

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

betreut an der
Dr. Senckenbergischen Anatomie
Institut für Anatomie II
(Experimentelle Neurobiologie)
Direktor: Prof. Dr. Horst-Werner Korf

**Reaktivitätsmuster des Orexin-Systems im Hypothalamus der C57BL- und
der C3H-Maus unter Wach-Bedingung, während des Schlafes und nach
Schlafentzug – Interaktion mit dem Melanin-concentrating hormone
(MCH)-System**

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

vorgelegt von
Mehmet Emin Simsek

aus Yüregir (Adana), Türkei

Frankfurt am Main, 2018

Dekan: Prof. Dr. Josef M. Pfeilstifter
Referent: Prof. Dr. Frank Nürnberger
Korreferent: Prof. Dr. Jochen Kaiser
Tag der mündlichen Prüfung: 20.06.2018

Bismillah - Für meine Frau, die mir stets treu und ermutigend zu Seite steht,
unsere Familien und unsere gemeinsame Zukunft.

1. Inhaltsverzeichnis

1. Inhaltsverzeichnis	4
2. Abbildungsnachweis	6
3. Tabellennachweis	8
4. Abkürzungsverzeichnis	9
5. Einleitung	12
5.1 Der Schlaf	12
5.2 Das Orexin-System	15
5.2.1 Liganden und Rezeptoren	15
5.2.2 Physiologische Wirkung	17
5.3 Das Melanin-concentrating hormone (MCH)-System	21
5.3.1 Liganden und Rezeptoren	21
5.3.2 Physiologische Wirkung	24
5.4 Zusammenspiel der untersuchten Hormone	27
5.5 Fragestellung	29
6. Material und Methodik	30
6.1 Material	30
6.1.1 Art der Versuchstiere	30
6.1.2 Haltung der Versuchstiere	30
6.1.3 Puffer und Lösungen	32
6.2 Experimentelles Vorgehen	33
6.2.1 Tötung nach Schlafentzug	33
6.2.2 Tötung im Schlaf	34
6.2.3 Tötung im aktiven Wachzustand	34
6.3 Materialgewinnung	34
6.3.1 Modus der Tötung	34
6.3.2 Entnahme der Gehirne	35
6.3.3 Fixation und Kryoprotektion	35

Inhaltsverzeichnis

6.3.4	Herstellung der Gehirnschnitte	36
6.4	Immunhistochemie und Immunfluoreszenz.....	36
6.4.1	Prinzip der Immunhistochemie.....	36
6.4.2	Material und Antikörper.....	39
6.4.3	Protokoll für Immunhistochemie.....	44
6.4.4	Protokoll für Immunfluoreszenzfärbung	45
6.5	Semiquantifizierung der immunhistochemischen Färbung.....	46
6.6	Konfokale Mikroskopie.....	48
6.7	Statistische Auswertung.....	49
7.	Ergebnisse	50
7.1	Lokalisationsmuster der immunreaktiven Strukturen bei C3H- und C57BL-Mäusen.....	50
7.1.1	Orexin-System	50
7.1.2	MCH-System	52
7.2	Reaktivitätsmuster von C3H- und C57BL-Mäusen	55
7.2.1	Orexin-System.....	55
7.3	Reaktivitätsmuster bei schlafenden, schlafdeprivierten und wachen Mäusen	56
7.3.1	Orexin	56
7.3.2	MCH	59
8.	Diskussion	61
8.1	Methodenkritik	61
8.2	Orexin und MCH im Kontext mit dem Schlaf-Wach Verhalten	63
8.3	Der Schlafentzug	68
9.	Zusammenfassung (Abstract)	72
10.	Summary (Abstract)	74
11.	Literaturverzeichnis	75
12.	Lebenslauf	86
13.	Schriftliche Erklärung	87

2. Abbildungsnachweis

Abbildung 5.1 Orexinsynthese und Bindungsaffinität von Präproorexin zu Orexin A und Orexin B	16
Abbildung 5.2 MCH-Synthese	22
Abbildung 5.3 Topographie des Hypothalamus	23
Abbildung 6.1 Laborbedingung bei gemeinsamer Akklimatisierung	31
Abbildung 6.2 Laborbedingung vor dem Experiment.....	32
Abbildung 6.3 Prinzip der Immunfluoreszenzfärbung	37
Abbildung 6.4 Prinzip der Immunhistochemie mit DAB	38
Abbildung 6.5 Shandon Coverplate	43
Abbildung 6.6 Halteapparat für Shandon Coverplates.....	43
Abbildung 6.7 Objektträger im Färbegestell und in der Glasküvette.....	44
Abbildung 6.8 Exemplarischer Ausschnitt der untersuchten Fläche	47
Abbildung 7.1 Orexin-immunreaktive Zellsomata im Hypothalamus.....	51
Abbildung 7.2 Mehrfach innerviertes Neuron sowie zwei schwach positive Orexin immunreaktive Neurone im Cortex.....	52

Abbildung 7.3 MCH-immunreaktive Zellsomata im Hypothalamus	53
Abbildung 7.4 Immunfluoreszenz von Orexin- und MCH-positiven Nervenzellen im lateralen Hypothalamus	54
Abbildung 7.5 Größe der Orexin-immunreaktiven Perikaryen im lateralen Hypothalamus	55
Abbildung 7.6 Semiquantitative Auswertung der immunhistochemisch gefärbten Präparate für Orexin im lateralen Hypothalamus	57
Abbildung 7.7 Stadienabhängige Alteration in der Immunreaktivität von Orexin im lateralen Hypothalamus	58
Abbildung 7.8 Semiquantitative Auswertung der immunhistochemisch gefärbten Präparate für MCH im lateralen Hypothalamus.....	59
Abbildung 7.9 Stadienabhängige Alteration in der Immunreaktivität von MCH im lateralen Hypothalamus	60

3. Tabellennachweis

Tabelle 1 Ansatz für die Sacharrose-Lösung	33
Tabelle 2 Überblick über die Experimentalgruppen und Tötungszeit.....	33
Tabelle 3 Verwendete Primärantikörper	40
Tabelle 4 Verwendete Sekundärantikörper für die Immunhochemie	41
Tabelle 5 Verwendete Sekundärantikörper für die Immunfluoreszenzfärbung.....	41

4. Abkürzungsverzeichnis

3.V	3. Ventrikel
α -MSH	α - Melanozyten stimulierendes Hormon
AANAT	Serotonin N-Acetyltransferase (englisch: arylalkylamine N-acetyltransferase)
Abb.	Abbildung
AChE	Acetylcholinesterase
Ag	Antigen
AK	Antikörper
Alexa Fluor	Alexa Fluorescein
ANOVA	Analysis of variance
Aqua dest	Aqua destillata
BSA	Bovines Serumalbumin
Bzw.	Beziehungsweise
CRH	Corticotropin-releasing Hormone
d	Tag (lat. dies)
DAB	Diaminobenzidin
d.h.	Das heißt
dH ₂ O	destilliertes Hydrogendioxid (Aqua)
DMA	Area hypothalamica dorsomedialis
dy	Donkey
f	Fornix
g	Gramm
GABA	Gamma-aminobutyric acid
gt	Goat
h	Stunde (lat. hora)
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HCL	Chlorwasserstoff (Salzsäure)

Abkürzungsverzeichnis

HRP	Horseradish peroxidase (Meerrettichperoxidase)
ir	immunreaktiv (e)
IgG	Immunglobulin G
IgM	Immunglobulin M
kDa	Kilodalton
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
lat.	Lateinisch
LH (A)	(Area) hypothalamica lateralis
LSM	Laser scanning Microscopy
MCH	Melanin-concentrating hormone
MCH-R	Melanin-concentrating hormone-Rezeptor
M	Molar
min	Minute(n)
ml	Milliliter
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
NaCl	Natriumchlorid
Na ₂ HPO ₄	Dinatriumphosphat
NaN ₃	Natriumazid
NaOH	Natriumhydroxid
Ncl.	Nucleus
NEI	Neuropeptide-glutamic acid-isoleucine
NGE	Neuropeptide-glycine-glutamic acid
nm	Nanometer
OP	Nervus opticus
OXA	Orexin A
OXB	Orexin B
PB	Phosphatpuffer (engl. Phosphate buffer)
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung (engl. Phosphate buffered saline)

Abkürzungsverzeichnis

PBST	Phosphat-gepufferter Salzlösung mit Triton
PFA	Paraformaldehyd
pH	Potentia hydrogenii
POMC	Proopiomelanocortin
ppMCH	Präpro- Melanin-concentrating hormone
rb	Rabbit
REM	Rapid Eye Movement
RHT	Traktus retinohypothalamicus
RNA	Ribonucleic acid (deutsch: Ribonukleinsäure)
RT	Raumtemperatur
s	Siehe
SD	Standardabweichung
SCN	Nucleus suprachiasmaticus
SLC 1	Somatostatin-like receptor 1
Tab.	Tabelle
TSH	Thyroid stimulating hormone
UV	Ultraviolett
V	Ventrikel
vl	Ventrolateral
VMA	Area hypothalamica ventromedialis
z.B.	zum Beispiel
ZI	Zona incerta

5. Einleitung

5.1 Der Schlaf

Die weitaus größte Zahl der Lebewesen auf der Erde ist dem Wechsel von Tag und Nacht ausgesetzt. Die biologische Reaktion auf dieses geophysikalische Geschehen ist insbesondere bei höheren Wirbeltieren der Schlaf-Wach-Rhythmus. Der Schlaf-Wach-Rhythmus ist sicher auch das markanteste Phänomen der chronobiologischen Rhythmizität.

Der Schlaf füllt ca. 1/3 der Lebensspanne des Menschen aus. Umso erstaunlicher ist es, dass die Erkenntnisse in diesem Bereich immer noch vergleichsweise sehr bescheiden sind. Noch bis zur Mitte des letzten Jahrhunderts war es gängige Ansicht, der Schlaf sei ein rein passiver Zustand, der durch Augenschluss zustande käme. Er stellte schlicht die Abwesenheit von Wachheit dar (Hobson, 1995).

Die Erkenntnisse der letzten Jahre zeigen jedoch, dass der Schlaf vielmehr ein sehr komplexer, aktiver Vorgang mit multiplen Interaktionen zwischen aktivierenden und hemmenden Neuronen ist.

Einer der ersten Hinweise, dass Schlaf und Wachheit durch spezifische Regionen im Gehirn generiert werden, stammt vom Psychiater und Neurologen Constantin Freiherr Economo von San Serff. Grundlage seiner Arbeit war die Enzephalitis lethargica, die in den Jahren 1915-1927 auf dem europäischen Kontinent endemisch war und sich durch Lethargie, imperative Schlafanfalle und temporäre parkinsonoide motorische Störungen auszeichnete.

Economo von San Serff postulierte durch Hirnautopsien der verstorbenen Patienten, dass eine Region im rostralen Hypothalamus für Schlaf, und eine Region im posterioren Hypothalamus für Wachheit verantwortlich war (nach Triarhou, 2006).

Moruzzi und Magoun konnten bereits einige Jahre später zeigen, dass sedierte Tiere durch elektrische Stimulation des Hirnstamms geweckt werden können; sie postulierten das aufsteigende retikuläre Aktivierungssystem (ARAS) (Moruzzi und Magoun, 1949).

Im Laufe der Zeit wurden viele "Schlafzentren" und "Schlafhormone" entdeckt und auch wieder verworfen. Ein entscheidender Taktgeber für den Schlaf-Wach-Rhythmus bei Säugetieren stellt nach heutigen Kenntnissen der Nucleus suprachiasmaticus (SCN) dar. Es handelt sich um ein paarig angelegtes Kerngebiet im vorderen Hypothalamus, dorsal der Sehbahn-Kreuzung (Chiasma opticum) und lateroventral des 3. Ventrikels. Es wird angenommen, dass es sich um den wichtigsten circadianen Schrittmacher handelt. Seine Aktivität wird vor allem über das Tageslicht an die aktuellen Tag-Nacht-Verhältnisse angepasst bzw. korrigiert (Welsh et al., 2010).

Wie im Falle der Studien von Economo von San Serff konnten durch anatomische und physiologische Forschungen am Beispiel einer Krankheit die Kenntnisse über den Schlaf-Wach-Rhythmus erweitert werden. Eine dieser Krankheiten stellt die Narkolepsie dar.

Sie ist unter anderem gekennzeichnet durch folgende Merkmale (Gerloff et al., 2012):

- Tagesschläfrigkeit mit Tagschlafepisoden
- Kataplexie: d.h. emotionsbedingt (Lachen, Freude und Überraschung, Ärger, Furcht oder andere starke Gemütsregungen) auftretender kurzzeitiger Verlust des Muskeltonus ohne Bewusstseinsstrübung

- Schlafparalyse
- hypnagoge Halluzinationen (d.h. Halluzination am Übergang zwischen Einschlafen oder Erwachen)
- gestörter Nachtschlaf

Die Genese der Erkrankung ist multifaktoriell. Jedoch konnten Lin et. al. 1999 nachweisen, dass die Narkolepsie mit starker Verminderung oder dem Fehlen von Orexin-haltigen Neuronen im dorsolateralen Hypothalamus einhergeht.

Damit stellt das orexinerge System das einzige neurochemische System dar, von dem bekannt ist, dass es definitiv eine Schlafstörung beim Menschen verursacht. Die Reduktion von Orexin im Liquor unter die Nachweisgrenze ist ein pathognomischer Befund für die idiopathische, nicht familiäre Narkolepsie mit Kataplexie (Nishino et al., 2000).

In nachfolgenden Untersuchungen konnte ein weiteres wichtiges Schlafhormon entdeckt werden: das Melanin-concentrating hormone (MCH). MCH-Knockout Mäuse (MCH^{-/-}) schlafen weniger, womit es am ehesten ein gegensätzliches Hormon zu Orexin darstellt (Willie et al., 2008).

Im Folgenden sollen die beiden ZNS-Peptidhormone Orexin und MCH näher beschrieben und ihre reziproken Interaktionen, soweit bekannt, dargestellt werden.

5.2 Das Orexin-System

5.2.1 Liganden und Rezeptoren

Die Erstbeschreibung der Orexine erfolgte 1998 nahezu zeitgleich durch zwei unabhängige Arbeitsgruppen.

Während De Lecea et al. im Januar die im lateralen Hypothalamus gebildeten Peptidhormone auf Grund ihrer Nachweisregion und Sequenzhomologie zu Sekretin (ein gastrointestinales Hormon), Hypocretin 1 und 2 (zusammengesetzt aus Hypothalamus/Sekretion) nannten (Lecea et al., 1998), wurden sie von der Arbeitsgruppe um Sakurai et al. kurze Zeit später nach dem griechischen Wort für Appetit (griech. orexis = Appetit/Hunger) Orexin A und Orexin B benannt.

Dies war insofern naheliegend, da die intraventrikuläre Applikation von Orexin in Ratten zur Steigerung der Nahrungsaufnahme führte, sodass sich der Terminus Orexin in der Fachwelt schließlich durchsetzte (Sakurai et al., 1998).

Die beiden Neuropeptide Orexin A und Orexin B (im folgenden OXA und OXB genannt) sind gemeinsam auf dem Chromosom 17q21 lokalisiert und entstehen aus dem Präkursor-Protein Präproorexin, welches aus 131 Aminosäuren besteht und ca. 16 kDa groß ist. Erst durch proteolytische Spaltung und posttranslationale Modifikation entstehen die beiden Liganden. OXA besteht aus 33 Aminosäuren und besitzt durch zwei intramolekulare Disulfidbrücken eine zentrale Ringstruktur, wohingegen das 28 Aminosäuren-lange OXB linear vorliegt (s. Abb. 5.1). Die Sequenzhomologie beträgt 46% (Sakurai et al., 1998).

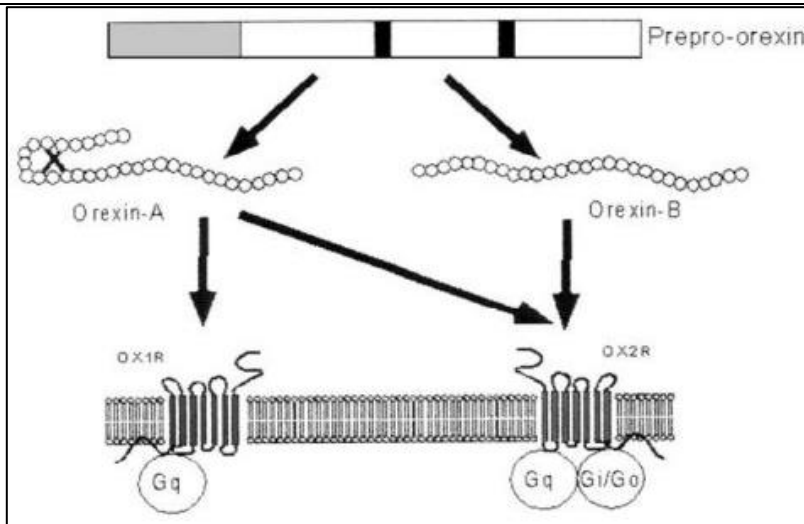


Abbildung 5.1 Orexinsynthese und Bindungsaffinität von Präproorexin zu Orexin A und Orexin B Orexin A enthält eine durch Disulfidbrücken gebildete Ringstruktur und bindet sich gleichermaßen an den Orexin-Rezeptor 1 und 2, wohingegen Orexin B eine höhere Affinität zu Orexin-Rezeptor 2 besitzt (aus Sakurai et al., 2002)

Während OXA auf Grund der Lipophilie sehr gut ins ZNS diffundieren kann, ist dies bei OXB auch auf Grund der raschen peripheren Metabolisierung nicht der Fall (Kastin und Akerstrom, 1999).

Beide Isoformen binden an Orexin-Rezeptoren 1 und 2, welche zu den G-Proteingekoppelten Transmembranrezeptoren gehören und in 64% ihrer Aminosäuren übereinstimmen.

Bereits in der Originalarbeit von Saturated et al. wurde ein relevanter Unterschied in der Bindungsaffinität der Rezeptoren zu den Liganden beschrieben (Sakurai et al., 1998). Während Orexin-Rezeptor 1 mit 100-fach höherer Affinität OXA bindet, ist die Affinität von Orexin-Rezeptor 2 zu beiden Liganden gleich, sodass der Orexin-Rezeptor 1 als selektiver Rezeptor für OXA und der Orexin-Rezeptor 2 als unselektiver Rezeptor zu werten ist (Kukkonen et al., 2002).

Beide Rezeptoren zeigen eine hohe Selektivität für Orexin und können kaum durch andere Neuropeptide aktiviert werden (Holmqvist et al., 2001).

Erste Medikamente als Orexin-Rezeptor Antagonisten zur Behandlung der Insomnie wie z.B. Suvorexant (Belsomra®, Merck/MSD), ebenso Agonisten zur Behandlung der Tagesmüdigkeit (z.B. bei Schichtarbeitern) sind bereits in klinischer Anwendung bzw. stehen kurz vor der Zulassung.

5.2.2 Physiologische Wirkung

Das Neuropeptid Orexin besitzt eine bedeutende Rolle bei diversen physiologischen Vorgängen und interagiert mit verschiedenen anderen Hormonsystemen, deren Funktionen im Detail noch unverstanden sind.

Neben der Bedeutung als Wachhormon, reguliert es zusätzlich die Nahrungsaufnahme, Emotionen und die Motivation (Tsujino und Sakurai, 2013).

Durch die intraventrikuläre Injektion von Orexin kam es bei Ratten dosisabhängig zur vermehrten Nahrungsaufnahme (Sakurai et al., 1998).

Umgekehrt führte die Applikation von Anti-Orexin Antikörpern in Ratten zur reduzierten Nahrungsaufnahme (Yamada et al., 2000).

Spätere Untersuchungen durch Mikroinjektion von Orexin in verschiedene Hirnareale zeigten, dass eine Steigerung der Nahrungsaufnahme nur durch Injektion in gezielt umschriebene Bereiche im Hypothalamus erzielt werden kann (Dube et al., 1999).

Ein entscheidender Wirkort ist der laterale Hypothalamus. Noch vor der Isolierung von Orexin, ist die bedeutende Funktion dieses Hirnareals im Zusammenhang mit der Nahrungsaufnahme bekannt gewesen.

Delgado und Anand beschrieben 1953 zum Beispiel vermehrtes Fressverhalten durch die elektrische Stimulation dieser Areale.

Man sollte annehmen, dass der Mangel an Orexin durch geringere Nahrungsaufnahme und geringerer Aktivität zum deutlichen Gewichtsverlust führen müsste. Anhand von Orexin-Knockout-Mäusen konnte jedoch nachgewiesen werden, dass Mäuse entgegen der Erwartung sogar an Gewicht zunehmen (Hara et al., 2001).

