

Anatomische Grundlagen der Übertragung
circadianer Signale zwischen
N. suprachiasmaticus und anderen Kerngebieten
des Hypothalamus

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften

vorgelegt beim Fachbereich Biowissenschaften
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
in Frankfurt am Main

von
Sabine Mahr
aus Hildburghausen

Frankfurt am Main (2008)
(D30)

vom Fachbereich Biowissenschaften der
Johann Wolfgang Goethe-Universität als Dissertation angenommen.

Dekan: Prof. Dr. Volker Müller

1. Gutachter: Prof. Dr. Günther Fleissner

2. Gutachter: Prof. Dr. Heinz Wässle

Datum der Disputation:

Für meine Mutti.

1 Inhaltsverzeichnis

1	Inhaltsverzeichnis	1
1.1	Abbildungsverzeichnis	3
1.2	Tabellenverzeichnis	6
1.3	Abkürzungsverzeichnis	7
2	Einleitung	11
2.1	Der Nucleus suprachiasmaticus der Säugetiere	11
2.2	Afferente Projektionen des N. suprachiasmaticus	16
2.3	Zielgebiete des N. suprachiasmaticus	17
2.4	Der laterale Hypothalamus	18
2.5	Der Nucleus arcuatus	21
2.6	Fragestellung	23
2.7	Transgene Mäuse – Marker für Neurotransmitter und Synapsen	23
3	Material und Methoden	25
3.1	Versuchstiere	25
3.1.1	Identifizierung der transgenen Mäuse	25
3.2	Präparation der Maus- und Rattengehirne	28
3.2.1	Herstellung der Gehirnschnitte	29
3.3	Nissl-Färbung	30
3.4	Immunzytochemie	30
3.4.1	Immunzytochemische Färbung an Gehirnschnitten	31
3.4.2	Immunzytochemische Färbung von Zellkulturen	33
3.5	Auswertung immunzytochemischer Färbungen am Hirngewebe transgener Mäuse	34
3.5.1	GAD67-GFP knock-in-Maus	34
3.5.2	GlyT2-EGFP-Maus	35
3.5.3	Munc 13-1-EYFP-Maus	35
3.6	Präparation und Kultivierung von Neuronen aus hypothalamischen Kerngebieten	36
3.7	Mikroskopie	37
3.7.1	Fluoreszenzmikroskopie	38
3.7.2	Konfokale Mikroskopie	38
3.8	Material	39
3.8.1	Lösungen und Medien	39
3.8.2	Chemikalien und Reagenzien	41
3.8.3	Geräte und Hilfsmittel	42
4	Ergebnisse	44
4.1	Verteilung der Neuropeptide Vasopressin, VIP, Orexin A und MCH im Hypothalamus von Maus und Ratte	44
4.1.1	Vasopressin-Verteilung im Hypothalamus	44
4.1.2	Vasoaktives Intestinales Polypeptid-Vorkommen im Hypothalamus	49
4.1.3	Orexin A-Verteilung im Hypothalamus	53
4.1.4	Melanin-concentrating hormone-Verteilung im Hypothalamus	57
4.2	Der Nucleus suprachiasmaticus	61

4.2.1	GABA-Expression in Vasopressin- oder VIP-positiven Neuronen	63
4.2.2	Afferente Projektionen aus dem lateralen Hypothalamus	64
4.2.3	Glyzin-enhaltende Afferenzen zum N. suprachiasmaticus	70
4.3	Der laterale Hypothalamus – Zielgebiet des N. suprachiasmaticus	71
4.3.1	Der Neurotransmitter GABA im lateralen Hypothalamus	75
4.3.2	Der Neurotransmitter Glyzin im lateralen Hypothalamus	79
4.3.3	Dopamin-positive Zellen im lateralen Hypothalamus	82
4.4	Der N. arcuatus – ein Zielgebiet des N. suprachiasmaticus	83
4.4.1	Der Neurotransmitter GABA im N. arcuatus	83
4.4.2	Der Neurotransmitter Glyzin im N. arcuatus	85
4.5	Immunzytochemische Untersuchung primärer Zellkulturen	86
4.5.1	Nachweis spezifischer Neuropeptide in den Zellkulturen	88
4.5.2	Neurotransmitter im Hypothalamus	92
5	Diskussion	98
5.1	Neuropeptide im Hypothalamus	99
5.2	Der Nucleus suprachiasmaticus	102
5.2.1	Die Neuropeptidexpression und Transmitterverteilung im SCN	102
5.2.2	Innervation von SCN-Neuronen durch Orexin A- und MCH-positive Fortsätze	103
5.2.3	Glyzin im N. suprachiasmaticus	105
5.3	Zielgebiete des N. suprachiasmaticus	106
5.3.1	Der Hypothalamus lateralis	106
5.3.2	Der Nucleus arcuatus	110
5.4	Histiotypische Zellkulturen	111
5.5	Der Neurotransmitters Glyzin im circadianen System: Ein Ausblick	111
6	Zusammenfassung	113
7	Literaturverzeichnis	115
8	Anhang	121
8.1	Vasopressin-Verteilung im Hypothalamus der Maus	121
8.2	VIP-Verteilung im Hypothalamus der Maus	128
8.3	Orexin A-Verteilung im Hypothalamus der Maus	135
8.4	MCH-Verteilung im Hypothalamus der Maus	142
9	Danksagung	149
10	Eidesstattliche Erklärung	150
11	Curriculum Vitae	151

1.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Der N. suprachiasmaticus.	13
Abbildung 2:	Ein- und Ausgangswege des N. suprachiasmaticus.	17
Abbildung 3:	Der laterale Hypothalamus.	21
Abbildung 4:	Der N. arcuatus.	22
Abbildung 5:	Identifizierung der GAD67-GFP knock-in positiven Mäuse.	27
Abbildung 6:	Identifizierung der GlyT2-EGFP positiven Mäuse.	28
Abbildung 7:	Immunzytochemische Doppelfärbung gegen GFP (grün) und GABA (rot).	34
Abbildung 8:	Immunzytochemische Färbung gegen GFP im Hypothalamus der GlyT2-EGFP-Maus.	35
Abbildung 9:	Immunzytochemische Färbung gegen Antikörper A und Antikörper B.	36
Abbildung 10:	Deckglas mit aufgesetztem Silikonring.	37
Abbildung 11:	Vasopressin-positive Neurone und Fortsätze im Hypothalamus der Maus.	46
Abbildung 12:	Vasopressin-positive Neurone und Fortsätze im Hypothalamus der Ratte.	48
Abbildung 13:	VIP-Verteilung im Hypothalamus der Maus.	50
Abbildung 14:	VIP-Verteilung im Hypothalamus der Ratte.	52
Abbildung 15:	Orexin A-Verteilung im Hypothalamus der Maus.	54
Abbildung 16:	Orexin A-Verteilung im Hypothalamus der Ratte.	56
Abbildung 17:	MCH-positive Neurone und Fasern im Hypothalamus der Maus.	58
Abbildung 18:	MCH-positive Neurone und Fasern im Hypothalamus der Ratte.	60
Abbildung 19:	Verteilung der Neuropeptide Vasopressin und VIP im SCN.	62
Abbildung 20:	Zahlreiche Vasopressin- oder VIP-positive Neurone im SCN der Maus- exprimieren GAD67.	64
Abbildung 21:	Orexin A- und MCH-positive Fasern projizieren nicht zu Vasopressin-exprimierenden Neuronen im SCN der Maus.	66
Abbildung 22:	MCH-positive Fasern projizieren im dorsalen SCN der Ratte auf Vasopressin-positive Fortsätzen.	67
Abbildung 23:	Eingangswege des SCN	68
Abbildung 24:	Orexin A-positive Projektionen innervieren VIP-exprimierende Neurone im SCN der Ratte.	68
Abbildung 25:	VIP-exprimierende Neurone im SCN bilden Synapsen aus.	69
Abbildung 26:	Glyzin-positive Fasern innervieren Vasopressin-positive Fortsätze im SCN der Maus.	71
Abbildung 27:	Verteilung Orexin A- und MCH-exprimierender Neurone im lateralen Hypothalamus.	72

Inhaltsverzeichnis

Abbildung 28:	Eingangswege in den lateralen Hypothalamus	74
Abbildung 29:	Orexin A- oder MCH-exprimierende Neurone bilden keine direkten Kontakte mit Vasopressin- oder VIP-positiven Fasern im lateralen Hypothalamus aus.	74
Abbildung 30:	Orexin A und GAD67 werden im lateralen Hypothalamus nicht gemeinsam in einer Zelle exprimiert.	76
Abbildung 31:	Zwei verschiedene MCH-positive Neuronenpopulationen im lateralen Hypothalamus der Maus.	77
Abbildung 32:	Vasopressin- und VIP-positive Fasern im lateralen Hypothalamus.	78
Abbildung 33:	Coronale Ausschnitte aus dem Gehirn einer GlyT2-EGFP-Maus.	79
Abbildung 34:	Orexin A- und MCH-positive Neurone im lateralen Hypothalamus werden durch Glyzin-positive Fasern innerviert.	80
Abbildung 35:	Vasopressin-exprimierende Neurone und VIP-positive Fortsätze sind mit glyzinerger Fasern im lateralen Hypothalamus der Maus verschaltet.	81
Abbildung 36:	Dopamin- und Orexin-positive Zellen im lateralen Hypothalamus der Ratte.	82
Abbildung 37:	Vasopressin- und Orexin A-positive Fasern innervieren GAD-positive Zellen im N. arcuatus der Maus.	84
Abbildung 38:	Eingangswege des N. arcuatus	84
Abbildung 39:	Orexin-enthaltende Fasern kontaktieren Glyzin-positive Projektionen im N. arcuatus der Maus.	85
Abbildung 40:	Neurone und Gliazellen in Zellkulturen.	87
Abbildung 41:	Neurone in hypothalamischen Zellkulturen bilden Synapsen aus.	88
Abbildung 42:	Vasopressin- und VIP-positive Neurone in Kulturen des SCN.	89
Abbildung 43:	Kultivierte Neurone des lateralen Hypothalamus exprimieren Orexin A oder MCH.	90
Abbildung 44:	Orexin A- und MCH-exprimierende Neurone bilden in Kultur Synapsen aus.	92
Abbildung 45:	Viele Neurone des N. arcuatus sind GAD-positiv und bilden Synapsen aus.	93
Abbildung 46:	GAD-positive und GAD-negative MCH-exprimierende Neurone in Zellkulturen des lateralen Hypothalamus.	94
Abbildung 47:	Dopamin-positive Neurone in kultivierten Zellen des N. arcuatus der Ratte.	95
Abbildung 48:	GAD-positive Neurone des N. arcuatus exprimieren Dopamin.	95
Abbildung 49:	Orexin A- und MCH-exprimierende Neurone in Zellkulturen des lateralen Hypothalamus stehen in direktem Kontakt mit Dopamin-positiven Neuronen.	96

Inhaltsverzeichnis

Abbildung 50:	Neurone in Zellkulturen des Hypothalamus bilden Acetylcholin.	97
Abbildung 51:	Vasopressin-Verteilung im Hypothalamus der Maus	121
Abbildung 49:	VIP-Verteilung im Hypothalamus der Maus	128
Abbildung 50:	Orexin A-Verteilung im Hypothalamus der Maus	135
Abbildung 51:	MCH-Verteilung im Hypothalamus der Maus	142

1.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1	Tabelle zur Herstellung des Mastermixes (GAD67-GFP knock-in Maus)	27
Tabelle 2	Tabelle zur Herstellung des Mastermixes (GlyT2-EGFP Maus)	28
Tabelle 3	Protokolle der Immunzytochemie	31
Tabelle 4	Verwendete Primärantikörper	32
Tabelle 5	Verwendete Sekundärantikörper und die dazu passenden Filtersätze	33
Tabelle 6	Lösungen und Medien	39
Tabelle 7	Chemikalien und Reagenzien	41
Tabelle 8	Geräte und Hilfsmittel	42

1.3 Abkürzungsverzeichnis

µg	Mikrogramm
µm	Mikrometer
3V	3. Ventrikel
A	Adenin
Abb.	Abbildung
aCSF	[engl. artificial CerebroSpinalFluid]
AGRP	Neuropeptid [engl. agouti related protein]
AHA	Area hypothalamica anterior
AHC	Area hypothalamica central
AHP	Area hypothalamica posterior
Alexa Fluor	Alexa Fluorescein
Aq. bidest.	Aqua bidestillata
ARC	Nucleus arcuatus
AVP	(Arginin-) Vasopressin
bp	Basenpaare
BSA	bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
CaCl ₂	Calciumchlorid
CART	Neuropeptid [engl. Cocaine- and amphetamine-regulated transcript]
CD	Mausstamm [engl. cecarian derived]
ch	Huhn [engl. chicken]
ChAT	Cholinacetyltransferase
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CRF	Polypeptid [engl. corticotropin releasing factor]
Cy	Carbocyanin
DIC	Normaski Kontrast, Phasenkontrast [engl. differential interference contrast]
dk	Esel [engl. donkey]
DMEM	Dulbecco´s Modified Eagles Medium
DMH	Nucleus dorsomedialis hypothalamis
DNA	Desoxyribonukleinsäure [engl. desoxyribonucleic acid]
dNTP	Desoxyribunukleosidtriphosphat

EBSS	[engl. E arle´s B alanced S alt S olution]
EDTA	E thylendiamintetaacetat
EGFP	g rün-verstärktes fluoreszierendes P rotein [engl. e nhanced g reen f luorescent p rotein]
engl.	englisch
EYFP	gelb-vertärktes fluoreszierendes P rotein [engl. e nhanced y ellow f luorescent p rotein]
f	F ornix
fr	F asciculus retroflexus
FBS	F ötales B ovines S erum
franz.	französisch
g	Erdbeschleunigung (Normalschwere ist definiert als $g = 9,80665\text{m/s}^2$)
GABA	γ -Aminobuttersäure [engl. G amma- a minobutyric a cid]
GAD	Glutamat-Decarboxylase [engl. g lutamic a cid d ecarboxylase]
GFAP	saures gliales Faserprotein [engl. G lial F ibrillary A cidic P rotein]
GFP	g rün fluoreszierendes P rotein [engl. g reen f luorescent p rotein]
GHT	g eniculo h ypothalamischen T rakt
GlyT2	G lyzin t ransporter 2
gp	Meerschweinchen [engl. g uinea p ig]
griech.	griechisch
GRP	Polypeptid [engl. g astrin r eleasing p eptide]
gt	Ziege [engl. g oat]
HEPES	(2-[H ydroxy e thyl] p iperaziny N' -[2-ethansulfonsäure])
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatografie [engl. h igh p erformance l iquid c hromatography]
KCl	K alium c hlorid
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogencarbonat
LA	Nucleus lateroanterior hypothalami
lat.	lateinisch
LGN	lateraler Nucleus geniculatus (laterales Geniculatum)
LH	Hypothalamus lateralis
LPO	Area praeoptica lateralis
MAP2	M ikrotubuli assoziiertes P rotein 2
max	M aximum

MCH	M elanin- c oncentrating h ormone
ME	Eminentia mediana
MgCl ₂	M agnesium c hlorid
MgSO ₄	Magnesiumsulfat
min	M inimum
ml	M illiliter
MPA	Area praeoptica medialis
MPO	Nucleus praeopticus medialis
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure [engl. m essenger r ibonucleic a cid]
ms	Maus [engl. m ouse]
Munc13-1	präsynaptisches Protein
N.	N ucleus
Na ₂ HPO ₄	Dinatriumhydrogenphosphat
NaCl	N atrium c hlorid
NaH ₂ PO ₄	Natriumdihydrogenphosphat
NaHCO ₃	Natriumhydrogencarbonat
NDS	Normales Eselserum [engl. n ormal d onkey s erum]
NF200	N eurofilament 200
NGS	Normales Ziegenserum [engl. n ormal g oat s erum]
nm	N anometer
NSE	N euronen s pezifische E nolase
opt	Tractus o pticus
ox	Chiasma opticum
PACAP	Polypeptid [engl. p ituitary a denylate c yclase a ctivating p olypeptide]
PB	Phosphatpuffer [engl. p hosphate b uffer]
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung [engl. p hosphate b uffered s aline]
PCR	Polymerasekettenreaktion [engl. P olymerase c hain r eaction]
Pe	Nucleus p eriventricularis
PeF	N. p erifornicalis
PFA	P araformaldehyd
pH	Säuregrad [lat. p otentia h ydrogenii]
POMC	P ro- o piomelanocortin
PVN	Nucleus paraventricularis
rb	Kaninchen [engl. r abbit]

RCh	Area retrochiasmatica
RHT	retino hypothalamischer Trakt
RNA	Ribonukleinsäure [engl. ribonucleic acid]
SCN	Nucleus suprachiasmaticus
SF	s mall f ragment
so	Nucleus s upra o pticus
SPa	s ub p araventrükuläre Zone
Tab.	T abelle
TBE	T rizma- B orsäure- E DTA-Puffer
TFM	Einbettmedium für Gefrierschnitte [engl. t issue f reezing m edium]
TH	T yrosin h ydroxylase
TRSC	T exas R ed s ulfony chloride
TTX	T etrodotoxin (Na ⁺ -Kanal-Blocker)
upm	U mdrehungen p ro M inute
VIP	V asoaktives I ntestinales P olypeptid
VMH	Nucleus hypothalamicus ventromedialis
ZI	Z ona i ncerta
ZNS	Z entrales N ervensystem
λ	Symbol für Wellenlänge [griech. Lamda]

2 Einleitung

Der Hypothalamus ist eine wichtige Schaltzentrale im Diencephalon von Säugetieren und setzt sich aus circa 40 Kerngebieten zusammen (Meister 2007). Der Begriff Kerngebiet steht in diesem Zusammenhang für definierte Abschnitte des Hypothalamus, die aufgrund ihrer funktionellen Einheit als Nuclei [lat. Kerne] zusammengefasst und in Subnuclei unterteilt werden. Die Anzahl dieser Nuclei lässt auf die Menge der physiologischen Abläufe schließen, auf die der Hypothalamus regulatorisch einwirkt. Viele dieser Abläufe unterliegen einer Rhythmik, die durch die innere Uhr gesteuert wird. Der Sitz dieser Uhr ist der Nucleus suprachiasmaticus (SCN) des Hypothalamus, der zentraler Bestandteil des circadianen [lat. *circa* um herum, *dies* Tag] Systems ist (Reuss 1996). Dieses System ist ein neuronales Netzwerk, das für die Generierung circadianer Rhythmik, deren Synchronisation durch Umweltreize, zum Beispiel durch Licht, und die Abstimmung der Rhythmik hinsichtlich der morphologischen, physiologischen und biochemischen Parameter von Säugetieren, die im Verlauf eines Tages Veränderungen unterliegen (Reuss 1996), verantwortlich ist. Zum circadianen System zählen der SCN und neuronale Komponenten, die modulatorisch auf die innere Uhr einwirken, wie die Retina, weitere hypothalamische Kerngebiete, autonome Regionen des Rückenmarks, sympathische Ganglien sowie das Pinealorgan (Reuss 1996).

