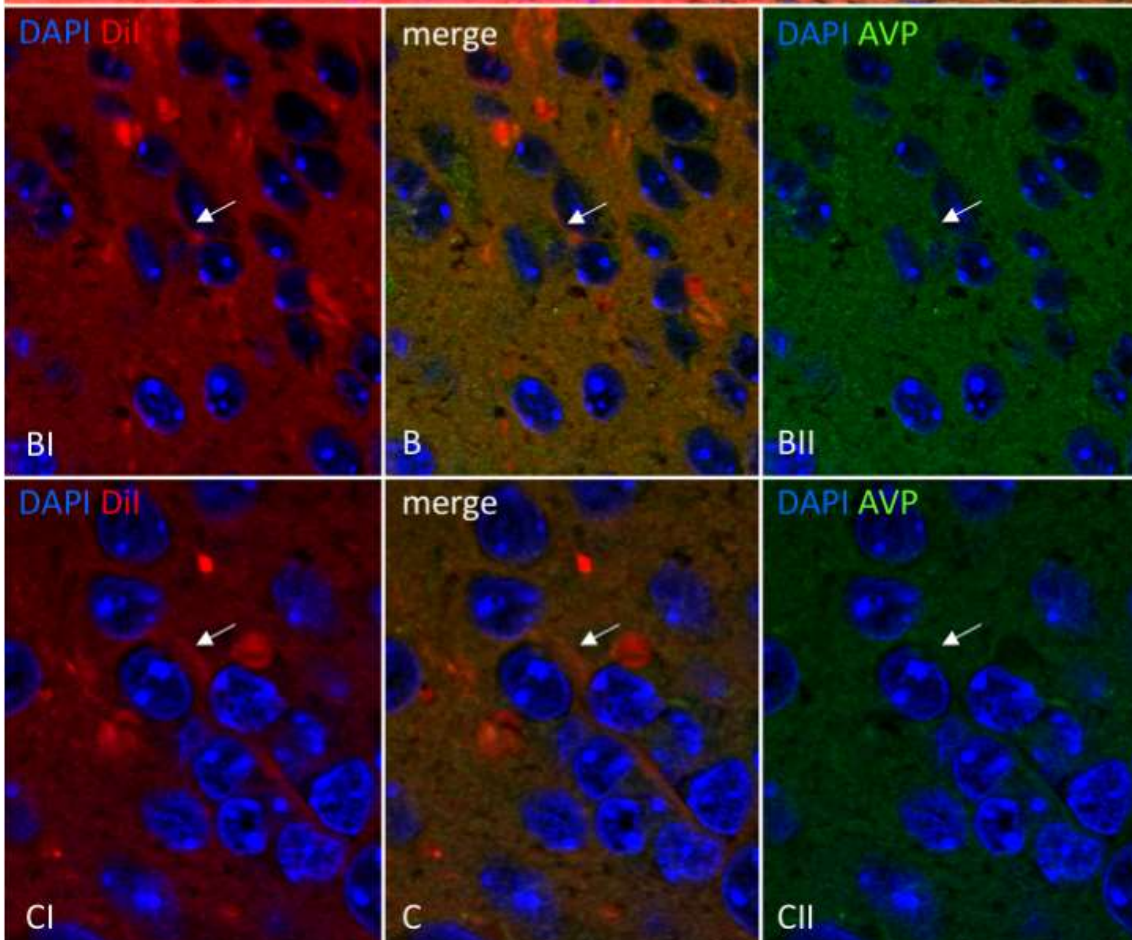
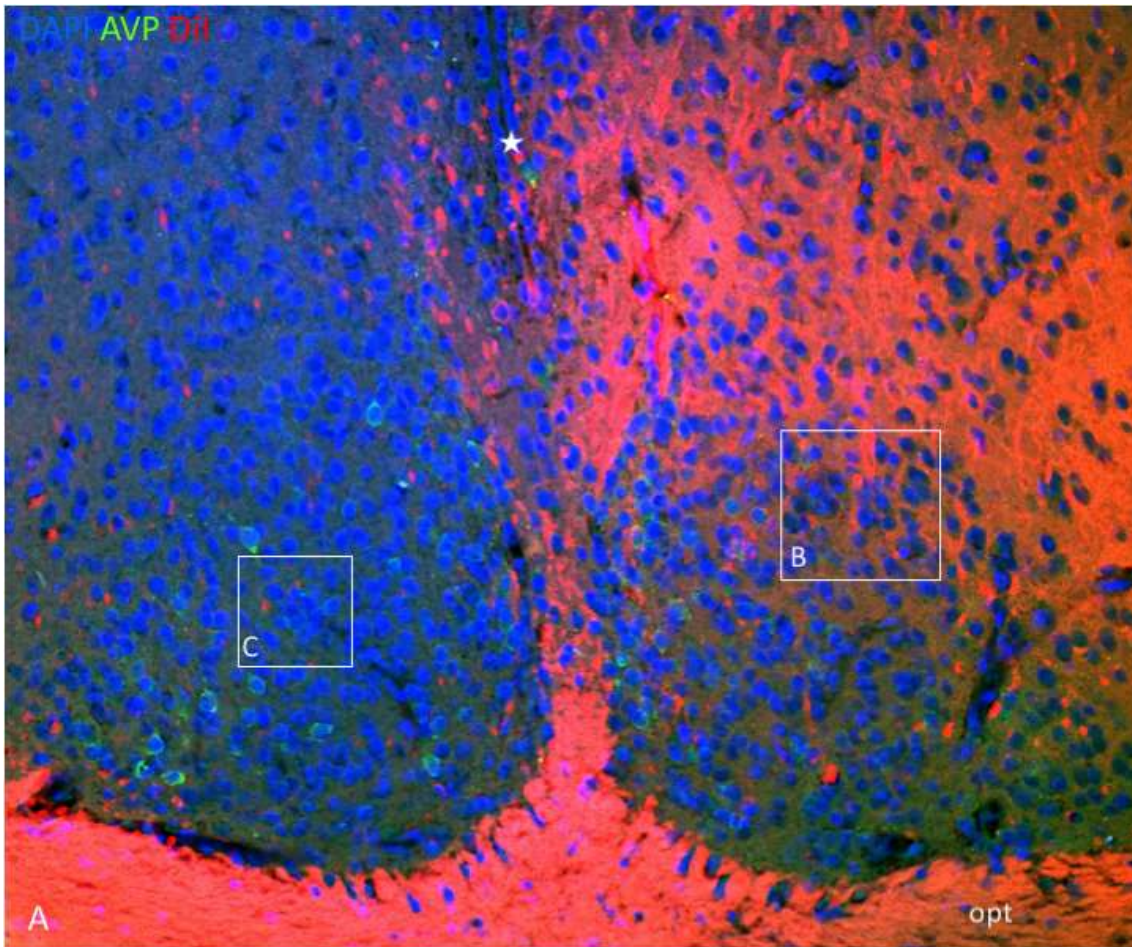
A Übersichtsaufnahme Hypothalamus im zentralen Bereich des SCN; das Chiasma opticum zeigt deutliche Autofluoreszenz. **B** Ausschnitt aus A mit Darstellung des periventriculären Bereiches. **C** Ausschnitt wie B mit zusätzlicher AVP-Färbung. opt = Chiasma opticum. Stern = 3. Ventrikel. Vergrößerung: A = x200, B-C = x400.



Sofern die Dil-Applikation in den periventriculären Kern auf der rechten Seite erfolgte, so zeigte sich das eine große Anzahl der tingierten Fasern im SCN über den medialen bzw. periventriculären Schenkel in den SCN verlaufen. Die Tracing-Untersuchungen mit Dil zeigten in gerade diesem Bereich eine hohe Dichte an Fasern, die im medialen Randbereich des SCN kondensiert sind. Außerhalb des SCN insbesondere im medialen Anteil des Hypothalamus fächern sich diese Fasern in verschiedenen Richtungen auf (**Abb. 4.7 B**). Teilweise haben die Fasern ihren Ursprung von den Vasopressin-positiven Neuronen (**Abb. 4.7 C**).