Dies deckt sich auch mit der klinischen Beobachtung, dass Narkolepsiepatienten signifikant adipöser sind. Eine Erklärung dieser Ambivalenz wäre ein direkter Einfluss von Orexin auf den Energiehaushalt (Kok et al., 2003) und das kardiovaskuläre System (Samson et al., 1999).

Tatsächlich führte das Fasten bei Probanden zur Zunahme von Orexin A im Blutserum (Komaki et al., 2001).

Interessanterweise ließen sich Orexin-Rezeptoren unter anderem in Testis, Niere, Nebenniere, Schilddrüse, Fettgewebe, Lunge, Pankreas, Magen-Darm Trakt und Nervus vagus nachweisen. Dies zeigt die breite Funktion von Orexin auch außerhalb der zerebralen Ebene (Zhang et al., 2005, Kirchgessner und Liu, 1999, Randeva et al., 2001, Jöhren et al., 2001, Blanco et al., 2002, Nakabayashi et al., 2003, Burdyga et al., 2003, Karteris et al., 2004, Ehrström et al., 2005, Spinazzi et al., 2005, Digby et al., 2006, Takahashi et al., 2006).

Beispielsweise konnten Ouedraogo et al. zeigen, dass Orexin in Inselzellen des Pankreas nachweisbar ist und die Glukagonsekretion erhöht sowie Insulinsekretion hemmt. Somit moduliert es den Blutzucker während einer Fastenperiode (Ouedraogo et al., 2003).

Zweifellos ist die Regulation der Nahrungsaufnahme noch im Detail unverstanden und beruht unter anderem auf der Interaktion zwischen Orexin, MCH, Neuropeptid Y, Galanin, Ghrelin und Leptin.

So hemmt Leptin, welches aus Adipozyten freigesetzt wird und bei intakter Physiologie mit der Menge an Fettgewebe korreliert, die Synthese von Neuropeptid Y. Umgekehrt steigert OXA die Neuropeptid Y-Freisetzung (Horvath et al., 1999).

Im unmittelbaren Vergleich konnte zwar OXA die Nahrungsaufnahme, wie vorstehend beschrieben stimulieren, jedoch war dieser Effekt der Wirkung von Neuropeptid Y unterlegen (Edwards et al., 1999).

Das orexinerge System vermittelt die Corticosteronausschüttung aus der Nebennierenrinde (Malendowicz et al., 1999) und steigert in Stresssituationen dosisabhängig die Herzfrequenz, den Blutdruck, die Atemfrequenz und das Atemzeitvolumen (Zhang et al., 2005)

Umgekehrt wirkt sich eine Stressreaktion unmittelbar auf die Orexinsynthese aus. So lässt sich durch Corticotropin-releasing Hormone (CRH) eine deutliche gesteigerte Synthese von Orexin nachweisen, was zur gesteigerten Wachheit und Wachsamkeit führt (Winsky-Sommerer et al., 2004).

Nach seiner Entdeckung dauerte es nicht lange bis eine weitere, wenn nicht sogar die wichtigste Rolle von Orexin bekannt wurde: als Wachheitshormon. Im Tierexperiment konnte ein Zusammenhang von Narkolepsie und Orexinmangel nachgewiesen werden (Lin et al., 1999).

Chemelli et al. (1999) beschrieben bereits kurz nach der Erstbeschreibung des Botenstoffs, dass Orexin-Knockout Mäuse in der Nacht, zu einer Zeit also, in der sie sonst maximale Aktivität zeigten, deutlich weniger aktiv waren.

Der entscheidende Hinweis, dass der Orexinmangel letztlich auch beim Menschen die wahrscheinlich kausale Ursache der Narkolepsie ist, wurde in einer im Lancet publizierten Arbeit von Nishino et al. postuliert (Nishino et al., 2000).

Orexin scheint insbesondere den REM-Schlaf zu modifizieren. Bei Ratten führt der Knockdown von Orexin-Rezeptor 1 im Locus coeruleus zum Anstieg des REM Schlafes während der Nachtperiode (Chen L et al., 2010).

Dies deckt sich sehr gut mit dem klinischen Bild der Narkolepsie, bei der es zu einem verfrüht auftretenden REM-Schlaf kommt. Dies wird durch einen sogenannten Schlaf-Latenz-Test im Schlaflabor quantifiziert und gehört unter anderem zu den Diagnosekriterien (Bourgin et al., 2000).

Neuerdings gibt es Hinweise, dass das orexinerge System in der Pathogenese von Morbus Alzheimer eine neuroprotektive Rolle erfüllen könnte (Davies et al., 2015).

Die vorstehenden Ausführungen lassen erkennen, dass nicht alle Funktionen von Orexin bisher endgültig bekannt sind, und dass weiterführende Untersuchungen notwendig sind.

5.3 Das Melanin-concentrating hormone (MCH)-System

5.3.1 Liganden und Rezeptoren

Lange war unter Ichthyologen bekannt, dass das Melanotropin (= α -Melanozyten stimulierendes Hormon, kurz α -MSH), ein Prozessierungshormon aus Proopiomelanocortin (POMC), für die Dunkelfärbung des Integuments von Knochen- und Knorpelfischen zuständig ist (Hickman und Weber, 2008).

1983 konnten Kawauchi et al. schließlich ein Hormon in der Hypophyse des Keta/Hundslachses (*Oncorhynchus keta*) isolieren, welches die Aggregation von Melaningranula in Melanophoren induziert und somit zur Hellfärbung der Haut führt. Der evolutionäre Sinn ist die Tarnung in Abhängigkeit von der Hintergrundfarbe. Das Melanin-concentrating hormone (MCH) ist ein zyklisches Peptid aus 17 Aminosäuren und wurde ursprünglich als Antagonist zum α -MSH gesehen (Kawauchi et al., 1983).

Im Gegensatz zu den Fischen besteht das MCH sonst bei allen Säugetieren (einschließlich Mäusen, Ratten und Menschen) aus 19 Aminosäuren (Saito und Nagasaki, 2008).

Das zyklische Neuropeptid ist auf dem Chromosom 12q23-24 (bei Ratten Chromosom 7) kodiert; es entsteht aus dem 165 Aminosäure-langen Präkursor-Protein Präpro-MCH (ppMCH). Durch proteolytische Spaltung und posttranslationale Modifikation entstehen zwei weitere Liganden: Neuropeptid GE (NGE=neuropeptide-glycine-glutamic acid) und das Neuropeptid EI (NEI=neuropeptide-glutamic acid-isoleucine; Nahon et al., 1992).

Einleitung

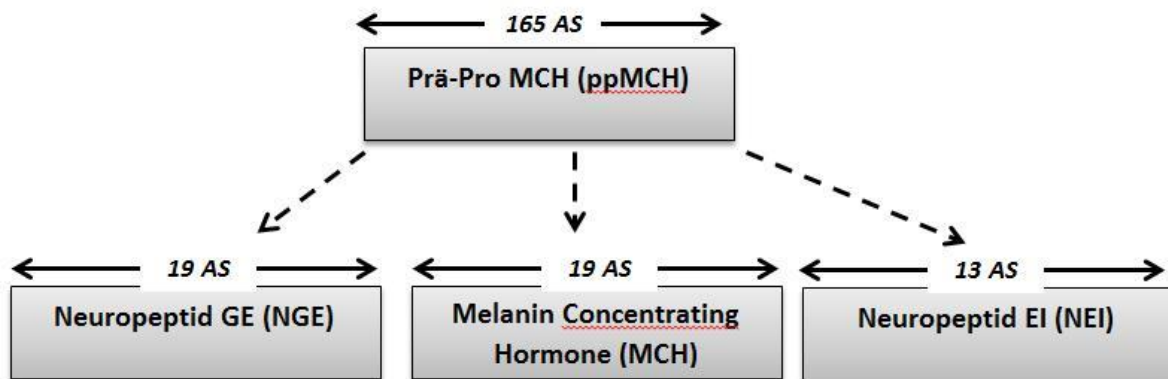


Abbildung 5.2 MCH-Synthese Aus dem Präkursor-Protein ppMCH entsteht neben MCH zusätzlich das Neuropeptid GE (NGE) sowie das Neuropeptid EI (NEI)

Die ppMCH-RNA und das MCH sind insbesondere in Neuronen im lateralen Hypothalamus (LH) und in der Zona incerta nachweisbar (s. Abb. 5.3). Ein kleiner Anteil MCHerger Neurone wurde unter anderem auch im Tuberculum olfactorium, in der pontinen Formatio reticularis sowie im laterodorsalen Tegmentum der Ratte beschrieben (Bittencourt et al., 1992).

Bei humanen Zellen wurde die Expression von MCH zudem in verschiedenen peripheren Organen beschrieben, ihre Funktion ist jedoch im Detail noch nicht verstanden (Viale et al., 1997).

Es sind bisher zwei MCH-Rezeptoren (MCH-R) bisher beschrieben: 1999 wurde von mehreren Arbeitsgruppen der MCH-R1 entdeckt (initial somatostatin-like receptor 1=SLC-1 genannt). Die Bindung des Liganden aktiviert verschiedene intrazelluläre Signalkaskaden durch Aktivierung von Gi, Gq und G0-Proteinen. (Bachner et al., 1999).

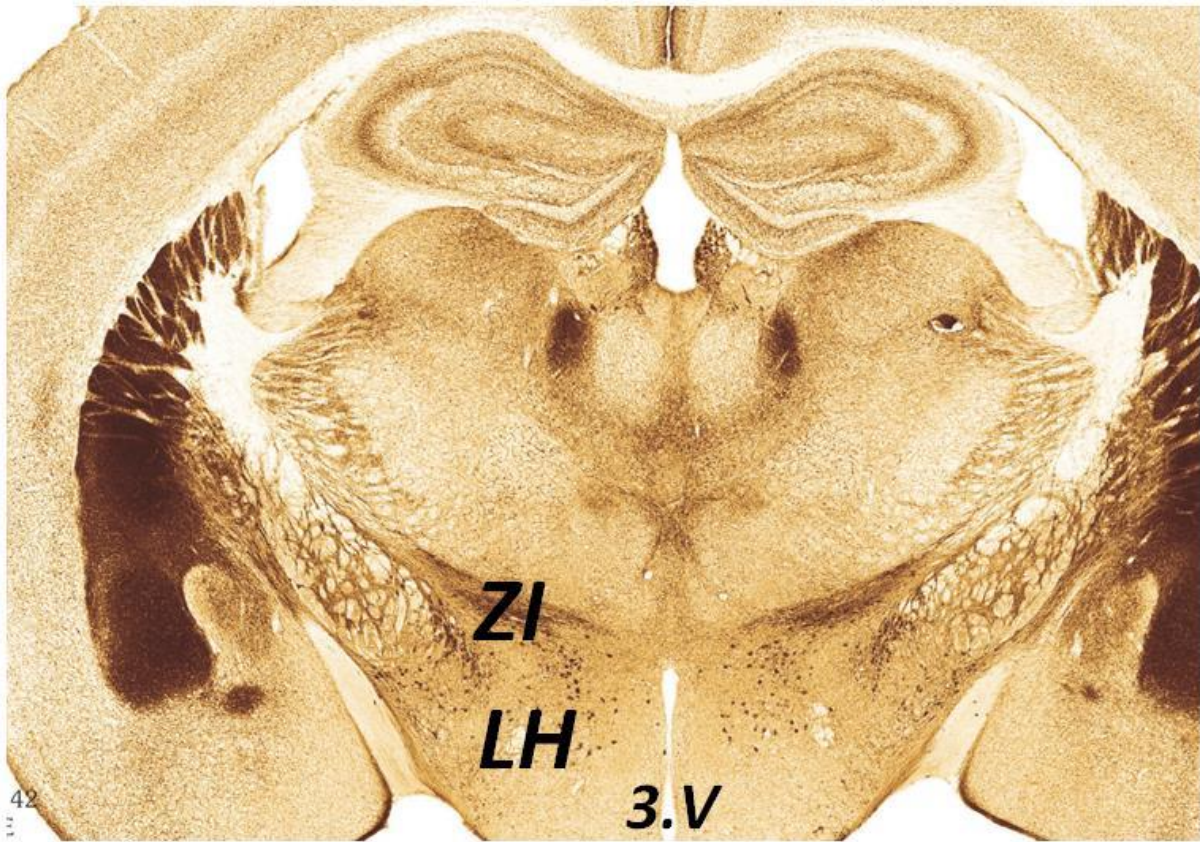


Abbildung 5.3 Topographie des Hypothalamus Coronaler Schnitt durch das Rattenhirn. Acetylcholinesterase (AChE)-Färbung. **ZI** Zona incerta, **LHA** Area hypothalamica lateralis, **3.V** 3. Ventrikel (Franklin und Paxinos, 2013)

2001 konnte die Arbeitsgruppe um Sailer et al. schließlich das Gq-gekoppelte MCH-R2 identifizieren, welche eine Sequenzhomologie von 38% zum MCH-R1 aufweist.

Der MCH-R1 konnte sowohl in diversen Hirnabschnitten wie z.B. Kortex, Hippocampus, Amygdala und Medulla oblongata nachgewiesen werden, als auch in verschiedenen peripheren Organen, u.a. Lymphknoten, Thymus, Milz, Nebenniere, Duodenum etc. (Saito et al., 2001, Hill et al., 2001).

Im Gegensatz zu MCH-R1 ist der MCH-R2 bei Nagetieren lediglich ein Pseudogen, während er bei Menschen, Rhesus-Affen und Hunden funktional ist (Tan et al., 2002).

5.3.2 Physiologische Wirkung

Während bei der Erstbeschreibung dem MCH vor allem eine Funktion für die Farbadaptation der Fische an die Umgebung zugeschrieben wurde, konnte schon bald ihre herausragende Bedeutung für die Regulation der Nahrungseinnahme, des Energiehaushaltes, der Psyche und des Tag-Nacht-Rhythmus herausgefunden werden.

Die intraventrikuläre Injektion von MCH führt zu gesteigerter Futteraufnahme, während nach dem Fasten und bei Leptin-defizienten ob/ob-Mäusen eine gesteigerte MCH-RNA Expression nachweisbar ist (Qu et al., 1996).

MCH-defiziente Mäuse sind hypophag und schlank, ebenso wie MCH-R2-Defizienz zu schlanken, hyperaktiven und hyperphagen Mäusen führt (Shimada et al., 1998, Marsh et al., 2002).

Die Energiehomöostase wird zusätzlich durch MCHerge Hemmung der thyreotropen Achse (verminderte TSH Sekretion) beeinflusst (Kennedy et al., 2001).

Wie im vorherigen Abschnitt dargelegt, sind MCH-Rezeptoren in diversen peripheren Organen nachweisbar, unter anderem im Pankreas und in Adipozyten. Es konnte gezeigt werden, dass MCH die Leptin- und Insulin-Synthese und -Sekretion reguliert (Bradley et al., 2000, Tadayyon et al., 2000).

Naheliegender ist daher die Option, dass durch geeignete MCH-R-Antagonisten Therapiemöglichkeiten gegen Adipositas gefunden werden könnten.

Der Effekt würde nicht nur auf einer geringeren Nahrungsaufnahme, sondern auch auf der Modulation des Energiehaushaltes basieren (Ito et al., 2010).

Interessanterweise konnte durch die Applikation von MCH-R-Antagonisten bei Mäusen ein antidepressiver und anxiolytischer Effekt nachgewiesen werden (Borowsky et al., 2002).

Bei Ratten erzeugt die Mikroinjektion bereits geringster Mengen an MCH in den dorsalen Raphekern (ein serotonerges Kerngebiet) ein Verhaltensmuster, das durch generell verminderte Mobilität und Kletteraktivität, besonders betont im erzwungenen Schwimmtest nach Porsolt, in den depressiven Formenkreis angesiedelt werden kann. Ein gegenteiliger Effekt konnte durch vorherige systematische Behandlung mit Fluoxetin (ein Selektiver Serotonin-Reuptake-Inhibitor=SSRI) oder Injektion von Anti-MCH Antikörpern in den Raphekern hervorgerufen werden.

Die Arbeit von Lagos et al. zeigt, dass MCHerge Fasern im dorsalen Raphekern durch Modulation serotonerger Neurone Einfluss auf das emotionale Verhalten haben können. Ein weiteres Zentrum, welches stimmungsmulatorisch wirkt, ist das limbische System, wo ebenfalls MCHerge Fasern und Rezeptoren entdeckt wurden. Es eröffnet sich pharmakologisch ein weiteres Feld für die Entwicklung von Antidepressiva (Lagos et al., 2011, Bittencourt et al., 1992).

In den letzten Jahren zeigte sich, dass das MCH-Neuropeptid im Schlaf-Wach Verhalten eine essenzielle Funktion einnimmt.

Verret et al. beschrieben 2003 in ihrer Arbeit das MCH als ein sehr potentes hypnogenes Hormon. Insbesondere während der REM-Schlaf Phase zeigt sich eine ausgeprägte Aktivität des MCH-Systems.

Einleitung

Durch intraventrikuläre Injektion von MCH konnte ein Anstieg des REM-Schlafes (bis zu 200%) und des Slow-Wave Schlafes (SWS) (bis zu 70%) erzeugt werden (Verret et al., 2003). Bei Ratten zeigt sich am Tag, d.h. zu ihrer Hauptschlafphase, die höchste Konzentration an MCH im Liquor (Pelluru et al., 2013).

MCH-Knockout Mäuse (MCH^{-/-}) schlafen signifikant weniger. Unter Nahrungskarenz zeigen sie eine deutliche Hyperaktivität, beschleunigten Gewichtsverlust und ausgeprägte Abnahme des REM-Schlafes (Willie et al., 2008).

Adamantidis et al. beschreiben 2008, dass MCH-R1-defiziente Mäuse entgegen der Erwartung einen Hyperinsomnie-ähnlichen Zustand zeigen, der im Vergleich zu Wildtyp Mäusen mit vermehrtem REM-Schlaf während der Wachphase einhergeht. Wie die Autoren in ihrer Arbeit diskutieren, könnte dies an der Ausbildung von Kompensationsmechanismen liegen.

Insgesamt belegen die bisherigen Arbeiten, dass das MCH als potentes Glied in der Regulation des Schlafes zu betrachten ist.

5.4 Zusammenspiel der untersuchten Hormone

Der laterale Hypothalamus stellt neben zahlreichen anderen Funktionskreisen ein bedeutsames Areal in der Regulation des Schlaf-Wach Verhaltens dar. In den letzten Jahren haben sich insbesondere zwei Neuropeptidhormone als entscheidend herauskristallisiert: MCH und Orexin. Diese sind sowohl topographisch als auch funktionell eng miteinander verzahnt. Trotz der topographischen Nähe der Expressionsorte der beiden Botenstoffe wird angenommen, dass die Peptide explizit nicht von derselben Nervenzelle exprimiert und sezerniert werden. Es lassen sich jedoch engmaschige axodendritische und axosomatische Nervenverbindungen mit reziproker Innervation nachweisen, die eine enge funktionelle Regulation nahelegen (Tortorello et al. 2006). Diese Tatsache, ebenso der Nachweis von Orexin-Rezeptoren auf MCHergen Neuronen, lässt kaum einen Zweifel an einer wichtigen funktionellen Interaktion beider Peptidhormone (Backberg et al., 2002).

Während Orexin-Knockout Mäuse narkoleptisch, adipös und hypometabolisch sind, sind MCH-Knockout Mäuse eher hyperaktiv, schlank und hypermetabolisch (Hara et al., 2001, Shimada et al., 1998).

In funktionellen Untersuchungen des Schlaf-Wach Verhaltens zeigten sich erhöhte Expressionen von Orexin während der Wachphase, während MCH vor allem im Schlaf, hier insbesondere im paradoxen Schlaf (REM-Schlaf), die höchsten Expressionsniveaus zeigt (Hassani et al., 2009).

Messungen der zerebrospinalen Flüssigkeit belegen ebenfalls ein reziprokes Verhalten beider Hormone: während das MCH bei Ratten v.a. tagsüber (also zur Schlafenszeit) die höchste Konzentration aufweist, ist dies bei Orexin insbesondere nachts (also zur Wachzeit) der Fall (Pelluru et al., 2013).

Auch beim Menschen ist das MCH mit Schlaf, und das Orexin mit Wachheit assoziiert (Blouin et al., 2013).

Bis vor kurzem war jedoch noch unklar, ob die orexinerge Aktivität lediglich eine Korrelation zum wachen Zustand aufweist oder ob sie auch kausal mit dem Wachzustand verknüpft ist.