2.1 Der Nucleus suprachiasmaticus der Säugetiere

Der SCN ist ein paarig im ventralen Teil des Hypothalamus angeordnetes Kerngebiet (Abb.1), bestehend aus etwa 20.000 Neuronen (Reghuandanan & Reghuandanan 2006, Herzog 2007) und ist der Sitz der inneren Uhr. Dabei handelt es sich um einen autonomen, endogenen Oszillator, der in einer annähernd 24-Stunden-Periode oszilliert und daher auch circadiane Uhr oder circadianer Schrittmacher genannt wird. Dieser Haupt-Oszillator synchronisiert sich überwiegend an dem externen Hell/Dunkel-Rhythmus, aber auch an anderen externen Einflüssen, wie der Verfügbarkeit von Nahrung. Die Einstellung oder auch Synchronisation der circadianen Uhr durch externe Lichteinflüsse wird als Photoentrainment bezeichnet.

Periphere Oszillatoren, die an den Haupt-Oszillator im SCN gekoppelt sind, existieren in der Skelettmuskulatur, der Lunge, der Leber, der Niere und dem Herzen. Dadurch wird die Aktivität der einzelnen Organe an den zentralen

Schrittmacher synchronisiert (Reghuandanan & Reghuandanan 2006). Die circadiane Uhr steuert die zeitliche Organisation vieler physiologischer Abläufe, wie den Schlaf-Wach-Rhythmus, die Körpertemperatur und den Hormonhaushalt, sowie das unbewusste Verhalten. Ebenso koordiniert sie die circadiane Rhythmik in Bezug auf die tageszeitlichen und saisonalen Änderungen der Lichtbedingungen.

Bisher konnte nicht geklärt werden, welche SCN-Neurone circadiane Rhythmen erzeugen. Welsh und Kollegen zeigten, dass 64% der Neurone spontanaktiv sind und die Hälfte dieser Zellen circadiane Rhythmen ausbilden. Diese Zellen werden „Clock“-Zellen [engl. Uhr] oder auch Einzel-Zell-Oszillatoren genannt. Da die Rhythmen der einzelnen Neurone mitunter stark voneinander abweichen (20 bis 28 Stunden), scheinen Netzwerkverbindungen zwischen den Zellen wichtig für die Synchronisation zu sein. Allerdings funktioniert die circadiane Uhr auch ohne direkte interzelluläre Kommunikation, also ohne Synapsen durch diffusionsfähige Faktoren, da nach der Applikation des Natrium-Kanal-Blockers TTX (Tetrodotoxin) die circadiane Rhythmik ohne Veränderung der Phase wieder auftritt (Welsh et al. 1995). Ein spezifisches Neuropeptid-Expressionsmuster konnte den „Clock“-Zellen bislang nicht zugeordnet werden. Allerdings wurden sowohl Vasopressin (AVP)-, Vasoaktives Intestinales Polypeptid (VIP)- und Somatostatin-exprimierende Neurone beschrieben (Welsh et al. 1995).

Der SCN vieler Säugetiere, beispielsweise der Ratte und der Maus, ist eine der Gehirnregionen mit den kleinsten Neuronen (Durchmesser der Zellkörper 7-11µm) und wird in der Literatur, aufgrund der Expressionsmuster von Neuropeptiden und Neurotransmittern, meist in zwei Haupt-Subnuclei unterteilt (Reuss 1996, Morin 2007). Die dorsomediale Region des SCN wird als „shell“ [engl. Schale, Muschel] bezeichnet, die dichter gepackte ventrolaterale Region als „core“ [engl. Kern] (van Esseveldt et al. 2000). Diese Subnuclei des SCN zeigen klare Unterschiede in Morphologie und Neuronenverteilung, was auf verschiedene Rollen in der Generierung und Regulierung der circadianen Rhythmik hinweist. Diese Annahme wird durch das heterogene Vorkommen von Neuropeptiden gestützt.

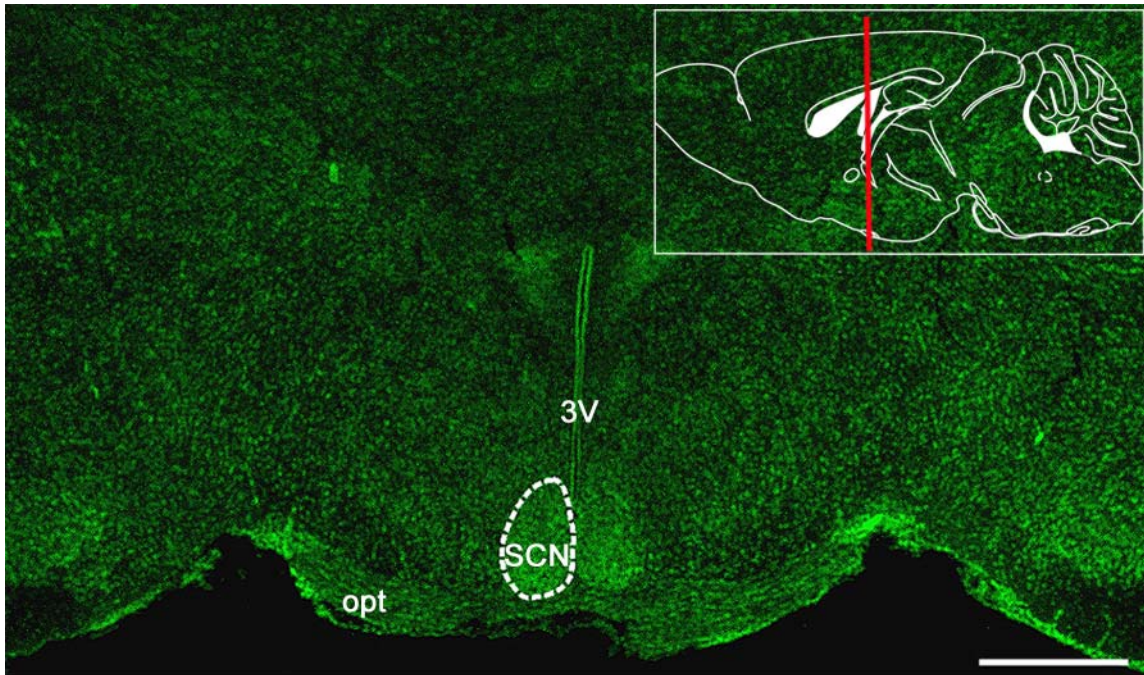


Abbildung 1: Der N. suprachiasmaticus. Coronalschnitt durch den Hypothalamus einer CD1-Maus, angefärbt mit dem Nissl-Farbstoff NeuroTrace zur Darstellung der Kerngebiete. Der SCN ist paarig zum ventralen Teil des 3. Ventrikels, direkt über dem optischen Trakt, angeordnet. Die linke Hälfte des Kerngebiets ist weiß umrandet. Die Schnittebene des Coronalschnitts ist durch die rote Linie in der schematischen Darstellung eines sagitalen Maushirnschnitts markiert. Modifiziert nach Paxinos & Franklin 2001. 3V, 3. Ventrikel; opt, Tractus opticus, SCN, N. suprachiasmaticus. Maßstab 500µm

Die meisten Neurone des dorsomedialen Ratten- oder Maus-SCN synthetisieren Vasopressin (AVP), während viele Neurone des ventrolateralen Nucleus VIP exprimieren. Beide Neuropeptide werden teilweise zusammen mit GABA exprimiert (Moore et al. 2002). Neben Vasopressin und VIP werden noch andere neuroaktive Substanzen im SCN gebildet, wie GRP [engl. *gastrin releasing peptide*], Somatostatin, Angiotensin II, Dynorphin, Enkephalin, Galanin, Substanz P und CRF [engl. *corticotropin releasing factor*]. Einige Neuropeptide werden gemeinsam in Neuronen des SCN synthetisiert, wie Vasopressin und Enkephalin oder VIP und CRF (Reuss 1996, van Esseveldt et al. 2000, Abrahamson & Moore 2001a, Moore et al. 2002).

Die genaue Funktion der Neuropeptide im SCN ist weitgehend unbekannt. Dabei unterliegen beispielsweise die Synthesen von Vasopressin und VIP sowie deren mRNA-Gehalt in der Zelle circadianen Schwankungen. Diese Beobachtung legte die Vermutung nahe, dass beide Neuropeptide bei der Generierung und

Aufrechterhaltung der circadianen Rhythmik und der Verbreitung des circadianen Signals mitwirken (van Esseveldt et al. 2000).

Vasopressin spielt beispielsweise in der Kontrolle der circadianen Rhythmik von Wasser- und Nahrungsaufnahme eine Rolle (Reghuandanan & Reghuandanan 2006). Der Gehalt von Vasopressin und Vasopressin mRNA erreicht den höchsten Wert während des subjektiven Tages, sowohl unter Hell/Dunkel- als auch Dunkel/Dunkel-Bedingungen. Das Neuropeptid wird in 37% der SCN-Zellen exprimiert und wirkt über drei verschiedene Rezeptoren. Zwei V1-Rezeptoren, die in a und b unterschieden werden, und einen V2-Rezeptor (Moore et al. 2002, Reghuandanan & Reghuandanan 2006). Die Expression des Vasopressin 1a-Rezeptors und die Größenveränderung der Vasopressin mRNA unterliegen ebenfalls einem circadianen Rhythmus, der allerdings nur unter Hell/Dunkel-Bedingungen aufrecht erhalten bleibt. Demzufolge scheint diese Rhythmik durch den Hell/Dunkel-Zyklus gesteuert zu werden. Somit ist Vasopressin höchstwahrscheinlich nicht an der Rhythmusgenerierung beteiligt, sondern wirkt vielmehr modulatorisch (van Esseveldt et al. 2000).

Das Neuropeptid VIP, ursprünglich bekannt als Peptid des Magen-Darm-Traktes, kommt in 9 bis 24% der Neurone im SCN vor (Reghuandanan & Reghuandanan 2006). Die Expression des Neuropeptids und dessen mRNA-Gehalt in Zellen des Kerngebiets weisen bei bestehendem Hell/Dunkel-Rhythmus ebenfalls ein circadianes Muster auf, wobei der Höchststand während der subjektiven Nacht erreicht wird. Da diese circadiane Rhythmik jedoch unter konstanter Dunkelheit nicht bestehen bleibt, scheint auch VIP keine entscheidende Rolle in der Rhythmusgenerierung oder der Übertragung des circadianen Signals zu anderen Zielgebieten der inneren Uhr zu spielen (van Esseveldt et al. 2000).

Neurone im ventrolateralen SCN, die zum Teil VIP synthetisieren, werden von retinalen Ganglienzellen innerviert. Der VIP-Rezeptor VIPR2, auch VPAC2 genannt, wird bei 60% aller SCN-Neurone, besonders im dorsalen Bereich, gefunden und besitzt eine hohe Affinität für VIP und PACAP [engl. *pituitary adenylate cyclase activating polypeptide*]. Da PACAP in retinalen Projektionen vorkommt, liegt die Vermutung nahe, dass VIP wichtig für die Übersetzung und Weiterleitung externer photischer Informationen im SCN ist (van Esseveldt et al. 2000, Reghuandanan & Reghuandanan 2006, Liu et al. 2007). Im Gegensatz zu VIP scheint die Expression des VIPR2/VPAC2-Rezeptors unter Kontrolle des circadianen Systems zu stehen,

da circadiane Schwankungen nicht nur unter Hell/Dunkel-, sondern auch Dunkel/Dunkel-Bedingungen fortbestehen (van Esseveldt et al. 2000). Die Applikation von VIP im SCN führte sowohl in vitro als auch in vivo zu einer Phasenverschiebung, ähnlich der durch Lichtimpulse induzierten, was die Annahme verstärkt, dass das Neuropeptid modulatorisch wirkt (Reghuandanan & Reghuandanan 2006, Liu et al. 2007).

Die Neuropeptide Vasopressin und VIP sind demnach nicht an der Generierung circadianer Rhythmen beteiligt, besitzen jedoch modulatorische Funktionen im SCN und sind möglicherweise an der Weiterleitung circadianer Signale in andere hypothalamische Kerngebiete beteiligt (van Esseveldt et al. 2000).

Neben den erwähnten Neuropeptiden schütten die Zellen des SCN auch klassische Neurotransmitter aus, vor allem den inhibitorischen Neurotransmitter GABA (γ -Aminobuttersäure; Decavel & van den Pol 1990), aber auch Glutamat, Acetylcholin und Glyzin sind relevant für die Funktionen des SCN (Rao et al. 1987, Shinohara et al. 1998, Reghuandanan & Reghuandanan 2006).

Etwa 40 bis 70% der Neurone im SCN der Ratte sind GABAerg (Morin & Allen 2006). Die GABA-Expression erfolgt ohne sichtbares circadianes Muster. Allerdings verändert sich der mRNA-Gehalt des Enzyms Glutamatdecarboxylase, das Glutamat in GABA umwandelt, circadian (van Esseveldt et al. 2000). Obwohl keine Veränderung der GABA-Konzentration im SCN nachgewiesen werden konnte, scheint die Empfindlichkeit der SCN-Neurone für GABA tageszeitlichen Schwankungen zu unterliegen (Reghuandanan & Reghuandanan 2006).

Über die Wirkung von GABA auf Neurone des SCN gibt es unterschiedliche Ergebnisse. Wagner und Kollegen beschrieben den GABA-Effekt in vitro als hemmend während der Nacht und erregend am Tag. Dieses Ergebnis wurde mit der oszillierenden intrazellulären Kalzium-Konzentration begründet (Wagner et al. 1997). Andere Forschergruppen bestätigten diesen Effekt nicht und schrieben GABA ausschließlich eine hemmende Wirkung zu, unabhängig von der Tageszeit (Liu & Reppert 2000).

Dieser Neurotransmitter scheint bei der Verschaltung zwischen dem ventralen und dorsalen SCN sowie zwischen den einzelnen Neuronen eine Schlüsselrolle einzunehmen, da nach GABA-Applikation unterschiedliche circadiane Rhythmen individueller Neurone synchronisiert wurden (Albus et al. 2005, Aton et al. 2006, Liu und Reppert 2000, Liu et al. 2007). Die Signalübertragung zwischen GABAergen

Projektionen und angrenzenden Zellen ist überwiegend synaptischer Natur. Die Hälfte der synaptischen Eingänge in den SCN sind GABAerg (Decavel und van den Pol 1990).

2.2 Afferente Projektionen des N. suprachiasmaticus

Etwa 40 Gehirnstrukturen projizieren direkt zum SCN (Moga & Moore 1997, Morin & Allen 2006). Drei Haupt-Eingangswege in den SCN der Säugetiere existieren (Abb. 2A).

1) Der ventrolaterale Teil wird über den retinohypothalamischen Trakt (RHT) von Fasern retinaler Ganglienzellen innerviert. Diese Fasern enthalten, neben Glutamat auch PACAP und Melanopsin. 10 bis 20% dieser Ganglienzellen sind frei von Melanopsin (Morin & Allen 2006). Ein kleiner Teil dieser retinalen Fasern zieht in den dorsomedialen SCN, verzweigt sich dort und projiziert zu Neuropeptid Y-exprimierenden Neuronen des Intergeniculate leaflet (IGL; van Esseveldt et al. 2000, Moore et al. 2002, Morin & Allen 2005, Liu et al. 2007).

2) Vom Intergeniculate leaflet des lateralen Genuculatums (LGN) im Thalamus ausgehend ziehen Fasern über den geniculohypothalamischen Trakt (GHT), die Neuropeptid Y-haltig und GABAerg sind, in den ventrolateralen Teil des SCN. Der geniculohypothalamische Trakt stellt eine zweite, jedoch indirekte, retinale Afferenz zum SCN dar, da das Intergeniculate leaflet direkt von Fasern des retinohypothalamischen Traktes innerviert wird. Im SCN enden die eingehenden Fasern des geniculohypothalamischen Traktes in Bereichen des SCN, die auch vom retinohypothalamischen Trakt innerviert werden (van Esseveldt et al. 2000, Reghuandanan & Reghuandanan 2006). Reuss beschrieb Neuropeptid Y-haltige Fasern des geniculohypothalamischen Traktes, die zu VIP-exprimierenden Neuronen des ventralen SCN synaptischen Kontakt herstellen (Reuss 1996).

3) Der ventrolaterale SCN, besonders die darin befindlichen VIP-exprimierenden Neurone, werden ferner durch serotonerge Fasern von den medialen und dorsalen Raphé-Kernen im Mittelhirn innerviert (Moga & Moore 1997, van Esseveldt et al. 2000, Moore et al. 2002, Morin & Allen 2006). Die Aktivität dieser serotonergen Projektionen scheint durch den SCN und eingehende externe Lichtinformationen reguliert zu werden, da der Serotonin-Gehalt im SCN einem circadianen Rhythmus unterliegt (van Esseveldt et al. 2000).

Neben diesen drei Haupt-Eingangswegen existieren weitere Afferenzen. Zum dorsomedialen SCN projizieren überwiegend nicht-photische Fasern aus dem Cortex, dem basalen Vorderhirn und dem Hypothalamus auf die hier nicht detaillierter eingegangen wird (Moga & Moore 1997, van Esseveldt et al. 2000, Moore et al. 2002).

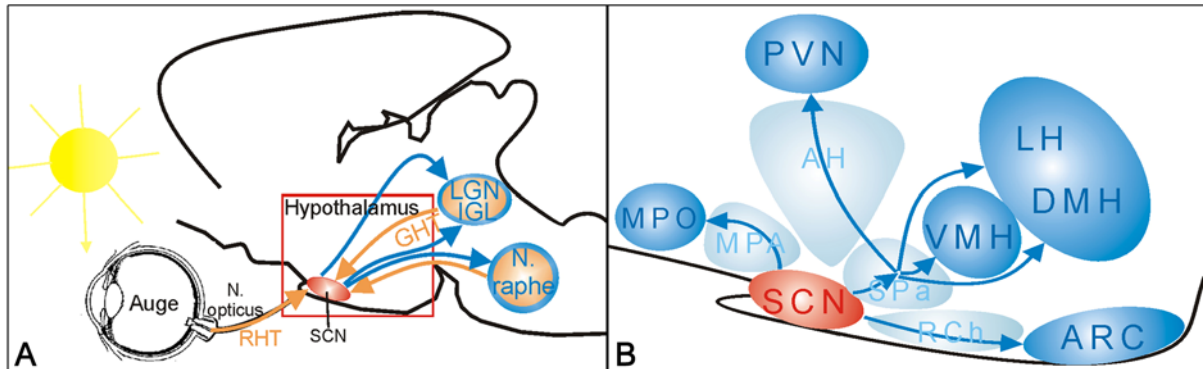


Abbildung 2: Ein- und Ausgangswege des N. suprachiasmaticus. **A:** Es existieren drei Haupt-Eingangswegen in den SCN (durch orangefarbene Pfeile dargestellt). Über das Auge wird die Lichtinformation aufgenommen und über den retinohypothalamischen Trakt (RHT) in den ventralen SCN geleitet. Ein Teil der retinalen Fasern projiziert in den dorsalen SCN, von wo aus die Fasern in das Intergeniculate leaflet (IGL) ziehen (blaue Pfeile), welches die photische Information indirekt über den geniculohypothalamischen Trakt (GHT) in den SCN weiterleitet. Ferner wird der SCN durch serotonerge Fasern der Raphé-Kerne innerviert. **B:** Fasern des SCN projizieren in verschiedenste hypothalamische Kerngebiete (markiert durch blaue Pfeile). Im anterioren Hypothalamus erreichen die SCN-Fasern den N. praeopticus medialis (MPO) über die Area praeoptica (MPA). In die subparaventriculäre Zone (SPa) ziehen dichte Projektionen, die von dort aus über die Area hypothalamica (AH) in den N. paraventricularis (PVN) laufen. Weitere SCN-Fasern projizieren von der SPa in den N. ventromedialis (VMH), den Hypothalamus lateralis (LH), den N. dorsomedialis (DMH) und über die Area retrochiasmatica (RCh) in den N. arcuatus (ARC). Modifiziert nach Saper et al. 2005.