Abb. 4.8: Dil-Markierung im dorsalen SCN

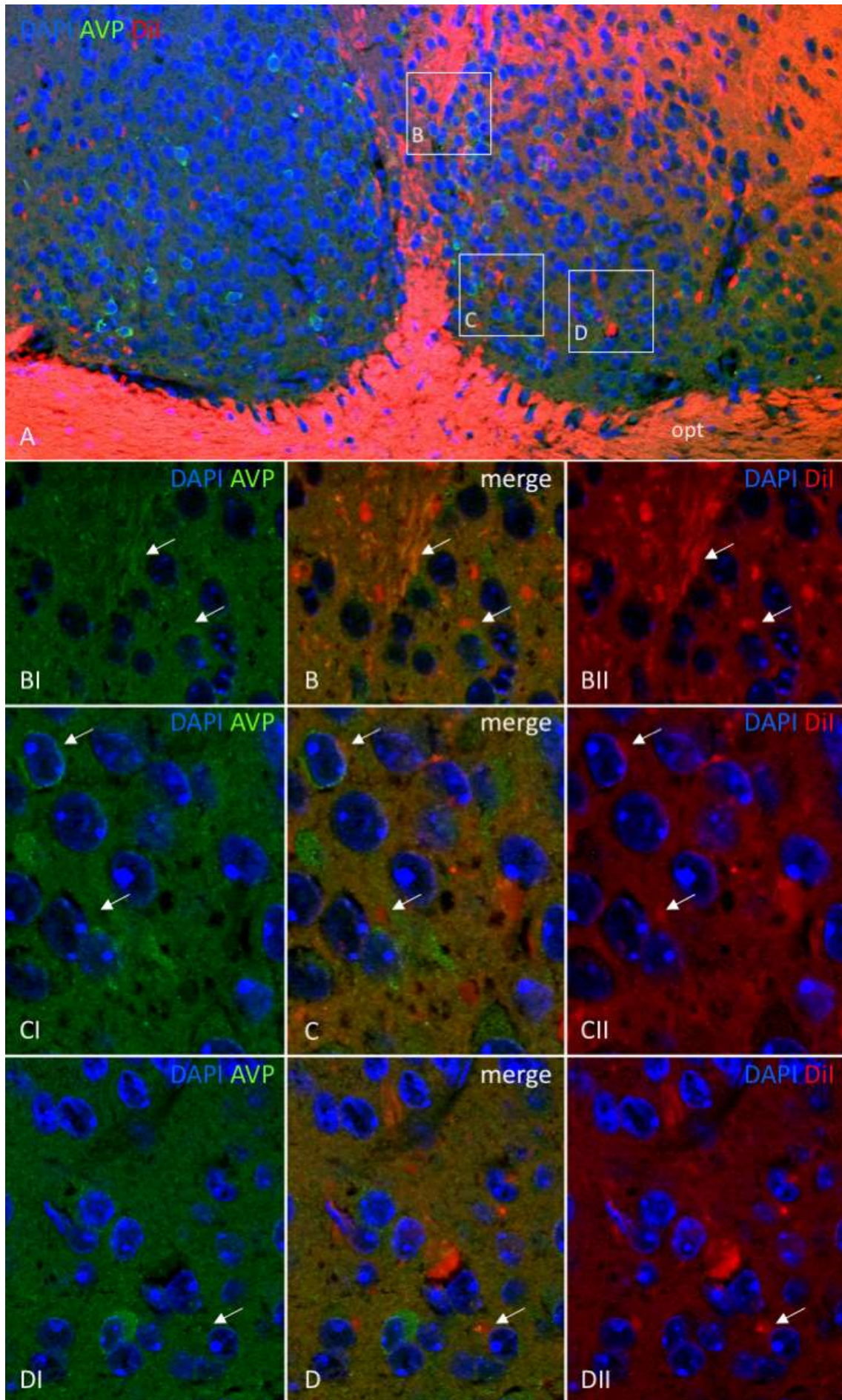
A Übersicht des dorsalen SCN mit Darstellung des Grenzbereiches (insbesondere im rechten SCN deutlich sichtbar) **B** Ausschnitt aus A mit Darstellung des Grenzbereiches und Darstellung des mit Dil gefärbten Neuropils im SCN (Pfeil). **BI-BII** Ausschnitt wie B nur mit separater Darstellung der Dil/DAPI- und AVP/DAPI-Färbung. **C** Ausschnitt aus A mit Darstellung des linken SCN mit Nachweis von Dil-positiven Fasern im zentralen SCN-Bereich. **CI-CII** Ausschnitt wie C nur mit separater Darstellung der Dil/DAPI- und AVP/DAPI-Färbung. Stern = 3. Ventrikel, opt = Chiasma opticum (mit Autofluoreszenz). Vergrößerung: A = x200, B, BI-BII = x400, C, CI-CII = x600



Erfolgte die Dil-Applikation beidseitig in den periventrikulären Bereich, so zeigte sich um den SCN herum eine starke Färbung des gesamten umgebenden Grenzbereichs. Der Dil-Farbstoff hob die Kernkontur des SCN deutlich hervor. Bei genauer Betrachtung erkennt man, dass der äußere Bereich des SCN keine starre Abgrenzung hat, sondern multiple Eingänge bzw. Ausgänge besitzt (**Abb. 4.8 A**). Dil-gefärbte Fasern durchdringen die SCN-Grenze im dorsolateralen Bereich, um insbesondere die Vasopressin-immunreaktiven-Neurone zu kontaktieren (**Abb. 4.8 B**). Andere Dil-gefärbte Fasern konnten bis in den zentralen Bereich des SCN verfolgt werden.

Abb. 4.9: Räumliche Beziehung von AVP-immunreaktiven Elementen und Dil- markierten Fasern

A Übersicht des dorsalen SCN (mit Darstellung des Grenzbereiches wie in **Abb. 4.8 A**). **B** Ausschnitt aus A: Faserverdichtung im medialen Bereich des SCN. **C** Ausschnitt aus A mit Nachweis Dil-Farbstoff in Perikaryen im medialen Teil des SCN. **D** Ausschnitt aus A mit Nachweis vom Dil-Farbstoff im zentralen Bereich des SCN. **BI-BII, CI-CII und DI-DII** wie B, C und D mit separater Darstellung der Dil/DAPI- und AVP/DAPI-Färbung. opt = Chiasma opticum mit Autofluoreszenz. merge = Superposition DAPI, AVP und Dil Färbung. Vergrößerung: A = x200, B, BI-BII = x600, C, CI-CII = x600, D, DI-DII = x600.



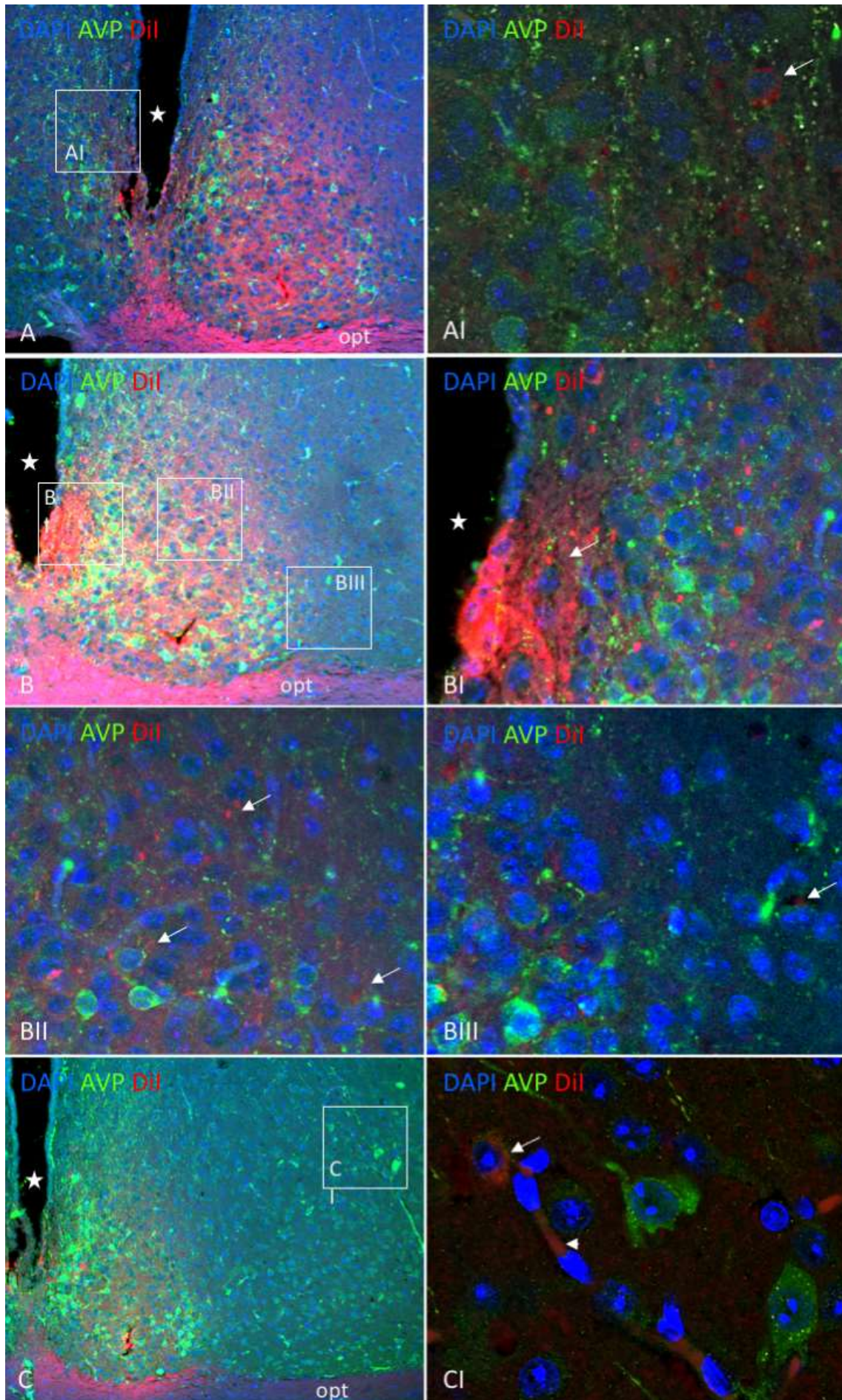
Die Fasern mit positivem Dil-Nachweis zeigten innerhalb des SCN im medialen Bereich eine deutliche Faserverdichtung (**Abb. 4.9** BII, vgl. auch **Abb. 4.7**). Die Mehrzahl dieser Fasern war Vasopressin-immunpositiv (**Abb. 4.9** B-BI). Weiterhin waren viele Fasern im medialen Randbereich des SCN nachweisbar, die sich in räumlicher Nähe zu den Vasopressin-immunreaktiven-Neuronen befanden. Die Fasern waren zumeist nicht über längere Strecken darstellbar, sondern die Dil-Markierung war im Zytoplasma bzw. in enger Apposition zu Neuronen zu beobachten (**Abb. 4.9** C, Pfeil auf Dil-Farbstoff im Zytoplasma bzw. Zellhülle). Aufgrund der Diffusion zeigte sich der Farbstoff als homogene Hintergrundfärbung im Neuropil des SCN, jedoch ließen sich diskrete Faserprofile mit Dil Anfärbung zahlreich in den Bereichen auffinden, in denen Vasopressin-immunreaktive-Neurone prominent vorkamen. Vereinzelte Dil-positive Fasern waren jedoch auch in Bereichen nachweisbar, in denen keine Vasopressin-immunreaktive-Neurone lokalisiert waren; dieses Bild bot sich hauptsächlich im zentralen Bereich des SCN.