Erst mit den neuen Methoden der Optogenetik konnte diese Frage suffizient beantwortet werden. In einer in vivo Arbeit an freilaufenden Mäusen konnte durch eine selektive, optogenetische Photostimulation von Orexin-Neuronen im lateralen Hypothalamus die Wahrscheinlichkeit der Beendigung des REM-Schlafs deutlich erhöht werden (Adamantidis et al., 2007).

Zur Induktion von Schlaf, insbesondere in der aktiven Phase der Tagesperiode, reicht jedoch die alleinige Hemmung der "Wachneurone", wie z.B. der Orexin-Neuronen oder der noradrenergen Neurone des Locus coeruleus, nicht aus (Tsunematsu et al., 2011; Carter et al., 2010).

Wie von Konadhode et al. 2013 gezeigt, ist zusätzlich die Aktivierung von schlafgenerierenden Neuronen nötig. Die selektive, optogenetische Aktivierung MCHerger Neurone beispielsweise reduzierte die Wachperiode um 50% und erhöhte den Anteil von non-REM und REM Schlaf signifikant.

Somit scheint das Orexin für das „wachwerden“ und/oder „wachbleiben“ verantwortlich zu sein, wohingegen der Schlaf nicht durch die bloße Abwesenheit von Orexin, sondern durch die Aktivität schlaffördernder Peptidhormone, wie das MCH, induziert zu werden scheint.

5.5 Fragestellung

Die vorhergehend geschilderten Prozesse, z.B. eine sehr deutliche Aktivität von MCH, nicht jedoch von Orexin, während des REM-Schlafs, wurden überwiegend an Ratten beobachtet (Verret et al., 2003).

Es liegen gegenwärtig keine Arbeiten vor, die den Einfluss von Schlafentzug auf das Orexin- und das MCH-System bei Mäusen beobachtet. In keiner bisherigen Arbeit wurde die Immunreaktivität von Orexin- und MCH-positiven Neuronen bei C57BL- und C3H-Mäusen, die sich auf Grund ihrer Retinaeigenschaft und ihrer Melatonin-Expression unterscheiden, im Vergleich untersucht. Dies soll nun mit der vorliegenden Arbeit erfolgen. Dabei geht es insbesondere um folgende Fragen:

1. **Sind Unterschiede im chemoarchitektonischen Profil des Orexin-Systems der C57BL- und C3H-Maus erkennbar?** Die C57BL-Maus wird im Gegensatz zur C3H-Maus als Melatonin-defizient erachtet. Die C3H-Maus dagegen ist auf Grund frühzeitiger postnataler Retinadegeneration blind. Es gibt bisher nur rudimentäre Kenntnisse über die Interaktion der orexinergen und MCHergen Neurone und Melatonin.
2. **Bestehen qualitative und semiquantitative Unterschiede im Orexin-System während der Vigilanzphase Wachheit, im Schlaf und unter Schlafentzug? Zeigt sich eine zirkadiane Veränderung?**
3. **Wie verhält sich das Orexin-System im Vergleich zum MCH-System?**

6. Material und Methodik

6.1 Material

6.1.1 Art der Versuchstiere

Für das Experiment wurden **männliche Mäuse** der Zuchtstämme **C3H/HeNCrl** und **C57BL/6NCrl** verwendet. Zum Zeitpunkt der Lieferung waren die Mäuse **6 Wochen alt**, sie wurden von Charles River (Sulzbach, Germany) bezogen.

6.1.2 Haltung der Versuchstiere

Die beiden Mäusestämmen wurden unter denselben Bedingungen gehalten. Die Materialgewinnung erfolgte sequentiell, d.h. bei Präparation der C3H-Mäuse wurden die C57BL-Mäuse bestellt.

Die Versuchstiere hatten ad libitum Zugang zu Wasser und Nahrung. Die Akklimatisierung erfolgte in temperaturneutraler Umgebung von ca. 20°C und einem Tag-Nacht-Zyklus von jeweils 12 Stunden, wobei das Licht mittels Schaltuhr von 8-20 Uhr an- und von 20-8 Uhr ausgeschaltet wurde (LD 12:12).

Der Tierkäfig wurde einmal pro Woche gereinigt und die Streu ausgewechselt. Jeweils 15 Mäuse wurden zunächst gemeinsam in einem Käfig gehalten, sodass sie die gleichen experimentellen Bedingungen ausgesetzt waren. Der Käfig entsprach einer reizvollen Umgebung und maß 56 x 34 x 20 cm. Bestückt wurde er mit 2 Laufrädern, zu dem die Mäuse jederzeit Zugang hatten, sowie mit Papiertüchern, die von den Mäusen zum Nestbau verwendet wurden.

Durch manuellen Kontakt wurden die Mäuse gezähmt und an menschlichen Umgang gewöhnt.

Vor dem Experiment wurden die Mäuse - nach 12 Tagen in Gruppenhaltung - zu jeweils 5 Tieren pro Käfig gehalten, sodass sie später separat entnommen werden konnten.

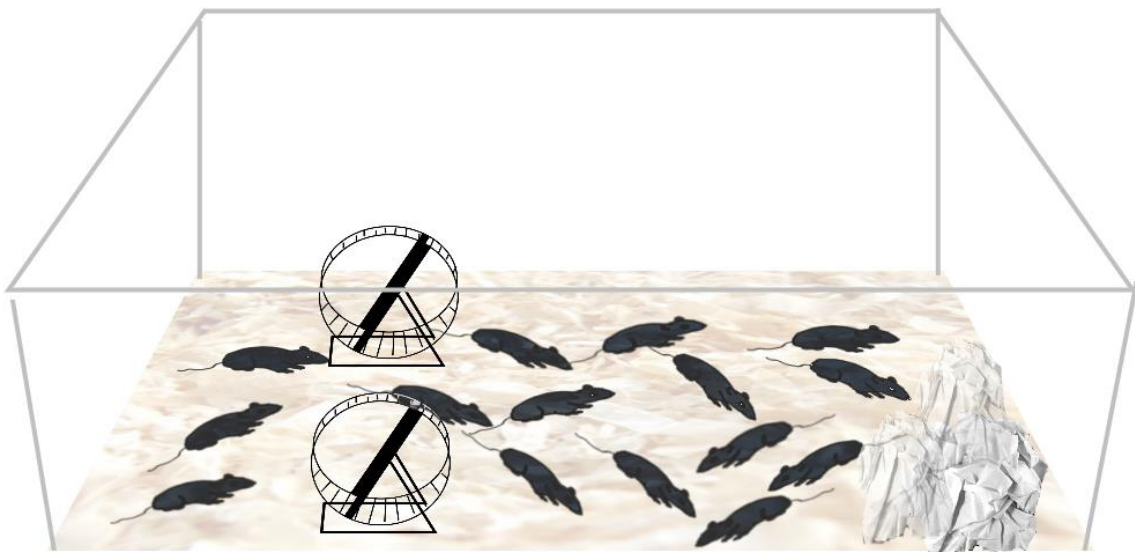


Abbildung 6.1 Laborbedingung bei gemeinsamer Akklimatisierung (eigene Zeichnung)

Die Käfige der Experimentalgruppen waren mit 39 x 24 x 15 cm etwas kleiner und konnten mangels passender Größe nicht mit Laufrädern, sondern nur mit jeweils 2 Papprollen und Papiertüchern bestückt werden.

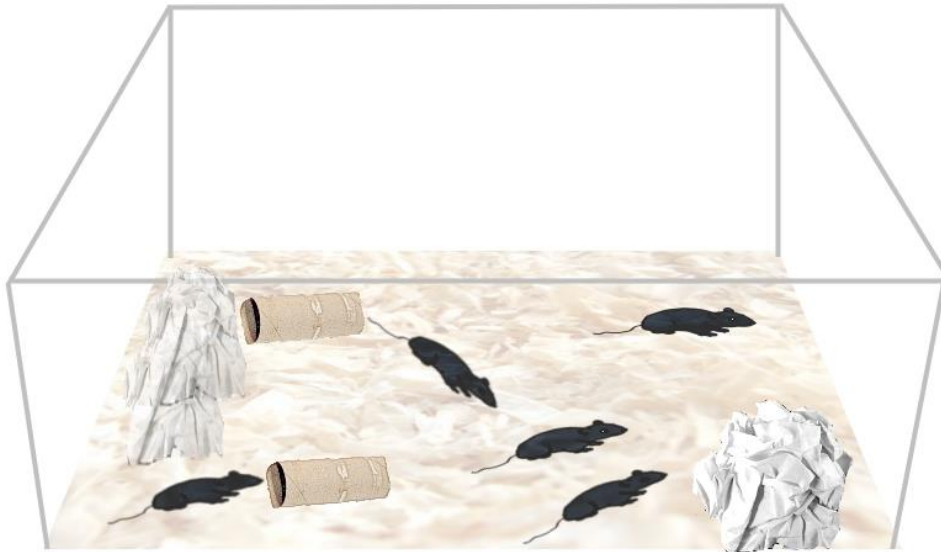


Abbildung 6.2 Laborbedingung vor dem Experiment (eigene Zeichnung)

6.1.3 Puffer und Lösungen

- **Phosphatpuffer-Lösung (PB)**

Es wurde eine 0,1 mol Pufferstammlösung aus 11,36g Na_2HPO_4 und 2,72 g KH_2PO_4 in 1000 ml destilliertem Wasser (dH_2O) hergestellt.

- **Paraformaldehyd (PFA)**

Es handelt sich um ein Polymer aus mehr als zehn polymerisierten Formaldehydverbindungen. Zur Herstellung einer 500ml 4%igen PFA-Lösung wurde 20g Paraformaldehyd in 250ml aqua dest. unter ständigem Rühren und bei einer max. Temperatur 60°C aufgelöst (depolymerisiert). Anschließend mit 250ml 0,2M PB aufgefüllt und abfiltriert.

- **Saccharose**

10%, 20% und 30% in 0,1 M Phosphatpuffer

Tabelle 1 Ansatz für die Saccharose-Lösung

Konzentration	Saccharose Menge	0,1M PB Lösung
10%	30g	300ml
20%	60g	300ml
30%	90g	300ml

6.2 Experimentelles Vorgehen

Die Mäuse jedes Zuchtstammes wurden randomisiert in eine von 3 Experimentalgruppen eingeteilt. Die Tötung erfolgte jeweils zu unterschiedlichen Zeiten.

Tabelle 2 Überblick über die Experimentalgruppen und Tötungszeit

	C3H	C57Bl
1. Gruppe	Aktiv (22:00 Uhr)	Aktiv (22.00 Uhr)
2. Gruppe	im Schlaf (14:30 Uhr)	Im Schlaf(14:30)
3. Gruppe	Schlafentzug (14:00 Uhr)	Schlafentzug (14:00 Uhr)

6.2.1 Tötung nach Schlafentzug

In der Schlafentzugsgruppe wurden insgesamt 5 Mäuse desselben Stammes im Zeitraum 8:00-14:00 Uhr (6 Stunden) - d.h. während ihrer Einschlafphase- vom Schlaf depriviert. Dies erfolgte unter Tageslichtbedingungen und ausschließlich durch sanftes Hantieren („*Gentle-handle Methode*“).

Die Tiere wurden lediglich am Einschlafen gehindert und in ihrem natürlichen Verhalten nur dann gestört, wenn sie sich zum Schlafen zusammenrollten.

6.2.2 Tötung im Schlaf

Die Tötung der Mäuse "im Schlaf" erfolgte nach 6 1/2 Stunden Schlaf. Es wurde darauf geachtet, dass zwischen Entnahme der schlafenden Maus aus dem Käfig und der Tötung nur eine sehr kurze Zeitspanne lag, um die Effekte des Weckreizes auf die Transmitterhomöostase gering zu halten.

6.2.3 Tötung im aktiven Wachzustand

Die Tötung der Mäuse im aktiven Zustand erfolgte 2 Stunden nach Ausschalten des Lichts (d.h. 22:00 Uhr). Um die Exposition der Mäuse zu hellem Licht zu vermeiden verwendeten wir Rotlicht (Glühbirne 15 Watt der Firma Philips).

6.3 Materialgewinnung

6.3.1 Modus der Tötung

Um eine im Rahmen der Tötung stressbedingte Dysbalance der Transmitter in Grenzen zu halten, erfolgte die Dekapitation der Tiere unmittelbar nach dem Entnehmen aus dem Käfig mittels einer speziellen Schere.

6.3.2 Entnahme der Gehirne

Im Anschluss an die Dekapitation wurden die Gehirne aus den Schädeln präpariert. Hierzu wurde der hintere Kopfbereich vom Fell befreit und die Calvaria durch laterale Schnitte entfernt. Das Gehirn wurde durch vorsichtiges Ablösen der Hirnnerven von der Schädelbasis entnommen.

6.3.3 Fixation und Kryoprotektion

Die Gehirnpräparate wurden zur weiteren Fixierung in 100ml Behälter mit jeweils 4% Paraformaldehyd (PFA) in 0,1 M Phosphatpuffer (PB) bei 4°C im Kühlschrank für mindestens 24 Stunden fixiert.

Zur Vorbereitung des Schneidevorgangs mit dem Kryostaten wurden die Präparate in 0,1 M PB Lösung überführt. Da das Fixativ durch Diffusion ausgewaschen wird, wurden die Gehirne genauso lange in der PB Lösung gehalten wie zuvor in der PFA Lösung.

Um eine Zerstörung des Gewebes beim Einfrieren zu verhindern, wurden die Hirnpräparate in aufsteigend konzentrierter Saccharoselösung infiltriert. Beginnend in 30ml 10%-Saccharose Lösung für zwei Stunden, weitere 6 Stunden in 30ml 20%-Saccharose und zuletzt die Inkubation in 30ml 30%-Saccharose Lösung für mindestens 24 Stunden bei 4°C. Dabei war das Absinken der Präparate auf den Boden ein Zeichen für den vollständigen Gefrierschutz.

Zur Lagerung wurden die Gehirnpräparate von der 30% Saccharoselösung aus zunächst in minus 20-25°C kaltes Isopentan schockgefroren und anschließend, sobald es eine weißliche Farbe annahm, mit Aluminiumfolie umwickelt und für ca. 30min auf Trockeneis gelegt (etwa minus 70°C) und komplett durchgefroren. Der Zwischenschritt mit Isopentan vermittelt ein schnelles Einfrieren des Gewebes.

Schließlich wurden alle Gehirne bei $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ bis zur Weiterverwendung in einer Gefriertruhe gelagert.

6.3.4 Herstellung der Gehirnschnitte

Auf einem mit Trockeneis gekühlten Präparatenhalter wurde das Einbettmedium Tissue-Tek® O.C.T.™ Compound (Electron Microscopy Sciences, Hatfield, Pennsylvania, USA), bestehend aus wasserlöslichen Glykolen und Harzen, aufgetragen und das gefrorene Gehirn hierin befestigt.

Am Kryostat-Mikrotom CM 3050 (Leica, Nußloch, Deutschland) wurden von den Gehirnen koronare Schnittserien erstellt. Die Schnittdicke der Präparate betrug $20\text{ }\mu\text{m}$. Dabei zeigte sich mit folgenden Einstellungen sehr gute Schnittergebnisse: Kammertemperatur von -24°C , Objekttemperatur von -22°C bis -23°C . Aufgefangen wurden die Präparate auf elektrostatisch beladene Objektträger (Thermo Scientific™ SuperFrost Plus©). Diese wurden schließlich bis zur immunhistochemischen Aufarbeitung bei mind. -20°C tiefgefroren.

6.4 Immunhistochemie und Immunfluoreszenz

6.4.1 Prinzip der Immunhistochemie

Das Prinzip der Immunhistochemie basiert darauf, dass antigenwirksame Moleküle, in dieser Arbeit Proteinstrukturen, durch einen Primärantikörper gebunden werden. Anschließend erfolgt die Kopplung von Sekundärantikörper an Fc-Fragmenten der Primärantikörper.

An die Sekundärantikörper können nun wiederum entweder Fluoreszenzmoleküle (wie z.B. Fluorescein=FITC in dieser Arbeit) gekoppelt sein oder, wie im Falle der Immunhistochemie für Durchlichtmikroskopie, das Vitamin Biotin gekoppelt werden. Letzteres nutzt den Umstand, dass Biotin (Vitamin H) und Avidin (ein Glykoprotein im Eiweiß von Vögeln) eine der stärksten nicht-kovalenten Bindungen zwischen Protein und Ligand eingehen ($K_d = 10^{-15}$), so dass Avidin an den Sekundärantikörper bindet und das chromogene Substrat Diaminobenzidin (DAB) in einer Farbreaktion umsetzt. Das gesuchte Antigen wird braun dargestellt. Diese Methode stellt die gebräuchlichste und sensitivste Methode zum Nachweis von Antigenen in situ da. DAB-Polymere sind Alkohol- & Xylol stabil, sodass diese als Intermedien für das Eindeckmittel verwendet wurden.

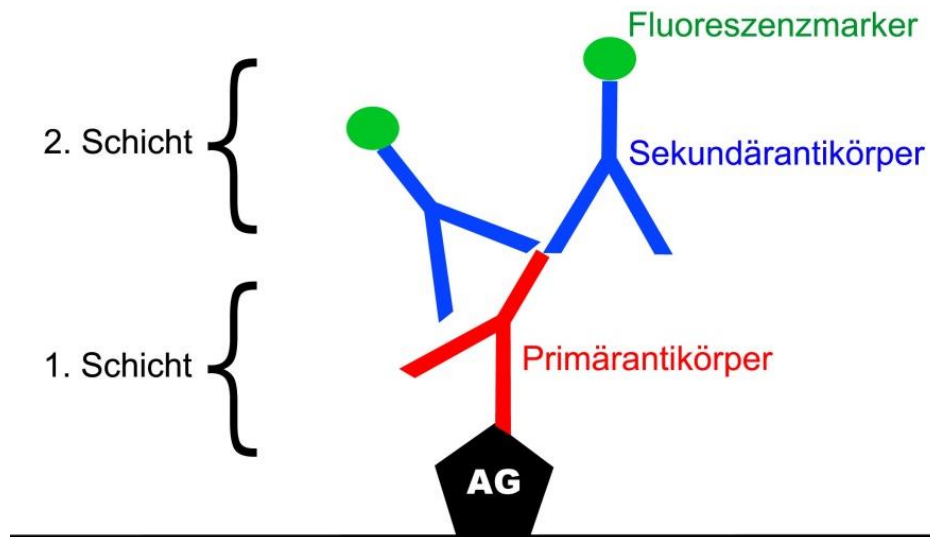


Abbildung 6.3 Prinzip der Immunfluoreszenzfärbung Details siehe Text (eigene Zeichnung)

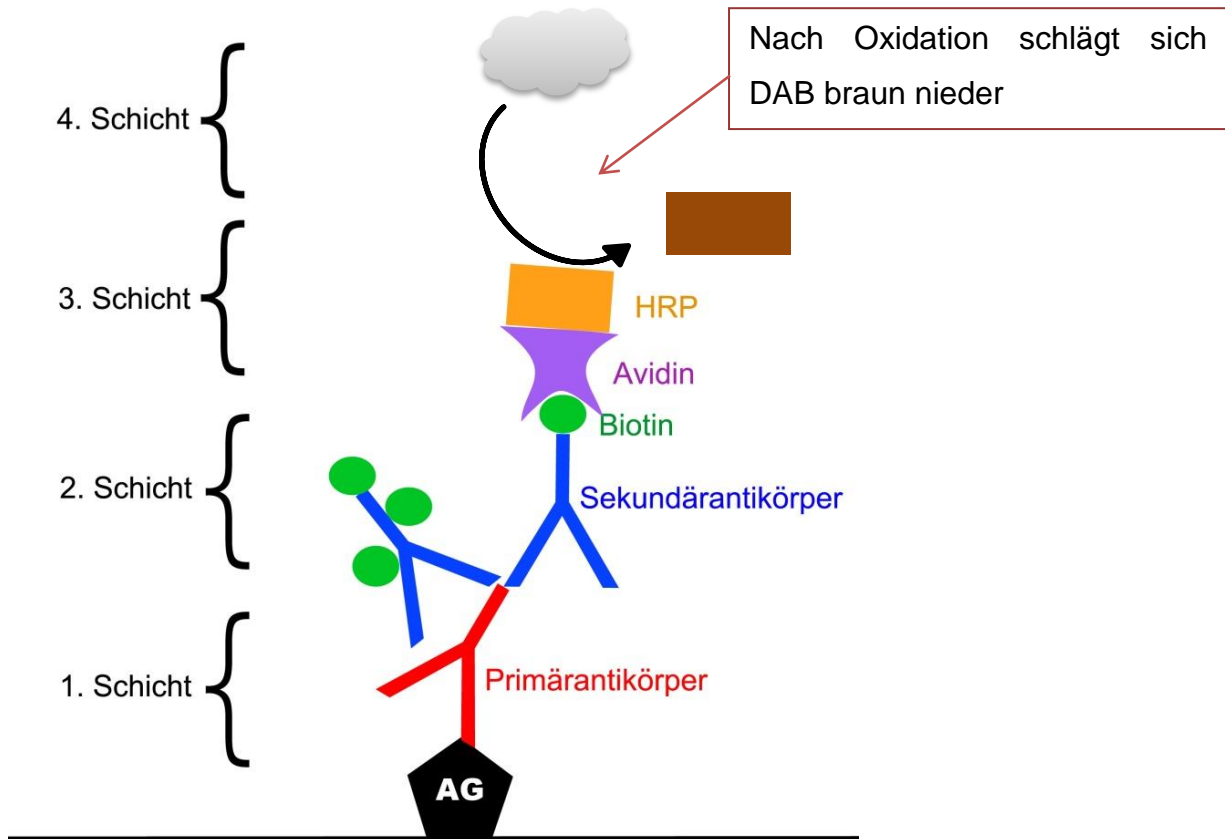


Abbildung 6.4 Prinzip der Immunhistochemie mit DAB Detail siehe Text (eigene Zeichnung)

Wieso wird der Primär-AK nicht direkt mit dem Fluorophor oder dem Enzym gekoppelt (direkte Färbung)? Dies hat vor allem 3 Gründe:

1. Kostenfaktor: die Herstellung eines spezifischen Primär-AK ist teuer. Durch Kopplung eines Enzyms an den AK wird die Affinität deutlich herabgesetzt, sodass zusätzlich höhere Konzentrationen (also geringere Verdünnung) notwendig sind. Die Herstellung enzymgekoppelter Anti-Fc-AK ist deutlich günstiger.