2.3 Zielgebiete des N. suprachiasmaticus

Die Regulation der Körpertemperatur, lokomotorische Aktivität, Schlaf, Reproduktion, Nahrungsaufnahme oder auch Hormonausschüttung, unterliegen einer circadianen Rhythmik, die durch die innere Uhr gesteuert wird. Daher muss das circadiane Signal in Bereiche des Gehirns geleitet werden, die für die Regulation dieser Prozesse verantwortlich sind (Abb. 2B). Diese Zielgebiete des SCN wurden durch immunzytochemische Färbungen in Kombination mit Tracing-Studien [engl. *trace* Ablaufverfolgung] identifiziert. Krout und Kollegen fanden beispielsweise durch Applikation der retrograden transneuronalen Tracer Pseudorabies Virus und Cholera Toxin β sowohl direkte als auch indirekte

Verbindungen (multisynaptische) in unterschiedliche Bereiche des SCN (Krout et al. 2002). Ebenso wie für die in den SCN ziehenden (afferenten) Fasern scheint es auch für die herausführenden (efferenten) Fasern einen Unterschied zwischen dem ventrolateralen und dem dorsomedialen Teil zu geben. Fasern des ventrolateralen SCN projizieren hauptsächlich zur lateralen subparaventriculären Zone (SPa), Fasern des dorsomedialen Teils enden überwiegend in der medialen subparaventriculären Zone und dem N. dorsomedialis (DMH). Einige Fasern führen über die subparaventriculäre Zone hinaus in den N. paraventricularis (PVN), den N. dorsomedialis und den N. ventromedialis (VMH) des Hypothalamus. Weitere hypothalamische Kerne wie der N. praeopticus medialis (MPO), die Area retrochiasmatica (RCh), die Area hypothalamica (AH), der N. supraopticus (so) oder der N. arcuatus (ARC) werden von wenigen Fasern aus dem SCN innerviert (Watts & Swanson 1987, Watts et al. 1987, Leak & Moore 2001, Deurveilher & Semba 2005). Zu den Zielen der SCN-Fasern zählen ferner extrahypothalamische Hirnstrukturen, wie die Raphé-Kerne und der N. geniculatus (van Esseveldt et al. 2000), die unter 2.2 als Gehirnstrukturen vorgestellt wurden und den SCN innervieren. Die Raphé-Kerne fungieren als wichtige Relais-Station innerhalb des circadianen Systems.

Wie genau das circadiane Signal in die vielen Zielgebiete übertragen wird, ist bis dato unbekannt. Die Verbreitung des circadianen Signals kann durch direkte neuronale Verbindungen und/oder durch diffusionsfähige Stoffe erfolgen. Transplantations-Studien mit dem SCN deuten darauf hin, dass diffusionsfähige Neurotransmitter und Neuropeptide eine tragende Rolle in der Signalübertragung spielen (Reghuandanan & Reghuandanan 2006).

2.4 Der laterale Hypothalamus

Zum lateralen Hypothalamus werden der Hypothalamus lateralis (LH), der N. dorsomedialis (DMH), der um die Fornix (f) gelegene N. perifornicalis (PeF) und die Zona incerta (ZI) gezählt (Abb. 3). Dieses Gebiet spielt unter anderem eine wichtige Rolle in der Regulierung der Erregung, der Nahrungsaufnahme, des Energiehaushalts, der Thermoregulation und des Schlaf-Wach-Rhythmus und zeichnet sich durch eine Vielzahl von Neurotransmittern und Neuropeptiden aus. Der laterale Hypothalamus ist Bestandteil des circadianen Systems und Ziel von Projektionen des SCN (Thompson & Swanson 1998).

Zwei ausschließlich in diesem Gebiet des Gehirns vorkommende Neuropeptidgruppen sind Orexine und MCH [engl. *Melanin-concentrating hormone*] (Peyron et al. 1998). Diese Neuropeptide werden von zwei unterschiedlichen Neuronengruppen gebildet (Broberger et al. 1998), die zum Teil auch Glutamat exprimieren (Abrahamson et al. 2001) und über Synapsen miteinander in Kontakt stehen (Guan et al. 2002). Tracing-Studien im Hypothalamus von Ratten und Menschen bewiesen, dass beide Neuronenpopulationen von Fasern aus dem SCN innerviert werden (Abrahamson et al. 2001).

Zwei verschiedene Orexine werden unterschieden, Orexin A und Orexin B (Sakurai et al. 1998), auch unter den Namen Hypocretin 1 und Hypocretin 2 bekannt (de Lecea et al. 1998). Diese werden aus einer gemeinsamen Vorstufe, dem Prepro-Orexin oder Prepro-Hypocretin gebildet (Sakurai et al. 1998, de Lecea et al. 1998, Meister 2007). Der Name Orexin entstand, da diesem Neuropeptid eine wichtige Rolle in der Regulation des Appetits zugeschrieben wurde [griech. *orexis* Appetit]. Durch die weite Verbreitung orexinerger Fasern im Gehirn ist es nicht verwunderlich, dass Orexine auch Schlaf, Erregung, Bewegung, Appetit und Energiehaushalt beeinflussen. Interessanterweise unterliegt der Orexin A-Gehalt im Hirnwasser circadianen Schwankungen, mit hohen Werten in der Nacht und niedrigeren Werten am Tag (Yoshida et al. 2001).

Die Orexine wirken über zwei G-Protein gekoppelte Rezeptoren, deren Verteilung im Gehirn mit der orexinerger Fasern vergleichbar ist (Sakurai et al. 1998, Willie et al. 2001). Allerdings ist die Verbreitung der beiden Rezeptoren im Gehirn unterschiedlich. *In situ* Hybridisierungsanalysen belegten, dass Orexin-Rezeptor 1 unter anderem stark im präfrontalen Cortex, im Hippocampus und im N. ventromedialis exprimiert wird. Dagegen ist der Orexin-Rezeptor 2 vorwiegend in hypothalamischen Kerngebieten zu finden, wie dem N. dorsomedialis, dem N. paraventricularis, N. arcuatus, dem lateralen Hypothalamus aber auch in hippocampalen Strukturen. Außerhalb des Gehirns, beispielsweise in den Nebennieren und der Bauchspeicheldrüse, konnte mRNA der Orexin-Rezeptoren nachgewiesen werden. Aufgrund der unterschiedlichen mRNA-Expressionsmuster für Orexin-Rezeptor 1 und 2 scheinen die Rezeptoren Rollen in unterschiedlichen physiologischen Prozessen zu spielen. Nicht nur die Verteilung der Rezeptoren im Gewebe sondern ebenso die Lokalisation der Rezeptoren in der Zelle ist

verschieden. Orexin-Rezeptor 1 ist vorwiegend im Zytosol, der Orexin-Rezeptor 2 ist dagegen im Zellkern ausgebildet (Taheri & Bloom 2001).

Die Orexin-Rezeptoren zeigen unterschiedlich starke Affinität für die beiden Orexin-Peptide (Sakurai et al. 1998). Orexin-Rezeptor 1 hat eine 30- bis 100-mal höhere Affinität für Orexin A (Marcus et al. 2001). Dagegen binden beide Orexine an den Orexin-Rezeptor 2 mit gleicher Affinität.

Das Neuropeptid MCH moduliert bei Fischen und Amphibien die Pigmentierung der Haut (Kawauchi et al. 1983). Bei Säugetieren scheint es die Reproduktion, den Energiehaushalt und den Appetit zu steuern, die alle eine circadiane Rhythmik zeigen. Das Verbreitungsmuster von MCH-haltigen Fortsätzen und MCH-Rezeptoren (SLC-1/MCH-R1 und MCH-R2) ist sehr weitläufig (Lembo et al. 1999). Der MCH-R2 wird im Hypothalamus vorwiegend im N. ventromedialis, dem lateralen Hypothalamus und dem N. arcuatus exprimiert (Hillebrand et al. 2002).

Das Wissen über die Funktion der Orexine und MCH im Gehirn ist bisher lückenhaft. Orexine stimulieren die synaptische Aktivität (de Lecea et al. 1998, van den Pol et al. 1998), während MCH einen gegenteiligen Effekt hat. So zeigten beispielsweise Gao und van den Pol bei Neuronen des lateralen Hypothalamus, dass MCH die synaptische Transmission von GABA und Glutamat hemmt, Orexin die synaptische Transmission der beiden Neurotransmitter dagegen verstärkt (Gao & van den Pol 2001). Orexine begünstigen den Wachzustand am Tag (Liu et al. 2007).

Orexine und MCH scheinen eine entscheidende Rolle bei der Nahrungsaufnahme zu spielen, da intracerebroventrikuläre Injektionen der beiden Substanzen die Nahrungsaufnahme steigern und während des Fastens der mRNA-Gehalt erhöht ist (Sakurai et al. 1998, Rossi et al. 1997, Qu et al. 1996). Die beiden Neuropeptide haben demnach eine appetitanregende Wirkung (Elias et al. 1998).

Weitere Neuropeptide, die im lateralen Hypothalamus gebildet werden sind Urocortin, Neurotensin, Galanin und CART [engl. *Cocaine- and amphetamine-regulated transcript*], das zusammen mit MCH, jedoch nicht mit Orexin exprimiert wird (Hillebrand et al. 2002).

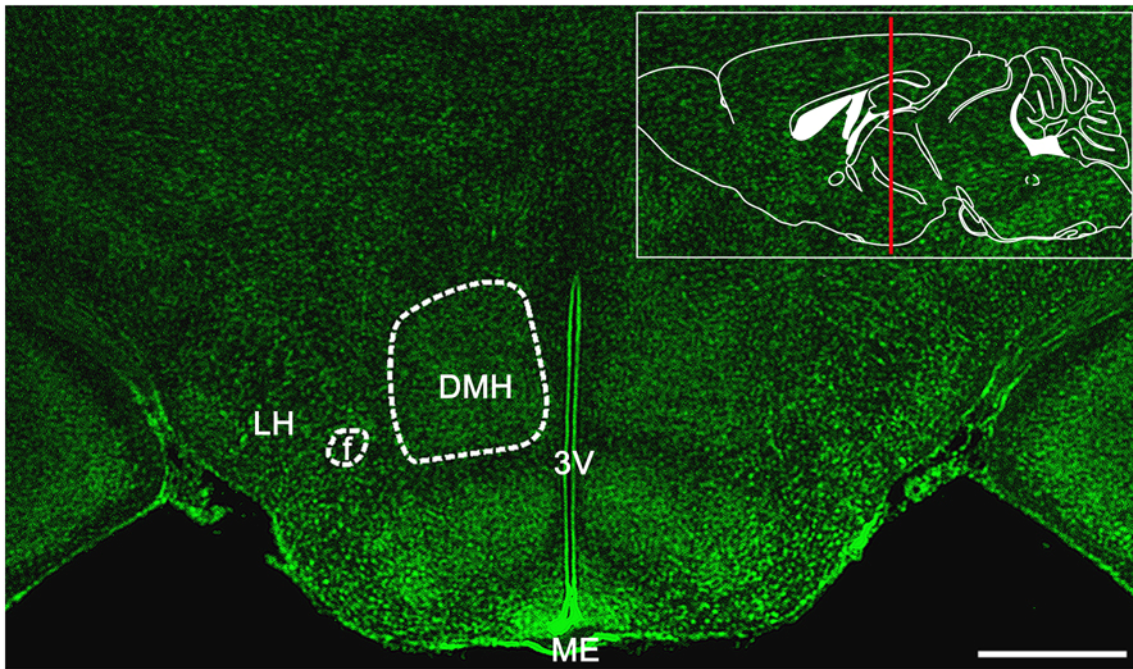


Abbildung 3: Der laterale Hypothalamus. Coronarschnitt durch den Hypothalamus einer CD1 Maus, angefärbt mit dem Nissl-Farbstoff NeuroTrace. Der N. dorsomedialis (DMH) und der Hypothalamus lateralis (LH) liegen auf beiden Seiten des 3. Ventrikels angeordnet. Die Schnittebene des Coronarschnitts ist durch die rote Linie in der schematischen Darstellung eines sagitalen Maushirnschnitts markiert. Modifiziert nach Paxinos & Franklin 2001. 3V, 3. Ventrikel, f, Fornix. Maßstab 500µm

2.5 Der Nucleus arcuatus

Der N. arcuatus (ARC) zählt ebenfalls zu den Zielgebieten des SCN und ist Teil des circadianen Systems. Er liegt caudal zum SCN, am ventralen Teil des 3. Ventrikels, auf gleicher Ebene wie der N. dorsomedialis (DMH) und der Hypothalamus lateralis (LH) (Abb. 4). Der Bereich des N. arcuatus und der Eminentia mediana (ME) ermöglicht wegen der fehlenden Bluthirnschranke das Zusammenspiel zwischen den peripheren Organen und dem Gehirn (Meister 2007). Dieses Kerngebiet hat eine Schlüsselrolle bei der Regulation der Ernährung, des Körpergewichts und des Energiehaushalts. Es besitzt enge Verbindungen zum lateralen Hypothalamus, der ebenfalls regulierend auf diese physiologischen Prozesse einwirkt (Bouret et al. 2004).

Viele unterschiedliche Neurotransmitter und Neuropeptide wurden im N. arcuatus nachgewiesen. Einige können in zwei Gruppen aufgeteilt werden: appetitanregende und appetitsuppressive Neuropeptide. Neuropeptid Y und AGRP [engl. *agouti related protein*] regen die Nahrungsaufnahme an. POMC (**P**ro-**o**piomelanocortin) und CART unterdrücken den Appetit (Valasssi et al. 2007).

Neuropeptide Y kommt bevorzugt im N. arcuatus vor und beeinflusst die neuroendokrine Regulation und den Energiehaushalt. 90% der Neuropeptid Y-haltigen Neurone exprimieren AGRP. Etwa ein Drittel der Neuropeptid Y-haltigen Neurone sind GABAerg (Horvath et al. 1997). GABA kommt in der Hälfte aller synaptischen Endigungen des Kerngebiets vor (Decavel & van den Pol 1990) und wird von vielen Neuronen des Kerngebiets gebildet (Horvath et al. 1997).

POMC fungiert als Vorstufe einiger Peptide wie beispielsweise α -MSH (*α -melanocyte-stimulating hormone*), welches den Haupt-Regulator des Energiehaushalts darstellt. POMC wird in 90% der CART-exprimierenden Zellen gebildet (Valasssi et al. 2007).

Neben den genannten Neuropeptiden werden auch β -Endorphin, Dynorphin, Enkephalin, Galanin, Ghrelin, Neurotensin, Neuromedin U, Somatostatin und GHRH [engl. *Growth hormone-releasing hormone*] im N. arcuatus exprimiert (Ludwig & Leng 2006).

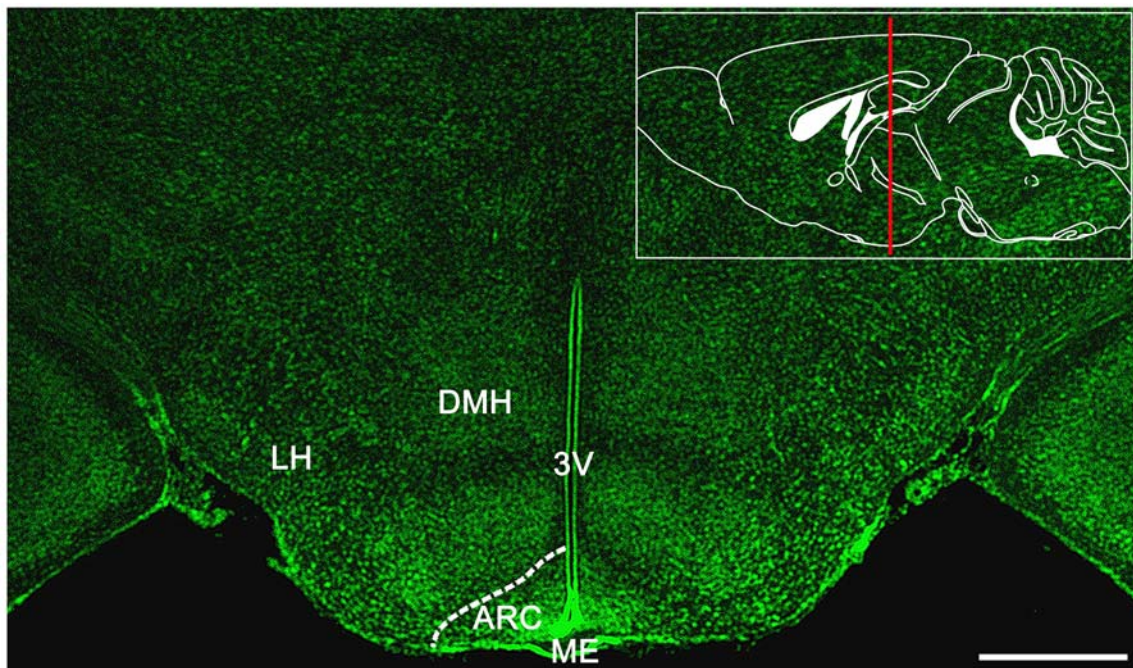


Abbildung 4: Der N. arcuatus. Coronalschnitt durch den Hypothalamus einer CD1 Maus, angefärbt mit dem Nissl-Farbstoff NeuroTrace. Der N. arcuatus (ARC) ist paarig zum ventralen Teil des 3. Ventrikels angeordnet. Die linke Hälfte des Kerngebiets ist weiß umrandet. Die Schnittebene des Coronalschnitts ist durch die rote Linie in der schematischen Darstellung eines sagitalen Maushirnschnitts markiert. Modifiziert nach Paxinos & Franklin 2001. 3V, 3. Ventrikel; DMH, N. dorsomedialis; LH, Hypothalamus lateralis, ME, Eminentia mediana. Maßstab 500 μ m

2.6 Fragestellung

Die Kommunikationswege zwischen der inneren Uhr im SCN und anderen hypothalamischen Kerngebieten sind sehr komplex und sollten in dieser Doktorarbeit am Hypothalamus der Maus und der Ratte untersucht werden.