4.4 Intrinsische Verbindungen des Nucleus suprachiasmaticus

Zur Darstellung der intrinsischen Verbindungen erfolgte die Applikation eines Dil-Kristalls in den rechten SCN. Dies führte zur Anfärbung von Fasern innerhalb des Kerngebietes, aber auch zu Tingierung von Fasern, die aus dem SCN in das umgebende Neuropil übertraten. Eine Darstellung der Fasern innerhalb des ipsilateralen SCN-Kompartiments war kaum möglich, da dort die hohe Konzentration von Dil eine genaue Differenzierung der einzelnen Fasern nicht möglich machte. Außerhalb des Kerngebietes konnten die Neurone nachgewiesen werden, die durch den Farbstoff markiert wurden. Die Ergebnisse zeigen, wie bei der Untersuchung der extrinsischen Verbindung zuvor, dass der SCN im dorsomedialen Bereich sowie auch im gesamten dorsalen und lateralen Grenzbereich multiple Faserpassagen besitzt. Ebenso fanden sich durch Färbung des kontralateralen SCN, wie auch anderer kontralateraler Kerngebiete (z.B. Nucleus periventricularis) zahlreiche Hinweise auf kommissurale Kommunikationswege zwischen beiden SCN-Hemisphären und Verbindungen zwischen Kerngebieten des kontralateralen Hypothalamus und des ipsilateralen SCN (**Abb. 4.10 A-AI**).

Abb. 4.10: Darstellung der Faserverbindungen nach Applikation von Dil in den SCN

A rechter Nucl. suprachiasmaticus nach einseitiger zentraler Dil-Applikation. **AI** Ausschnitt aus A mit Nachweis von Dil Färbung in Perikaryen im kontralateralen Nucl. periventricularis. **B** einseitige Dil Applikation in den rechten Nucl. suprachiasmaticus. **BI** Ausschnitt aus B mit Darstellung dichter Faserverbindung im dorsomedialen Anteil des SCN. **BII** Ausschnitt aus B: Dil-gefärbte Faserverbindung im Grenzbereich des SCN. **BIII** Ausschnitt aus B mit weiteren Nachweisen Dil-gefärbter Faserverbindungen im lateralen Grenzbereich des SCN. **C** Einbindung des SCN in den Hypothalamus. **CI** Ausschnitt aus C mit Darstellung Dil gefärbte Perikaryen (Pfeil) im Bereich der Area hypothalamica lateralis, Pfeilspitze zeigt auf ein Blutgefäß. Stern = 3. Ventrikel. opt = Chiasma opticum. Vergrößerung: A-B = x200, C = x100, BI-BIII = x400, CI = x600.



Erfolgte die Applikation eines Dil-Kristalls in den zentralen Bereich des SCN, so zeigte sich generell eine starke Färbung des gesamten Kerngebietes (**Abb. 4.10 A**). Die weitere Analyse ergab, dass der Farbstoff Verbindungen markierte, die bis zum kontralateralen SCN verliefen. Weitere Dil gefärbte Fasern erreichten den periventriculären Bereich (**Abb. 4.10 AI**). Der Pfeil in dieser Abbildung zeigt exemplarisch auf ein mit Dil gefärbtes Neuron im Nucl. periventricularis. Weiterhin war eine große Anzahl von Fasern im dorsomedialen Anteil des SCN konzentriert, die über die Begrenzung des Kerngebiets in periventriculärer Richtung hinausführte. Der Pfeil in **Abb. 4.10 BI** zeigt auf derartige dichte Faserverbindungen, die jedoch nicht in individuelle Faserprofile aufgelöst werden können. Weitere Dil-gefärbte Faserverbindungen waren im gesamten dorsalen und lateralen Randbereich wie auch im nahen Außenbereich des SCN lokalisiert (**Abb. 4.10 BII–BIII**). Die Pfeile deuten hier auf die Dil-Färbung in den Neuronen unmittelbar außerhalb des Kerngebietes. Die Ergebnisse der Untersuchung belegen weiter, dass die Dil-Fasern vom SCN sehr weit in den Hypothalamus hineinziehen. Ihr Nachweis erfolgte im lateralen Hypothalamus (**Abb. 4.10 CI**), wo Neurone mit Dil gefärbten Perikaryen regelmäßig aufgefunden wurden.

5 Diskussion

5.1 Kritische Bewertung der Methodik

5.1.1 Färbemethode

Zum Nachweis von Vasopressin wurde die Technik der Immunzytochemie mit Fluorophor-gekoppeltem Zweitantikörper-Nachweis verwendet. Die Spezifität der Immunfärbung wurde durch die entsprechenden Testverfahren mit Präabsorption und Puffersubstitution bei allen Reaktionsschritten geprüft. Die Antikörperfärbung erfolgte nach den etablierten Regeln und auf der Basis der nach langjähriger Erfahrung erstellten Protokolle. Somit wurde eine hohe intra- und interprozedurale Konstanz erzielt, Kreuzreaktionen waren ausgeschlossen worden. Für die Tracer-Studien wurde der lipophile und fluoreszierende Dil-Farbstoff gewählt. Dil-Färbung bzw. Tracing ist eine einfache Methode um Membranstrukturen in ihrer gesamten Ausbreitung darzustellen. Das Gewebe muss dafür nicht speziell vorbereitet werden, jedoch müssen die Membranen zu Aufnahme des Tracers in die hydrophobe Innenschicht der Fettsäurephase eröffnet werden. Es bedarf darüber hinaus vieler Versuche und umfassender Erfahrung, um die genaue Menge an Kristall zu applizieren. Eine zu große Menge bedeutet eine komplette Überfärbung der Präparate und somit eine Überdeckung der zu untersuchenden Zielregionen. Leider ist es mit den Dil-Tracing nicht möglich, spezielle Richtungsuntersuchungen - also gezielt Efferenzen oder Afferenzen - zu unterscheiden. Es handelt sich dabei um eine Methode, die alle Fortsätze eines Neurons gleichermaßen färbt und dadurch neuronale Verbindungen zu analysieren ermöglicht. Sofern Perikaryen gefärbt erscheinen, lässt sich jedoch auch auf die Richtung der neuronalen Verbindung schließen. Für die vorliegende Arbeit wurde trotz der beschriebenen Problemkreise die Dil-Tracing-Methode gewählt, da sie ohne Probleme post mortem angewendet werden kann. Dies ist vor allem für Studien mit generellem Charakter, wie in der vorliegenden Dissertationsarbeit angestrebt, sehr attraktiv, da kein Tierversuch im Sinne der Tierschutzgesetzgebung mit für das Versuchstier einhergehenden postoperativen Beeinträchtigungen durchgeführt werden muss.

5.1.2 Applikationsmethode

Bei der Anwendung der Dil-Färbung kommt nicht nur die in **5.1.1** genannte Problematik zum Tragen, sondern der Erfolg war vom Auffinden des richtigen Zielorts für die Applikation bei jedem Präparat abhängig. Die Applikation erfolgte mit einer feinen Nadel per Hand unter Lupenkontrolle, somit musste versucht werden, ohne große Abweichungen die Zielregion aufzufinden. Zudem war es erforderlich, die Dil-Applikation so durchzuführen, dass der Kristall nicht zu tief in das Gewebe oder gar hindurchgesteckt wurde. Bei der mikroskopischen Auswertung der Präparate wurde diese Fehlermöglichkeit initial analysiert, und für die Befunderhebung wurden nur die Präparate mit korrekter Applikation verwendet. Dennoch müssen bei dieser Methode Gewebeschäden in unmittelbarer Umgebung des Tracer-Applikationsorts toleriert werden.

5.1.2.1 Autofluoreszenz

Natürliche Fluoreszenz (Autofluoreszenz) ist bedingt durch Substanzen wie Porphyrine oder Flavine. Bei fixierten und somit bereits bearbeiteten Geweben haben diese Substanzen in der Regel keine Bedeutung. Jedoch zeigt besonders neuronales Gewebe eine Prädisposition für Autofluoreszenz, da dieses Gewebe einen hohen Anteil an Lipofuszin etc. besitzt und somit Autofluoreszenz begünstigen ⁵¹. Zu den natürlichen Fluoreszenzen kommen Möglichkeiten hinzu, Autofluoreszenzen zu induzieren. Speziell bei Gewebefixierung mit Aldehyden kommt es sehr häufig zu Reaktionen mit Gewebeproteinen und zu einer deutlichen Induktion autofluoreszierender Produkte ⁵². In dieser Arbeit zeigte sich aufgrund der Fixierung mit Paraformaldehyd eine deutliche Autofluoreszenz der Präparate. Problematisch ist darüber hinaus, dass sich stark myelinisierte Faserbündel – wie das Chiasma opticum – leicht mit freiem Dil beladen. Die Myelinscheide wirkt gewissermaßen wie eine Dil-Falle.