2. Signalverstärkung: an den 1. AK können sich 2 oder mehr sekundäre AK binden, dies hat eine deutliche Amplifikation und Potentierung des Signals zur Folge.
3. Sensitivität: aus oben genanntem Reaktionsmechanismus gilt die direkte Färbung als nicht sehr sensitiv und kann höchstens dann verwendet werden, wenn das gesuchte Antigen in hoher Menge vorhanden ist.

6.4.2 Material und Antikörper

- **Phosphat-gepufferter Salzlösung (PBS)**

0,1 M, pH 7,4: 9,0 g NaCl, 0,54 g KH_2PO_4 , 2,27 g Na_2HPO_4 in 1000 ml destilliertem Wasser (dH_2O). Der pH-Wert wurde unter pH-Meter-Kontrolle mit HCL oder NaOH auf 7,4 feinadjustiert.

- **Phosphat-gepufferter Salzlösung mit Triton X-100 (PBST)**

PBS, 0,1M (s.o.)+ 3 ml Triton X-100 je 1 Liter Puffer. Triton ist ein Detergenz und löst bzw. lockert lipophile Strukturen (z.B. die Zellmembran) auf, sodass die zur Färbung verwendeten Antikörper leichter in das Gewebe Eindringen können.

- **Tris-Puffer**

0,05M, pH 7,4: 6,06g Tris in 1000ml. Der pH-Wert ergab einen Wert von 7,4. Tris-Puffer ist für die DAB-Färbung der geeignete Puffer: das Phosphat aus dem PBS komplexiert mit DAB und setzt sich ab, wodurch eine Farbreaktion ausgeschlossen ist.

▪ **Blockinglösung**

Rinderserumalbumin (BSA = Bovine Serum Albumin)

Zur Blockung unspezifischer Bindungsstellen:

5% BSA: 25g BSA in 500ml PBST.

1% BSA: 5g BSA in 500 ml PBST

▪ **Eindeckmedium**

Verwendet wurde ein Fluoreszenzgeeignetes Eindeckmedium (Fluorescence Mounting Medium, DAKO North America, Inc., Via Real Carpinteria, California, USA) mit der Eigenschaft der besseren Visualisierung und des verzögerten Ausbleichens. Für die Immunhistochemie wurde Entellan® (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) verwendet.

▪ **Primärantikörper**

Der Primärantikörper Orexin-A/B (H-104) dient dem Nachweis der Aminosäuren 28-131 vom Orexin-Prekursorprotein. Es handelt sich um einen polyklonalen Antikörper vom IgG-Typ von Kaninchen (s. Tab. 2).

Der Primärantikörper „MCH“ richtet sich gegen pro-MCH Prekursorprotein. Es handelt sich um einen polyklonalen Antikörper vom IgG-Typ von Ziegen. Bei der Immunhistochemischen Färbung mit Biotin/Avidin wurde als Arbeitsverdünnung jeweils 1:100 gewählt, bei der Immunfluoreszenzfärbung 1:50.

Tabelle 3 Verwendete Primärantikörper

Antigen	Wirt	Bezugsquelle	Verdünnung
Orexin-A/B (Prekursor)	Rabbit (rb)	Santa Cruz Biotechnologym, INC., Dallas, Texas, USA	1:100
Pro-MCH (Prekursor)	Goat (gt)	Santa Cruz Biotechnologym, INC., Dallas, Texas, USA	1:100

▪ **Sekundärantikörper**

Für die Immunhistochemie wurden mit Biotin gebundene Antikörper verwendet.

Tabelle 4 Verwendete Sekundärantikörper für die Immunhistochemie

Antikörper	Wirt	Antigen	Bezugsquelle	Verdünnung
goat anti-rabbit	Rabbit (rb)	Orexin	DakoCytomation, Glostrup, Denmark	1:100
rabbit anti-goat	Goat (gt)	MCH	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA	1:100

Die Sekundärantikörper für die Immunfluoreszenz waren Fluorophorgekoppelte Immunglobuline vom Typ G (= Fluoreszein-Isothiocyanat-Konjugat). Durch Anregung mit Strahlung bestimmter Wellenlänge emittieren die markierten neuronalen Strukturen Licht bestimmter Wellenlänge. Alexa Fluor® 488, welches für die Darstellung von Orexin verwendet wurde, emittiert rotes Licht. Für die Darstellung von MCH wurde Alexa Fluor® 546, das rot/orange leuchtet, verwendet.

Tabelle 5 Verwendete Sekundärantikörper für die Immunfluoreszenzfärbung

Antikörper	Wirt	Antigen	Bezugsquelle	Verdünnung
Alexa Fluor® 488 donkey anti-rabbit	Rabbit (rb)	Orexin (grün)	Molecular Probes, Inc., Eugene, Oregon, USA	1:200
Alexa Fluor® 546 donkey anti-goat	Goat (gt)	MCH (rot)	Molecular Probes, Inc., Eugene, Oregon, USA	1:500

- ***HRP-gekoppeltes ExtrAvidin®***

HRP=horseradish peroxidase=Meerrettichperoxidase. ExtrAvidin® (Sigma, St Louis, Missouri, USA).

- ***DAB***

= 3,3'-Diaminobenzidin

chromogenes Substrat, das nach Oxidation mit Wasserstoffperoxid (durch Meerrettichperoxidase/HRP) ein System konjugierter Doppelbindungen bildet und als brauner Farbstoff abgelagert wird.

- ***Hoechst***

Der Fluoreszenz-Farbstoff Hoechst wird zur Anfärbung von DNA genutzt. Er emittiert blaues Licht.

- ***Shandon Coverplates™***

Diese speziellen Inkubationsdeckplatten (Thermo Scientific, Pittsburgh, USA) wurden mit den Objektträgern beladen und in den speziell hierfür vorgesehenen Halteapparat in einem Auffangbecken eingesteckt (s. Abb. 6.6). Hierdurch ist neben einer gleichmäßigen Inkubation der Schnitte ein Einsparen der Reagenzien möglich. Der Spaltraum einer Platte hat ein Fassungsvermögen von ca. 200 µl.

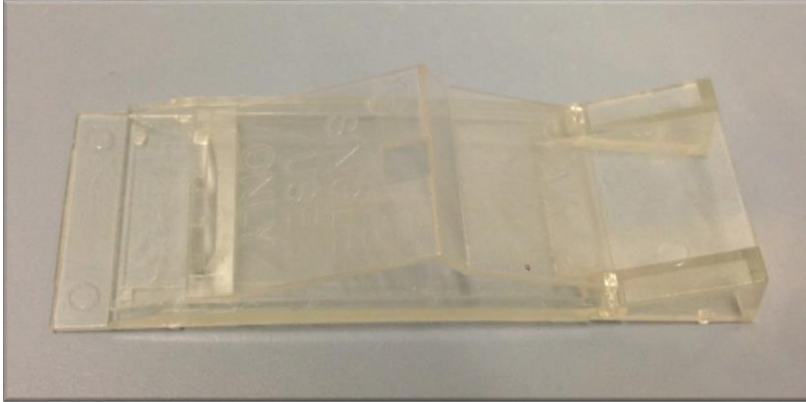


Abbildung 6.5 Shandon Coverplate™ (eigene Aufnahme)



Abbildung 6.6 Halteapparat für Shandon Coverplates™ Alle Inkubations- und Spülschritte wurden hier durchgeführt (eigene Aufnahme)

6.4.3 Protokoll für Immunhistochemie



Abbildung 6.7 Objektträger im Färbegestell (links) und in der Glasküvette (rechts) (eigene Aufnahmen)

Tag 1

1. Gefrierschnitte zunächst bei Raumtemperatur (RT) für ca. 30 min im Färbegestell trocknen lassen (s. Abb. 6.7)
2. Blockierung der endogenen Peroxidase (wie z.B. am Endothel oder anderen Geweben) mit 3% H_2O_2 in Methanol in der Glasküvette (s. Abb. 6.7) (10 min)
3. Spülen mit PBS (Verhinderung von Schaumbildung) und anschließend PBST (je 10min)
4. Blockung unspezifischer Bindungsstellen mit 5% BSA (30min)
5. Inkubieren mit 1. AK in entsprechender Verdünnung (s. Tabelle 2) mit PBST+1%BSA (Übernacht bei Raumtemperatur)

Tag 2

1. Spülen mit PBST (3x10min)
2. Inkubieren mit dem 2. AK, Biotin-konjugiert, in entsprechender Verdünnung (s. Tabelle 3) mit PBST+1%BSA (60 min)

3. Spülen mit PBST (3x10min)
4. Inkubieren mit ExtrAvidin®-gekoppelter HR-Peroxidase (1:100 in PBST+1%BSA) (60min)
5. Spülen mit PBST (3x10min)
6. Waschen mit Tris-Puffer (5min)
7. Farbreaktion: 0,1 mg DAB in 200 ml Tris lösen, kurz vor Anwendung 100 µl 30% H₂O₂ dazugeben (5-10 min)
8. Spülen mit Aqua dest. (5min)
9. Entwässern durch aufsteigende Alkoholreihe: 70%, 80%, 90%, 96%, 2x100% (jeweils 2-3min).
10. Xylolbad (mindestens: 2x5min)
11. Eindeckeln mit Entellan®

Nach dem Aushärten (1-2 Tage) konnte mit der mikroskopischen Auswertung begonnen werden.

6.4.4 Protokoll für Immunfluoreszenzfärbung

Tag 1

1. Gefrierschnitte zunächst bei Raumtemperatur (RT) für ca. 30 min im Färbegestell trocknen lassen (s. Abb. 6.7)
2. Spülen mit 1x PBS (Verhinderung von Schaumbildung) und anschließend PBST (3x5min)
3. Blockung unspezifischer Bindungsstellen mit 5% BSA (30min)
4. Inkubieren mit 1. AK in entsprechender Verdünnung (s. Tabelle 2) mit PBST+1%BSA (Übernacht bei Raumtemperatur)

Tag 2

(im Dunkeln, wichtig ist der Schutz vor UV-Strahlen)

1. Spülen mit PBST (3x5min)
2. Inkubieren mit den 2. AK in entsprechender Verdünnung (s.Tabelle 4) mit PBST (60min). Während der Wartezeit Inkubationsrack mit Aluminiumfolie bedecken (UV-Schutz)
3. Spülen mit PBST (3x5min)
4. Inkubieren mit Höchst-Kernfärbung (5min)
5. Spülen mit PBST (3x5min)
6. Eindeckeln mit Dako-Medium®

Alle Präparate wurden bis zum Mikroskopieren zur längeren Haltbarkeit bei 4°C gelagert.

6.5 Semiquantifizierung der immunhistochemischen Färbung

Zur Vorbereitung wurde ein Mikroskop (Axioplan®; Zeiss, Göttingen) mit einer Videokamera ausgestattet und an einen Computer angeschlossen. Die Präparate wurden mit einer 10-fachen Objektiv-Vergrößerung und 10-fachen Okular-Vergrößerung fotografiert und durch das Programm (AxioVision 3.1.®) digitalisiert. Es wurde darauf geachtet, dass alle Präparate möglichst mit derselben Lichtintensität aufgenommen wurden.

Des Weiteren wurde stets jenes Bild untersucht, auf dem die meisten sichtbaren Perikaryen im rechten Hypothalamus zu sehen waren (s. Abb. 6.8).

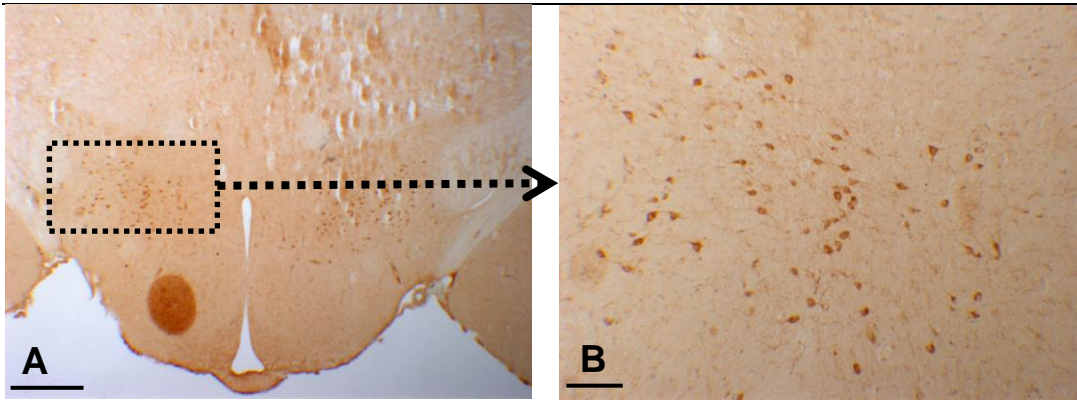


Abbildung 6.8 Exemplarischer Ausschnitt der untersuchten Fläche (A-B)
Dabei stellt das Bild B eine zehnfache Vergrößerung vom rechten (bildseitig linken) lateralen Hypothalamus dar (A). Hier Darstellung von Orexin immunreaktiven Zellsomata (Balkenlänge A=500µm, B=100µm)

Die semiquantitative Messung der immunhistochemischen Färbung beruht auf planimetrischen Methoden. Zur binären Verarbeitung der immunhistochemischen Präparate wurden alle aufgenommenen Bilder in Grauwerte (8-Bit) umgewandelt und anschließend invertiert, sodass die intensiver gefärbten Perikaryen heller erscheinen und in der Statistik einen höheren Zahlenwert erhalten. Durch Schwellenwertverfahren (Thresholding) wurden alle braun gefärbten Neurone und Neuriten im lateralen Hypothalamus ermittelt und in Beziehung zur Gesamtfläche gesetzt.

Zur (Semi)-Quantifizierung ist jede gängige, kommerziell erwerbbar Bildbearbeitungssoftware geeignet (Lehr et al. 1997). In dieser Arbeit wurde die in der Biowissenschaft gängige, plattformunabhängige Bildverarbeitungssoftware ImageJ® (National Institutes of Health, Bethesda, USA) verwendet.

Folgender Arbeitsschritt wurde mit der Software durchgeführt:

1. *Image=>Typ=>8Bit*
2. *Edit=> Invert*

3. *Image=>Adjust=>Threshold*: Hierbei wird der Schwellenwert so eingestellt, dass möglichst alle tatsächlich gefärbten Zellsomata und Axone/Dendriten rot markiert sind. Interaktiv konnten Artefakte eliminiert werden.

4. *Analyze=>Measure*. Wichtige Messparameter (einzustellen unter: *Analyse=> Set Measurements*) waren „%Area“, d.h. das prozentuale Verhältnis der ausgewählten Fläche zur Gesamtfläche sowie „IntDen“, d.h. integrierte Densität (Produkt aus Fläche und mittleren Grauwert). Der mittlere Grauwert ergibt sich aus der Summe der Grauwerte von allen Pixeln im ausgewählten Bereich dividiert durch die Anzahl der Pixel.

Zur Messung der Zellgröße musste die Skala, d.h. das Verhältnis von Pixel zur realen Größe unter *Analyze=>Set Scale* angepasst werden.

6.6 Konfokale Mikroskopie

Die mit den Primärantikörpern erstellten Fluoreszenzfärbungen wurden mit einem Laser-Scan-Mikroskop (LSM) an einem Olympus Fluorview™ FV1000 (Software FV10-ASW 2.0.) durchgeführt (Olympus®, Shinjuku, Tokio, Japan).

Die verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe besitzen unterschiedliche Anregungs- und Emissionsmaxima, sodass durch die Verwendung von Laser unterschiedlicher Wellenlänge die Möglichkeit besteht, mehrere Antigene (in dieser Arbeit zwei Antigene) einer Zelle zur gleichen Zeit darzustellen.

Der entscheidende Vorteil der konfokalen Laser-Mikroskopie liegt, basierend auf der geringen optischen Schichtstärke, in der deutlich schärferen und besseren räumlichen Bildauflösung. Dies wird durch eine Blende vor dem Detektor gewährleistet, welches nur Fluoreszenzsignale von fokussierten Strukturen passieren lässt. Die konventionelle Fluoreszenz-Lichtmikroskopie lässt bei Bestrahlung stets auch Licht aus nicht fokussierten Bereichen hindurch, sodass das Bild unschärfer wird.

Die aufgenommenen Bilder wurden anschließend mit dem Bildbearbeitungsprogramm Image J® (Wayne Rasband, NIH, USA) und Adobe Photoshop CS2® (San José, Kalifornien, USA) nachbearbeitet.

6.7 Statistische Auswertung

Um einen statistischen Unterschied zwischen Kontroll- (aktiv) und Versuchstiergruppen (im Schlaf und Schlafentzug) zu analysieren wurde in dieser Arbeit der Student t-Test oder einfaktorielle Varianzanalyse (one-way analysis of variance, ANOVA) mit Hilfe des Programms Microsoft Excel XP® verwendet. Der p-Wert stellt die Irrtumswahrscheinlichkeit dar, mit der die Nullhypothese gerade noch widerlegt werden kann. Dieser wurde für alle gemessenen Variablen berechnet und rein deskriptiv angegeben. Ein signifikanter Unterschied zwischen einzelnen Gruppen wurde bei $p < 0,05$ angenommen. Für die prozentuale Darstellung der untersuchten Gruppen wurde jeweils der aktive Zustand auf 100% festgesetzt. Im Balkendiagramm wurden die Daten als Mittelwert von jeweils drei Messungen mit doppelter Standardabweichung (SD, Konfidenzintervall 95%) angegeben.

7. Ergebnisse

Die qualitative und semiquantitative Auswertung des orexinergen und MCHergen Systems erfolgte mit Hilfe der Immunhistochemie an coronalen Hirnschnitten (Frontalschnitten). Die Gefrierschnitte der jeweiligen Versuchsgruppen eines Mäusestammes wurden im gleichen Färbeprozess angefärbt. Dies ermöglicht den direkten Vergleich in der Auswertung zwischen Versuchs- und Kontrollgruppe, da alle Schnitte identisch behandelt wurden.

7.1 Lokalisationsmuster der immunreaktiven Strukturen bei C3H- und C57BL-Mäusen

7.1.1 Orexin-System

Orexin-immunreaktive (Orexin-ir) Perikarya finden sich vor allem im lateralen Hypothalamus (LHA), im perifornikalen Areal sowie vereinzelt lateral vom ventromedialen Hypothalamus (VMA) und dorsomedialen Hypothalamus (DMA). Im coronalen Schnitt war die Ncl. ventro/dorsomedialis bilateral symmetrisch organisiert und besonders gut erkennbar (s. Abb. 7.1). Außerhalb des Hypothalamus fanden sich keine deutlichen Orexin-ir Zellsomata. Das Verteilungsmuster der Zellen unterschied sich zwischen C3H- und C57BL-Mäusen und zwischen den unterschiedlichen Versuchstiergruppen nicht wesentlich. Orexin-ir Neurone lassen sich selbst im Schlaf in den beschriebenen Lokalisationen nachweisen (s. Abb 7.1).