Im Zentrum stand die Frage, über welche neuronalen Bahnen und unter Verwendung welcher möglicher Neurotransmitter und Neuropeptide das circadiane Signal vom SCN in andere Kerngebiete des Hypothalamus geleitet wird und welche möglichen Rückkopplungs-Mechanismen von diesen Kerngebieten zum SCN existieren.

Drei hypothalamische Nuclei, der SCN, als Hauptbestandteil des circadianen Systems, und zwei seiner Zielgebiete, der laterale Hypothalamus und der N. arcuatus wurden für die Untersuchungen ausgewählt. Insbesondere das Vorkommen von vier Neuropeptiden sollte immunzytochemisch nachgewiesen werden: Vasopressin und VIP, die im SCN selbst synthetisiert werden, sowie Orexin A und MCH, die in den Zielgebieten des SCN exprimiert werden.

Nicht nur die Verbindungen zwischen diesen Kerngebieten sollten dabei näher beleuchtet werden, sondern auch die neuronalen Vernetzungen, sowie die Verteilung spezifischer Neuronenpopulationen innerhalb der einzelnen Nuclei. Daher wurde außerdem auf transgene Mauslinien zurückgegriffen, die sich als ausgezeichnete Marker für verschiedene Neurotransmitter und Synapsen erwiesen.

Um detaillierte Einblicke in Schaltkreise und Interaktionen von Neuronen zu erhalten, wurden zusätzlich primäre Zellkulturen der hypothalamischen Nuclei angelegt und immunzytochemisch charakterisiert.

2.7 Transgene Mäuse – Marker für Neurotransmitter und Synapsen

Im Rahmen dieser Arbeit wurde auf drei transgene Maus-Modelle zurückgegriffen, die GAD67-GFP knock-in-Maus [engl. GAD - *glutamic acid decarboxylase*, GFP – *green fluorescent protein*], die GlyT2-EGFP-Maus [engl. GlyT - *glycine transporter*, EGFP - *enhanced green fluorescent protein*] und die Munc 13-1-EYFP-Maus [engl. *yellow fluorescent protein*]. Jedes dieser Maus-Modelle exprimiert jeweils ein Markerprotein (GFP bzw. YFP) in bestimmten Zelltypen (GAD67- oder GlyT2-exprimierend) oder Zellkompartimenten (Munc 13-1, aktive Zone an der Synapse).

GAD67-GFP knock-in-Maus: Bei der GAD67-GFP knock-in-Maus wurde GFP-cDNA mit dem GAD67-Promotor fusioniert, wodurch GABAerge Neurone, die bereits

in frühen Entwicklungsstadien positiv für GAD67 sind, grün fluoreszieren (Tamamaki et al. 2003).

GlyT2-EGFP-Maus: Glyzinerge Zellen und deren Fortsätze fluoreszieren in der GlyT2-EGFP-Maus grün, da in dieser Mauslinie das künstliche Chromosom BAC [engl. **B**acterial **A**rtificial **C**hromosome] mit verstärktem grün-fluoreszierenden Protein unter Kontrolle des GlyT2-Promotors eingebaut wurde (Zeilhofer et al. 2005).

Munc 13-1 EYFP-Maus: In dieser Mauslinie wurden durch Einbau des verstärkt gelb-fluoreszierenden Proteins in das Gen des präsynaptischen Proteins Munc 13-1 Synapsen visualisiert (Kalla et al. 2006).

3 Material und Methoden

3.1 Versuchstiere

Für die Untersuchungen wurden Gehirne von Wistar-Ratten (*Rattus norvegicus*) und verschiedenen Mauslinien (*Mus musculus*) verwandt:

- 1) Wildtypmäuse des Stammes CD1,
- 2) transgene Mäuse mit dem grün fluoreszierenden Protein (GFP) unter der Kontrolle des GAD67-Promotors (Tamamaki et al. 2003),
- 3) Mäuse mit grün-verstärktem fluoreszierenden Protein (EGFP) unter der Kontrolle des GlyT2-Promotors (Zeilhofer et al. 2003)
- 4) Munc 13-1-EYFP knock-in-Mäuse, die das gelb-verstärkte fluoreszierende Protein (EYFP) unter der Kontrolle des Munc 13-1-Promotors exprimieren (Kalla et al. 2006).

Die Tiere wurden im Tierhaus unter einem 12:12 Hell/Dunkel-Rhythmus bei konstanter Temperatur gehalten. Wasser und Futter waren frei für die Tiere zugänglich.

3.1.1 Identifizierung der transgenen Mäuse

Zur Identifizierung der heterozygoten GAD67-GFP knock-in-Mäuse und der homozygoten GlyT2-EGFP-Mäuse wurde eine Fluoreszenz-Brille (Modell GFsP-5 „miner's lamp“) der Firma BLS verwendet. Diese Brille enthält Breitbandfilter (510-560 nm) der die GFP Emission sichtbar macht. Bei den GFP-positiven GAD67-GFP knock-in-Mäusen war die Fluoreszenz im Bulbus olfactorius zu sehen, während bei den GlyT2-EGFP-Mäusen die Milz und das Rückenmark fluoreszierten. Zur Kontrolle wurden einige Würfe der transgenen Mäuse genotypisiert.

Die Munc 13-1 knock-in-Mäuse wurden freundlicherweise von Nils Brose und Stefan Kalla (MPI für Experimentelle Medizin, Göttingen) zur Verfügung gestellt und waren bereits genotypisiert.

3.1.1.1 Genotypisierung

Die Genotypisierung mit Hilfe der PCR [engl. „Polymerase chain reaction“, Polymerasekettenreaktion] soll zunächst am Beispiel der GAD67-GFP knock-in-Mauslinie ausführlicher erklärt werden.

Die Schwanzspitzen der Mäuse wurden abgeschnitten, in beschriftete 1,5ml Eppendorf-Gefäßen gelegt, mit 20µl Proteinase K und 500µl Schwanzbiopsie-Lyse-Puffer überschichtet und über Nacht bei 55°C und 1100upm (Umdrehungen pro Minute) auf einem Thermoschüttler lysiert. Am nächsten Morgen wurde die Proteinase K durch 10minütiges Erhitzen auf 95°C im Thermoschüttler (300upm) inaktiviert und anschließend das Lysat 6 Minuten bei 13000U/min zentrifugiert. Nach diesem Schritt wurden je 1µl des Überstandes mit 19µl Mastermix (siehe Tabelle 3.1) versetzt und das für GFP kodierende Gen in einem PCR-Thermocycler vermehrt. Die verwendeten Oligonukleotide waren:

TR-1b	GGC ACA GCT CTC CCT TCT GTT TGC
TR-3	GCT CTC CTT TCG CGT TCC GAC AG
TRGFP-8	CTG CTT GFC GGG GAT ATA GAC G

Das PCR-Programm verlief folgendermaßen: zunächst 3 Minuten bei 94°C, dann 30-mal die folgende Schleife: 94°C 30 Sekunden, 58,2°C 45 Sekunden, 72°C 1 Minute. Das Programm schloss mit einer Phase von 10 Minuten bei 72°C und kühlte dann auf 4°C ab.

Die PCR-Produkte wurden mit DNA [engl. *desoxyribonucleic acid*]-Ladepuffer versetzt, auf ein Agarosegel (1,5% in 0,5x TBE-Puffer) aufgetragen und bei 110 Volt 60 bis 90 Minuten lang aufgetrennt. Zusätzlich zu den Proben wurde auch ein DNA-Standard (SMART-Ladder SF) auf das Gel aufgetragen.

Das Gel wurde anschließend 15 Minuten in Ethidiumbromidlösung gelegt, danach 10 Minuten in Wasser gewaschen und abschließend in ultraviolettem Durchlicht fotografiert (Eagle Eye Geldokumentationssystem). Die GFP-Bande lag bei 564 Basenpaaren.

Probenzahl	1
HPLC-Wasser	7µl
Q-Solution	4µl
10x PCR Puffer	2µl
MgCl ₂ 25mM	1,8µl
dNTP 10mM	1µl
TR-1b 10mM	1µl
TR-3 10mM	1µl
TRGFP 10mM	1µl
Taq-Polymerase 5 Einheiten/µl	0,2µl

Tabelle 1: Tabelle zur Herstellung des Mastermixes (GAD67-GFP knock-in-Maus)

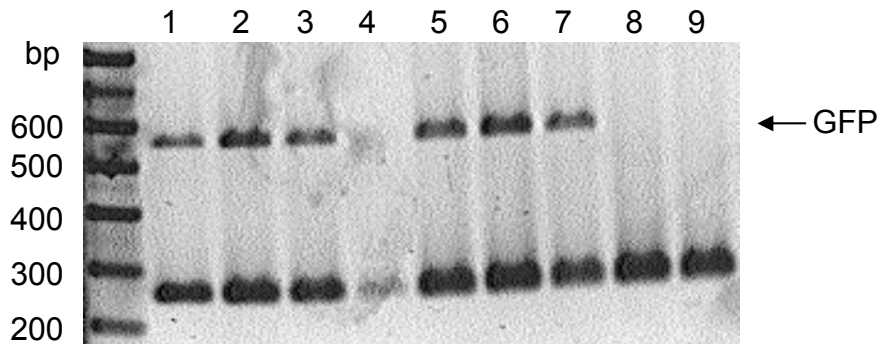


Abbildung 5: Identifizierung der GAD67-GFP knock-in positiven Mäuse. Durch PCR wurde sowohl das 564 bp lange Fragment des GFP-Gens, als auch das 265 bp lange Fragment des Wildtyp Gens ermittelt. Die Tiere 1 bis 3 und 5 bis 7 sind transgen, 4, 8 und 9 sind Wildtypen.

Das PCR-Protokoll der GlyT2-EGFP-Mäuse enthielt einige Veränderungen.

Die PCR verlief in folgenden Zyklen: zunächst 95°C 5 Minuten, dann 40-mal die folgende Schleife: 95°C 45 Sekunden, 58°C 45 Sekunden, 72°C eine Minute. Das Programm schloss mit einer Phase von 2 Minuten bei 72°C und anschließender Kühlung auf 4°C ab.

Die verwendeten Oligonukleotide waren:

Primer 1 AAT GTG TGC ATC TGT GTA TGC AGA C

Primer 2 CTT GAA GAA GAT GGT GCG CTC CTG

Die EGFP-Bande lag ungefähr bei 421 Basenpaaren.

Probenzahl	1
HPLC-Wasser	10,5µl
Q-Solution	5µl
10x PCR Puffer	2,5µl
MgCl ₂ 25mM	1,75µl
dNTP 10mM	0,5µl
Primer 1	0,25µl
Primer 2	0,25µl
Taq-Polymerase	0,25µl

Tabelle 2: Tabelle zur Herstellung des Mastermixes (GlyT2-EGFP-Maus)

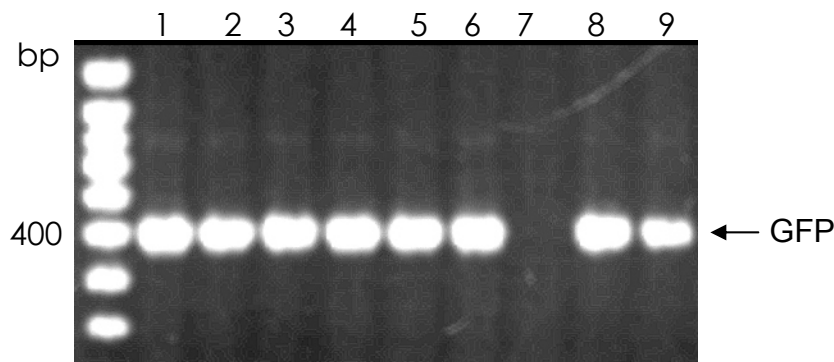


Abbildung 6: Identifizierung der GlyT2-EGFP positiven Mäuse.
 Durch PCR wurde das 421 bp lange Fragment des GFP-Gens ermittelt. Die Tiere 1 bis 6, 8 und 9 sind transgen.

3.2 Präparation der Maus- und Rattengehirne

Das Alter der Mäuse zum Zeitpunkt der Präparation war etwa 3 bis 4 Wochen, dass der Ratten 3 bis 4 Monate.

Die Versuchstiere wurden zunächst dekapitiert. Der Kopf wurde vom Fell befreit und die Augen nach Durchtrennung der Sehnerven vorsichtig mit einer gebogenen Schere aus den Augenhöhlen entnommen. Anschließend wurde die Schädeldecke mit einer Schere geöffnet und zusammen mit der Hirnhaut vom restlichen Schädel entfernt. Der Schädel wurde nun um die Längsachse gekippt und das Gehirn mit einem Spatel vorsichtig entnommen und behutsam mit dem ventralen Teil nach oben auf einem Stück Parafilm platziert.

3.2.1 Herstellung der Gehirnschnitte

Die Gehirne wurden zur Vorbereitung für die immunzytochemische Färbung und Nissl-Färbung zunächst über Nacht in 4%igem Paraformaldehyd (PFA) immersionsfixiert. Einige Gehirne wurden mit 2%igem PFA perfusionsfixiert, um das Färbeergebnis der Immunfärbung zu optimieren.

Zur Durchführung der Perfusionsfixierung wurden die Mäuse mit 0,5ml Isofluran narkotisiert und mit Kanülen auf einem Styropordeckel mit der Bauchseite nach oben fixiert. Mit einer stumpfen Schere wurde der Brustkorb geöffnet und das Herz freigelegt. Danach wurde eisgekühltes 0,1M PBS mittels einer Kanüle und einer 20ml-Spritze in den linken Ventrikel geleitet und der rechte Ventrikel wurde geöffnet, um das Blut aus dem Kreislauf zu spülen. Anschließend wurden die Tiere mit 30ml eisgekühltem 2%igem PFA perfundiert; die Gehirne wie unter 3.2 beschrieben entnommen und für etwa 30 Minuten in 2%igem PFA nachfixiert.

Im Anschluss an die Immersions- und Perfusionsfixierung wurden die Gehirne in 0,1M PB gewaschen und in 30%ige Saccharose überführt. Dabei war das Absinken der Gehirne auf den Boden der Saccharose enthaltenden Gefäße ein Zeichen für den vollständigen Gefrierschutz. Dieser Schutz war jedoch nur für das Schneiden der Gehirne am Kryostaten notwendig, nicht jedoch bei Vibratomschnitten.

Das Vibratom wurde bei Raumtemperatur verwendet; die Schnittdicke betrug circa 100 μ m.

Am Kryostat wurden die Schnitte bei einer Kammertemperatur von -21°C und einer Objekttemperatur von -18 bis -20°C hergestellt. Die Schnittdicke betrug 20 bis 25 μ m. Die Gehirnschnitte wurden in 24-Well-Platten in 0,1M PB mit 0,05% Natriumazid gesammelt und bis zur Weiterverarbeitung im Kühlschrank gelagert. Sie wurden sowohl für Nissl-Färbungen (siehe 3.3) als auch für immunzytochemische Färbungen (siehe 3.4) verwendet.

3.3 Nissl-Färbung

Zur Darstellung der Strukturen des Hypothalamus wurden Nissl-Färbungen durchgeführt. Dabei wurde die Nissl-Substanz mit einem grün fluoreszierenden Farbstoff (NeuroTrace) angefärbt. Die Nissl-Substanz kommt besonders reichlich in neuronalem Gewebe vor und besteht aus ribosomaler RNA verbunden mit rauem endoplasmatischem Retikulum.

Gefärbt wurden sowohl frei schwimmende Kryostat-, als auch Vibratom-Gehirnschnitte.

Die Gehirnschnitte wurden zunächst für einige Minuten in 0,1M PB (pH 7,4), danach für 10 Minuten in 0,1M PB plus 0,1% Triton X-100 und zweimal fünf Minuten in 0,1M PB gewaschen. Anschließend wurden die Schnitte 20 Minuten in je 150µl NeuroTrace-Lösung (250fach verdünnt in 0.1M PB) im Dunkeln inkubiert. Nach dem Abziehen der Farbstofflösung wurden die Schnitte nochmals für 10 Minuten in 0,1M PB plus 0,1% Triton X-100 und anschließend zweimal fünf Minuten in 0,1M PB gewaschen. Abschließend wurden die Schnitte entweder zwei Stunden bei Raumtemperatur oder über Nacht im Kühlschrank in 0,1M PB gewaschen und danach auf Objektträger aufgezogen, mit Aqua Poly Mount eingedeckelt und im Kühlschrank gelagert.

3.4 Immunzytochemie

Sowohl die Gehirnschnitte als auch die Zellkulturen wurden durch die indirekte Fluoreszenzmethode gefärbt. Zunächst wurden durch die Präinkubation alle unspezifischen Bindungsstellen im Gewebe geblockt. Der unkonjugierte Primärantikörper wurde anschließend an das Antigen gebunden und ein Überschuss des ersten Antikörpers durch Waschen in 0,1M PB entfernt. Anschließend wurde ein zweiter Antikörper aufgetragen, der gegen den Primärantikörper gerichtet war. Nach der Inkubation wurde wiederum der Überschuss des Zweitantikörpers durch mehrmaliges Waschen in 0,1M PB entfernt. Eine Liste der verwendeten Primär- und Sekundärantikörper zeigen die Tabellen 4 und 5.

3.4.1 Immunzytochemische Färbung an Gehirnschnitten

Für die immunzytochemische Färbung der Schnitte wurde die indirekte Fluoreszenzmethode mit unterschiedlichen Inkubationszeiten verwandt. Diese war abhängig von der Qualität der Primärantikörper. Einige Antikörper benötigten standardisierte Zeiten, um zu einem optimalen Färbeergebnis zu gelangen und wurden bei Raumtemperatur inkubiert („Standardprotokoll“). Bei anderen Primärantikörpern waren sehr kurze Inkubationszeiten ausreichend, da sie bei 37°C auf einer Heizplatte inkubiert werden konnten („Kurzprotokoll“). Die schrittweise Durchführung der zwei Färbe-Protokolle ist in Tabelle 3 gegenübergestellt.