5.2 Nucleus suprachiasmaticus

Der SCN ist ein bilateral symmetrisches Kerngebiet im Hypothalamus von höheren Wirbeltieren; seine Neurone generieren die circadiane Rhythmik und somit ist der SCN Sitz der inneren Tageszeitenuhr. Die nötigen Funktionen zur Erzeugung der circadianen Rhythmik sind in den komplexen neuronalen Verschaltungen innerhalb und außerhalb des Kerngebietes kodiert, sie benötigen ein Zusammenwirken von zahlreichen Neurotransmittern⁶. Zwei Neuropeptide spielen neben dem intrinsischen Neurotransmitter GABA bei der Ausbildung der circadianen Rhythmik eine wesentliche Rolle: Vasopressin (AVP) und das Vasoaktive-intestinale-Peptid (VIP)⁵³. Daher wurde in dieser Arbeit das Expressionsmuster eines dieser Neuropeptide (AVP) im SCN und im benachbarten Hypothalamus untersucht. Ein weiteres wichtiges Element für die circadiane Prozesskontrolle sind die neuronalen Verbindungen innerhalb des SCN und insbesondere die ein- bzw. ausgehenden Verbindungen zu anderen vegetativen Regelkernen. Um diese Untersuchungen durchzuführen, wurden C3H und C57BL Mäuse als Versuchstiere gewählt. Um das Neuropeptid Vasopressin in seiner Reaktivität zu untersuchen, wurden immunzytochemische Methoden angewandt. Weiterhin wurde eine Tracer-Studie mit Dil durchgeführt um die Kommunikationswege nahe zum SCN wie auch innerhalb des SCN zu analysieren.

Eine Charakterisierung der Verschaltung dient dem Verständnis, die Funktionsweise des SCN im Organismus besser zu verstehen und ermöglicht somit möglicherweise ein Erklärungsmodell für die Entstehung mancher Krankheitsbilder wie Schlafstörung, affektive Störung, metabolische Störung und sogar bestimmte Krebserkrankungen⁵⁴⁻⁵⁶.

5.3 AVP im Hypothalamus

Die Vasopressin-positiven Neurone zeigen im Expressionsmuster und ihrer Häufigkeit im Hypothalamus keine wesentlichen Unterschiede zwischen den Mäusestämmen C3H und C57BL auf. Die Immunzytochemie erlaubte eine semiquantitative Darstellung der Expressionsmuster. Die Anwendung von Kombination Dil als Tracer ließ keine Aussage darüber zu, ob es sich bei den tingierten Dil-Fasern um afferente oder efferente Projektionsverläufe handelte. Unabhängig von den verschiedenen Mäusestämmen entsprach das Expressionsmuster der Zellkörper und Fortsätze im Hypothalamus wie auch speziell im SCN den Befunden aus der rezenten Literatur ^{26,34}.

In den Kerngebieten Nucleus paraventricularis und Nucleus supraopticus fand sich die höchste Dichte an Vasopressin-positiven Perikaryen. Dies wurde bereits von Watts und Swanson (1987) beschrieben ²⁶. Diese Beobachtung erklärt sich aus der Wichtigkeit der beiden Kerngebiete, die im Wesentlichen für die folgenden physiologischen Prozesse verantwortlich sind, für die Aufrechterhaltung und Regulierung des Wasserhaushalts, der Körpertemperatur und des Blutdrucks. Weiterhin besteht nicht nur die bekannte physiologische Verknüpfung bei der Kontrolle der beschriebenen Prozesse, sondern es lassen sich immunzytochemisch Faserverbindungen nachweisen, die vom Nucleus paraventricularis ausgehen und nach ventrolateral verlaufen um sich dort mit den Fasernbündeln des Nucleus supraopticus zu vereinigen und ein dichtes Netzwerk hin zur Eminentia mediana auszubilden. Gemeinsam projizieren diese Fasern entlang Eminentia mediana in die Neurohypophyse ⁵⁷. Dies wird durch die starke Immunreaktivität Vasopressin-positiver Axone in der Eminentia mediana bestätigt. Weitere Nervenfasern mit positivem Vasopressin-Nachweis fanden sich im Nucleus arcuatus; sie sollen ihren Ursprung im Nucleus suprachiasmaticus haben ^{31,34}. Diese Verknüpfung dient offenbar primär der circadianen Modulation der Nahrungsaufnahme und der Gewichtsregulation ^{58,59}. Weiterhin fanden sich Vasopressin-positiv Fasern in der Area hypothalamica lateralis (AHL) die teilweise aus dem SCN und teilweise aus dem Nucleus arcuatus stammen. Im Nucleus arcuatus befinden sich Neurone, die appetitfördernde Peptide wie das Neuropeptid Y (NPY) oder das appetithemmende Melanozyten stimulierendes Hormon (MSH)

enthalten. Diese Peptidhormone wirken auf die AHL ein und haben eine aktivierende oder eine inhibitorische Wirkung⁶⁰. Auf diese Untersuchung basierend kann postuliert werden, dass eine gestörte circadiane Rhythmik mit einer gestörten Nahrungsaufnahme assoziiert ist, diese wiederum kann ein erhöhtes Risiko zur Entwicklung von Adipositas, Diabetes und letztendlich für Herz-Kreislauf-Erkrankungen bedeuten^{61,62}.

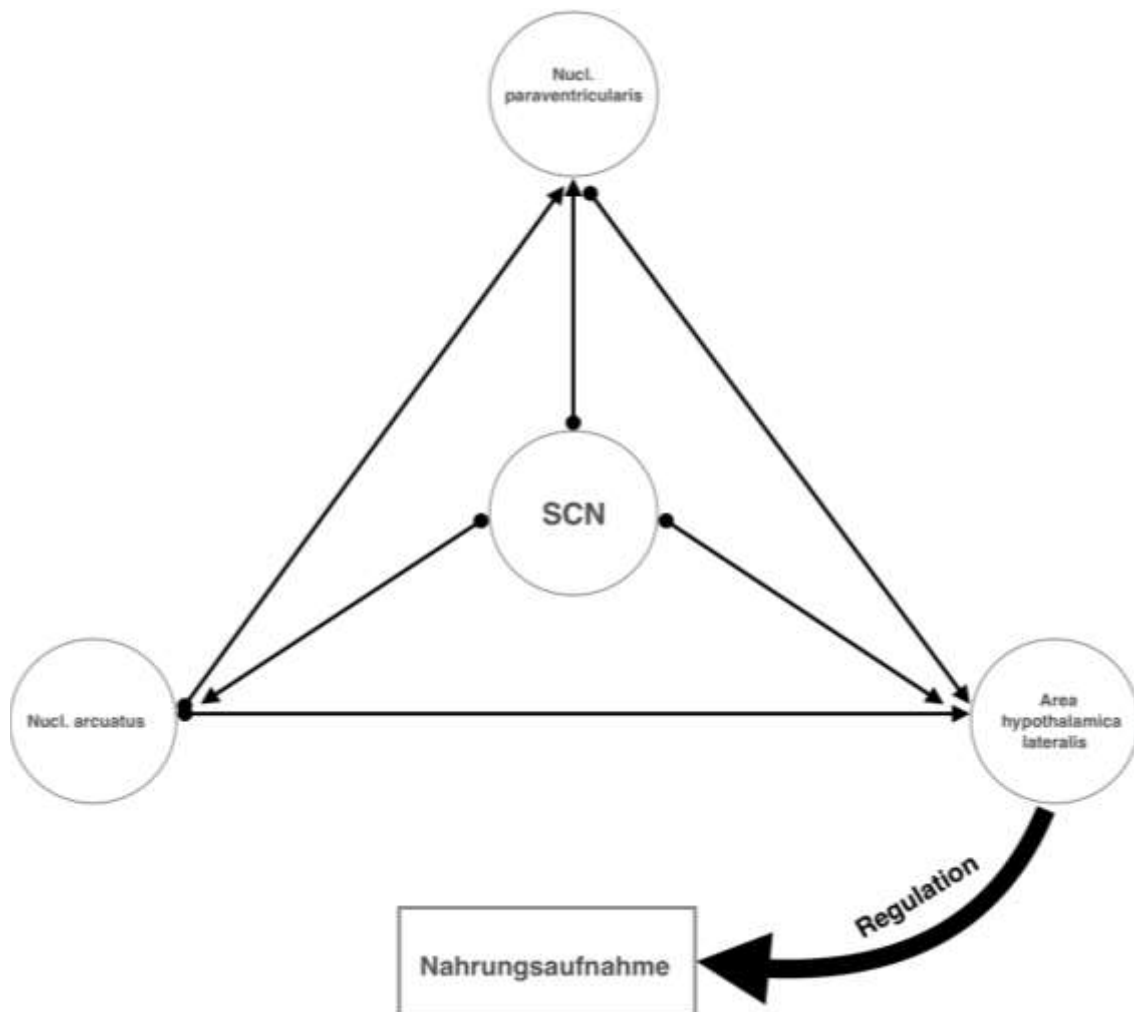


Abb. 5.1: SCN als zentraler Zeitgeber der neuronalen Regulation der Nahrungsaufnahme

5.4 AVP im Nucleus suprachiasmaticus

Die Verteilung der Vasopressin-positiven Neurone im SCN zeigen eine spezifische räumliche Organisation innerhalb des Kerngebietes. Es bestätigt sich die bereits beschriebene Zytoarchitektur mit einer dorsomedialen Kondensation der Vasopressin Perikaryen¹⁷. Erhebliche Unterschiede zwischen C3H-Mäusen und C57BL-Mäusen in Lokalisationsmuster der Perikaryen konnten nicht nachgewiesen werden, jedoch war die Neuronendichte, insbesondere diejenige im medialen Aspekt des SCN (dorsomedial / periventrikulär) bei C3H-Mäusen deutlich größer als bei den C57BL-Mäusen. Die C57BL-Mäuse haben aufgrund einer Mutation eine angeborene Melatoninsynthesestörung und somit einen Melatoninmangel. Die Melatonin Feedback-Schleife hat eine inhibierende Funktion auf den SCN und somit eine modifizierende Wirkung auf die circadiane Rhythmik⁶³. Das Neuropeptid Vasopressin im SCN dient vermutlich der Synchronisierung und dadurch der Aufrechterhaltung des circadianen Rhythmus und dessen Weiterleitung zu anderen Kerngebieten.