Ergebnisse

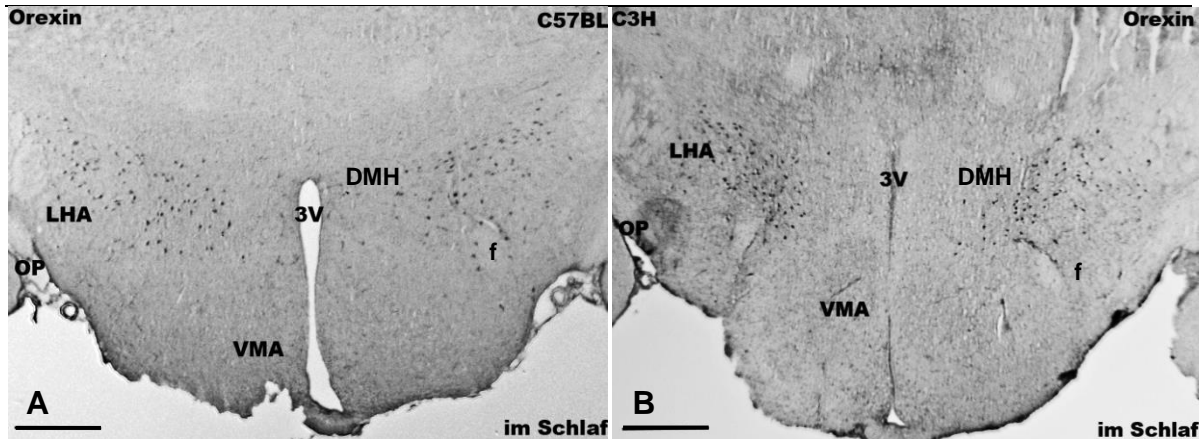


Abbildung 7.1 Orexin-immunreaktive Zellsomata im Hypothalamus (A-B) coronale Schnitte des Hypothalamus mit immunhistochemischen Nachweis von Orexin bei C3H- und C57BL-Mäusen im Schafzustand. Die Neurone verteilen sich gleichmäßig im lateralen Hypothalamus und perifornikal. Selbst im Schlaf lässt sich in den Perikaryen deutlich Orexin nachweisen. **LHA** Area hypothalamica lateralis, **3V** 3. Ventrikel, **VMA** Area hypothalamica ventromedialis, **DMA** Area hypothalamica dorsomedialis, **OP** Nervus opticus, **f** Fornix (Balkenlänge=500µm)

Die Axone konnten kontinuierlich teils bis in die Zona incerta verfolgt werden. Orexin-ir Nervenfasern fanden sich homogen verteilt im gesamten Hypothalamus, einschließlich des Nucleus suprachiasmaticus und Nucleus supraopticus, Thalamus und diffus verstreut im Cortex. Besonders hohe Immunreaktivität mit langen axonalen Fasern ließen sich im Nucleus arcuatus, sowie teils in den Raphekernen und der pontinen Formatio reticularis beobachten.

Im Cortex, insbesondere nahe der Fissura longitudinalis cerebri, fanden sich vereinzelt, jedoch regelhaft, schwach positive Orexin-ir Neurone. Dieser Nachweis gelang jedoch nur im aktiven Wachstadium (s. Abb. 7.2).

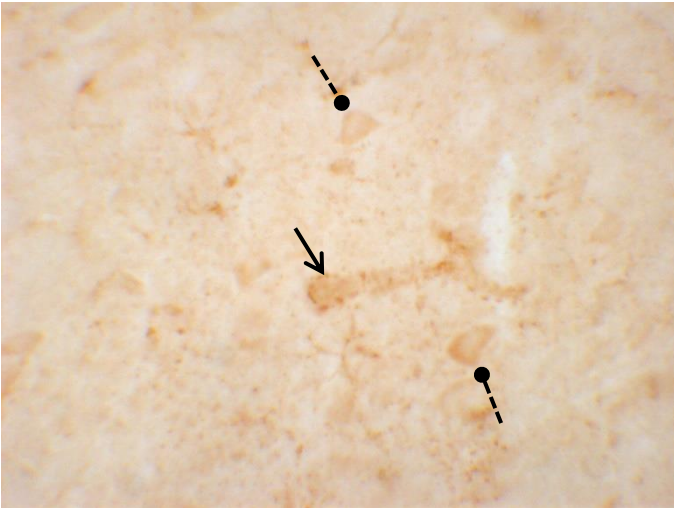


Abbildung 7.2 Mehrfach innerviertes Neuron (—→) sowie zwei schwach positive Orexin-immunreaktive Neurone im Cortex (--●) (400x Vergrößerung)

7.1.2 MCH-System

MCH-immunreaktive (MCH-ir) Perikarya waren insbesondere im lateralen Hypothalamus (LHA), perifornikal und in der Zona incerta nachweisbar (s. Abb. 7.3). Vereinzelte Zellsomata fanden sich auch im paraventrikulären Nucleus und dorsomedialen Hypothalamus. Der Frontalschnitt verdeutlichte eine bilaterale symmetrische Organisation. Das Verteilungsmuster von MCH-ir Perikaryen unterscheidet sich zwischen C3H- und C57BL-Mäusen sowie zwischen den Versuchstieren nicht wesentlich.

Ergebnisse

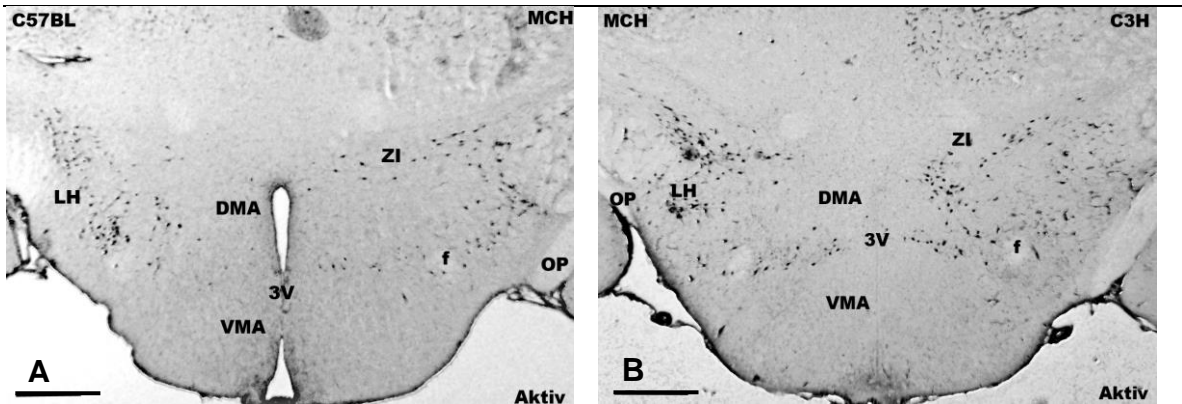


Abbildung 7.3 MCH-immunreaktive Zellsomata im Hypothalamus (A-B) coronale Schnitte des Hypothalamus mit immunhistochemischen Nachweis von MCH bei C3H- und C57BL-Mäusen im aktiven Zustand. Die Neurone verteilen sich verstreut im lateralen Hypothalamus und in der Zona incerta. Selbst im aktiven Zustand lässt sich in den Perikaryen deutlich MCH nachweisen. **LHA** Area hypothalamica lateralis, **ZI** Zona incerta, **3V** 3. Ventrikel, **VMA** Area hypothalamica ventromedialis, **DMA** Area hypothalamica dorsomedialis, **OP** Nervus opticus, **f** Fornix (Balkenlänge=500µm)

Trotz ihrer topographischen Nähe werden sowohl Orexin als auch MCH in unterschiedlichen Neuronen gebildet, dies bestätigte sich in beiden Mäusestämmen (exemplarisch s. Abb. 7.4).

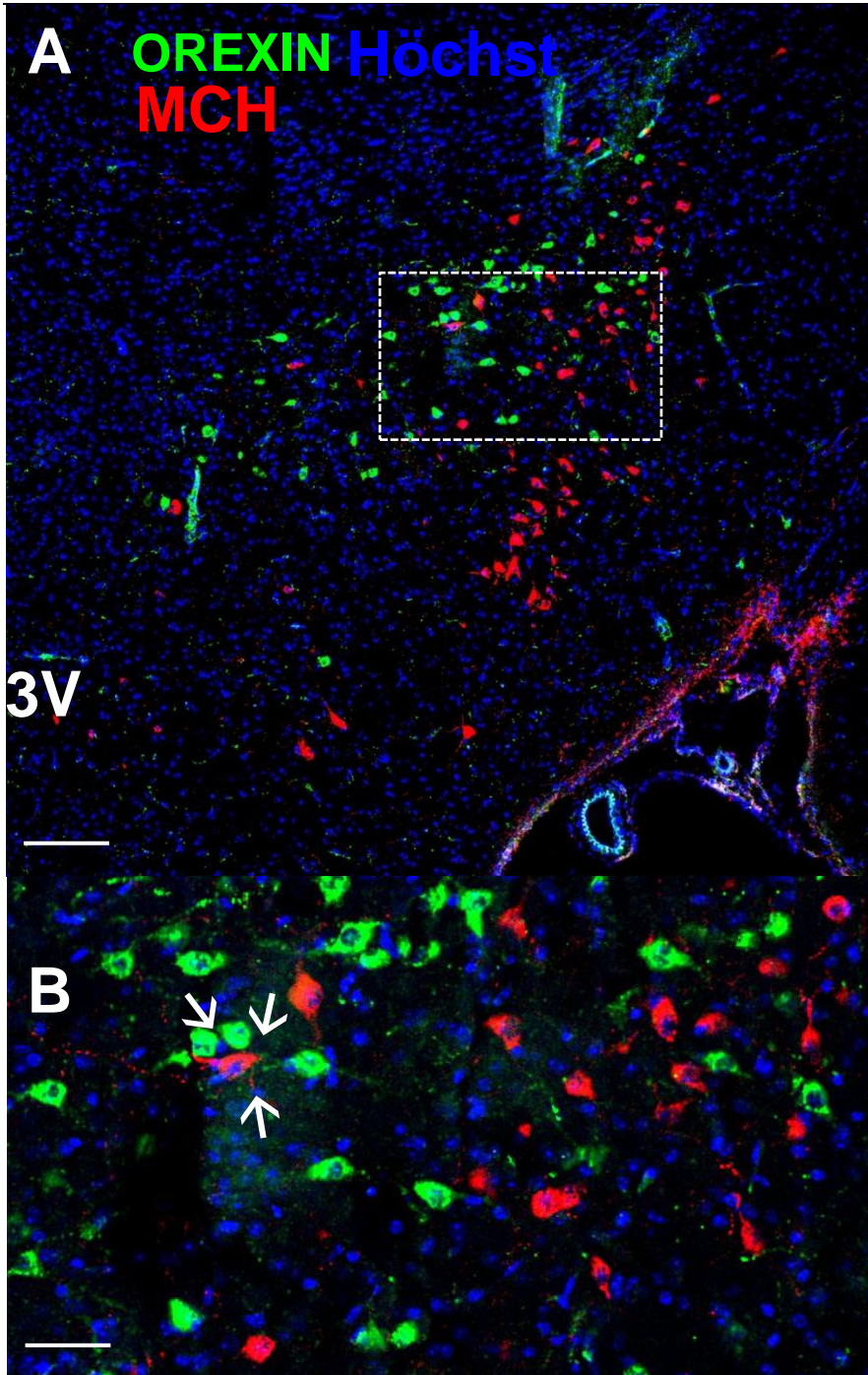


Abbildung 7.4 Immunfluoreszenz von Orexin- und MCH-positiven Nervenzellen im lateralen Hypothalamus (A-B) Umschriebene Neuronenansammlung im lateralen Hypothalamus, vereinzelt auch im ventromedialen Hypothalamus (A, Balkenlänge: 100 μ m). Im vergrößerten Ausschnitt klar abgrenzbar Orexin- und MCH-positive Neurone (Pfeile, Orexin=grün, MCH=rot). Kollokalisierungen wurden nicht beobachtet (B, Balkenlänge: 50 μ m) **3V** 3. Ventrikel

7.2 Reaktivitätsmuster von C3H- und C57BL-Mäusen

7.2.1 Orexin-System

Im wachen Zustand konnten in beiden Zuchtstämmen im repräsentativen Areal des lateralen Hypothalamus pro Schnitt ca. 50-60 Perikaryen gezählt werden. Dabei wurden lediglich Neurone mit deutlich sichtbarem Nucleus gezählt. Die Intensität der Immunreaktion war in der Schlafphase jedoch signifikant geringer (s. Abb. 7.6). Generell waren die Orexin-ir Neurone bei C3H-Mäusen deutlich schwächer tingiert.

Orexin-ir Neurone waren bei beiden Stämmen mittelgroß und hauptsächlich multipolar und fusiform. Jedoch war die Größe des Zellnukleus bei C57BL im Durchschnitt mit 15-18 µm hoch signifikant ($p < 0,0003$) größer als beim C3H Stamm, mit ca. 12-16µm (s. Abb. 7.5). Innerhalb des Vigilanzstadiums ergab sich erwartungsgemäß keine signifikante Größenveränderung (C57BL $p > 0,21$, C3H $p > 0,33$).

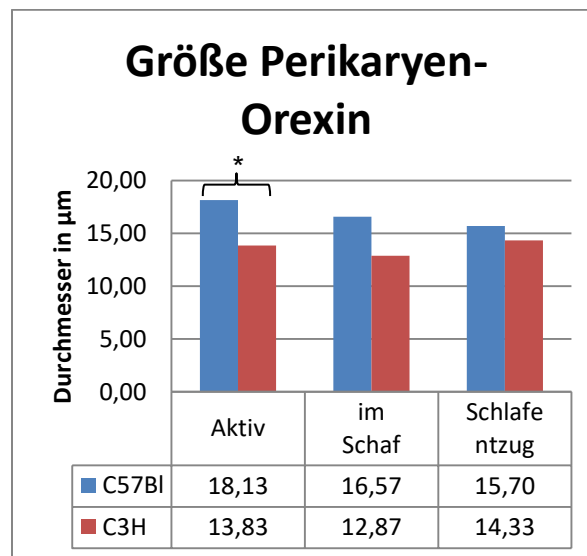


Abbildung 7.5 Größe der Orexin-immunreaktiven Perikaryen im lateralen Hypothalamus Durchmesser der Neurone fielen bei den C3H-Mäusen hochsignifikant kleiner aus ($*p < 0,0003$), innerhalb der Stadien ergab sich kein relevanter Unterschied

7.3 Reaktivitätsmuster bei schlafenden, schlafdeprivierten und wachen Mäusen

7.3.1 Orexin

Die Immunreaktivität wurde während der aktiven Wachphase beobachtet (s. Abb.7.6). Bei beiden Mäusestämmen nahm die Immunreaktivität im Schlaf um nahezu die Hälfte ab (C57BL $p < 0,02$, C3H $p < 0,004$), ebenfalls nahm sie signifikant durch den Schlafentzug ab (C57BL $p < 0,04$, C3H $p < 0,04$). Im Vergleich zur Schlafphase zeigte sich ein geringer, nicht signifikanter Anstieg der Immunreaktivität durch den Schlafentzug und nahm somit eine gewisse Mittelstellung ein (C57BL $p > 0,4$, C3H $p > 0,3$).

Die Orexin-Immunreaktivität war bei C57BL im Vergleich zu C3H höher ($p < 0,02$), jedoch korrelierte sie bei beiden Mäusestämmen eng mit dem Vigilanzstadium. Das Lokalisationsmuster änderte sich in unterschiedlichen Phasen bei beiden Mäusestämmen jedoch nicht (s. Abb. 7.7).

Ergebnisse

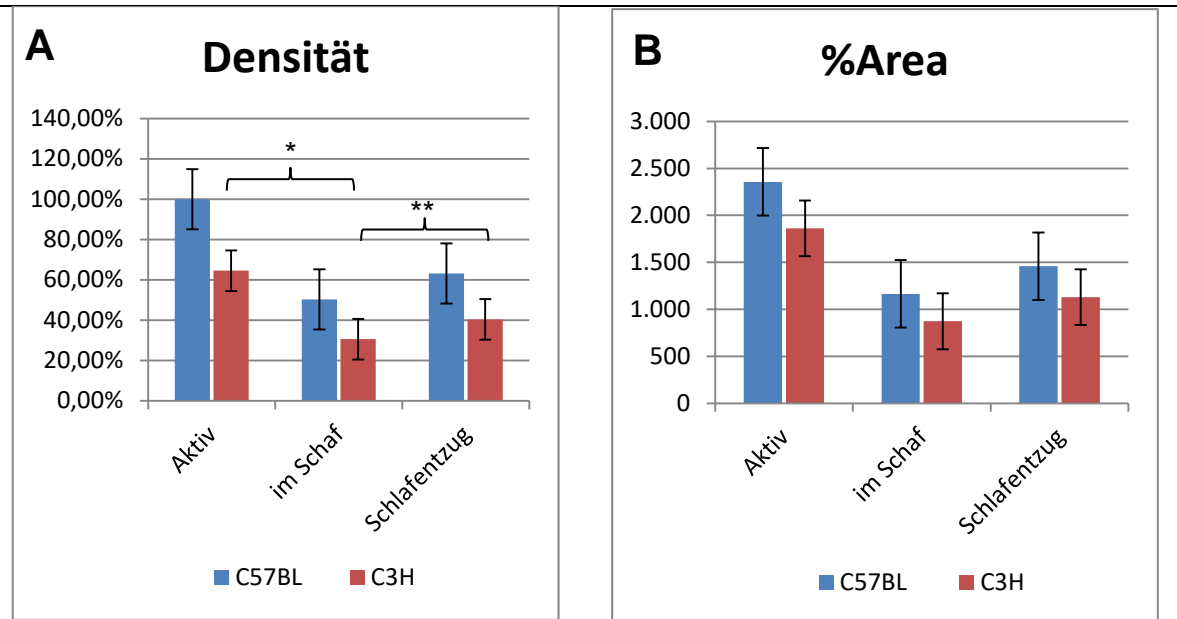


Abbildung 7.6 Semiquantitative Auswertung der immunhistochemisch gefärbten Präparate für Orexin im lateralen Hypothalamus (A-B) Die Zahlenwerte stellen die Flächendichte (A) sowie immunreaktive Fläche (B) in Prozent dar. Die höchsten Werte wurden in der aktiven Phase („Aktiv“) ermittelt und als 100% gesetzt. *p-Wert<0,004, **p-Wert>0,3 (zum Verfahren siehe Material und Methoden)

Ergebnisse

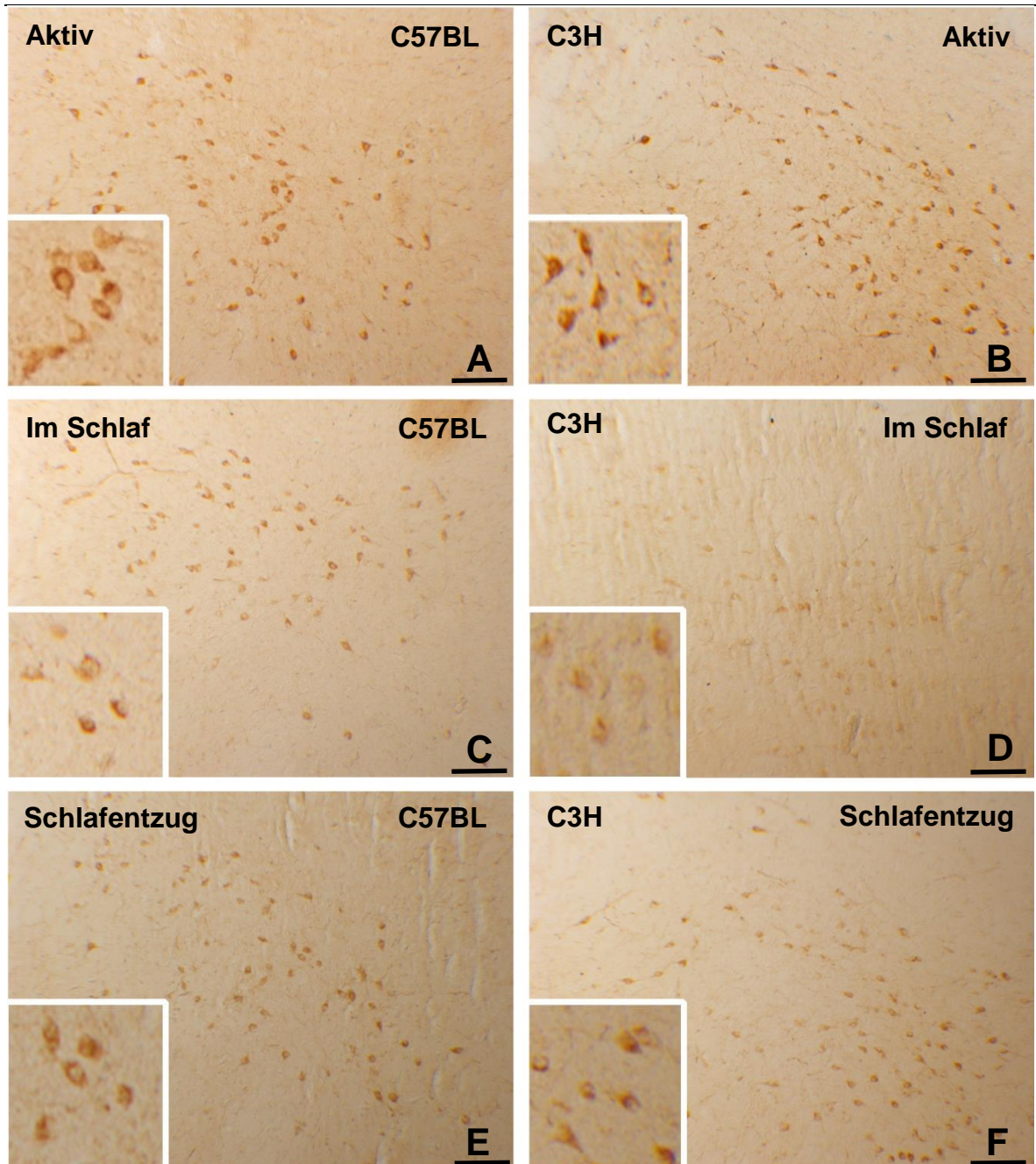


Abbildung 7.7 Stadienabhängige Alteration in der Immunreaktivität von Orexin im lateralen Hypothalamus (A-F) Höchste Immunreaktivität zeigt sich in der aktiven Phase (A, B), eine deutliche Abnahme im Schlaf und durch Schlafentzug ist bei beiden Mäusestämmen erkennbar (C-F). Insgesamt waren die C3H-Mäuse weniger immunreaktiv. Ausschnitte im linken Bildrand sind digitale Vergrößerungen (Balkenlänge=100µm)

7.3.2 MCH

Die stadienabhängige Alteration in der Immunreaktivität für MCH zeigt zwar, dass sie in der Schlafphase am höchsten war (s. Abb.7.8), jedoch war dieser Unterschied nicht signifikant (C57BL $p > 0,5$, C3H $p > 0,8$). Zwischen C57BL und C3H konnte ebenso kein signifikanter Unterschied festgestellt werden ($p > 0,5$). Das Lokalisationsmuster änderte sich in unterschiedlichen Phasen bei beiden Mäusen jedoch nicht (s. Abb. 7.9).