Standardprotokoll bei Raumtemperatur (RT)	Kurzprotokoll bei 37°C
2-mal 10 Minuten in 0,1M PB auf Schüttler bei Raumtemperatur waschen	
1 Stunde Präinkubation	15 Minuten Präinkubation
Inkubation des Primärantikörpers über Nacht	30 Minuten Inkubation des Primärantikörpers
3-mal 10 Minuten in 0,1M PB auf Schüttler bei Raumtemperatur waschen	
1 Stunde Inkubation des Sekundärantikörpers	30 Minuten Inkubation des Sekundärantikörpers
3-mal 10 Minuten in 0,1M PB auf Schüttler bei Raumtemperatur waschen	
Schnitte in dest. Wasser auf Objektträger aufziehen, antrocknen lassen und mit Aqua Poly Mount eindeckeln	

Tabelle 3: Protokolle der Immunzytochemie

Antigen	Wirt	Bezugsquelle	Verdünnung
Arginin-Vasopressin (AVP)	rb	F. Nürnberger, Anatomisches Institut, Frankfurt/M	1:800
AVP	gp	Peninsula Laboratories, INC.	1:20000 - 1:30000
Gamma-Aminobuttersäure (GABA)	rb	Sigma	1:2000
Glial Fibrillary Acidic Protein (GFAP)	rb	Sigma	1:800 – 1:1000

Material und Methoden

Antigen	Wirt	Bezugsquelle	Verdünnung
grün-fluoreszierendes Protein (GFP)	gt	Rockland	1:500
GFP	m	Chemicon	1:500
GFP	rb	Molecular Probes	1:5000
Mikrotubuli assoziiertes Protein 2 (MAP2)	ms	WAK Chemie	1:200
Melanin Concentrating Hormone (MCH)	ch	BMA Biomedicals AG	1:200 - 1:300
MCH	ch	Acris Antibodies	1:300
Neurofilament 200 (NF200)	ms	Sigma	1:400
Neuronen spezifische Enolase (NSE)	rb	Polysciences	1:5000
Orexin A	gt	Santa Cruz Biotechnology Inc.	1:200
Somatostatin	rb	Peninsula Laboratories, INC.	1:500
Synapsin I	ms	Chemicon	1:200
Tyrosinhydroxylase (TH)	ms	H. Rohrer, Frankfurt/M.	1:1500
Vasoactives Intestinales Polypeptid (VIP)	rb	Chemicon	1:1000

Tabelle 4: Verwendete Primärantikörper

IgG-Konjugat	Wirt und Antigen	Hersteller	Verdünnung	Filter/Fluorophor-Spezifikation
Alexa Fluor 488 TM (Alexa Fluorescein)	dk anti gt	Molecular Probes	1:500	Zeiss # 10 Absorption: $\lambda_{\max} = 495\text{nm}$ Emission: $\lambda_{\max} = 519\text{nm}$
	dk anti m			
	dk anti rb			
	dk anti gp			
	gt anti rb			
Cy3 TM (Carbocyanin)	dk anti gt	Dianova	1:500	Zeiss # 31 Absorption: $\lambda_{\max} = 550\text{nm}$ Emission: $\lambda_{\max} = 570\text{nm}$
	dk anti m			
	dk anti rb			
	dk anti gp			
TRSC (Texas Red sulfony chloride)	dk anti ch	Dianova	1:200	Zeiss # 31 Absorption: $\lambda_{\max} = 596\text{nm}$ Emission: $\lambda_{\max} = 620\text{nm}$
Cy5 TM	dk anti gt	Dianova	1:200	Zeiss # 26 Absorption: $\lambda_{\max} = 650\text{nm}$ Emission: $\lambda_{\max} = 670\text{nm}$
	dk anti gp		1:500	
	dk anti ch			

Tabelle 5: Verwendete Sekundärantikörper und die dazu passenden Filtersätze

3.4.2 Immunzytochemische Färbung von Zellkulturen

Die Zellkulturen wurden ebenfalls mit der indirekten Fluoreszenzmethode angefärbt. Da die Zellkulturen in der Regel nur zwei Schichten, eine Gliazellschicht und eine darüber liegende neuronale Zellschicht umfassten, waren kurze Inkubationszeiten ausreichend.

Zunächst wurden die Zellen im Inkubator über Nacht mit 50µg/ml Colchicin behandelt. Colchicin führt zu einer Blockade der Mikrotubuli-Bildung und bewirkt

dadurch eine Hemmung des axonalen Proteintransports und eine Anreicherung der Proteine und Peptide im Zytoplasma. Nach der Colchicin-Behandlung wurden die Zellen für 5 bis 10 Minuten in 4% PFA mit 4% Saccharose fixiert, danach mit 0,3% Triton X-100 in PB gewaschen und bis zur Färbung in PB im Kühlschrank aufbewahrt.

Die Zellfärbung wurde bei 37°C durchgeführt. Zunächst wurden die Kulturen 3-mal je 5 Minuten in PB gewaschen und anschließend 15 Minuten präinkubiert. Nach 30minütiger Inkubation des Primärantikörpers wurden die Zellen 3-mal je 5 Minuten in 0,1M PB gewaschen, darauf folgte eine 15minütige Inkubation in der Sekundärantikörperlösung. Überschüssiger Antikörper wurde durch dreimaliges Waschen mit 0,1M PB entfernt. Abschließend wurden die Kulturen mit Aqua Poly Mount eingedeckelt und im Kühlschrank gelagert.

3.5 Auswertung immunzytochemischer Färbungen am Hirngewebe transgener Mäuse

3.5.1 GAD67-GFP knock-in-Maus

Die GAD67-GFP knock-in-Maus wurde zur Darstellung von GABAergen Neuronen verwendet (siehe 2.7). Um die Annahme zu überprüfen, ob GFP-positive Zellen in dieser Mauslinie tatsächlich GABAerg sind, wurden immunzytochemische Färbungen gegen GFP und GABA durchgeführt (Abb. 7). Dabei stellte sich heraus, dass die meisten GFP-positiven Zellen ebenfalls positiv für GABA sind. Die Auswertung erfolgte, wie bei Tamamaki und Kollegen (Tamamaki et al. 2003) beschrieben, die diese Mauslinie entwickelten. Nur diejenigen Zellen wurden als positiv für GAD67 und damit als GABAerg gewertet, deren Grünfärbung sich von dem umgebenden Neuropil abhob.

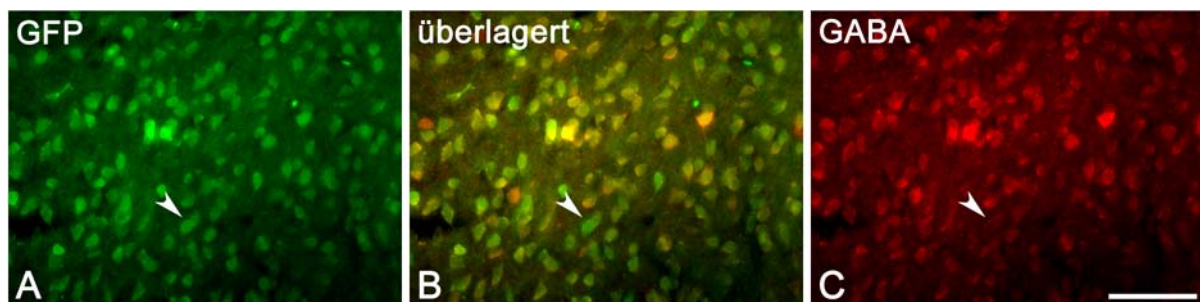


Abbildung 7: Immunzytochemische Doppelfärbung gegen GFP (grün) und GABA (rot). Die Pfeilspitzen im Coronschnitt des N. dorsomedialis der GAD67-GFP knock-in-Maus markieren eine Zelle, die als GFP positiv aber negativ für GABA angesehen wird. Maßstab 50µm

3.5.2 GlyT2-EGFP-Maus

In Gehirnschnitten der GlyT2-EGFP-Maus wurde das EGFP Signal durch eine immunzytochemische Färbung gegen GFP verstärkt. Im Hypothalamus dieser Mauslinie fanden sich größtenteils grüne Zellfortsätze (Abb. 8), die ausschließlich als glyzinerg angesehen wurden.

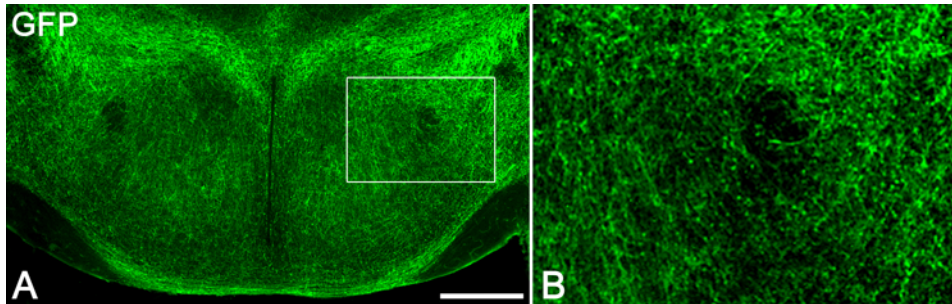


Abbildung 8: Immunzytochemische Färbung gegen GFP im Hypothalamus der GlyT2-EGFP-Maus. **A:** Coronalschnitt des Hypothalamus lateralis der GlyT2-EGFP-Maus. Der in **A** umrahmte Ausschnitt ist in **B** vergrößert dargestellt. Maßstab 500µm

3.5.3 Munc 13-1-EYFP-Maus

In der Munc 13-1-EYFP-Maus ist das YFP an Munc 13-1 gekoppelt und dient der Darstellung von Synapsen (siehe 2.7), die punktförmig erscheinen. Die Auswertung der immunzytochemischen Färbungen an Gehirnschnitten der Munc 13-1-EYFP-Maus gestaltete sich schwierig, da der passende Filtersatz für YFP nicht zur Verfügung stand. Stattdessen wurde mit den Filtersätzen für Cy3 und Alexa Fluor 488 gearbeitet (siehe Tabelle 5), da durch beide das YFP (Absorption: $\lambda_{\max} = 513\text{nm}$, Emission: $\lambda_{\max} = 527\text{nm}$) sichtbar ist. Bei der Auswertung wurde folgendermaßen vorgegangen (Abb. 9): Ein Gehirnschnitt einer Munc 13-1-EYFP-Maus sollte immunzytochemisch gegen zwei Neuropeptide durch die Primärantikörper A und B angefärbt werden. Um die Färbungen sichtbar zu machen, wurde für den Antikörper A ein an Cy5 gekoppelter und für den Antikörper B ein an Alexa 488 gekoppelter Sekundärantikörper verwendet. Die Färbung mit dem an Cy5-gekoppelten Antikörper wurde in den blauen Kanal gelegt. Antikörper B war durch Alexa Fluor 488 im grünen Kanal zu sehen. YFP wurde in den roten Kanal gelegt, war jedoch ebenfalls im grünen Kanal sichtbar. Da sich der Primärantikörper B gegen ein Neuropeptid richtete, waren durch diese Färbung sowohl das Neuropeptid-enthaltende Somata als auch Fortsätze erkennbar und konnten von der Synapsenfärbung (YFP) unterschieden werden.

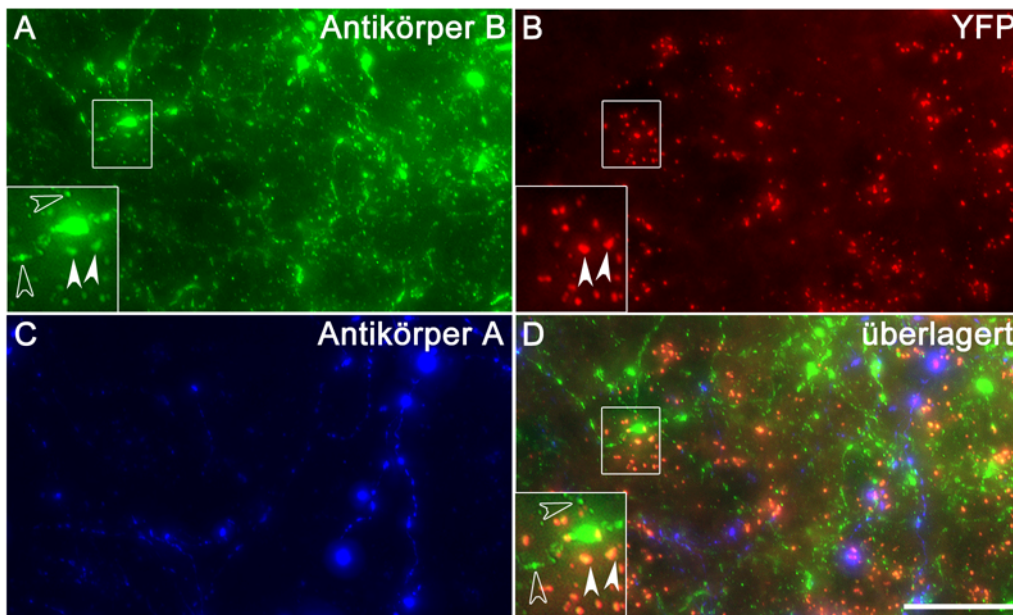


Abbildung 9: Immunzytochemische Färbung gegen Antikörper A (blau; C) und Antikörper B (grün; A); als Projektion (Überlagerung der Einzelbilder eines Bilderstapels) abgebildet. Die umrahmten Ausschnitte in A, B und D sind vergrößert dargestellt. Die gefüllten Pfeilspitzen in den Vergrößerungen kennzeichnen exemplarisch Synapsen, die durch die Kopplung des Proteins Munc 13-1 an das Fluorophor YFP sowohl im grünen (A) als auch roten Kanal (B) sichtbar sind. Die immunzytochemische Färbung gegen ein Neuropeptid (Antikörper B) ist in den Vergrößerungen (A, D) durch ungefüllte Pfeilspitzen exemplarisch markiert und von der punktförmigen Synapsenfärbung (gefüllte Pfeilspitzen) zu unterscheiden. Maßstab 20µm

3.6 Präparation und Kultivierung von Neuronen aus hypothalamischen Kerngebieten

Zur Herstellung primärer histiotypischer Zellkulturen wurde das Gehirngewebe von 2 bis 4 Tage alten Tieren mit Papain enzymatisch aufgelöst (*Papain Dissociation System*, Worthington).

Das Gehirn der verwendeten Mäuse und Ratten wurde wie unter 3.2 beschrieben präpariert. Mit einer Rasierklinge wurden coronale Schnitte der zu untersuchenden Kerngebiete angefertigt. Unter Verwendung eines Binokulars wurden die hypothalamischen Kerngebiete mit einer geschliffenen Kanüle ausgestanzt und mit einer mit eisgekühltem EBSS [engl. *Earle's Balanced Salt Solution*] gefüllten Spritze in ein Gefäß überführt. Nach der Präparation wurde das Gefäß mit den Proben kurz zentrifugiert, möglichst viel EBSS abgezogen und circa 1ml der Dissoziationslösung zugegeben. Die ausgestanzten Nuclei des Hypothalamus wurden für 45 bis 90 Minuten bei 37°C und 1400upm in einem Thermoschüttler mit einer Papainlösung

(20 Einheiten/ml Papain und 0,0005% DNase) dissoziiert und alle 10 bis 15 Minuten vorsichtig mit einer 100µl Pipette trituriert. Die Zell-Dissoziation wurde beendet, wenn sich die Zellverbände vollständig aufgelöst hatten. Anschließend wurde die Zellsuspension bei Raumtemperatur und 300g fünf Minuten zentrifugiert und der Überstand vorsichtig abgezogen. Die Zellen wurden in einer Albumin-Ovomucoid Inhibitor Lösung, die EBSS, Albumin-Ovomucoid Inhibitor und DNase enthielt, resuspendiert. Diese Zellsuspension wurde mittels eines diskontinuierlichen Dichtegradienten durch eine Zentrifugation bei 70g für 6 Minuten von den Membranresten getrennt. Anschließend wurde das verbleibende Zell-Pellet in Neurobasal A- oder DMEM/F12-Medium resuspendiert und auf den sterilisierten und mit Poly-D-Lysin/Laminin beschichteten Deckgläsern oder MEAs [engl. *multi-electrode array*, Multielektrodenplatten für elektrophysiologische Untersuchungen] ausplattiert und im Inkubator bei 37°C inkubiert. Nach 60 Minuten wurden die Präparate vorsichtig mit Nährmedium überschichtet. Das Medium dieser histiotypischen Zellkulturen wurde alle zwei bis drei Tage ausgetauscht. Damit sich die Zellen nicht über die gesamte Fläche der Deckgläser und MEAs verteilen, wurden vor dem Ausplattieren Sylgard-Ringe (Durchmesser 3mm) mittig auf die Deckgläser (Abb. 10) oder um die Elektroden der MEAs gesetzt.

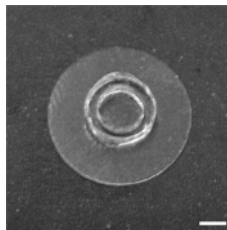


Abbildung 10: Deckglas mit aufgesetzten Silikonring.

Dem Deckglas (Durchmesser 12mm) ist ein Silikonring (Innendurchmesser 3mm) zur Kultivierung von Zellkulturen aufgesetzt. Maßstab 2mm

3.7 Mikroskopie

Die in dieser Arbeit beschriebenen Bilder wurden an verschiedenen Mikroskopen aufgenommen (siehe 3.8.3) und anschließend in Adobe Photoshop 7.0 nachbearbeitet.

3.7.1 Fluoreszenzmikroskopie

Die Fluoreszenzaufnahmen wurden an einem Zeiss SteREO Lumar.V12 (niedrige Vergrößerung) und einem Zeiss Axioplan 2 (hohe Vergrößerung) angefertigt und mit einer digitalen Kamera (Zeiss AxioCam MRm) aufgenommen. Beide Mikroskope wurden über die Axiovision Software Version 4.2 gesteuert und besaßen eine z-Achsen-Motorisierung. Mit dem Fluoreszenz-Stereomikroskop wurden Übersichten und mit dem Zeiss AxioPhot Detailaufnahmen der Präparate als Bilderstapel aufgenommen. Fluorophore, die dem Filtersatz dieser Mikroskope entsprechend verwendet werden konnten, waren: Alexa Fluor 488, Cy3, Cy5 und TRSC. Die Auswertung der immunzytochemischen Färbungen wurde überwiegend am Mikroskop bei höherer Vergrößerung durchgeführt (Zeiss Axioplan 2, Zeiss Objektive: Plan-Neoflunar 40x/0,75, Plan-Apochromat 63x/1,4 Oil und Plan-Neofluar 100x/1,3 Oil).

Durch den in die Software eingebauten Dekonvolutionsalgorithmus wurde über ein mathematisches Verfahren die Lichtstreuung an den Objekten außerhalb der Fokusebenen verringert und ein schärferes Bild mit weniger Hintergrundfluoreszenz erzeugt.

3.7.2 Konfokale Mikroskopie

Konfokale Aufnahmen wurde mit einem Laser-Scan-Modul 5 Pascal an einem Zeiss Axioskop MOT (Software LSM Pascal Version 3.2) angefertigt. Die Anregung der Fluoreszenz erfolgte durch einen Helium-Neon-Laser (Wellenlänge 543nm), und einen Argon-Laser (Wellenlänge 450 bis 514nm). Dementsprechend konnten unter Verwendung der an Sekundäntikörper gekoppelten Fluorophore Alexa Fluor 488, Cy3 und TRSC Bilderstapel aufgenommen werden.

Meistens wurden Bilderstapel durch das gesamte Präparat (20 bis 25µm) aufgenommen. Die z-Tiefe der Schnittebenen und damit deren Anzahl, hingen dabei von den verwendeten Objektiven ab. Sie betrug bei geringer Vergrößerung etwa 1,6µm und bei höherer Vergrößerung 0,3µm.