Die Konzentration des Neuropeptids im SCN unterliegt ebenfalls einer circadianen Rhythmik, wobei die Rhythmik des Vasopressins hauptsächlich dem Hell/Dunkel-Wechsel folgt^{19,64}. Der generelle Melatoninmangel bei den C57BL-Mäusen könnte das Vasopressindefizit erklären. Da auch die Melatonin-Synthese⁶⁵ vom Hell/Dunkel-Wechsel⁶⁶ abhängig ist, sollte man annehmen, dass bei C3H-Mäusen ebenfalls ein Vasopressinmangel zu erwarten ist. Die C3H-Mäuse sind nämlich durch gezielte Züchtung von Geburt an blind, da diese einen angeborenen Retina-Schaden besitzen. Somit sollten Individuen dieses Mäusestammes den Hell/Dunkel-Wechsel nicht wahrnehmen können, jedoch bestätigte sich diese Annahme in der Untersuchung nicht. Ein Erklärungsversuch für dieses Phänomen könnte sein, dass vermutlich der Retina-Schaden nicht komplett ausgeprägt ist und die wenigen retinalen Melanopsin-Ganglienzellen, unter Umständen spezielle PACAP-Neurone, die Informationen über den retinohypothalamischen Trakt an den SCN weiterleiten^{22,67}.

Die Vasopressin-positiven Neurone im SCN stehen mit anderen Entitäten des Hypothalamus in Verbindung. Dabei zeigt sich, dass der mediale Anteil (dmSCN) mit dem Nucleus paraventricularis in Verbindung steht. Die Untersuchungen zeigten, dass diese Fasern den SCN über den medialen Anteil parallel zum 3.

Ventrikel verlassen, um polysynaptisch verschaltet über den Nucleus periventricularis den weiter dorsal gelegenen Nucleus paraventricularis zu erreichen. In früheren Tracing-Untersuchungen wurde dieser Weg bereits von Watts & Swanson (1987) ²⁶ beschrieben. Innerhalb des SCN zeigten sich die Verschaltungen der Vasopressin-positiven Neurone aufgrund der engen Nachbarschaftsbeziehung untereinander sehr undeutlich. Dennoch waren einzelne Fasern bei starker Vergrößerung differenzierbar und es zeigte sich, dass die Neurone innerhalb des Kerngebietes miteinander verschaltet waren. Dies bestätigt die früheren Beobachtungen von Van den Pol (1980) ¹⁴. Die intrinsische Verschaltung deutet darauf hin, dass innerhalb des Kerngebietes die individuellen Schrittmacher-Neurone für die Erzeugung der generellen circadianen Rhythmik Vasopressin-vermittelt gekoppelt sind ⁴⁰.

5.5 Extrinsische Verbindungen des Nucleus suprachiasmaticus

Zur Darstellung der Verbindungen im SCN wurden Dil-Kristalle im Gewebeschnittkulturen außerhalb des Kerngebietes appliziert. Dadurch konnten alle afferenten und efferenten Faserverbindungen des SCN sichtbar gemacht werden. Die gefärbten Fasern zeigten im Kerngebiet eine charakteristische Verteilung in den Bereichen, in denen auch Vasopressin-positive Perikaryen aufgefunden werden. Zum einen gelang ein prominenter Fluoreszenznachweis des Dil-Tracers im dorsomedialen Bereich des SCN, aber auch im lateralen Bereich des Kerngebietes. Der dorsomediale Bereich ist charakteristisch für seine hohe Dichte an Vasopressin-immunreaktive-Perikaryen ¹⁷. Im Zuge der Untersuchung zeigte sich nicht nur in diesen Bereichen innerhalb des SCN eine starke Konzentration der Dil-haltigen Faserverbindungen sondern auch unmittelbar außerhalb des Kerngebietes waren prominente Faserzüge zu erkennen. Besonders viele Faserverbindungen waren periventrikulär nachweisbar, diese wiesen eine fächerförmige Anordnung in dorsaler Richtung auf. Vermutlich handelt es sich dabei um den Bereich, in dem die meisten Faserverbindungen des SCN gebündelt verlaufen, und somit dürfte diese Bahn die wichtigste Zugangs- und Abgangsstruktur darstellen. Weiterhin zeigt sich, dass der SCN weitere multiple extrinsische Verbindungen besitzt, die in ihrer Faserzahl jedoch deutlich hinter dem periventrikulären Weg zurückbleiben (s. **Abb. 5.2.**). Die Vasopressin-positiven Neurone spielen

eine wesentliche Rolle in der Vernetzung des SCN mit anderen Hypothalamus-Entitäten. Dass die Kommunikation zwischen dem SCN und anderen Kerngebieten des Hypothalamus nicht nur über vasopressinerge Fasersysteme erfolgt und nicht nur einem abgegrenzten (vasopressinergen-) Areal im Kerngebiet zuzuordnen ist, muss aus den vorliegenden Befunden gefolgert werden. Die Neurone, die extrinsische Verbindungen entsenden oder empfangen, sind über den gesamten SCN verteilt. Der Versuch, die interperikaryellen Verbindungen im SCN mit Dil zu charakterisieren, scheiterte an der erheblichen Dichte der Neurone im SCN. Es ließen sich aufgrund der intensiven generellen Dil-Fluoreszenz keine eindeutigen intrinsischen Faserverbindungen nachweisen. Stattdessen zeigte sich eine komplette homogene rote Darstellung des Kerngebietes. Ganz besonders interessant sind die suprachiasmaticusnahen Verbindungen, die sowohl nach Dil-Applikation innerhalb als auch außerhalb des Kerngebietes gefunden wurden. Zahlreiche Perikaryen in der subparaventriculären Zone der Area hypothalamica lateralis entsenden ihre Axone in das Kerngebiet. Aus früheren Studien ist bekannt, dass die subparaventriculäre Zone besonders reich an limbische Verknüpfungen, speziell an Fasern aus dem Septum und aus dem Fornix ist ^{68,69}. Dies deutet ganz eindeutig darauf hin, dass über diese Verbindung die innere Tageszeituhr im SCN Informationen über das emotionale Geschehen erhält. Dadurch ließen sich möglicherweise biorhythmische Entgleisungen des Vegetativums, das durch den Hypothalamus kontrolliert wird, erklären (saisonal-affektive Störungen, Stress-amenorrhoe etc.).

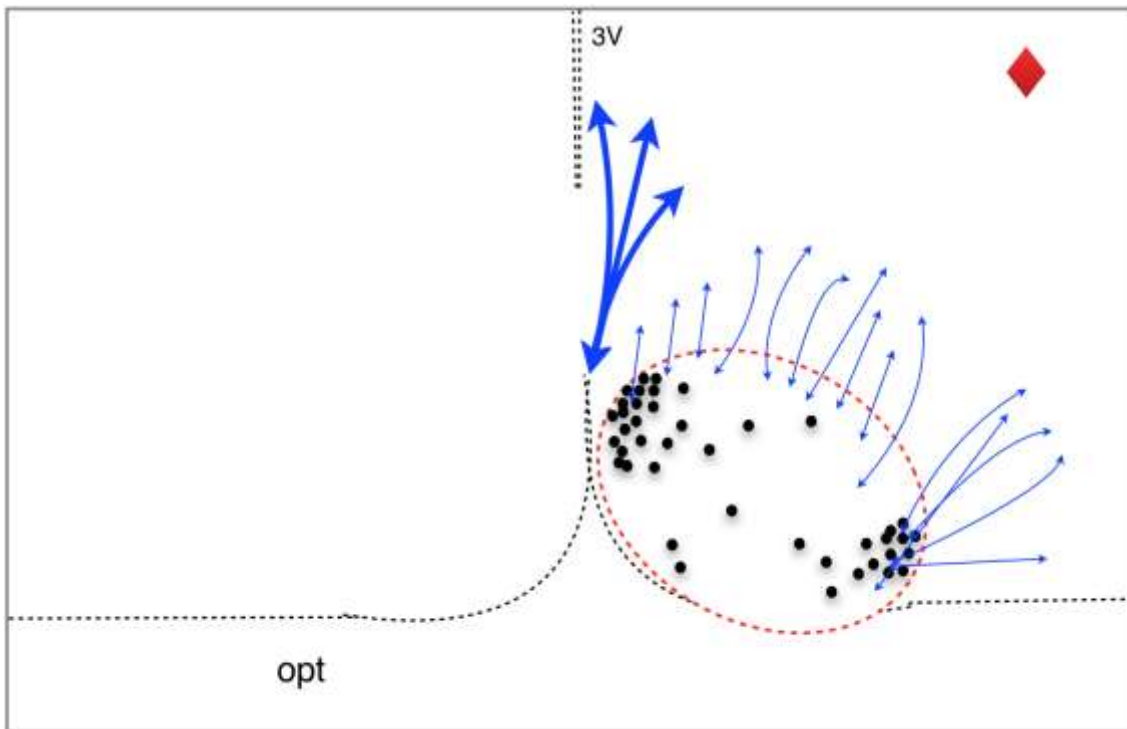


Abb. 5.2: Schematische Darstellung der kernnahen Verbindungen des SCN.