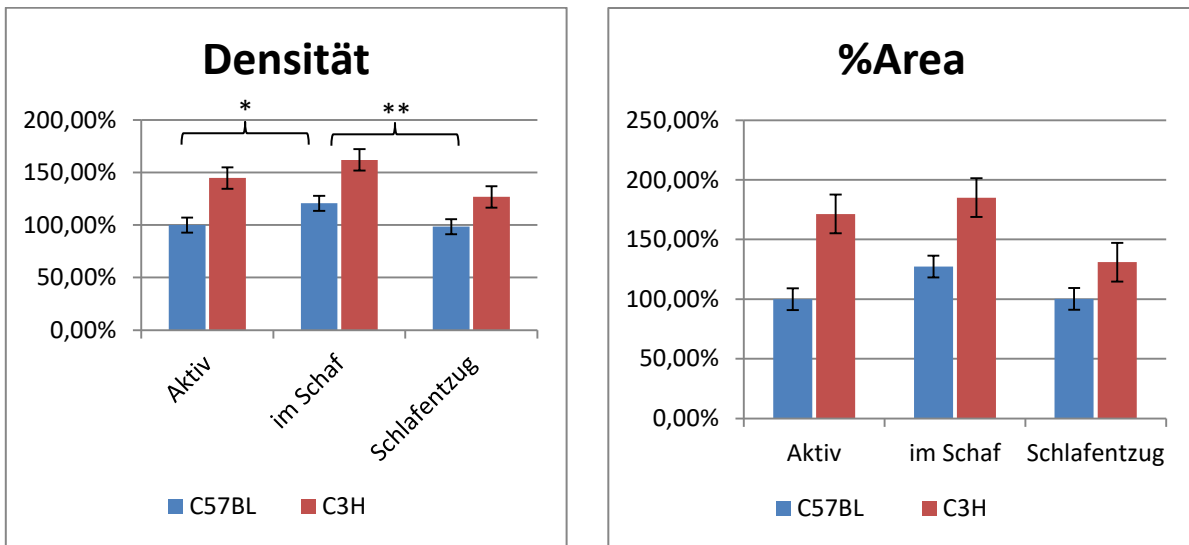


Abbildung 7.8 Semiquantitative Auswertung der immunhistochemisch gefärbten Präparate für MCH im lateralen Hypothalamus (A-B) Die Zahlenwerte stellen die Flächendichte (A) sowie immunreaktive Fläche (B) in Prozent dar. Die höchsten Werte wurden in der Schlafphase ermittelt, jedoch waren die Differenzen nicht signifikant. Der Wert von C57BL im aktiven Stadium wurde 100 % gesetzt. *p-Wert sowie **p-Wert $> 0,5$ (zum Verfahren siehe Material und Methoden)

Ergebnisse

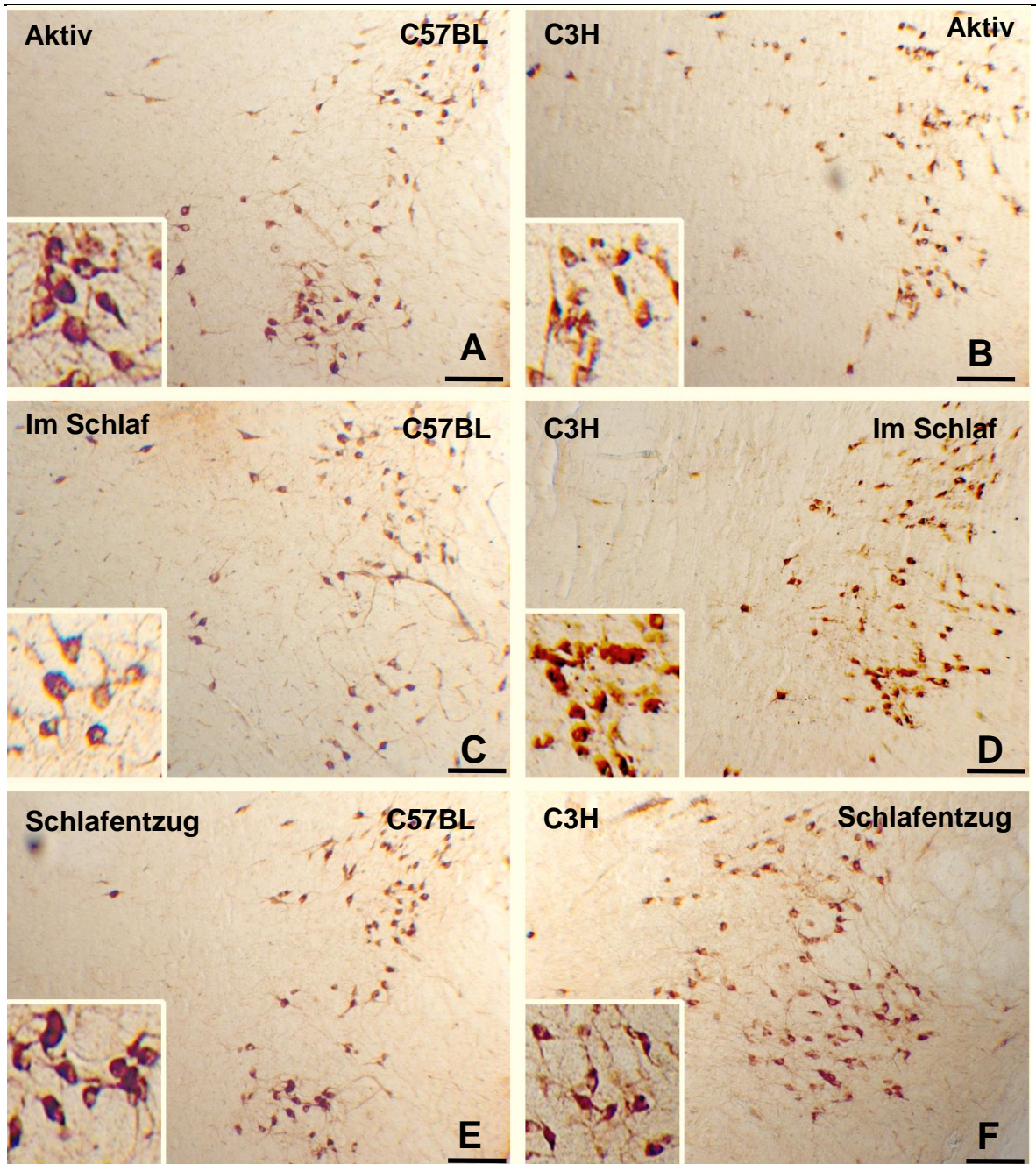


Abbildung 7.9 Stadienabhängige Alteration in der Immunreaktivität von MCH im lateralen Hypothalamus (A-F) Höchste Immunreaktivität zeigt sich in der Schlafphase (C, D), jedoch war dieser Unterschied im Vergleich nicht signifikant. Zwischen den Mäusestämmen zeigte sich ebenfalls kein relevanter Unterschied. Ausschnitte im linken Bildrand sind digitale Vergrößerungen (Balkenlänge=100µm)

8. Diskussion

8.1 Methodenkritik

In der folgenden Arbeit wurde auf eine negative Kontrolle, die beweist, dass die verwendeten Antikörper tatsächlich Orexin/MCH-Neurone anfärben, bewusst verzichtet, da es sich bei den verwendeten Antikörpern (von Santa Cruz Biotechnology INC.) um bereits intensiv (insbesondere auch auf Kreuzreaktion mit anderen Peptiden) getestete und etablierte Immunglobuline handelt (Sakurai et al., 1998).

Um die Stärke der Immunreaktionen zu quantifizieren und somit den Antigen-Gehalt zu bewerten ergibt sich als Hauptproblem, dass die immunhistochemische Reaktion naturgemäß nicht stöchiometrisch erfolgt. Das bedeutet, dass ein „dunkelbrauner Fleck“ nicht gleichzusetzen ist mit der „Menge des untersuchten Antigens“. Darüber hinaus sind viele gefärbte Strukturen im histologischen Präparat Artefakte (z.B. Knick im Gewebe oder Fremdkörper). Nur wenn alle Schnitte von Tieren verschiedener Versuchsgruppen im identischen Färbedurchgang bearbeitet wurden, können Relationen der Tingierung relative Unterschiede im Gehalt markieren.

Zur exakteren Quantifizierung sind validierte Untersuchungen wie RIA, ELISA oder Western Blot besser geeignet. Neben einem hohen Materialverbrauch haben all diese Verfahren jedoch eine entscheidende Einschränkung: das untersuchte Antigen lässt sich nicht exakt lokalisieren, womit das Verteilungsmuster, die Wechselwirkungen und der strukturelle Aufbau von Kernregionen nicht beschrieben werden kann. Dies war hingegen Zweck der vorliegenden Arbeit, da uns bisher keine Arbeit bekannt ist, welche die Immunreaktivität von Orexin- und MCH-positiven Neurone bei C57BL und C3H während verschiedener Aktivitätszustände vergleicht und untersucht. Die absolute Bestimmung des Antigengehaltes könnte man in einer weiterführenden Studie untersuchen.

Bereits in mehreren Arbeiten konnte gezeigt werden, dass die Immunhistochemie zumindest einer Semiquantifizierung zugänglich ist. Dies kann zum einen dadurch erzielt werden, dass durch die Schwellenwertbestimmung (Thresholding) die durch Perikaryen und Axone/Dendriten bedeckte Fläche in das Verhältnis zur Gesamtfläche gesetzt wird (%Area im ImageJ®). Eine andere Möglichkeit stellt die integrierte Densität (IntDen im ImageJ®), das Produkt aus Fläche und mittleren Grauwert, dar. Obwohl in der vorliegenden Arbeit darauf geachtet wurde, dass alle Präparate eines Mäusestammes am selben Tag präpariert, fixiert und denselben Antikörperkonzentrationen zu exakt derselben Zeit ausgesetzt wurden, können nicht alle Parameter, z.B. das Mikroskoplicht, die Filter oder das Raumlicht an unterschiedlichen Tagen mit letzter Sicherheit exakt identisch eingestellt werden. Um zumindest diese Probleme zu minimieren, wurden die Bilder invertiert und eine Hintergrundkorrektur durchgeführt. Wie Wicht et. al in ihrer Arbeit zeigen konnten, stellt der mittlere Grauwert im Verhältnis zur Fläche ein indirektes Maß für den Antigengehalt im Gewebe dar (Wicht et al., 1999).

Bei Untersuchungen des Schlaf-Wach Verhaltens besteht eine weitere Schwierigkeit darin, dass die Versuchstiere vor der experimentellen Prozedur (Dekapitation, Schlafentzug etc.) Stressreaktionen auf Grund der manuellen Agitationen zeigen. Um eine valide Interpretation der Ergebnisse zu gewährleisten, sollte möglichst jeglicher Stress vermieden werden. Dies wurde in der vorliegenden Arbeit durch initiale Zähmung gewährleistet, die durch regelmäßigen Handkontakt mit allen Versuchstieren erfolgte. Es ist ein valide Vorgehensweise, die bisher in vielen anderen Arbeiten bestätigt wurde (u.a. J. Schilling & F. Nürnberger, 1998). Allerdings kann nicht mit letzter Sicherheit ausgeschlossen werden, dass Stresshormone (insbesondere Adrenalin, Noradrenalin und Cortison) freigesetzt werden und somit eine Dysbalance der Transmitter verursacht wird. Ein vollständiger Ausschluss ist jedoch bei lebenden Tieren schwierig und nur bei Zellkulturen tatsächlich zu 100% möglich.

Die Dekapitation erfolgte in der aktiven Gruppe bewusste nicht nach sechs Stunden, also dem arithmetischen Mittel der nächtlichen Aktivitätsphase, sondern zwei Stunden nach Löschen des Lichts. Denn wie die Arbeitsgruppe um Wicht et al. 2014 zeigen konnte, sind C3H- und C57BL-Mäuse insbesondere in der ersten Nachthälfte hoch aktiv.

8.2 Orexin und MCH im Kontext mit dem Schlaf-Wach Verhalten

Jedes epiterrestische Lebewesen ist dem Wechsel von Tag und Nacht ausgesetzt (24-stündiger Hell-Dunkel Rhythmus). Somit ist nahezu jeder biochemische und physiologische Vorgang in einer Zelle einer Rhythmik unterworfen. Selbst beim Fehlen des externen Stimulus „Licht“ funktioniert dieser Biorhythmus, sodass auf das Vorhandensein einer inneren Uhr geschlossen wurde, die von der Arbeitsgruppe von Moore initial im Ncl. suprachiasmaticus beschrieben wurde (Moore und Eichler, 1972).

Der Taktgeber der circadianen Rhythmik, der Nucleus suprachiasmaticus (Welch et al., 2010), beeinflusst die rhythmische Sekretion von Melatonin aus der Zirbeldrüse (Glandula pinealis), welches bisher als schlafinduzierendes Hormon gesehen wird. Die Substitution von Melatonin findet Anwendung bei zirkadianen Rhythmusstörungen (Dodson et al., 2010).

Zwei weitere schlafregulierende Peptidhormone, die in der vorliegenden Arbeit untersucht wurden und welche unter dem Einfluss vom SCN stehen, sind das Orexin und MCH (Zang et al., 2004). Die vorliegenden Ergebnisse decken sich hinsichtlich des Verteilungsmusters beider Peptidhormone (v.a. im lateralen Hypothalamus und Zona incerta) mit vorangehenden Arbeiten (u.a. Lecea et al., 1998, Sakurai et al., 1998, Peyron et al., 1998, Bittencourt et al., 1992). Weiterhin konnte in der Immunfluoreszenzfärbung gezeigt werden, dass die beiden Peptidhormone, trotz Expression im gleichen Kerngebiet, explizit nicht von derselben Nervenzelle exprimiert und sezerniert werden (nicht kolokalisiert sind),

sondern von unterschiedlichen Zellpopulationen stammen (s. Abb. 7.4.). Es lassen sich jedoch engmaschige Fasergeflechte nachweisen, die gegenseitige axodendritische und axosomatische Innervation vermuten lassen und eine enge funktionelle Regulation nahelegen (Tortero et al., 2006). Vermutlich findet die Interaktion zwischen Orexin und MCH-Neuronen über GABAerge Interneurone statt. Erhöhte Aktionspotentialhäufigkeit in Orexinnerven unterdrückt effektiv die Aktivität von MCH-Neuronen (Apergis-Schoute et al., 2015).

In der anatomischen und topographischen Verteilung zeigte sich kein Unterschied zwischen C3H- und C57BL-Mäusen. Offenbar ist das Lokalisationsmuster bei der Entwicklung der Zuchtstämme erhalten geblieben.

Während beide Hormone in der Regulation der Nahrungsaufnahme, des Energiehaushalts und kardiovaskulären Systems eine wichtige Rolle spielen, zeigte sich in funktionellen Untersuchungen des Schlaf-Wach Verhaltens eine erhöhte Expression von Orexin während der Wachphase, während MCH vor allem im Schlaf, insbesondere im paradoxen Schlaf (REM-Schlaf), die höchste Expression zeigt (Hassani et al., 2009).

In der vorliegenden Untersuchung konnte beobachtet werden, dass orexinerge Neurone und Neuriten die höchste Immunreaktivität in der Wachphase zeigten, während sie im Schlaf um ca. 50% abnahm. Somit stand die Reaktivität in enger Beziehung zum Vigilanzstadium und ist ein weiterer Beleg für eine wichtige Funktion von Orexin während der Wachphase und für die zirkadiane Modulation.

Weiterhin ließen sich orexinerge Fasern bei beiden Mäusestämmen in Gehirnarealen nachweisen, die eine wichtige Rolle bei der Schlaf-Wach Kontrolle erfüllen, unter anderem im Thalamus, den Raphekernen, der pontinen Formatio reticularis sowie um den Nucleus suprachiasmaticus (s. Kapitel 7.1.1). Bei Ratten zeigte sich ein ähnliches Muster (Peyron et al., 1998).

Entgegen jeglicher Erwartung fanden sich jedoch in der vorliegenden Arbeit regelmäßig schwach gefärbte Orexin-ir und MCH-ir Perikaryen und Axone auch im Cortex (s. Abb. 7.2). Ihre immunhistochemische Färbung könnte mehrere Gründe haben; zum einen ist eine unspezifische AK-Bindung denkbar. Die vom Hersteller zugesprochene Spezifität ist zwar in vielen Arbeiten zuvor belegt, dennoch kann eine unspezifische Bindung selbst mit einer Negativ-Kontrolle nicht vollends ausgeschlossen werden. Eine weitere Erklärung könnte jedoch der Lokalisation beruhen; äußere Strukturen bzw. Grenzflächen sind durch einfache Diffusion bei höherer Konzentration leicht penetrierbar (Vandesande 1979). Dennoch, denkbar ist auch, dass Neurone im Cortex kleine Mengen an Orexin und MCH enthalten. Hier spielen sie möglicherweise eine bedeutende Rolle bei der neuronalen Plastizität und Lernprozessen, die vornehmlich auch im Schlaf stattfinden. Die endgültige Funktion an dieser Stelle ist schlussendlich bisher noch nicht bekannt oder beschrieben und bedarf weiterer Forschungen.

Nicht nur anatomische, sondern auch in-vivo Untersuchungen belegen die vigilanzsteigernde Wirkung von Orexin. Die intraventrikuläre Injektion erhöht dosisabhängig die Wachphase (Piper et al., 2000), während ein komplettes Fehlen des Hormons zum Krankheitsbild Narkolepsie führt (Lin et al., 1999).