Die Übersichtsaufnahmen wurden meist als Projektion der einzelnen Schnittebenen erstellt. Zur Detailbetrachtung bestimmter Regionen wurden einzelne Schnittebenen dargestellt, um das Ergebnis nicht zu verfälschen.

3.8 Material

3.8.1 Lösungen und Medien

Lösung	Zusammensetzung
Antikörperinkubationslösung	0,6ml NGS 0,2g BSA 0,5ml Natriumazid (2% Stammlösung) 2ml Triton X-100 (5% Stammlösung) 16,4ml 0,1M PB
Dissoziationslösung	5ml EBSS 20 Einheiten/ml Papain 0,005% DNase
Ascorbinsäure-Lösung	1g Ascorbinsäure 10ml Aq. bidest.
DMEM/F12 (Brutschrankmedium)	45ml DMEM/F12 500µl HEPES (1M) 500µl GlutaMax 100µl Primocin 50µl Ascorbinsäure 40µl NaOH 5M 5ml FBS Medium im Brutschrank (5% CO ₂) über Nacht equilibrieren
HEPES-Lösung 1M	11,92g HEPES 50ml Aq. bidest. sterilfiltrieren
30% Saccharose	30g Saccharose ad 100ml 0,1M PB
künstliche Cerebrospinalflüssigkeit (aCSF [engl. <i>artificial CerebroSpinalFluid</i>])	7,25g NaCl 0,37g KCl 0,17g KH ₂ PO ₄ 0,32g MgSO ₄ * H ₂ O 2,18g NaHCO ₃ 0,32g CaCl ₂ 1,8g Glucose (D)

Material und Methoden

Lösung	Zusammensetzung
	2,38g HEPES 100kU Penicillin/Streptomycin Aq. bidest. ad 1000ml
Natriumazid 2% Stammlösung	2g Natriumazid ad 100ml Aq. bidest.
Natronlauge 5M	2g NaOH 50ml Aq. bidest. sterilfiltrieren
Neurobasal A-Lösung (Brutschrankmedium)	48ml Neurobasal A 1ml B27 Supplement 250µl GlutaMax 100µl Primocin
Paraformaldehyd-Lösung (PFA)	4% in PB, im Wasserbad bei 65°C unter ständigem Rühren lösen und anschließend filtrieren
Phosphatpuffer 0,1M pH 7,4 (PB 0,1M)	50% PB 0,2M in Aq. bidest.
Phosphatpuffer 0,2M (PB 0,2M)	43,42g Na ₂ HPO ₄ * 7 H ₂ O 5,42g NaH ₂ PO ₄ * 7 H ₂ O Aq. bidest. ad 1000ml
Poly-D-Lysin-Lösung	5mg 10ml Aq. bidest.
Präinkubationslösung	2ml NGS 0,2g BSA 2ml Triton X-100 (5% Stammlösung) 16ml 0,1M PB
Triton X-100 5% Stammlösung	5g Triton X-100 0,1M PB ad 100ml

Tabelle 6: Lösungen und Medien

3.8.2 Chemikalien und Reagenzien

Chemikalie/Reagenz	Hersteller
10x PCR Puffer	Roche
6x MassRuler™ DNA Loading Dye	Fermentas
Agar	Sigma
Aqua bidestillata (Aq. Bidest.)	bidestilliertes, entionisiertes und gefiltertes Wasser
Ascorbinsäure	Aldrich
B27 Supplement	Gibco
BSA Fraction V	Sigma
Calciumchlorid	Sigma
Colchicin	Serva
Dinatriumhydrogenphosphat	Merck
dNTP	Roche
DMEM/F12	Gibco
Ethanol	J.T. Baker
Ethidiumbromid	Sigma
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Sigma
Fötale Bovines Serum (FBS)	Gibco
Glucose (D)	Merck
GlutaMax	Invitrogen
HEPES	Sigma
Isofluran	Curamed Pharma
Kaliumchlorid	Sigma
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	Roche
Magnesiumsulfat-Heptahydrat	Sigma
Natriumazid	Riedel-de Haen
Natriumbicarbonat	Gibco
Natriumchlorid	Roth
Natriumdihydrogenphosphat	Aplichem
Natriumhydroxid	Merck
Neurobasal A	Invitrogen

Chemikalie/Reagenz	Hersteller
NeuroTrace <i>Fluorescent Nissl Stains</i>	Molecular Probes
Normales Eseserum (NDS)	Sigma
Normales Ziegenserum (NGS)	Sigma
Paraformaldehyd	Merck
Penicillin / Streptomycin	Sigma
Poly-D-Lysin	Sigma
Primocin	Invitrogen
Proteinase K	Roche
Q-Solution	Roche
Saccharose D(+)	Roth
Salzsäure 1 N	Roth
Smart Ladder SF	Eurogentec
Sylgard 184	Swiss-Composite
Taq-DNA Polymerase	Qiagen
Triton X-100	Sigma

Tabelle 7: Chemikalien und Reagenzien

3.8.3 Geräte und Hilfsmittel

Geräte bzw. Hilfsmittel	Hersteller
„miner`s lamp“ GFsP-5	BLS
Adobe Photoshop 7.0	Adobe Systems
Analysenwaage	Sartorius
Aqua Polymount	Polysciences Europe
Axioplan 2	Zeiss
Axiovision 4.2	Carl Zeiss Version
Brutschrank Cellstar	Nunc
Corel Draw 10	Corel Corporation
Deckgläser 12 mm rund No. 1 DKR1	Superior
Deckgläser 15 x15 mm No. 1	Superior
Eagle Eye Geldokumentationssystem	Stratagene
Einbettmedium für Gefrierschnitte (TFM, [engl. <i>tissue freezing medium</i>])	Reichert-Jung
Entwicklermaschine Curix60	AGFA

Material und Methoden

Geräte bzw. Hilfsmittel	Hersteller
Farbdrucker Tektronix	Xerox
Gewebekleber Histoacryl	Braun Aesculap
Grafiktablett XD-0608-U	Wacom
Kryostat CM3050 S	Leica
Laser-Scan-Mikroskop (LSM 5 Pascal)	Zeiss
Mircosoft Office 2002 SP2	Mirosoft
Multiwellplatten	Nunc
Objektträger	Marienfeld
Oligonukleotide	MWG
Papain Dissociation System	Worthington
Parafilm PM-996	Pechiney Plastic Packaging
pH Messgerät	inoLAB
SteREO Lumar.V12	Zeiss
Sterilbank Lamin Air	Holten
Sterilfilter 0,2µm	Sartorius
Thermocycler MJ Mini	Bio-Rad
Thermocycler PTC-220 DNA Engine	MJ Research
Thermoschüttler	Eppendorf
Vibratom VT 100S	Leica
Waage CP 1204	Sartorius
Wasseraufreinigungsanlage Elix 5 mit 60 I Tank und MilliQ Academic	Millipore
Windows XP	Microsoft
Zentrifugationsgefäße	Sigma
Zentrifuge 5417R	Eppendorf
Zentrifuge Biofuge pico	Heraeus

Tabelle 8: Geräte und Hilfsmittel

4 Ergebnisse

4.1 Verteilung der Neuropeptide Vasopressin, VIP, Orexin A und MCH im Hypothalamus von Maus und Ratte

Die Verteilung der Neuropeptide Vasopressin, VIP, Orexin A und MCH wurde im Maus- und Ratten-Hypothalamus untersucht. Diese vier Neuropeptide wurden ausgewählt, weil sie entweder im SCN selbst (Vasopressin, VIP) oder in seinen Zielgebieten (Orexin A, MCH) exprimiert werden. Die Expressionsmuster sind in Ratte und Maus ähnlich.

Besonders detailliert wird die Neuropeptidverteilung in der Mauslinie CD1 beschrieben, um sicherzustellen, dass sie vergleichbar mit den hier untersuchten transgenen Mauslinien ist.

In diesem Teil der Arbeit sind Aufnahmen coronaler Schnittebenen der Maus- und Rattengehirne exemplarisch dargestellt. Die vollständigen Abbildungen der CD1-Maus-Schnitte befinden sich im Anhang (Kapitel 8, Abb. 48-51).

4.1.1 Vasopressin-Verteilung im Hypothalamus

Das Neuropeptid Vasopressin wurde im Maus- und Ratten-Hypothalamus vorwiegend in drei Kerngebieten immunzytochemisch gezeigt: im N. paraventricularis (PVN, Abb. 11B; Abb. 12B), im N. supraopticus (so, Abb. 11A,B; Abb. 12A,B) und im SCN (Abb. 11A; Abb. 12A-D). Daneben wurden vereinzelte Vasopressin-positive Neurone im N. periventricularis (Pe, Abb. 11A; Abb. 12D) und dem Hypothalamus lateralis (LH, Abb. 11B; Abb. 12D) gefunden. Von diesen Kerngebieten ausgehend zogen Fortsätze in weite Teile des Hypothalamus. Die Zuordnung der Projektionen zu ihren Ursprungsneuronen war in Serienschnitten aufgrund der stellenweise hohen Dichte der Vasopressin-enthaltenden Fasern nur teilweise möglich.

Viele der im SCN entspringenden Vasopressin-positiven Projektionen verließen das Kerngebiet nicht, die Mehrheit der Fortsätze verliefen allerdings dorsal entlang des 3. Ventrikels, nahe des N. periventricularis (Pe). Einige dieser Fasern endeten in der subparaventriculären Zone (SPa, Abb. 11B; 12D), während andere in Teile des N. paraventricularis (PVN, Abb. 11B; Abb. 12D) zu projizieren schienen. Vasopressin-positive Fasern wurden ebenfalls im N. dorsomedialis (DMH, Abb. 12F), dem Hypothalamus lateralis (LH, Abb. 11A-C; Abb. 12E), sowie dem N. hypothalamicus ventromedialis (VMH, Abb. 11C; Abb. 12G) gefunden, die in früheren Tracing-

Studien ebenfalls als Zielgebiete des SCN identifiziert worden sind (Watts & Swanson 1987, Watts et al. 1987, Abrahamson & Moore 2001b). Andere Fortsätze verliefen unterhalb des 3. Ventrikels (3V) und projizierten in den ventralen Teil des anterioren Hypothalamus. Die Vasopressin-positiven Fasern in der Area praeoptica (MPA, Abb. 11A; Abb. 12B), dem N. praeopticus medialis (MPO, Abb. 12B,D), der Area hypothalamica (AHA/AHC/AHP, Abb. 11A,B; Abb. 12B,D) und dem N. arcuatus (ARC, Abb. 11C; Abb. 12F,H) könnten ebenfalls (zumindest teilweise) von Neuronen des SCN stammen. Die Mehrheit der Vasopressin-enthaltenden Fasern im Hypothalamus lateralis (LH), der Area hypothalamica (AHA/AHC/AHP) und dem N. arcuatus (ARC) gingen jedoch eindeutig vom N. paraventricularis (PVN) und dem N. supraopticus (so) aus.

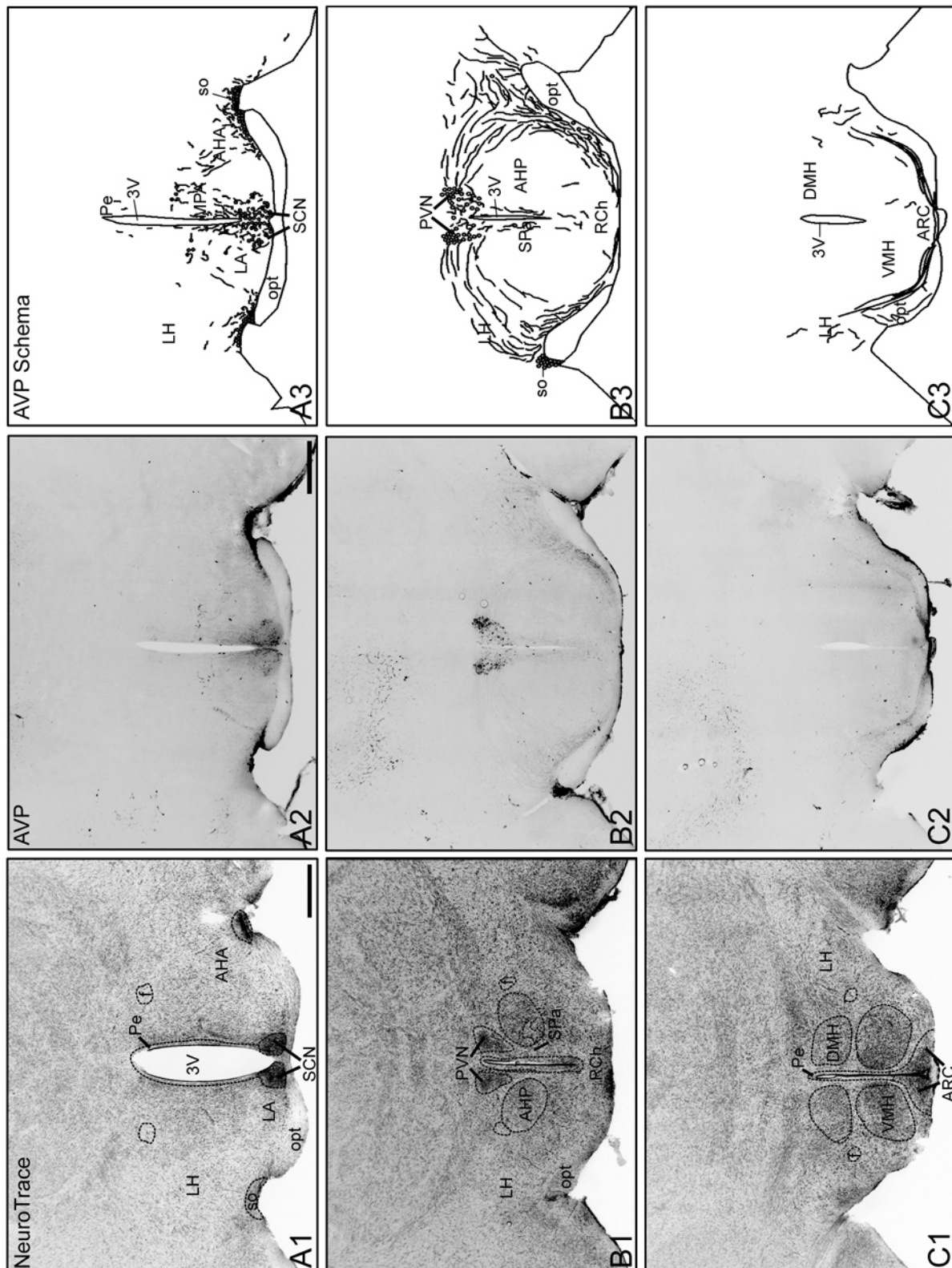


Abbildung 11: Vasopressin-positive Neurone und Fortsätze im Hypothalamus der Maus. A1-C1 (linke Reihe): Coronal Schnitte durch den Hypothalamus einer CD1-Maus, angefärbt mit dem fluoreszierenden Nissl-Farbstoff NeuroTrace zur Darstellung der Kerngebiete. **A2-C2 (mittlere Reihe):** Immunzytochemische Färbung gegen Vasopressin im Hypothalamus der Maus (coronale Schnittebene). **A3-C3 (rechte Reihe):** Schematische Darstellung der Vasopressin-positiven Somata (Kreise) und Fortsätze (Linien).

Vasopressin-enthaltende Somata liegen im Hypothalamus der Maus vorwiegend im SCN (**A2**), dem N. paraventricularis (PVN, **B2**) und dem N. supraopticus (so, **A2**, **B2**), vereinzelt auch im N. periventricularis (Pe, **A2**, **B2**) und dem Hypothalamus lateralis (LH, **B2**). Von den genannten Kerngebieten ausgehend, innervieren Vasopressin-enthaltende Fasern beispielsweise die Area praeoptica (MPA, **A2**) den N. lateroanterior hypothalami (LA, **A2**), die Area hypothalamica (AHA/AHP, **A2**, **B2**), die Area retrochiasmatica (RCh, **B2**), den N. hypothalamicus ventromedialis (VMH) und den N. arcuatus (ARC, **C2**).

Zur besseren Ansicht der Vasopressin-positiven Neurone und Fasern wurden die Fluoreszenzaufnahmen der Coronschnitte (Schnittdicke 25µm; von rostral, **A2**, nach caudal, **C2**) mit benachbarten Schnitten, die mit einem Nissl-Farbstoff angefärbt wurden (**A1-C1**), verglichen und schematisiert (**A3-C3**).

3V, 3. Ventrikel; AHA/AHP, Area hypothalamica anterior/posterior ; ARC N. arcuatus; DMH, N. dorsomedialis; f, Fornix; LA, N. lateroanterior hypothalami; LH, Hypothalamus lateralis; MPA, Area praeoptica; opt, Tractus opticus; PVN, N. paraventricularis; Pe, N. periventricularis; RCh, Area retrochiasmatica; SCN, N. suprachiasmaticus; so, N. supraopticus; SPa, subparaventriculäre Zone; VMH, N. hypothalamicus ventromedialis. Maßstab 500µm

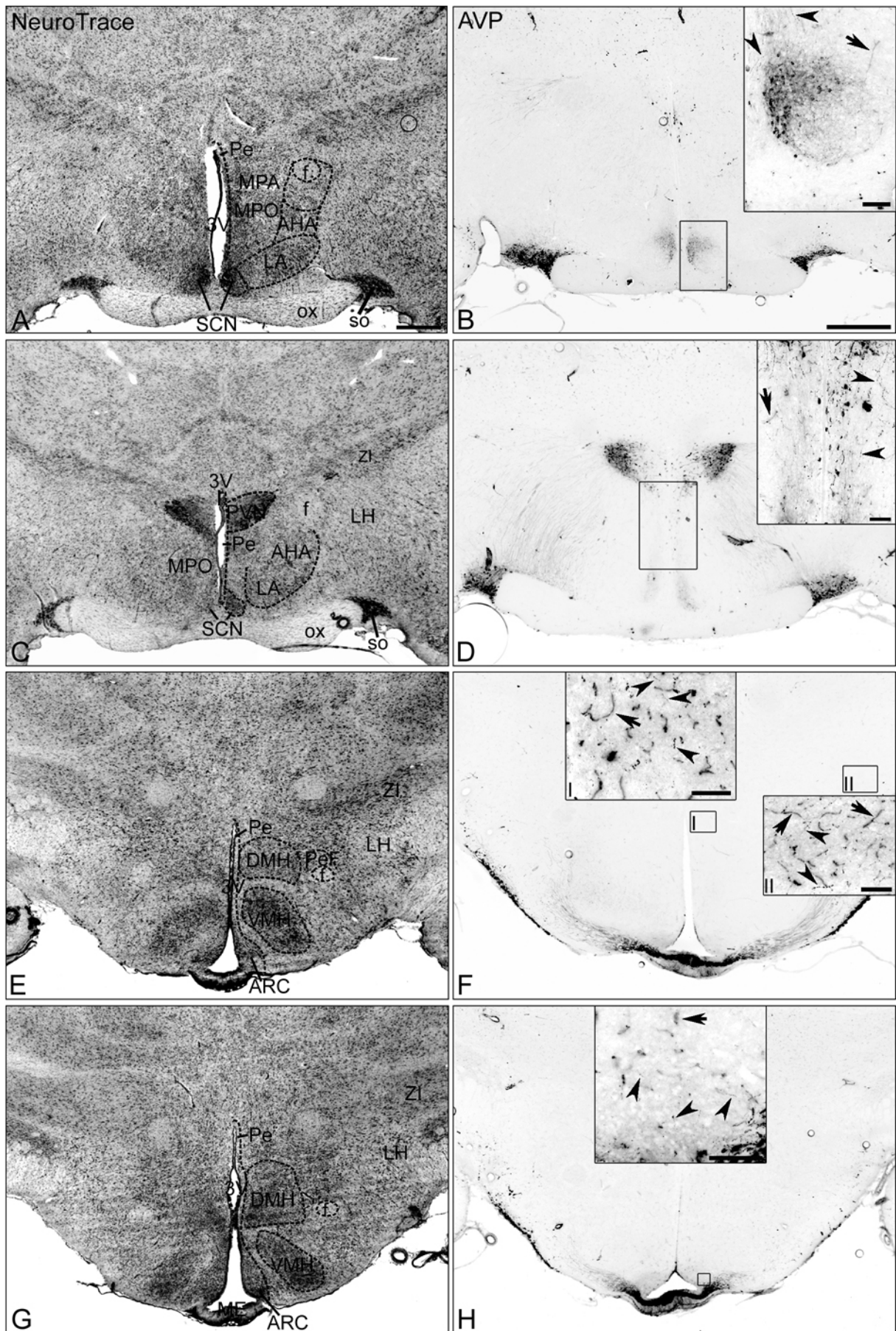


Abbildung 12: Vasopressin-positive Neurone und Fortsätze im Hypothalamus der Ratte. A, C, E, G (linke Reihe): Coronalanschnitte durch den Hypothalamus einer Wistar-

Ratte, angefärbt mit dem fluoreszierenden Nissl-Farbstoff NeuroTrace zur Darstellung der Kerngebiete. **B, D, F, H (rechte Reihe)**: Immunzytochemische Färbung gegen Vasopressin im Hypothalamus der Ratte.