Die Dil-Kristalle wurden außerhalb des SCN platziert (rote Raute) und es zeigten sich zwei Gruppen von Faserverbindungen. Die größte Anzahl mit der höchsten Dichte an Fasern befand sich dorsomedial des SCN und periventrikulär (**fettgedruckte blaue Pfeile**). Eine zweite Gruppe von Faserverbindungen führte über die dorsale und laterale Begrenzung des SCN (**dünn gedruckte Pfeile**). 3V = 3. Ventrikel, opt = Chiasma opticum, schwarze Punkte = vasopressinerge-Perikaryen, rote Raute = Dil-Applikationsort

5.6 Intrinsische-/ Kommissurale Verbindungen des Nucleus supra-chiasmaticus

Zur Darstellung dieser Verbindungen erfolgte die Applikation der Dil-Kristalle in den zentralen Bereich des SCN. Eine präzise Darstellung der intrinsischen Verbindung des SCN scheiterte bereits wie oben beschrieben aufgrund der hohen Dichte von Neuronen und Faser im SCN. Jedoch zeigten die Untersuchungen Faserverbindungen des SCN, die nicht nur den ipsilateralen Hypothalamus erreichen, sondern auch Hemisphären-übergreifend sind. Es zeigten sich im kontralateralen SCN Dil-gefärbte Fasern und Perikaryen. Auch außerhalb des kontralateralen SCN waren viele Fasern und auch Perikaryen zu beobachten. Dies bestätigt die Ergebnisse von Moore et al. (1999)³³, Pickard (1982)³² und Michel et al. (2013)³⁵. Die bereits in früheren Untersuchungen die kommissuralen Verbindungen nachwiesen. Ein interessanter Aspekt dieser Untersuchung zeigt, dass sich Faserverbindungen des SCN im kontralateralen Hypothalamus nachweisen ließ und somit hier eine gekreuzte Doppelinnervation des kontralateralen hypothalamischen Systems vorliegt. Jedoch ist aus den Untersuchungen nicht ersichtlich ob die Verbindung direkt zwischen dem SCN und dem kontralateralen Hypothalamus besteht oder zuvor eine Umschaltung über den kontralateralen SCN über Interneurone erfolgt. Mit Sicherheit kann man schlussfolgern, dass zwischen beiden SCN-Hemisphären und den anderen Kernsystemen im Hypothalamus eine Verbindung besteht, die im Dienste der Synchronisation der Gesamtheit der suprachiasmatischen Neurone zu einem, das Individuum steuernden circadianen Gesamtrhythmus steht.

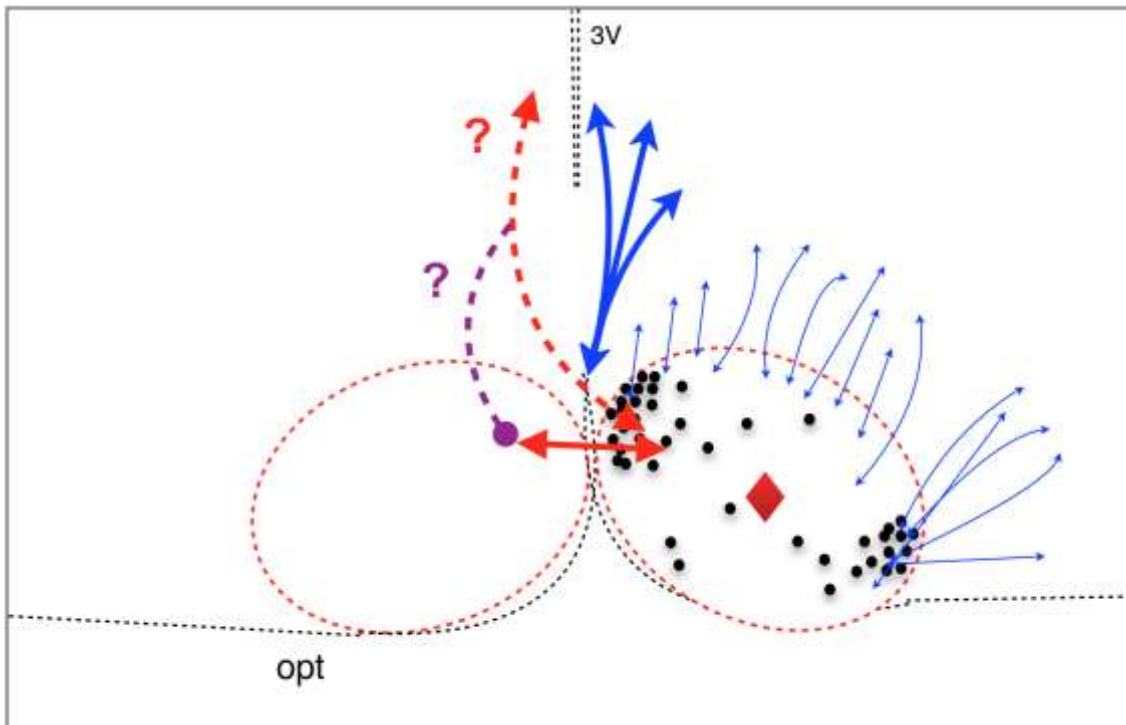


Abb. 5.3: Darstellung der kommissuralen Verbindungen des SCN

Die blauen Pfeile zeigen bereits wie in **Abb. 5.2** beschrieben die ipsilateralen Verbindungen des SCN mit Faserzügen im dorsomedialen/periventriculären Bereich (**fettgedruckte blaue Pfeile**). Der durchgezogene rote Pfeil zeigt die kommissuralen Verbindungen zwischen beide SCN. Die Untersuchungen zeigen, dass der ipsilaterale SCN mit kontralateralen hypothalamischen Kerngebieten in Verbindung steht, besonders mit dem Nucl. periventricularis. Jedoch geht aus der aktuellen Untersuchung der genaue Kommunikationsweg nicht hervor. Möglich ist ein direkter Weg zwischen SCN und den kontralateralen hypothalamischen Kerngebieten (**gestrichelter roter Pfeil**) oder es bestehen Verschaltungen über Interneurone im kontralateralen SCN (**gestrichelter violetter Pfad**). opt = Chiasma opticum, 3V = 3. Ventrikel, Punkte = vasopressinerge-Perikaryen, rote Raute = Dil-Applikationsort

6 Zusammenfassung

Der Nucleus suprachiasmaticus (SCN) ist ein Kerngebiet des Hypothalamus mit der Funktion des zentralen Taktgebers für die Generierung der circadianen Rhythmik. Zahlreiche petale Verbindungen zum SCN dienen der Synchronisierung der circadianen Uhr mit der tatsächlichen Tagesphase. Fugale Verbindungen des SCN dienen der Verteilung der Tageszeiteninformation über das Gehirn, insbesondere in vegetativen Zentren. So werden beispielsweise die physiologischen Vorgänge des Kreislaufsystems, Hormonausschüttung, der Schlaf-Wach-Zyklus etc. kontrolliert und mit Tag-Nacht-Wechsel synchronisiert. Obwohl viele dieser Verbindungen verstanden und beschrieben sind, sind die nahen Verbindungen in der unmittelbaren Nähe des SCN und dessen intrinsische Verbindung nicht genau untersucht. Zur Darstellung dieser nahen Verbindungen wurden Dil-Tracer-Studien an Gehirnschnitten von Mäusen durchgeführt. Untersucht wurde parallel zu der Dil-Färbung das Neuropeptid Vasopressin innerhalb und außerhalb des SCN bei Mäusen von zwei verschiedenen Mäusestämmen (C3H und C57BL); C57BL ist defizient für das photoperiodische sezernierte Epiphysenhormon Melatonin, C3H-Mäuse erblinden im frühen Lebensalter. Die immunzytochemische Untersuchung des Vasopressin-Systems belegte einen Unterschied in der Zytoarchitektur des SCN zwischen den C3H und C57BL Mäusen. Obwohl einige Elemente ähnliche Lokalisations- und Reaktivitätscharakteristika aufwiesen z.B. die dorsomediale Verteilung der Vasopressin-Perikaryen im Kerngebiet, so zeigte sich bei den C57BL-Mäusen eine deutlich schwächere Reaktivität des Neuropeptids AVP in diesem Bereich und ferner eine deutliche inhomogenere Verteilung der Vasopressin-Elemente im gesamten Kerngebiet. Die Tracing Untersuchung zeigte bei beiden Mäuse-Stämmen die gleichen Verbindungswege des SCN mit der nahen Peripherie. Zum einen zeigen die Ergebnisse, dass der Hauptpassage des SCN im dorsomedialen, also im periventrikulären Bereich lokalisiert ist und das der SCN multiple Zugänge an seiner dorsalen und lateralen Grenze zur subparaventrikulären Zone besitzt. Ferner konnte auch gezeigt werden, dass beide bilateralen SCN-Kerne direkt über ausgeprägte Kommissurfaserverbindungen miteinander kommunizieren. Diese Kommissuren dürften dafür verantwortlich sein, den SCN einer Seite mit dem SCN der kontralateralen Seite

zu synchronisieren. Obwohl in der vorliegenden Arbeit der Tracer nur einseitig appliziert wurde, ist dennoch von einer gekreuzten kontralateralen Verbindung auszugehen. Hier liegen Ansätze für weitere Untersuchungen. Ein weiterer Aspekt der Untersuchungen zeigen Faserverbindungen in die Area hypothalamica lateralis (AHL), die eine wichtige Rolle in der Kontrolle der zentralen Nahrungsaufnahme besitzt. Diese Faserverbindungen haben ihren Ursprung im SCN bzw. Nucl. paraventricularis und dem Nucl. arcuatus. Diese Verbindungen dienen am ehesten der Modulation der zentralen Regulation der Nahrungsaufnahme und spielen daher eine besondere Rolle in der Krankheitsentstehung wie Adipositas, Diabetes und Herz-Kreislauf-Erkrankung bei gestörter circadianen Rhythmik. Neu ist der Befund einer beachtlichen Anzahl von suprachiasmaticopetalen Fasern aus der subparaventriculären Zone. Diese könnten die Einbindung des limbischen Systems in die Modulation der inneren Uhr erklären, die darüber hinaus ursächlich für zahlreiche Pathologien sein könnten.