Das Krankheitsbild der Narkolepsie ist unter anderem gekennzeichnet durch folgende Merkmale (Gerloff et al., 2012):

- a) Tagesschläfrigkeit mit Tagschlafepisoden
- b) Kataplexie, d.h. emotionsbedingt (Lachen, Freude und Überraschung, Ärger, Furcht oder andere starke Gemütsregungen) auftretender kurzzeitiger Verlust des Muskeltonus ohne Bewusstseinsstrübung
- c) Schlafparalyse
- d) hypnagoge Halluzinationen (d.h. Halluzination am Übergang zwischen Einschlafen oder Erwachen)
- e) gestörter Nachtschlaf

Insbesondere letzteres ist ein interessanter und neuer Aspekt in der Funktion von Orexin; Orexin-defiziente Knockout-Mäuse, ebenso Menschen mit Narkolepsie, leiden unter fragmentiertem, nicht erholsamen Schlaf (Nishino et al., 2000; Willie et al., 2003). Dies belegt die zusätzlich schlafkonsolidierende Funktion orexinerger Neurone. Eine mögliche Erklärung hierfür liefert die Arbeit von Appelbaum und Mitarbeitern (2009), die eine neuroanatomische und funktionelle Verbindung zwischen Orexin und Melatonin im Pinealorgan von Zebrafischen feststellten. Während in der Orexin-Rezeptor defizienten Glandula pinealis von Nagern die Melatoninsynthese reduziert war, führte in normalen Zellkulturen die Perfusion mit Orexin zur vermehrten Melatoninsynthese. Die Versuche deuten darauf hin, dass Orexin nicht ausschließlich als Wachheitshormon fungiert. In der vorliegenden Arbeit konnten selbst im Schlaf in Hoher Zahl Orexin-ir Neurone und ihre Zellfortsätze nachgewiesen werden. Möglicherweise ist eine Grundaktivität dieser Nervenzellen ein wichtiger Co-Regulator der Melatoninsynthese und somit durch die Interaktion mit Botenstoffen des Tagrhythmus schlafkonsolidierend.

Vergleichende Untersuchungen an C57BL- und C3H-Mäusen sind für die Schlafforschung von besonderem Interesse, da sie sich in der Synthese und Sekretion eines wichtigen Schlafhormons unterscheiden: C57BL-Mäuse synthetisieren in ihrer Epiphyse (Zirbeldrüse) nicht das Schlafhormon Melatonin (Ebihara et al., 1986). Grund hierfür ist die Mutation eines Gens, welches für Serotonin N-Acetyltransferase (AANAT) kodiert, ein Enzym, das für die zyklische Sekretion von Melatonin durch Modifikation von Serotonin zuständig ist. Somit stellt die C57BL-Maus ein natürliches „Melatonin-Knockout“-Modell dar (Roseboom et al., 1998).

Dies gilt nicht für C3H-Mäuse (Goto et al., 1989). C3H-Mäuse leiden unter einer Degeneration ihrer retinalen Photorezeptoren, insbesondere der Stäbchen (Mutation Pde6 (rd1)), welche ab der 2. zweiten Lebenswoche beginnt und nach etwa 3 Wochen nahezu vollständig ist.

Im Laufe des Lebens verlieren sie (langsam) zusätzlich die Zapfen (die bei gesunden Mäusen nur 5 % der Gesamtphotorezeptoren ausmachen) und weitere retinale Strukturen (Fox et al., 2006, S. 644). Trotz fehlender Photorezeptoren können die Mäuse Licht wahrnehmen, zeigen eine intakte Pupillomotorik, einen intakten circadianen Rhythmus und Melatoninregulation (Provencio et al., 1998, Lucas et al., 2001). Angenommen wird, dass spezielle lichtsensible Ganglienzellen, die Melanopsinzellen, in der Retina mit zentraler Projektion in den circadianen Schrittmacher Ncl. suprachiasmaticus diese Prozesse vermitteln (Freedman et al., 1999, Berson et al., 2002). Die Stärke der Phototransduktion in den Melanopsin-Ganglienzellen ist abhängig auch von der Lichtwellenlänge (Semo et al., 2003).

Ausgehend von diesen anatomisch-genetischen Unterschieden würde man signifikante Unterschiede in der stadienabhängigen Alteration zwischen C3H- und C57BL-Mäusen erwarten, sofern es einen wechselseitigen Einfluss von Melatonin, Orexin und MCH gäbe.

Zwar zeigte sich bei C57BL eine stärkere Immunreaktivität im wachen Zustand als bei C3H-Mäusen ($p < 0,02$) (s. Abb.7.7), jedoch ist das Ergebnis im Hinblick auf unterschiedliche physiologische Zustände nicht hinreichend eindeutig.

Dagegen zeigte sich, dass innerhalb desselben Mäusestamms die Stärke der Immunreaktivität von Orexin bei beiden Mäusestämmen während des Schlafs nahezu identisch um 50% abnahm (s. Abb. 7.6.). Dies könnte zum einen damit zu tun haben, dass das Schlafhormon Melatonin im Umkehrschluss keinen Einfluss auf Orexin hat, während Orexin sehr wohl die Melatoninsynthese mitreguliert (Appelbaum et al., 2009). Andererseits ist möglicherweise eine, wenn auch geringe, Melatoninsynthese bei C57BL-Stämmen möglich und die gängige Ansicht, dass sie vollständig melatonindefizient seien, muss revidiert werden.

Schließlich zeigte die Arbeitsgruppe von v. Gall et al. 2000, dass es durch die Stimulation mit Noradrenalin zu einem messbaren Anstieg des Melatoninspiegels in der Glandula pinealis der C57BL-Maus kam und somit nicht von einem vollständigen Mangel auszugehen ist.

Die Immunreaktivität des Wachheitshormons Orexin war bei den melatonindefizienten C57BL-Mäusen in der vorliegenden Arbeit zwar deutlich höher, wohingegen die MCH-Immunreaktivität geringer war als bei C3H-Mäusen, dennoch war die vigilanzabhängige Veränderung der Immunreaktivität bei beiden Mäusestämmen nachweisbar. Zusammenfassend kann möglicherweise angenommen werden, dass die Melatonindefizienz der C57BL keine bedeutende Rolle in der zirkadianen Regulation von Orexin und MCH spielt.

Es fehlen weitere funktionelle und quantitative Untersuchungen, die die reziproke Wechselwirkung der beiden schlafbeeinflussenden Hormone Melatonin und MCH zur Orexin erklären könnten. Insbesondere herrscht eine große Wissenslücke im Hinblick auf die Wechselwirkung dieser Peptidhormone mit dem Nucleus suprachiasmaticus.

8.3 Der Schlafentzug

In der vorliegenden Arbeit wurden die Mäuse zunächst in einem Licht-Dunkel-Rhythmus von 12:12 Stunden gehalten und schließlich in der Schlafentzugsgruppe über 6 Stunden vom Schlaf depriviert. Dies erfolgte unter Tageslichtbedingungen (der natürlichen Einschlafphase der Mäuse) und ausschließlich durch sanftes Hantieren („Gentle-handle Methode“). Die Tiere wurden lediglich am Einschlafen gehindert und in ihrem natürlichen Verhalten nur dann gestört, wenn sie sich zum Schlafen zusammenrollten.

Bekanntermaßen wirkt sich eine Stressreaktion unmittelbar auf die Orexinsynthese aus. So lässt sich durch Corticotropin-releasing Hormone (CRH) eine deutliche gesteigerte Synthese von Orexin nachweisen, was zur gesteigerten Wachheit und Wachsamkeit führt (Winsky-Sommerer et al., 2004).

Orexin-ir Neurone zeigten in der vorliegenden Arbeit jedoch eine deutliche stadienabhängige Alteration der Immunreaktivität: Bei beiden Mäusestämmen nahm die Immunreaktivität sowohl im Schlaf, als auch durch den Schlafentzug signifikant ab (s. 7.3.1). Dies kann durchaus als Beleg für diese schonende Methode gesehen werden.

In funktionellen Untersuchungen des Schlaf-Wach Verhaltens zeigten sich erhöhte Expressionen von Orexin während der Wachphase (Hassani et al., 2009), außerdem exprimieren orexinerge Neurone nach Schlafentzug vermehrt c-Fos, ein neuronaler Aktivitätsmarker (Modirrousta et al., 2005).

Doch wie lässt sich eine Reduktion der Immunreaktivität durch Schlafentzug in dieser Arbeit erklären? Grundsätzlich nimmt in Folge der Schlafdeprivation der Schlafdruck zu. Eine entscheidende Rolle spielt dabei wahrscheinlich das biogene Amin GABA (γ -Aminobuttersäure), welches der wichtigste inhibitorische Neurotransmitter des zentralen Nervensystems ist.

Die meisten hypnotischen Medikamente (insbesondere Benzodiazepine) wirken über die Bindungsstelle des GABA_A-Rezeptors, um GABA-vermittelte Hyperpolarisation zu verstärken.

Matsuki et al. (2015) konnten nachweisen, dass GABA-Rezeptoren eine dynamische und unterschiedliche Veränderung während des Schlafzyklus aufweisen. Nach 6-stündigem Schlafentzug war die Immunfluoreszenzintensität der GABA_A-Rezeptoren (genauer: der α 1-Untereinheit) auf Orexin-Neuronen signifikant erhöht.

Die Orexin-Neurone zeigten somit eine gesteigerte Erregbarkeit durch GABA_A-Rezeptor Agonisten, womit das Schlafbedürfnis nach Schlafentzug möglicherweise durch zunehmend reduzierte Synthese von Orexin zustande kommt. Während des Schlafs kehrte die Immunreaktivität auf den Ausgangszustand zurück, womit vermutlich der Schlafdruck beseitigt und eine normale Erregung wieder hergestellt wird.

Im Vergleich zu Orexin zeigte MCH ein anderes zirkadianes Muster: in der vorliegenden Untersuchung konnte bis auf einen leichten, nicht signifikanten Anstieg in der Immunreaktivität (ca. 20%) während der Schlafphase keine relevante Alteration MCH-ir Neurone zu den unterschiedlichen Schlafphasen festgestellt werden. Dies traf auf beide Mäusestämme zu. Das Ergebnis unterscheidet sich grundlegend von demjenigen am orexinergen System, in dem ein deutlicher stadienabhängiger Unterschied festzustellen war.

Ein ähnliches Verhalten zeigte sich auch in der homöostatischen Veränderung der GABA_A-Rezeptoren auf MCH-Neuronen. Die Arbeitsgruppe von Toossi et al. (2016) konnte wie Matsuki (2015) zwar einen signifikanten Anstieg der GABA_A-Rezeptoren auf Orexin-Neurone nach Schlafentzug nachweisen, im Gegensatz dazu änderte sich der durchschnittliche Anteil von GABA_A-Rezeptoren auf immungefärbten MCH-Neuronen nur unwesentlich.

Eine mögliche Erklärung bietet die Arbeit von Hassani et al. (2009), die in ihrer Arbeit das Entladung/Aktivitätsprofil von Orexin und MCH-Neurone analysierten (Aufzeichnung in kopffixierten Präparationen mit juxtazellulärer Markierung post hoc). Orexin-Neurone waren während der Wachheit maximal aktiv, wohingegen kaum Entladung im Tiefschlaf nachweisbar war. MCH-Neurone zeigten dagegen ein reziprokes Verhalten: ihr Aktivitätsmaximum war eindeutig während der REM-Schlafphase („paradoxe Schlafphase“). Nur gelegentlich konnten Entladungen in der Non-REM-Phase aufgezeichnet werden.

In der vorliegenden Arbeit erfolgte die Dekapitation im Schlaf ungeachtet der Schlafphase nach einer festgelegten Zeit (2 Stunden). Um ein signifikantes Ergebnis im Verhältnis zwischen der aktiven Gruppe und der Schlafentzugsgruppe zu erhalten, hätte die Dekapitation womöglich spezifisch in der REM-Schlafphase erfolgen sollen.

Eine endgültige Erklärung für das Reaktivitätsmuster von MCH ist auf der Basis der vorliegenden Ergebnisse jedoch nicht möglich.

Zusammenfassend zeigt die vorliegende Arbeit, dass orexinerge Neurone im Gegensatz zur MCHergen Neuronen eine deutliche Schlaf-Wach-korrelierte Rhythmik aufweisen und ihre höchste Immunreaktivität während der Wachphase besitzen. Infolge des Schlafentzugs nimmt die Immunreaktivität ab, womit die Zunahme des Schlafdrucks einhergeht. Vermutlich spielt die relative Inaktivität von Orexin in Kombination mit zunehmender Sekretion von MCH eine wichtige Rolle in der Induktion und Kontrolle von Schlaf. Kein Unterschied wurde jedoch zwischen den jeweiligen Mäusestämmen festgestellt, sodass davon auszugehen ist, dass die Melatonindefizienz der C57BL keine bedeutende Rolle in der zirkadianen Regulation von Orexin spielt.

9. Zusammenfassung (Abstract)

Das Peptidhormon Orexin (Hypokretin), das insbesondere in Neuronen des lateralen Hypothalamus synthetisiert wird, hat nach neueren Untersuchungen neben dem Einfluss auf das Essverhalten eine entscheidende Funktion im Schlaf-Wach Verhalten. In optogenetischen Untersuchungen, in denen modifizierte Zellen durch Licht aktiviert werden, konnte durch die Hochregulation von Orexin eine deutliche Wachheits- und Aktivitätszunahme der Tiere verzeichnet werden. Bei erhöhter MCH Freisetzung war eine vermehrte Schlafneigung beobachtet worden. Orexin und MCH scheinen demnach gegensinnige Funktionen in der Schlaf-Wach Regulation einzunehmen.

Mit der vorliegenden Arbeit wurden genauere Einblicke in das orexinerge System im Gehirn von zwei unterschiedlichen Mäusestämmen gewonnen. Es ist nach unserem Wissensstand die erste Arbeit, die das Reaktivitätsmuster von Orexin und MCH bei C3H- und C57BL-Mäusen im Hinblick auf Schlaf und Schlafentzug beleuchtet. Der Vergleich zwischen den Mäusestämmen ist im Besonderen interessant, weil die C57BL-Mäuse das pineale Schlafhormon Melatonin nicht bilden.

Beide Mäusestämmen wurden nach Adaptation während drei unterschiedlicher Funktionszustände semiquantitativ immunhistochemisch untersucht: im Schlaf, im aktiven Zustand sowie nach 6-stündigem Schlafentzug. Nach Fixierung der Gehirne wurden die angefertigten Hirnschnitte immunhistochemisch gefärbt und mikroskopiert. Die Semi-Quantifizierung der Immunreaktivität erfolgte durch eine etablierte Bildbearbeitungsmethodik.

Das Verteilungsmuster Orexin- und MCH-ir Neurone ist zwischen den jeweiligen Mäusestämmen gleich und zeigt eine gegenseitige Innervation. Dies spricht für eine geregelte Interaktion beider Botenstoffsysteme.

Zusammenfassung (Abstract)

Weiterhin zeigte sich eine deutliche Schlaf-physiologische Korrelation orexinergere Neurone mit der höchsten Immunreaktivität während der Wachheit. Es konnte jedoch kein Unterschied der Immunreaktivität in Bezug auf Lokalisation und Stadien zwischen C3H- und C57BL-Mäusen nachgewiesen werden, sodass davon auszugehen ist, dass die Melatonindefizienz der C57BL keine bedeutende Rolle in der zirkadianen Regulation von Orexin spielt.

Im Gegensatz zu Orexin konnte kein signifikanter Unterschied in der Immunreaktivität MCH-ir Neurone zu den unterschiedlichen Vigilanzstadien festgestellt werden.

Vermutlich spielt die relative Inaktivität von Orexin in Kombination mit aktiver Sekretion von MCH eine wichtige Rolle in der Induktion und Kontrolle von Schlaf.

Es sind noch viele Fragen offen; insbesondere die Interaktion zwischen Wachheit- und Schlaf-induzierenden Neuronen deren Regulation. Auch der Einfluss vom Nucleus suprachiasmaticus auf Orexinerge/MCHerge Neurone, sowie das Verhältnis von Melatonin zu Orexin und MCH bedarf weiterer Forschungen.

10. Summary (Abstract)

Orexin (Hypokretin) is a peptide hormone, which is particularly synthesized in neurons of the lateral hypothalamus. Beside of the regulation of eating behavior, it has a determining function in the sleep-wake cycle. Recent studies on mammals utilizing optogenetically modified neurons revealed a considerable increase in wakefulness after upregulation of Orexin, whereas an increase of MCH caused drowsiness. Orexin and MCH seem to have opposing functions in the sleep-wake regulation.

To the best of our knowledge, this is the first study investigating in the change of immunohistochemical staining of Orexin and MCH in regard to the sleeping state and sleep-deprivation. We compared the two different mice strains C3H and C57BL, of which the latter one is assumed to be lack of the sleeping hormone Melatonin.

The semiquantitative analysis of the immunoreactivity was made by a well established image analysis program.

There were no differences between the two mice strains with respect to the distribution pattern of Orexin- and MCH-immunoreactive Neurons. The highest immunoreactivity of Orexin was found during the phase of wakefulness and a significant decrease during the sleeping state. No difference could be seen between C3H and C57BL-mice. These findings suggest, that the melatonin deficiency of C57BL does not considerably influence the circadian regulation of Orexin.

Unlike orexin, MCH-immunoreactive Neurons did not show significant changes according to its reactivity during the different states of sleep.

Relative inactivity of Orexin-Neurons und active secretion of MCH speak in favor of a key role in sleep control and sleep induction.

Further research is needed to understand sleep regulation, especially the reciprocal influence of Melatonin, Orexin and MCH.

11. Literaturverzeichnis

1. Adamantidis A, Salvert D, Goutagny R, et al. Sleep architecture of the melanin-concentrating hormone receptor 1-knockout mice. *The European journal of neuroscience*. 2008;27(7):1793-1800. doi:10.1111/j.1460-9568.2008.06129.x.
2. Adamantidis AR, Zhang F, Aravanis AM, Deisseroth K, Lecea L de. Neural substrates of awakening probed with optogenetic control of hypocretin neurons. *Nature*. 2007;450(7168):420-424. doi:10.1038/nature06310.
3. Apergis-Schoute J, Iordanidou P, Faure C, et al. Optogenetic Evidence for Inhibitory Signaling from Orexin to MCH Neurons via Local Microcircuits. *Journal of Neuroscience*. 2015;35(14):5435-5441. doi:10.1523/JNEUROSCI.5269-14.2015.
4. Appelbaum L, Wang GX, Maro GS, et al. Sleep-wake regulation and hypocretin-melatonin interaction in zebrafish. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2009;106(51):21942-21947. doi:10.1073/pnas.906637106.
5. Bachner D, Kreienkamp H, Weise C, Buck F, Richter D. Identification of melanin concentrating hormone (MCH) as the natural ligand for the orphan somatostatin-like receptor 1 (SLC-1). *FEBS letters*. 1999;457(3):522-524.
6. Berson DM, Dunn FA, Takao M. Phototransduction by retinal ganglion cells that set the circadian clock. *Science (New York, N.Y.)*. 2002;295(5557):1070-1073. doi:10.1126/science.1067262.
7. Bittencourt JC, Presse F, Arias C, et al. The melanin-concentrating hormone system of the rat brain: an immuno- and hybridization histochemical characterization. *The Journal of comparative neurology*. 1992;319(2):218-245. doi:10.1002/cne.903190204.
8. Blouin AM, Fried I, Wilson CL, et al. Human hypocretin and melanin-concentrating hormone levels are linked to emotion and social interaction. *Nature communications*. 2013;4:1547. doi:10.1038/ncomms2461.

9. Borowsky B, Durkin MM, Ogozalek K, et al. Antidepressant, anxiolytic and anorectic effects of a melanin-concentrating hormone-1 receptor antagonist. *Nature medicine*. 2002;8(8):825-830. doi:10.1038/nm741.
10. Bourgin P, Huitron-Resendiz S, Spier AD, et al. Hypocretin-1 modulates rapid eye movement sleep through activation of locus coeruleus neurons. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2000;20(20):7760-7765.
11. Bradley RL, Kokkotou EG, Maratos-Flier E, Cheatham B. Melanin-concentrating hormone regulates leptin synthesis and secretion in rat adipocytes. *Diabetes*. 2000;49(7):1073-1077.
12. Burdakov D, Gerasimenko O, Verkhatsky A. Physiological changes in glucose differentially modulate the excitability of hypothalamic melanin-concentrating hormone and orexin neurons in situ. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2005;25(9):2429-2433. doi:10.1523/JNEUROSCI.4925-04.2005.
13. Carter ME, Yizhar O, Chikahisa S, et al. Tuning arousal with optogenetic modulation of locus coeruleus neurons. *Nature neuroscience*. 2010;13(12):1526-1533. doi:10.1038/nn.2682.
14. Chambers J, Ames RS, Bergsma D, et al. Melanin-concentrating hormone is the cognate ligand for the orphan G-protein-coupled receptor SLC-1. *Nature*. 1999;400(6741):261-265. doi:10.1038/22313.
15. Chemelli RM, Willie JT, Sinton CM, et al. Narcolepsy in orexin Knockout Mice. *Cell*. 1999;98(4):437-451. doi:10.1016/S0092-8674(00)81973-X.
16. Chen L, McKenna JT, Bolortuya Y, et al. Knockdown of Orexin Type I Receptor in Rat Locus Coeruleus increases REM Sleep during the Dark Period. *The European journal of neuroscience*. 2010;32(9):1528-1536.
17. Chung S, Saito Y, Civelli O. MCH receptors/gene structure-in vivo expression. *Peptides*. 2009;30(11):1985-1989. doi:10.1016/j.peptides.2009.07.017.
18. Davies J, Chen J, Pink R, et al. Orexin receptors exert a neuroprotective effect in Alzheimer's disease (AD) via heterodimerization with GPR103. *Scientific reports*. 2015;5:12584. doi:10.1038/srep12584.