Vasopressin-exprimierende Somata liegen im Hypothalamus der Ratte vorwiegend im SCN (**B**), im N. paraventricularis (PVN, **D**) und im N. supraopticus (so, **B, D**), vereinzelt im N. periventricularis (Pe) und dem Hypothalamus lateralis (LH, **D**). Vasopressin-enthaltende Fortsätze (markiert durch Pfeilspitzen) innervieren unter anderem die Area praeoptica (MPA, **B**) den N. lateroanterior hypothalami (LA, **B, D**), die Area hypothalamica (AHA, **B**), den N. hypothalamicus ventromedialis (VMH) und den N. arcuatus (ARC, **F, H**). Die Ausschnittvergrößerungen verdeutlichen die abgegrenzte Anordnung Vasopressin-enthaltender Neurone im dorsomedialen SCN und feine Fasern im angrenzenden Gewebe (**B**); vereinzelt Vasopressin-positive Neurone und Fortsätze massiveren Durchmessers im N. periventricularis (Pe, **D**), sowie filigrane Vasopressin-positive Fasern im N. dorsomedialis (DMH, **FI**), Hypothalamus lateralis (LH, **FII**) und dem N. arcuatus (ARC, **H**).

Die in **A,C,E,G** abgebildeten Schnitte entsprechen der gleichen Schnittebene der in **B,D,F,H** dargestellten Schnitte und verdeutlichen die Lage der Vasopressin-positiven Neurone und Fasern. Schnittserien sind (25µm Schnittdicke) von rostral (**A,B**) nach caudal (**G,H**) angeordnet. Die Pfeile kennzeichnen Blutgefäße. 3V, 3. Ventrikel; AHA/AHP, Area hypothalamica anterior/posterior; ARC, N. arcuatus; DMH, N. dorsomedialis; f, Fornix; LA, N. lateroanterior hypothalami; LH, Hypothalamus lateralis; ME, Eminentia mediana; MPA, Area praeoptica; MPO, N. praeopticus medialis; ox, Chiasma opticum; Pe, N. periventricularis; PeF, N. perifornicalis; PVN, N. paraventricularis; SCN, N. suprachiasmaticus; so, N. supraopticus; VMH, N. hypothalamicus ventromedialis; ZI, Zona incerta. Maßstab der Übersichtsaufnahmen 500µm, Maßstab der Vergrößerungen 100µm

4.1.2 Vasoaktives Intestinales Polypeptid-Vorkommen im Hypothalamus

Die immunzytochemischen Untersuchungen zeigten lediglich im SCN zahlreiche, dicht gepackte VIP-positive Somata, die vor allem im ventralen SCN, aber auch im medialen Teil lagen. Vereinzelt VIP-exprimierende Neurone wurden ebenfalls im dorsalen SCN gezeigt. In allen anderen hypothalamischen Kerngebieten wurden keine VIP-positiven Neurone gefunden. Ausgehend von den VIP-exprimierenden Neuronen des SCN überdeckte ein dichtes Fasernetz den gesamten Nucleus (Abb. 13A; Abb. 14B). Einige Fasern zogen aus dem Kerngebiet hinaus. In dem direkt um den SCN liegenden Gewebe und in angrenzenden Gebieten wie dem N. periventricularis (Pe, Abb. 13A; Abb. 14B), der Area praeoptica (MPA, Abb. 13A; Abb. 14B), der subparaventriculären Zone (SPa, Abb. 14D) und der Area hypothalamica (AHA/AHC/AHP, Abb. 14C-G) zogen zahlreiche feine VIP-positive Fortsätze, die ihren Ursprung im SCN hatten. Die Mehrheit der im SCN entspringenden Fasern verlief dorsolateral in Richtung der Area hypothalamica (AHA/AHC/AHP Abb. 13A; 14B,D). Unter höherer Vergrößerung wurden außerdem filigrane VIP-enthaltende Fortsätze im N. praeopticus medialis (MPO, Abb. 13A; Abb.

14B), dem Hypothalamus lateralis (LH, Abb. 14F), dem N. dorsomedialis (DMH, Abb. 13B) und dem N. arcuatus (ARC, Abb. 13C; Abb. 14H) sichtbar. Diese hypothalamischen Kerngebiete sind als Zielgebiete des SCN bekannt.

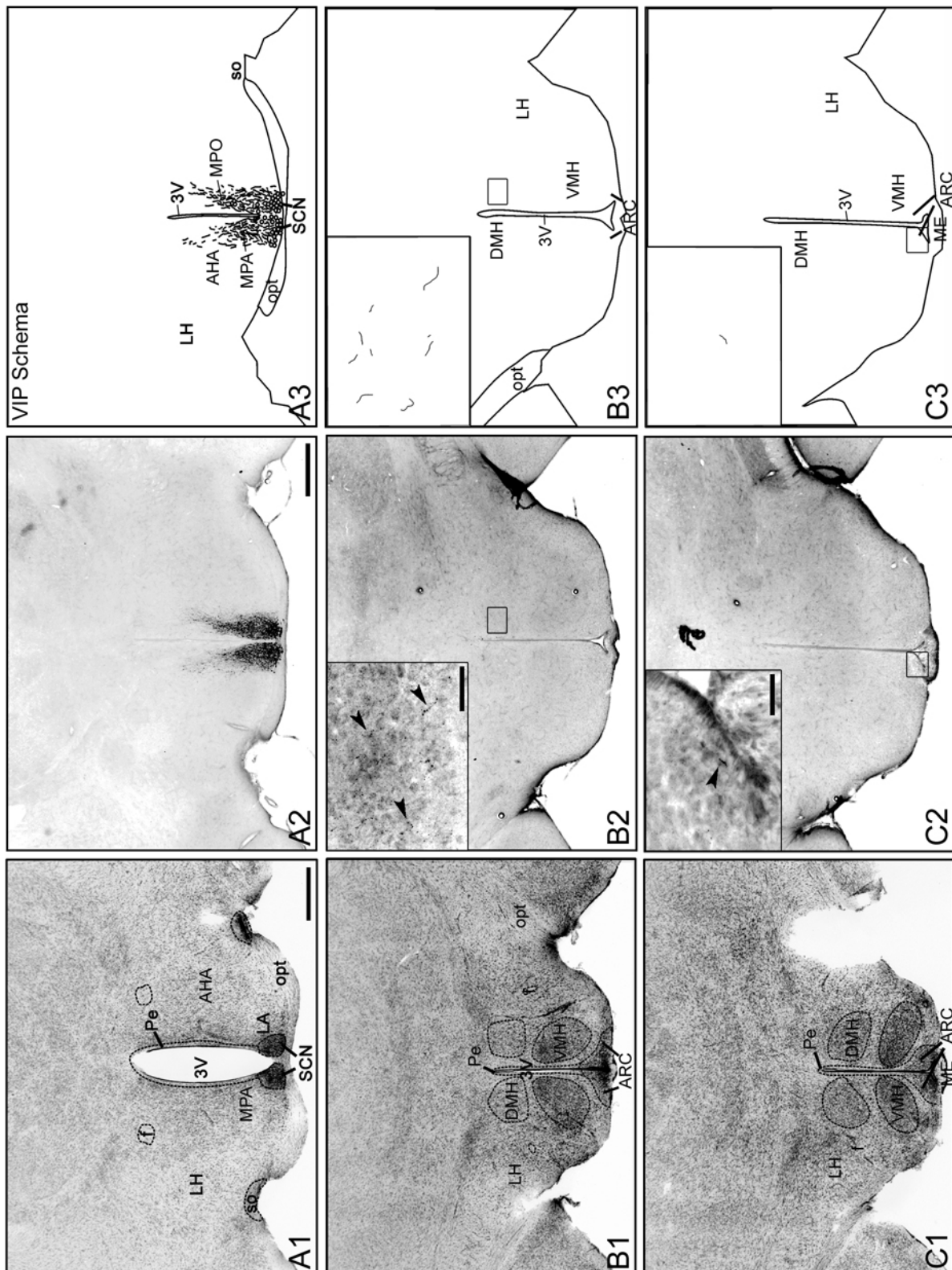


Abbildung 13: VIP-Verteilung im Hypothalamus der Maus. A1-C1 (linke Reihe): Schnittserien des Hypothalamus der CD1-Maus (Schnittdicke 25µm, von rostral **A** nach caudal **C**) mit einer Nissl-Färbung (Farbstoff: NeuroTrace); gleiche Schnittebene wie **A2-C2**.

A2-C2 (mittlere Reihe): Immunzytochemische Färbung gegen VIP im Hypothalamus der Maus. **A3-C3 (rechte Reihe):** Schematische Darstellung der VIP-positive Somata (Kreise) und Fortsätze (Linien) aus **A2-C2**.

VIP-positive Zellkörper liegen im Hypothalamus ausschließlich im SCN (**A2**). Dieses Kerngebiet ist von einem dichten Netz dünner VIP-positiver Fasern überzogen. Benachbarte hypothalamische Nuclei wie die Area praeoptica (MPA) und der N. praeopticus medialis (MPO) sind von wenigen feinen Fortsätzen durchzogen (**A2**). Andere Zielgebiete des SCN, wie der N. dorsomedialis (DMH, **B2**) und der N. arcuatus (ARC, **C2**) sind lediglich von einzelnen filigranen Fasern innerviert. Die Pfeilspitzen in den Vergrößerungen deuten auf sehr feine VIP-enthaltende Projektionen im N. dorsomedialis (DMH, **B2**) und dem N. arcuatus (ARC, **C2**). Abkürzungen siehe Abkürzungsverzeichnis. Maßstab der Übersichtsaufnahmen 500µm, Maßstab der Vergrößerungen 50µm

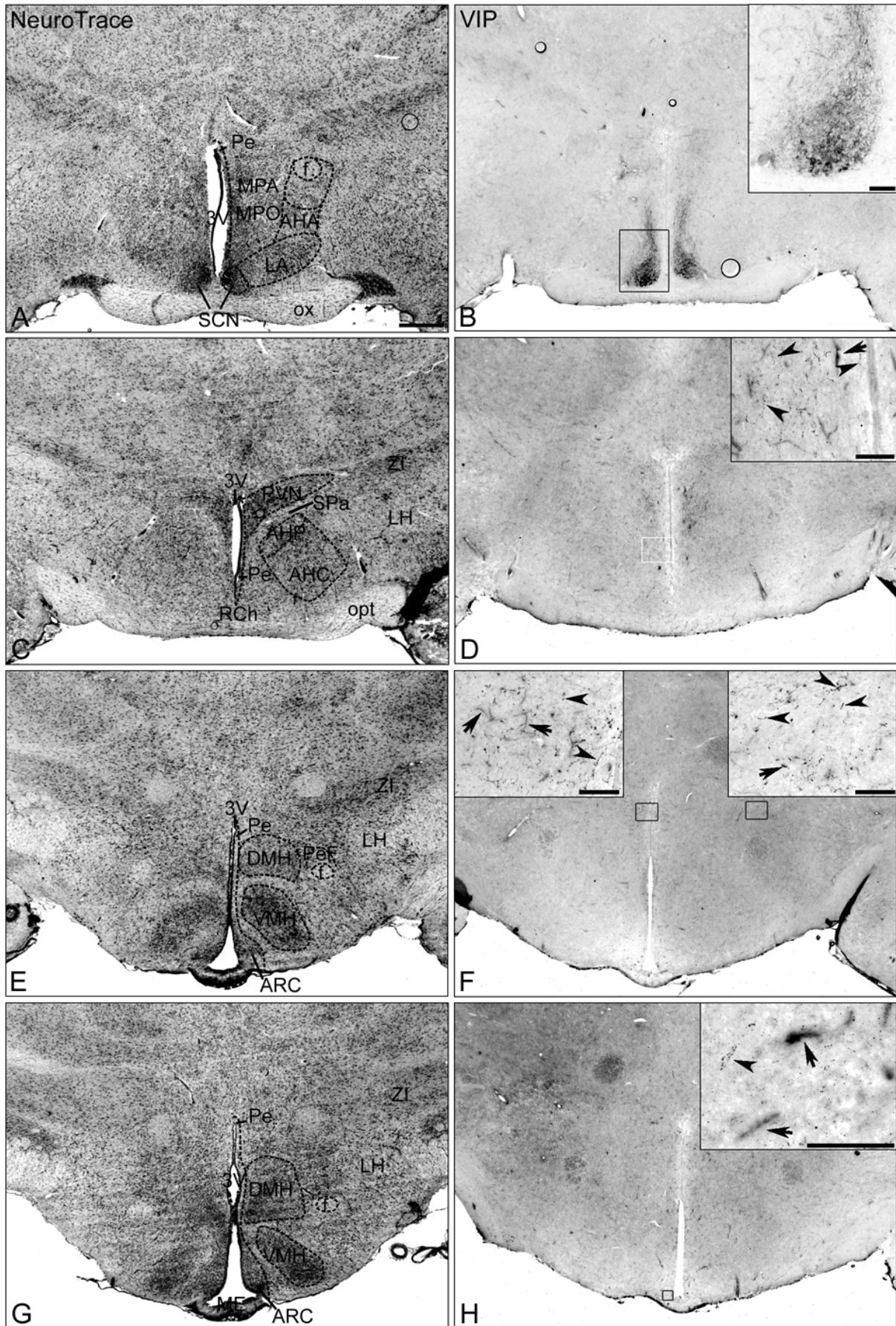


Abbildung 14: VIP-Verteilung im Hypothalamus der Ratte. A, C, E, G (linke Reihe): Hirnschnitte des Hypothalamus der Wistar-Ratte mit Nissl-Farbstoff angefärbt. **B, D, F, H**

(rechte Reihe): Immunzytochemische Färbung gegen VIP. VIP-positive Neurone liegen im Hypothalamus der Ratte ausschließlich im SCN (**B**), vorwiegend im ventralen Teil. Dieses Kerngebiet ist von einem dichten Netz feiner VIP-positiver Fasern überdeckt. Benachbarte Regionen, wie die Area praeoptica (MPA) und der N. praeopticus medialis (MPO, **B**) sowie die subparaventriculäre Zone (SPa, **D**), sind von wenigen dünnen Fortsätzen durchzogen. Einzelne, filigrane Fasern innervieren andere Zielgebiete des SCN, wie der Hypothalamus lateralis (LH, **F**) und der N. arcuatus (ARC, **H**). Pfeilspitzen innerhalb der Vergrößerung deuten auf feine VIP-Fasern. Die Pfeile kennzeichnen Blutgefäße.

Die in **A,C,E,G** abgebildeten Schnitte wurden aus einem anderen Rattengehirn hergestellt, entsprechenden der Schnittebene der Schnitte in **B,D,F,H**. Abkürzungen siehe Abkürzungsverzeichnis. Maßstab der Übersichtsaufnahmen 500µm, Maßstab der Vergrößerungen 100µm

4.1.3 Orexin A-Verteilung im Hypothalamus

Orexin A-positive Neurone wurden ausschließlich in einem begrenzten Areal des Hypothalamus gefunden, das im Wesentlichen den Hypothalamus lateralis (LH, Abb. 15A-C; Abb. 16C-G), das um die Fornix (f) befindliche Gewebe (N. perifornicalis, PeF; Abb. 15B,C; Abb. 16F,H) und die Zona incerta (ZI, Abb. 15 B,C; Abb. 16J-Q) umfasst. Daneben wurden einzelne Orexin A-positive Zellen im N. dorsomedialis gezeigt (DMH, Abb. 15 B,C; Abb. 16F). Diese limitierte Anzahl von Orexin A-exprimierenden Zellen steht im Gegensatz zu der enormen Ausdehnung der Projektionsgebiete im Gehirn. Im Bereich des medialen Hypothalamus waren Orexin A-positive Neurone sowohl ventral zur Fornix (f), als auch weiter dorsal nachzuweisen (Abb. 15B; Abb. 16F). Dagegen waren im äußerst posterioren Teil die Neurone vornehmlich dorsal zur Fornix (f) angeordnet (Abb. 15C; Abb. 16H). Orexin A-enthaltende Fasern wurden nahezu im gesamten Hypothalamus und in vielen anderen Hirnarealen gefunden. Im anterioren Hypothalamus waren Orexin A-positive Fasern vor allem in der Area praeoptica (MPA) und dem N. praeopticus medialis (MPO) zu finden (Abb. 15A; Abb. 16B). Feine Orexin A-enthaltende Fasern wurden ebenfalls im N. periventricularis (Pe, Abb. 15A,B; Abb. 16B,D,F,H) und dem N. paraventricularis gezeigt (PVN, Abb. 16D). Interessanterweise schien der SCN nur spärlich von Orexin A-enthaltenden Projektionen innerviert zu werden, während seine direkte Umgebung eine deutlich stärkere Immunfluoreszenz aufwies (Abb. 15A; Abb. 16B). Eine genaue Betrachtung des SCN belegte allerdings eindeutig, dass zahlreiche, meist feine, Orexin A-positive Fasern in das Kerngebiet hineinziehen (Abb. 15A; Abb. 16B).