7 Summary

The suprachiasmatic nucleus (SCN) is a symmetrically arranged core region of the anterior hypothalamus deciphered as the primary pacemaker for the regulation of circadian rhythms of mammals. Accordingly, the SCN is generally described as the internal circadian clock. External pathways of the SCN convey information of the internal day-night-cycle to mainly hypothalamic entities which control vital body functions, i.e. endocrine, vegetative nervous processes.

Although many of these pathways are well understood, however the network of the SCN and the pathways in the close vicinity of the SCN are not yet exactly discovered. The aim of the present research is to analyze these intrinsic and margin pathways of the SCN in two mice strains (C3H & C57BL) by using Dil –tracer and arginine vasopressin (AVP) immunocytochemistry methods. As result of this investigation, a different cytoarchitectural pattern of the SCN of C3H and C57BL mice was observed. C57BL mice displayed weaker immunoreactivity in to vasopressin and a distinctly lower number of perikarya which were more dispersedly distributed inside of the SCN. The Dil tracing studies revealed commissural projections between the bilateral proportions of the SCN. These commissural connections between the bilateral proportions of the SCN very likely mediate the information for synchronizing the pacemaker phases to the bilateral compartments. Pathways found to course from the SCN to the lateral hypothalamic area support a modulator function for food ingestion control. Dysfunction in the circadian rhythm, accordingly can cause diabetes, obesity and finally cardio-vascular-diseases. The tracing studies indicate the main communication pathway into and out of the SCN to be located at the dorso-medial border of the SCN neighboring the periventricular nucleus. Furthermore there are multiple access opportunities into the SCN emerging from the subparaventricular zone. These newly discovered source of neurons located dorsal and lateral of the SCN could mediate limbic information to the internal clock; these might be responsible for phenomena like stress amenorrhea or seasonal affective disorders.

8 Literaturverzeichnis

1. Moga MM, Moore RY. Organization of neural inputs to the suprachiasmatic nucleus in the rat. *J Comp Neurol.* 1997;389(3):508–34. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9414010>. Accessed December 11, 2014.
2. Saini C, Morf J, Stratmann M, Gos P, Schibler U. Simulated body temperature rhythms reveal the phase-shifting behavior and plasticity of mammalian circadian oscillators. *Genes Dev.* 2012;26(6):567–80. doi:10.1101/gad.183251.111.
3. Bhardwaj S, Verma N, Anjum B, Bhardwaj K. Variations in 7-day/24-h circadian pattern of ambulatory blood pressure and heart rate of type 2 diabetes patients. *J Diabetes Investig.* 2014;5(6):728–733. doi:10.1111/jdi.12224.
4. Sheward WJ, Naylor E, Knowles-Barley S, et al. Circadian control of mouse heart rate and blood pressure by the suprachiasmatic nuclei: behavioral effects are more significant than direct outputs. *PLoS One.* 2010;5(3):e9783. doi:10.1371/journal.pone.0009783.
5. Welsh DK, Takahashi JS, Kay SA. Suprachiasmatic nucleus: cell autonomy and network properties. *Annu Rev Physiol.* 2010;72:551–77. doi:10.1146/annurev-physiol-021909-135919.
6. Reuss S. Components and connections of the circadian timing system in mammals. *Cell Tissue Res.* 1996;285:353–378. doi:10.1007/s004410050652.
7. Lavie P. Sleep-wake as a biological rhythm. *Annu Rev Psychol.* 2001;52:277–303. doi:10.1146/annurev.psych.52.1.277.
8. Aschoff J, Pohl H. Phase relations between a circadian rhythm and its zeitgeber within the range of entrainment. *Naturwissenschaften.* 1978;65(2):80–4. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/345129>. Accessed November 29, 2015.

9. Reghunandanan V, Reghunandanan R. Neurotransmitters of the suprachiasmatic nuclei. *J Circadian Rhythms*. 2006;4:2. doi:10.1186/1740-3391-4-2.
10. Moore RY. Entrainment pathways and the functional organization of the circadian system. *Prog Brain Res*. 1996;111:103–19. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8990910>. Accessed December 25, 2014.
11. van den Pol AN, Tsujimoto KL. Neurotransmitters of the hypothalamic suprachiasmatic nucleus: Immunocytochemical analysis of 25 neuronal antigens. *Neuroscience*. 1985;15(4):1049–1086. doi:10.1016/0306-4522(85)90254-4.
12. Miller JD, Morin LP, Schwartz WJ, Moore RY. New insights into the mammalian circadian clock. *Sleep*. 1996;19(8):641–67. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8958635>. Accessed December 3, 2014.
13. Moore RY. *Chapter 8 Entrainment pathways and the functional organization of the circadian system, Progress in Brain Research, Volume 111*. Elsevier; 1996. doi:10.1016/S0079-6123(08)60403-3.
14. Van den Pol AN. The hypothalamic suprachiasmatic nucleus of rat: intrinsic anatomy. *J Comp Neurol*. 1980;191(4):661–702. doi:10.1002/cne.901910410.
15. Güldner FH. Numbers of neurons and astroglial cells in the suprachiasmatic nucleus of male and female rats. *Exp brain Res*. 1983;50(2-3):373–6. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6641871>. Accessed December 1, 2015.
16. Leone MJ, Beaulé C, Marpegan L, Simon T, Herzog ED, Golombek DA. Glial and light-dependent glutamate metabolism in the suprachiasmatic nuclei. *Chronobiol Int*. 2015;32(4):573–8. doi:10.3109/07420528.2015.1006328.
17. Moore RY, Speh JC, Leak RK. Suprachiasmatic nucleus organization. *Cell Tissue Res*. 2002;309(1):89–98. doi:10.1007/s00441-002-0575-2.

18. Swaab DF. *The Primate Nervous System, Part I*. Elsevier; 1997. doi:10.1016/S0924-8196(97)80004-8.
19. van Esseveldt LE, Lehman MN, Boer GJ. The suprachiasmatic nucleus and the circadian time-keeping system revisited. *Brain Res Rev.* 2000;33(1):34–77. doi:10.1016/S0165-0173(00)00025-4.
20. Hendrickson AE, Wagoner N, Cowan WM. An autoradiographic and electron microscopic study of retino-hypothalamic connections. *Z Zellforsch Mikrosk Anat.* 1972;135(1):1–26. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4629413>. Accessed December 11, 2014.
21. Moore RY, Lenn NJ. A retinohypothalamic projection in the rat. *J Comp Neurol.* 1972;146(1):1–14. doi:10.1002/cne.901460102.
22. Foster RG. Seeing the Light...in a New Way. *J Neuroendocrinol.* 2004;16(2):179–180. doi:10.1111/j.0953-8194.2004.01141.x.
23. Mikkelsen JD, Vrang N. A direct pretectosuprachiasmatic projection in the rat. *Neuroscience.* 1994;62(2):497–505. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7530345>. Accessed December 11, 2014.
24. Johnson RF, Moore RY, Morin LP. Lateral geniculate lesions alter circadian activity rhythms in the hamster. *Brain Res Bull.* 1989;22(2):411–22. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2650808>. Accessed December 11, 2014.
25. Moga MM, Weis RP, Moore RY. Efferent projections of the paraventricular thalamic nucleus in the rat. *J Comp Neurol.* 1995;359(2):221–38. doi:10.1002/cne.903590204.
26. Watts AG, Swanson LW. Efferent projections of the suprachiasmatic nucleus: II. Studies using retrograde transport of fluorescent dyes and simultaneous peptide immunohistochemistry in the rat. *J Comp Neurol.* 1987;258(2):230–52. doi:10.1002/cne.902580205.
27. Kalsbeek A, Buijs RM. Output pathways of the mammalian suprachiasmatic nucleus: coding circadian time by transmitter selection and specific targeting. *Cell Tissue Res.* 2002;309(1):109–18.