19. Delgado, Jose M. R., Anand BK. Increase of Food Intake Induced by Electrical Stimulation of the Lateral Hypothalamus. *American Journal of Physiology -- Legacy Content*. 1952;172(1):162-168.
20. Dodson ER, Zee PC. Therapeutics for Circadian Rhythm Sleep Disorders. *Sleep medicine clinics*. 2010;5(4):701-715. doi:10.1016/j.jsmc.2010.08.001.
21. Dube MG, Kalra SP, Kalra PS. Food intake elicited by central administration of orexins/hypocretins: identification of hypothalamic sites of action. *Brain research*. 1999;842(2):473-477.
22. Ebihara S, Marks T, Hudson DJ, Menaker M. Genetic control of melatonin synthesis in the pineal gland of the mouse. *Science (New York, N.Y.)*. 1986;231(4737):491-493.
23. Edwards CM, Abusnana S, Sunter D, Murphy KG, Ghatei MA, Bloom SR. The effect of the orexins on food intake: comparison with neuropeptide Y, melanin-concentrating hormone and galanin. *The Journal of endocrinology*. 1999;160(3):R7-12.
24. Estabrooke IV, McCarthy MT, Ko E, et al. Fos Expression in Orexin Neurons Varies with Behavioral State. *Journal of Neuroscience*. 2001;21(5):1656-1662.
25. Fox JG, Barthold S, Davisson M, Newcomer CE, Quimby FW. *The Mouse in Biomedical Research, Volume 2: Diseases*. 2nd ed. Burlington: Elsevier; 2006.
26. Franklin KBJ, Paxinos G. *Paxinos and Franklin's The mouse brain in stereotaxic coordinates*. Fourth edition. Amsterdam: Academic Press, an imprint of Elsevier; 2013.
27. Freedman MS, Lucas RJ, Soni B, et al. Regulation of mammalian circadian behavior by non-rod, non-cone, ocular photoreceptors. *Science (New York, N.Y.)*. 1999;284(5413):502-504.
28. Gall C von, Lewy A, Schomerus C, et al. Transcription factor dynamics and neuroendocrine signalling in the mouse pineal gland: A comparative analysis of melatonin-deficient C57BL mice and melatonin-proficient C3H mice. *European Journal of Neuroscience*. 2000;12(3):964-972. doi:10.1046/j.1460-9568.2000.00990.x.

-
29. Gerloff, Christian et al. S1-Leitlinie: Narkolepsie. http://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/030-056l_S1_Narkolepsie_2012_verlaengert.pdf. Accessed April 30, 2016.
30. Goto M, Oshima I, Tomita T, Ebihara S. Melatonin content of the pineal gland in different mouse strains. *Journal of pineal research*. 1989;7(2):195-204.
31. Hara J, Beuckmann CT, Nambu T, et al. Genetic ablation of orexin neurons in mice results in narcolepsy, hypophagia, and obesity. *Neuron*. 2001;30(2):345-354.
32. Hassani OK, Lee MG, Jones BE. Melanin-concentrating hormone neurons discharge in a reciprocal manner to orexin neurons across the sleep-wake cycle. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2009;106(7):2418-2422. doi:10.1073/pnas.0811400106.
33. Haynes AC, Jackson B, Overend P, et al. Effects of single and chronic intracerebroventricular administration of the orexins on feeding in the rat. *Peptides*. 1999;20(9):1099-1105.
34. Hickman CP, Weber W. *Zoologie*. 13., aktualisierte Aufl. München, Boston [u.a.]: Pearson Studium; 2008. Biologie.
35. Hill J, Duckworth M, Murdock P, et al. Molecular cloning and functional characterization of MCH2, a novel human MCH receptor. *The Journal of biological chemistry*. 2001;276(23):20125-20129. doi:10.1074/jbc.M102068200.
36. Hobson JA. *Sleep*. New York: Scientific American Library; Distributed by W.H. Freeman; 1995. A Scientific American Library paperback; no. 27.
37. Holmqvist T, Akerman KE, Kukkonen JP. High specificity of human orexin receptors for orexins over neuropeptide Y and other neuropeptides. *Neuroscience letters*. 2001;305(3):177-180.
38. Horvath TL, Diano S, van den Pol, A N. Synaptic interaction between hypocretin (orexin) and neuropeptide Y cells in the rodent and primate hypothalamus: a novel circuit implicated in metabolic and endocrine regulations. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 1999;19(3):1072-1087.

39. Ito M, Ishihara A, Gomori A, et al. Mechanism of the anti-obesity effects induced by a novel melanin-concentrating hormone 1-receptor antagonist in mice. *British journal of pharmacology*. 2010;159(2):374-383. doi:10.1111/j.1476-5381.2009.00536.x.
40. Jensen EC. Quantitative analysis of histological staining and fluorescence using ImageJ. *Anatomical record (Hoboken, N.J. : 2007)*. 2013;296(3):378-381. doi:10.1002/ar.22641.
41. Kastin AJ, Akerstrom V. Orexin A but not orexin B rapidly enters brain from blood by simple diffusion. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*. 1999;289(1):219-223.
42. Kawauchi H, Kawazoe I, Tsubokawa M, Kishida M, Baker BI. Characterization of melanin-concentrating hormone in chum salmon pituitaries. *Nature*. 1983;305(5932):321-323.
43. Kennedy AR, Todd JF, Stanley SA, et al. Melanin-concentrating hormone (MCH) suppresses thyroid stimulating hormone (TSH) release, in vivo and in vitro, via the hypothalamus and the pituitary. *Endocrinology*. 2001;142(7):3265-3268. doi:10.1210/endo.142.7.8374.
44. Kirchgessner AL. Orexins in the brain-gut axis. *Endocrine reviews*. 2002;23(1):1-15. doi:10.1210/edrv.23.1.0454.
45. Kok SW, Overeem S, Visscher, Tommy L S, et al. Hypocretin deficiency in narcoleptic humans is associated with abdominal obesity. *Obesity research*. 2003;11(9):1147-1154. doi:10.1038/oby.2003.156.
46. Komaki G, Matsumoto Y, Nishikata H, et al. Orexin-A and leptin change inversely in fasting non-obese subjects. *European journal of endocrinology / European Federation of Endocrine Societies*. 2001;144(6):645-651.
47. Konadhode RR, Pelluru D, Blanco-Centurion C, et al. Optogenetic Stimulation of MCH Neurons Increases Sleep. *Journal of Neuroscience*. 2013;33(25):10257-10263. doi:10.1523/JNEUROSCI.1225-13.2013.
48. Kukkonen JP, Holmqvist T, Ammoun S, Åkerman, Karl E. O. Functions of the orexinergic/hypocretinergic system. *American Journal of Physiology - Cell Physiology*. 2002;283(6):C1567–C1591.

- 49.Lagos P, Urbanavicius J, Scorza MC, Miraballes R, Torterolo P. Depressive-like profile induced by MCH microinjections into the dorsal raphe nucleus evaluated in the forced swim test. *Behavioural Brain Research*. 2011;218(2):259-266. doi:10.1016/j.bbr.2010.10.035.
- 50.Lecea L de, Kilduff TS, Peyron C, et al. The hypocretins: hypothalamus-specific peptides with neuroexcitatory activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1998;95(1):322-327.
- 51.Lehr H, Mankoff DA, Corwin D, Santeusanio G, Gown AM. Application of Photoshop-based Image Analysis to Quantification of Hormone Receptor Expression in Breast Cancer. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*. 1997;45(11):1559-1565. doi:10.1177/002215549704501112.
- 52.Lembo PM, Grazzini E, Cao J, et al. The receptor for the orexigenic peptide melanin-concentrating hormone is a G-protein-coupled receptor. *Nature cell biology*. 1999;1(5):267-271. doi:10.1038/12978.
- 53.Lin L, Faraco J, Li R, et al. The Sleep Disorder Canine Narcolepsy Is Caused by a Mutation in the Hypocretin (Orexin) Receptor 2 Gene. *Cell*. 1999;98(3):365-376. doi:10.1016/S0092-8674(00)81965-0.
- 54.Lucas RJ, Douglas RH, Foster RG. Characterization of an ocular photopigment capable of driving pupillary constriction in mice. *Nature neuroscience*. 2001;4(6):621-626. doi:10.1038/88443.
- 55.Malendowicz LK, Tortorella C, Nussdorfer GG. Orexins stimulate corticosterone secretion of rat adrenocortical cells, through the activation of the adenylate cyclase-dependent signaling cascade. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*. 1999;70(4-6):185-188.
- 56.Marsh DJ, Weingarh DT, Novi DE, et al. Melanin-concentrating hormone 1 receptor-deficient mice are lean, hyperactive, and hyperphagic and have altered metabolism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2002;99(5):3240-3245. doi:10.1073/pnas.052706899.
- 57.Matsuki T, Takasu M, Hirose Y, et al. GABAA receptor-mediated input change on orexin neurons following sleep deprivation in mice. *Neuroscience*. 2015;284:217-224. doi:10.1016/j.neuroscience.2014.09.063.

-
- 58.Modirrousta M, Mainville L, Jones BE. Orexin and MCH neurons express c-Fos differently after sleep deprivation vs. recovery and bear different adrenergic receptors. *The European journal of neuroscience*. 2005;21(10):2807-2816. doi:10.1111/j.1460-9568.2005.04104.x.
- 59.Moore RY, Eichler VB. Loss of a circadian adrenal corticosterone rhythm following suprachiasmatic lesions in the rat. *Brain research*. 1972;42(1):201-206.
- 60.Moruzzi G, Magoun HW. Brain stem reticular formation and activation of the EEG. *Electroencephalography and clinical neurophysiology*. 1949;1(4):455-473.
- 61.Nahon JL, Joly C, Levan G, Szpirer J, Szpirer C. Pro-melanin-concentrating hormone gene (PMCH) is localized on human chromosome 12q and rat chromosome 7. *Genomics*. 1992;12(4):846-848.
- 62.Nishino S, Ripley B, Overeem S, Lammers GJ, Mignot E. Hypocretin (orexin) deficiency in human narcolepsy. *The Lancet*. 2000;355(9197):39-40. doi:10.1016/S0140-6736(99)05582-8.
- 63.Ouedraogo R, Naslund E, Kirchgessner AL. Glucose regulates the release of orexin-a from the endocrine pancreas. *Diabetes*. 2003;52(1):111-117.
- 64.Pelluru D, Konadhode R, Shiromani PJ. MCH neurons are the primary sleep-promoting group. *Sleep*. 2013;36(12):1779-1781. doi:10.5665/sleep.3196.
- 65.Peyron C, Tighe DK, van den Pol, Anthony N., et al. Neurons Containing Hypocretin (Orexin) Project to Multiple Neuronal Systems. *Journal of Neuroscience*. 1998;18(23):9996-10015.
- 66.Piper DC, Upton N, Smith MI, Hunter AJ. The novel brain neuropeptide, orexin-A, modulates the sleep-wake cycle of rats. *The European journal of neuroscience*. 2000;12(2):726-730.
- 67.Provencio I, Cooper HM, Foster RG. Retinal projections in mice with inherited retinal degeneration: implications for circadian photoentrainment. *The Journal of comparative neurology*. 1998;395(4):417-439.
- 68.Qu D, Ludwig DS, Gammeltoft S, et al. A role for melanin-concentrating hormone in the central regulation of feeding behaviour. *Nature*. 1996;380(6571):243-247. doi:10.1038/380243a0.

-
69. Roseboom PH, Namboodiri MA, Zimonjic DB, et al. Natural melatonin 'knockdown' in C57BL/6J mice: rare mechanism truncates serotonin N-acetyltransferase. *Brain research. Molecular brain research*. 1998;63(1):189-197.
70. Russell SH, Kim MS, Small CJ, et al. Central administration of orexin A suppresses basal and domperidone stimulated plasma prolactin. *Journal of neuroendocrinology*. 2000;12(12):1213-1218.
71. Sailer AW, Sano H, Zeng Z, et al. Identification and characterization of a second melanin-concentrating hormone receptor, MCH-2R. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2001;98(13):7564-7569. doi:10.1073/pnas.121170598.
72. Saito Y, Cheng M, Leslie FM, Civelli O. Expression of the melanin-concentrating hormone (MCH) receptor mRNA in the rat brain. *The Journal of comparative neurology*. 2001;435(1):26-40.
73. Saito Y, Nagasaki H. The melanin-concentrating hormone system and its physiological functions. *Results and problems in cell differentiation*. 2008;46:159-179. doi:10.1007/400_2007_052.
74. Sakurai T, Amemiya A, Ishii M, et al. Orexins and Orexin Receptors: A Family of Hypothalamic Neuropeptides and G Protein-Coupled Receptors that Regulate Feeding Behavior. *Cell*. 1998;92(4):573-585. doi:10.1016/S0092-8674(00)80949-6.
75. Samson WK, Gosnell B, Chang JK, Resch ZT, Murphy TC. Cardiovascular regulatory actions of the hypocretins in brain. *Brain research*. 1999;831(1-2):248-253.
76. Schilling J, Nurnberger F. Dynamic changes in the immunoreactivity of neuropeptide systems of the suprachiasmatic nuclei in golden hamsters during the sleep-wake cycle. *Cell and tissue research*. 1998;294(2):233-241.
77. Semo M, Lupi D, Peirson SN, Butler JN, Foster RG. Light-induced c-fos in melanopsin retinal ganglion cells of young and aged rodless/coneless (rd/rd cl) mice. *The European journal of neuroscience*. 2003;18(11):3007-3017.

78. Shimada M, Tritos NA, Lowell BB, Flier JS, Maratos-Flier E. Mice lacking melanin-concentrating hormone are hypophagic and lean. *Nature*. 1998;396(6712):670-674. doi:10.1038/25341.
79. Steidl U, Bork S, Schaub S, et al. Primary human CD34+ hematopoietic stem and progenitor cells express functionally active receptors of neuromediators. *Blood*. 2004;104(1):81-88. doi:10.1182/blood-2004-01-0373.
80. Tadayyon M, Welters HJ, Haynes AC, Cluderay JE, Hervieu G. Expression of melanin-concentrating hormone receptors in insulin-producing cells: MCH stimulates insulin release in RINm5F and CRI-G1 cell-lines. *Biochemical and biophysical research communications*. 2000;275(2):709-712. doi:10.1006/bbrc.2000.3357.
81. Tan CP, Sano H, Iwaasa H, et al. Melanin-concentrating hormone receptor subtypes 1 and 2: species-specific gene expression. *Genomics*. 2002;79(6):785-792. doi:10.1006/geno.2002.6771.
82. Thal DR, Horn M, Schlote W. Selective quantitative analysis of the intensity of immunohistochemical reactions. *Acta Histochemica*. 1995;97(2):203-211. doi:10.1016/S0065-1281(11)80100-5.
83. Toossi H, Del Cid-Pellitero E, Jones BE. GABA Receptors on Orexin and Melanin-Concentrating Hormone Neurons Are Differentially Homeostatically Regulated Following Sleep Deprivation. *eNeuro*. 2016;3(3). doi:10.1523/ENEURO.0077-16.2016.
84. Torterolo P, Sampogna S, Morales FR, Chase MH. MCH-containing neurons in the hypothalamus of the cat: searching for a role in the control of sleep and wakefulness. *Brain research*. 2006;1119(1):101-114. doi:10.1016/j.brainres.2006.08.100.
85. Triarhou LC. The signalling contributions of Constantin von Economo to basic, clinical and evolutionary neuroscience. *Brain Research Bulletin*. 2006;69(3):223-243. doi:10.1016/j.brainresbull.2006.02.001.
86. Tsujino N, Sakurai T. Role of orexin in modulating arousal, feeding, and motivation. *Frontiers in behavioral neuroscience*. 2013;7:28. doi:10.3389/fnbeh.2013.00028.

87. Tsunematsu T, Kilduff TS, Boyden ES, Takahashi S, Tominaga M, Yamanaka A. Acute optogenetic silencing of orexin/hypocretin neurons induces slow-wave sleep in mice. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2011;31(29):10529-10539. doi:10.1523/JNEUROSCI.0784-11.2011.
88. Vandesande F. A critical review of immunocytochemical methods for light microscopy. *Journal of neuroscience methods*. 1979;1(1):3-23.
89. Verret L, Goutagny R, Fort P, et al. A role of melanin-concentrating hormone producing neurons in the central regulation of paradoxical sleep. *BMC neuroscience*. 2003;4:19. doi:10.1186/1471-2202-4-19.
90. Viale A, Zhixing Y, Breton C, et al. The melanin-concentrating hormone gene in human: flanking region analysis, fine chromosome mapping, and tissue-specific expression. *Brain research. Molecular brain research*. 1997;46(1-2):243-255.
91. Welsh DK, Takahashi JS, Kay SA. Suprachiasmatic Nucleus: Cell Autonomy and Network Properties. *Annu. Rev. Physiol.* 2010;72(1):551-577. doi:10.1146/annurev-physiol-021909-135919.
92. Whiddon BB, Palmiter RD. Ablation of Neurons Expressing Melanin-Concentrating Hormone (MCH) in Adult Mice Improves Glucose Tolerance Independent of MCH Signaling. *Journal of Neuroscience*. 2013;33(5):2009-2016. doi:10.1523/JNEUROSCI.3921-12.2013.
93. Wicht H, Korf H, Ackermann H, Ekhardt D, Fischer C, Pfeffer M. Chronotypes and rhythm stability in mice. *Chronobiology international*. 2014;31(1):27-36. doi:10.3109/07420528.2013.820739.
94. Wicht H, Maronde E, Olcese J, Korf H. A Semiquantitative Image-analytical Method for the Recording of Dose-Response Curves in Immunocytochemical Preparations. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*. 1999;47(3):411-419. doi:10.1177/002215549904700315.
95. Willie JT, Sinton CM, Maratos-Flier E, Yanagisawa M. Abnormal response of melanin-concentrating hormone deficient mice to fasting: hyperactivity and rapid eye movement sleep suppression. *Neuroscience*. 2008;156(4):819-829. doi:10.1016/j.neuroscience.2008.08.048.

-
96. Willie JT, Chemelli RM, Sinton CM, et al. Distinct narcolepsy syndromes in Orexin receptor-2 and Orexin null mice: molecular genetic dissection of Non-REM and REM sleep regulatory processes. *Neuron*. 2003;38(5):715-730.
97. Winsky-Sommerer R, Yamanaka A, Diano S, et al. Interaction between the corticotropin-releasing factor system and hypocretins (orexins): a novel circuit mediating stress response. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2004;24(50):11439-11448. doi:10.1523/JNEUROSCI.3459-04.2004.
98. Yamada H, Okumura T, Motomura W, Kobayashi Y, Kohgo Y. Inhibition of food intake by central injection of anti-orexin antibody in fasted rats. *Biochemical and biophysical research communications*. 2000;267(2):527-531. doi:10.1006/bbrc.1999.1998.
99. Zhang S, Zeitzer JM, Yoshida Y, et al. Lesions of the suprachiasmatic nucleus eliminate the daily rhythm of hypocretin-1 release. *Sleep*. 2004;27(4):619-627.
100. Zhang S, Blache D, Vercoe PE, et al. Expression of orexin receptors in the brain and peripheral tissues of the male sheep. *Regulatory peptides*. 2005;124(1-3):81-87. doi:10.1016/j.regpep.2004.07.010.
101. Zhang W, Fukuda Y, Kuwaki T. Respiratory and cardiovascular actions of orexin-A in mice. *Neuroscience letters*. 2005;385(2):131-136. doi:10.1016/j.neulet.2005.05.032.

12. Lebenslauf

13. 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

Reaktivitätsmuster des Orexin-Systems im Hypothalamus der C57BL- und der C3H-Maus unter Wach-Bedingung, während des Schlafes und nach Schlafentzug – Interaktion mit dem Melanin-concentrating hormone (MCH)-System

in dem Institut für Anatomie II (Experimentelle Neurobiologie) der Dr. Senckenbergischen Anatomie 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)