- doi:10.1007/s00441-002-0577-0.
28. Reiter RJ. Introduction, *Endocrine*, Volume 27. Springer; 2005. *Endocrine*. 2005;27(2):087–088. doi:10.1385/ENDO:27:2:087.
 29. Reiter RJ. Melatonin: The chemical expression of darkness. *Mol Cell Endocrinol*. 1991;79(1-3):C153–C158. doi:10.1016/0303-7207(91)90087-9.
 30. Klerman EB, Gershengorn HB, Duffy JF, Kronauer RE. Comparisons of the variability of three markers of the human circadian pacemaker. *J Biol Rhythms*. 2002;17(2):181–93. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12002165>. Accessed December 15, 2014.
 31. Watts AG, Swanson LW, Sanchez-Watts G. Efferent projections of the suprachiasmatic nucleus: I. Studies using anterograde transport of Phaseolus vulgaris leucoagglutinin in the rat. *J Comp Neurol*. 1987;258(2):204–29. doi:10.1002/cne.902580204.
 32. Pickard GE. The afferent connections of the suprachiasmatic nucleus of the golden hamster with emphasis on the retinohypothalamic projection. *J Comp Neurol*. 1982;211(1):65–83. doi:10.1002/cne.902110107.
 33. Leak RK, Card JP, Moore RY. Suprachiasmatic pacemaker organization analyzed by viral transynaptic transport. *Brain Res*. 1999;819(1-2):23–32. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10082857>. Accessed December 21, 2014.
 34. Abrahamson EE, Moore RY. Suprachiasmatic nucleus in the mouse: Retinal innervation, intrinsic organization and efferent projections. *Brain Res*. 2001;916:172–191. doi:10.1016/S0006-8993(01)02890-6.
 35. Michel S, Marek R, Vanderleest HT, et al. Mechanism of bilateral communication in the suprachiasmatic nucleus. *Eur J Neurosci*. 2013;37(6):964–71. doi:10.1111/ejn.12109.
 36. de la Iglesia HO, Meyer J, Carpino A, Schwartz WJ. Antiphase oscillation of the left and right suprachiasmatic nuclei. *Science*. 2000;290(5492):799–801. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11052942>. Accessed December 21,

- 2014.
37. Davis FC, Gorski RA. Unilateral lesions of the hamster suprachiasmatic nuclei: evidence for redundant control of circadian rhythms. *J Comp Physiol A*. 1984;154(2):221–232. doi:10.1007/BF00604987.
38. Pickard GE, Turek FW. Splitting of the circadian rhythm of activity is abolished by unilateral lesions of the suprachiasmatic nuclei. *Science*. 1982;215(4536):1119–21. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7063843>. Accessed December 21, 2014.
39. Yamaguchi S, Isejima H, Matsuo T, et al. Synchronization of cellular clocks in the suprachiasmatic nucleus. *Science*. 2003;302(5649):1408–12. doi:10.1126/science.1089287.
40. Liu AC, Lewis WG, Kay SA. Mammalian circadian signaling networks and therapeutic targets. *Nat Chem Biol*. 2007;3(10):630–9. doi:10.1038/nchembio.2007.37.
41. Jia F, Yue M, Chandra D, Homanics GE, Goldstein PA, Harrison NL. Isoflurane is a potent modulator of extrasynaptic GABA(A) receptors in the thalamus. *J Pharmacol Exp Ther*. 2008;324:1127–1135. doi:10.1124/jpet.107.134569.
42. Kapuscinski J. DAPI: a DNA-specific fluorescent probe. *Biotech Histochem*. 1995;70:220–233. doi:10.3109/10520299509108199.
43. DAKO. Dako Fluorescence Mounting Medium -. 2010:1–3. Available at: <http://www.dako.com/download.pdf?objectid=105416003>.
44. Lukas JR, Aigner M, Denk M, Heinzl H, Burian M, Mayr R. Carbocyanine postmortem neuronal tracing. Influence of different parameters on tracing distance and combination with immunocytochemistry. *J Histochem Cytochem*. 1998;46:901–910. doi:10.1177/002215549804600805.
45. Baker GE, Reese BE. Using confocal laser scanning microscopy to investigate the organization and development of neuronal projections labeled with Dil. *Methods Cell Biol*. 1993;38:325–44. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8246786>. Accessed March 1, 2015.
46. Honig MG, Hume RI. Dil and DiO: versatile fluorescent dyes for neuronal

- labelling and pathway tracing. *Trends Neurosci.* 1989;12:333–335, 340–341. doi:10.1016/0166-2236(89)90040-4.
47. Lichstein HC, Soule MH. Studies of the effect of sodium azide on microbin. 1943;(May):221–230.
48. Godement P, Vanselow J, Thanos S, Bonhoeffer F. A study in developing visual systems with a new method of staining neurones and their processes in fixed tissue. *Development.* 1987;101(4):697–713. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2460302>. Accessed November 20, 2014.
49. Harlow E, Lane D. *Using antibodies: a laboratory manual*, CSHL Press; 1998.; 1999.
50. COONS AH. Fluorescent antibody methods. *Gen Cytochem Methods.* 1958;1:399–422. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13574437>. Accessed November 26, 2014.
51. Knight AW, Goddard NJ, Billinton N, Cahill PA, Walmsley RM. Fluorescence polarization discriminates green fluorescent protein from interfering autofluorescence in a microplate assay for genotoxicity. *J Biochem Biophys Methods.* 2002;51(2):165–77. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12062116>. Accessed February 26, 2015.
52. Neumann M, Gabel D. Simple method for reduction of autofluorescence in fluorescence microscopy. *J Histochem Cytochem.* 2002;50(3):437–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11850446>. Accessed February 26, 2015.
53. Campos LMG, Cruz-Rizzolo RJ, Watanabe I-S, Pinato L, Nogueira MI. Efferent projections of the suprachiasmatic nucleus based on the distribution of vasoactive intestinal peptide (VIP) and arginine vasopressin (AVP) immunoreactive fibers in the hypothalamus of *Sapajus apella*. *J Chem Neuroanat.* 2014;57-58:42–53. doi:10.1016/j.jchemneu.2014.03.004.
54. Yu EA, Weaver DR. Disrupting the circadian clock: gene-specific effects

- on aging, cancer, and other phenotypes. *Aging (Albany NY)*. 2011;3(5):479–93. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3156599&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>. Accessed December 21, 2014.
55. Menet JS, Rosbash M. When brain clocks lose track of time: cause or consequence of neuropsychiatric disorders. *Curr Opin Neurobiol*. 2011;21(6):849–57. doi:10.1016/j.conb.2011.06.008.
56. Bechtold DA, Gibbs JE, Loudon ASI. Circadian dysfunction in disease. *Trends Pharmacol Sci*. 2010;31(5):191–8. doi:10.1016/j.tips.2010.01.002.
57. Swanson LW. Organization of Mammalian Neuroendocrine System. In: Terjung R, ed. *Comprehensive Physiology*. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc.; 2011:317–363.
58. Sawchenko PE. Toward a new neurobiology of energy balance, appetite, and obesity: the anatomists weigh in. *J Comp Neurol*. 1998;402(4):435–41. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9862319>. Accessed February 13, 2015.
59. Morton GJ, Cummings DE, Baskin DG, Barsh GS, Schwartz MW. Central nervous system control of food intake and body weight. *Nature*. 2006;443(7109):289–95. doi:10.1038/nature05026.
60. Ramos EJB, Meguid MM, Campos ACL, Coelho JCU. Neuropeptide Y, alpha-melanocyte-stimulating hormone, and monoamines in food intake regulation. *Nutrition*. 2005;21(2):269–79. doi:10.1016/j.nut.2004.06.021.
61. Bernsmeier C, Weisskopf DM, Pflueger MO, et al. Sleep Disruption and Daytime Sleepiness Correlating with Disease Severity and Insulin Resistance in Non-Alcoholic Fatty Liver Disease: A Comparison with Healthy Controls. *PLoS One*. 2015;10(11):e0143293. doi:10.1371/journal.pone.0143293.
62. Anea CB, Zhang M, Stepp DW, et al. Vascular disease in mice with a dysfunctional circadian clock. *Circulation*. 2009;119(11):1510–7. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.108.827477.
63. Roseboom PH, Namboodiri MAA, Zimonjic DB, et al. Natural melatonin ‘knockdown’ in C57BL/6J mice: rare mechanism truncates serotonin N-

- acetyltransferase. *Mol Brain Res*. 1998;63(1):189–197.
doi:10.1016/S0169-328X(98)00273-3.
64. Boer GJ, van Esseveldt KE, van der Geest BA, Duindam H, Rietveld WJ. Vasopressin-deficient suprachiasmatic nucleus grafts re-instate circadian rhythmicity in suprachiasmatic nucleus-lesioned arrhythmic rats. *Neuroscience*. 1999;89(2):375–85. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10077320>. Accessed December 9, 2014.
65. Ebihara S, Marks T, Hudson DJ, Menaker M. Genetic control of melatonin synthesis in the pineal gland of the mouse. *Science*. 1986;231(4737):491–3. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3941912>. Accessed March 10, 2015.
66. Korf HW, von Gall C. Mice, melatonin and the circadian system. *Mol Cell Endocrinol*. 2006;252(1-2):57–68. doi:10.1016/j.mce.2006.03.005.
67. Berson DM, Dunn FA, Takao M. Phototransduction by retinal ganglion cells that set the circadian clock. *Science*. 2002;295(5557):1070–3. doi:10.1126/science.1067262.
68. Staiger JF, Nürnberger F. The efferent connections of the lateral septal nucleus in the guinea pig: intrinsic connectivity of the septum and projections to other telencephalic areas. *Cell Tissue Res*. 1991;264(3):415–426. doi:10.1007/BF00319032.
69. Staiger JF, Nürnberger F. The efferent connections of the lateral septal nucleus in the guinea pig: projections to the diencephalon and brainstem. *Cell Tissue Res*. 1991;264(3):391–413. doi:10.1007/BF00319031.

9 Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus Datenschutzgründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht mit veröffentlicht.

Mein Lebenslauf wird aus Datenschutzgründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht mit veröffentlicht.

10 Schriftliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Medizin der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main zur Promotionsprüfung eingereichte Dissertation mit dem Titel

Die intrinsischen und nahen extrinsischen Verbindungen des Nucleus suprachiasmaticus bei C3H und C57BL-Mäusen

in dem Institut für Anatomie II unter Betreuung und Anleitung von Prof. Dr. Frank Nürnberger mit Unterstützung durch Dr. Qian Zhang ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe. Darüber hinaus versichere ich, nicht die Hilfe einer kommerziellen Promotionsvermittlung in Anspruch genommen zu haben.

Ich habe bisher an keiner in- oder ausländischen Universität ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht. Die vorliegende Arbeit wurde bisher nicht als Dissertation eingereicht.

(Ort, Datum)

(Unterschrift)