Im caudal zum SCN gelegenen Hypothalamus waren vor allem Projektionen in der Area retrochiasmatica (RCh, Abb. 16D), dem N. dorsomedialis (DMH, Abb. 15B,C;

Abb. 16F), N. ventromedialis (VMH, Abb. 15B; Abb. 16F) sowie dem Hypothalamus lateralis (LH, Abb. 15B,C; Abb. 16D,F,H) in größerer Dichte vorhanden. In den N. arcuatus (ARC) zogen dagegen nur verhältnismäßig wenige Orexin A-positive Fasern (Abb. 15C; Abb. 16G).

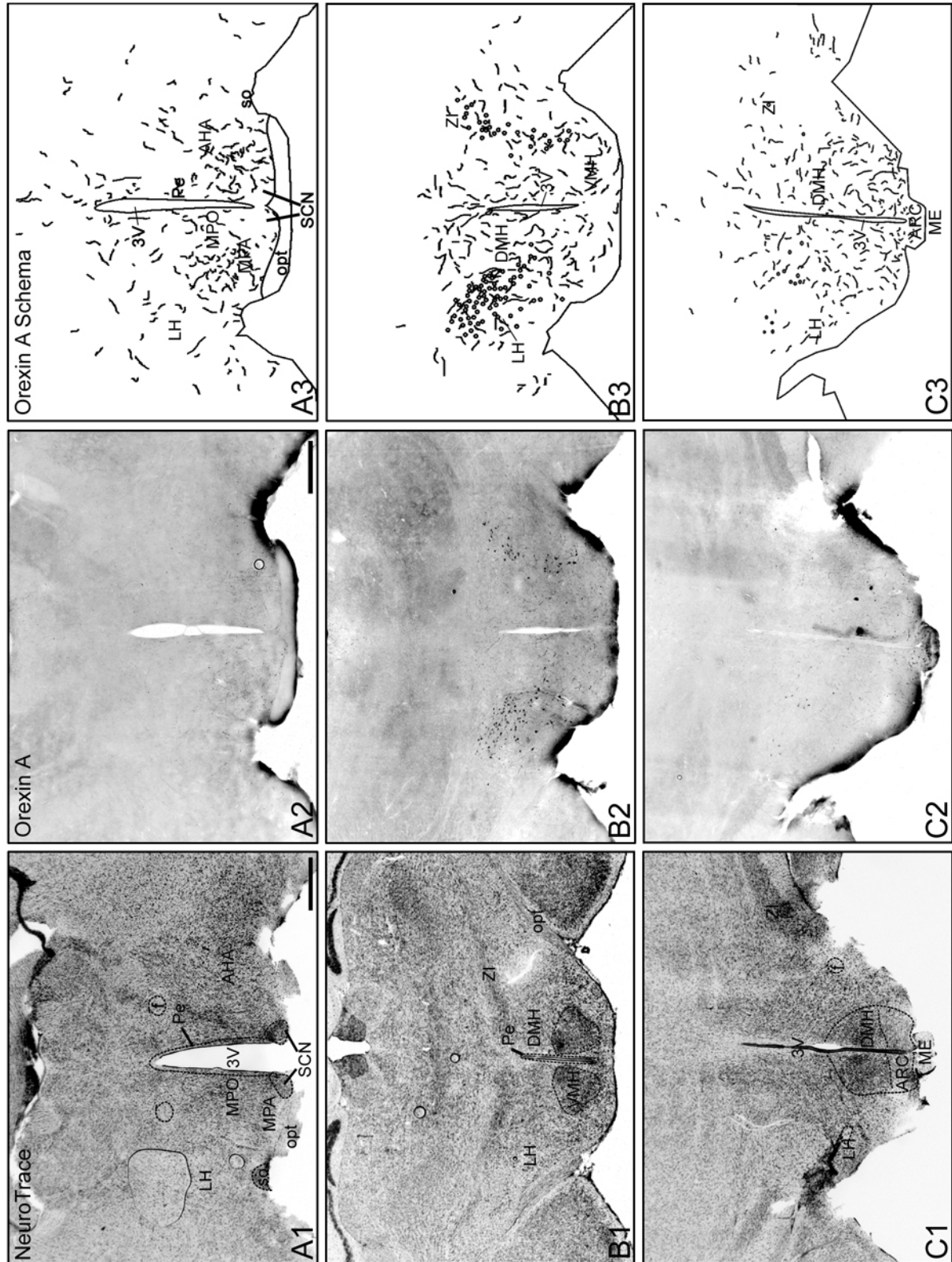


Abbildung 15: Orexin A-Verteilung im Hypothalamus der Maus. A1-C1 (Links): Coronschnitte durch den Hypothalamus der CD1-Maus angefärbt mit Nissl-Farbstoff

(NeuroTrace) zur Darstellung der Kerngebiete. **A2-C2 (Mitte)**: Immunzytochemische Färbung gegen Orexin A. **A3-C3 (Rechts)**: Schematische Darstellung der Orexin A-positiven Somata (Kreise) und Fortsätze (Linien) aus **A2-C2**.

Orexin A-exprimierende Neurone sind im Hypothalamus der Maus auf den Hypothalamus lateralis (LH), die Zona incerta (ZI) und den N. dorsomedialis (DMH, **B2-C2**) begrenzt. Orexin A-positive Fasern durchziehen dagegen nahezu den gesamten Hypothalamus. Der SCN wird weniger stark innerviert als das umgebende Gewebe, wie die Area hypothalamica (AHA), den N. praeopticus medialis (MPO) und die Area praeoptica (MPA, **A**). In caudal zum SCN gelegenen Kerngebieten, wie der Area retrochiasmatica (RCh), dem N. dorsomedialis (DMH), dem Hypothalamus lateralis (LH) und dem N. ventromedialis (VMH) sind ebenfalls reichlich Fasern vorhanden (**B2, C2**), während den N. arcuatus (ARC) nur wenige Orexin A-positiv Fortsätze durchziehen (**C2**). Um die Lage der Orexin A-positiven Neurone und Fasern genau zu bestimmen, wurden die Fluoreszenzaufnahmen der Coronalsschnitte (**A2-C2**, Schnittdicke 25µm; von rostral, **A**, nach caudal, **C**) mit benachbarten Schnitten, die mit einem Nissl-Farbstoff angefärbt wurden (**A1-C1**), verglichen und schematisiert (**A3-C3**). Abkürzungen siehe Abkürzungsverzeichnis. Maßstab 500µm

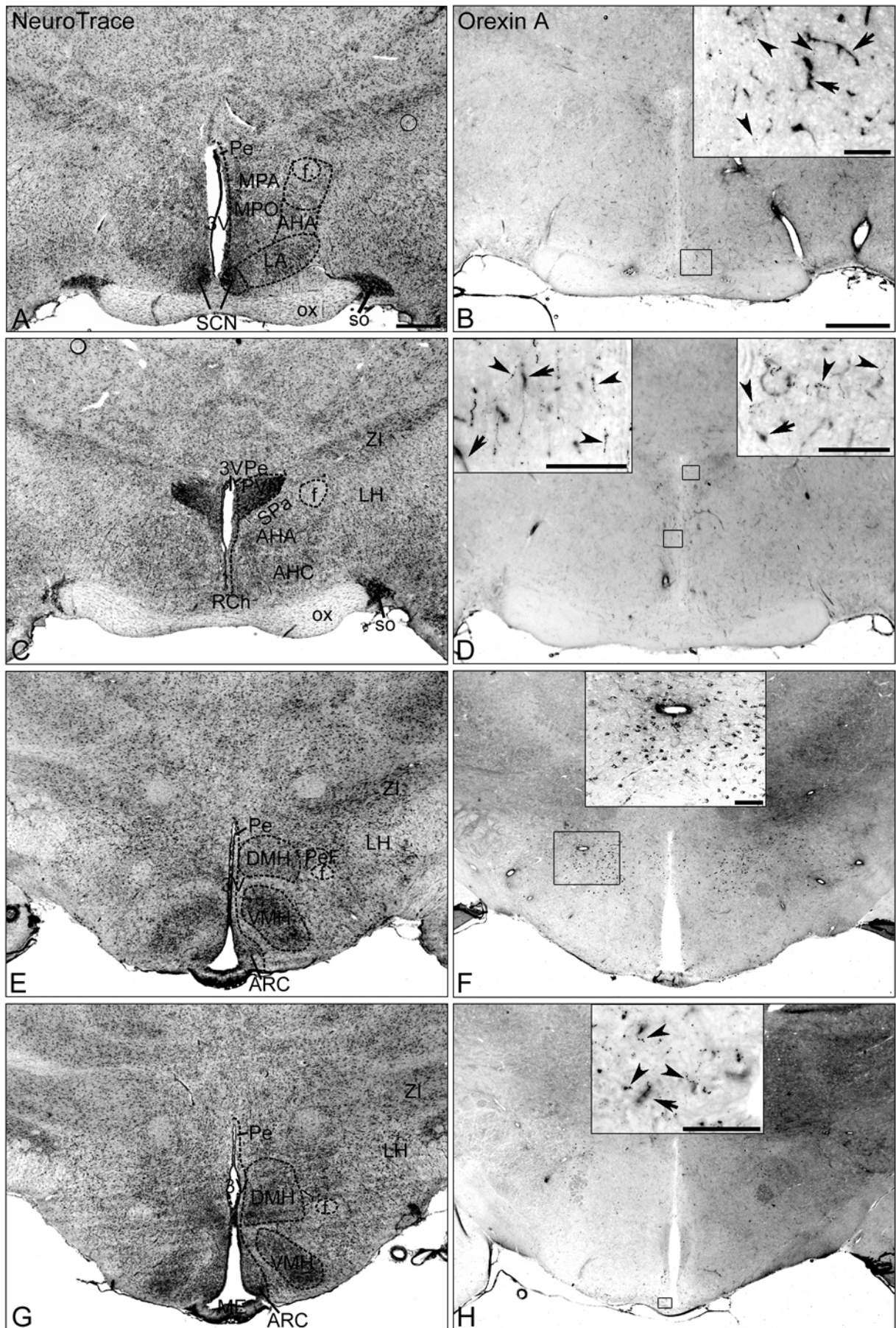


Abbildung 16: Orexin A-Verteilung im Hypothalamus der Ratte. A, C, E, G: Nissl-Färbung (NeuroTrace) coronaler Hypothalamusschnitte (Schnittdicke 25µm) zur Darstellung

der Kerngebiete im Hypothalamus. **B, D, F, H**: Immunzytochemische Färbung gegen Orexin A. Orexin A-positive Zellen liegen im Hypothalamus der Wistar-Ratte lediglich im Hypothalamus lateralis (LH), den um die Fornix (f) gelegenen N. perifornicalis (PeF), der Zona incerta (ZI) und dem N. dorsomedialis (DMH, **F**). Orexin A-positive Fasern projizieren dagegen nahezu in den gesamten Hypothalamus. Der SCN wird weniger stark innerviert als das umgebende Gewebe, wie die Area hypothalamica (AHA/AHC), der N. praeopticus medialis (MPO), die Area praeoptica (MPA) und der N. paraventricularis (PVN, **B**). In caudal zum SCN gelegenen Kerngebieten, wie der Area retrochiasmatica (RCh, **C**), dem N. dorsomedialis (DMH), dem Hypothalamus lateralis (LH) und dem N. ventromedialis (VMH) sind ebenfalls zahlreiche Fasern vorhanden, während im N. arcuatus (ARC) nur wenige Orexin-positive Fortsätze sichtbar sind (**F,H**).

Die Schnittebene der Abbildungen **A,C,E,G** entsprechen der der Abbildungen **B,D,F,H** (von rostral **A,B** nach caudal **G,H**). Die Pfeilspitzen kennzeichnen Orexin A-positive Fasern, die Pfeile Blutgefäße. Abkürzungen siehe Abkürzungsverzeichnis. Maßstab Übersichtsaufnahmen 500µm, Vergrößerungen 100µm

4.1.4 Melanin-concentrating hormone-Verteilung im Hypothalamus

MCH wird, ebenso wie Orexine, ausschließlich in der Region des lateralen Hypothalamus gebildet.

MCH-positive Zellkörper wurden im Hypothalamus lateralis (LH), der Zona incerta (ZI), den um die Fornix (f) gelegenen N. perifornicalis (PeF, Abb. 18F,H), dem N. dorsomedialis (DMH, Abb. 17B,C; Abb. 18G,H) und sehr vereinzelt im dorsalen N. paraventricularis (Pe) des Hypothalamus gefunden. Viele MCH-positive Zellkörper lagen im N. dorsomedialis (DMH) in Zellhaufen (Clustern) angeordnet.

Die MCH-exprimierenden Neurone projizierten ähnlich wie die Orexin A-exprimierenden Neurone in nahezu sämtliche Bereiche des Hypothalamus und darüber hinaus in weite Teile des Gehirns. Die Zellfortsätze waren in der Regel sehr fein und auf den Übersichtsaufnahmen nur schwer erkennbar, aber bei höheren Vergrößerungen eindeutig sichtbar. Dichte Projektionen fanden sich besonders in den Regionen des Hypothalamus, die zu den Zielgebieten des SCN zählen, wie dem Hypothalamus lateralis (Abb. 17A-C; Abb. 18D,F,H) und dem N. perifornicalis (PeF, Abb. 18D,F,H). Der SCN selbst wurde von sehr wenigen MCH-enthaltenden Fasern durchzogen (Abb. 17A; Abb. 18B), allerdings war die den SCN umgebende Region, ähnlich wie für Orexin A gezeigt, deutlich stärker innerviert. Darüber hinaus waren MCH-positive Fasern in Kerngebieten, wie dem N. dorsomedialis (DMH, Abb. 17B,C; Abb. 18F,H), dem N. praeopticus medialis (MPO, Abb. 18B), dem N. paraventricularis (PVN, Abb. 18D), dem N. ventromedialis (VMH, Abb. 17B,C; Abb.

18F,H) sowie dem N. arcuatus (ARC, Abb. 17C; Abb. 18F,H) vorhanden, die ebenfalls als Zielgebiete des SCN bekannt sind.

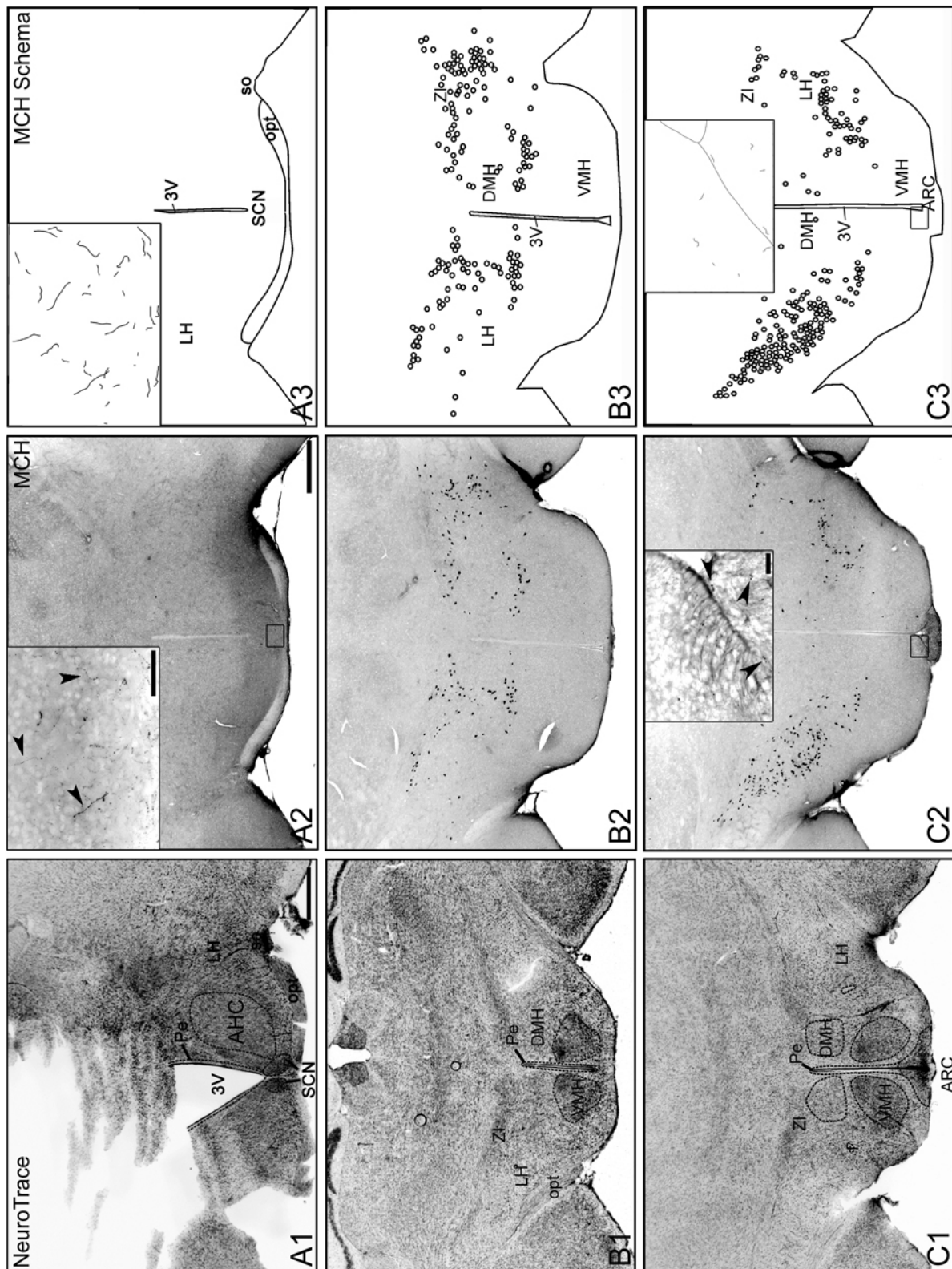


Abbildung 17: MCH-positive Neurone und Fasern im Hypothalamus der Maus. A1-C1 (linke Reihe): Coronalanschnitte durch den Hypothalamus der CD1-Maus, angefärbt mit einem Nissl-Farbstoff (NeuroTrace) zur Darstellung der Kerngebiete. **A2-C2 (mittlere Reihe):**

Immunzytochemische Färbung gegen MCH. **A3-C3 (rechte Reihe)**: Schematische Darstellung von MCH-positiven Somata (als Kreis) und Fortsätzen (Linien).

MCH-positive Zellen liegen im Hypothalamus der Maus im Hypothalamus lateralis (LH), der Zona incerta (ZI), der N. dorsomedialis (DMH) und vereinzelt im N. periventricularis (Pe, **B2-C2**). Von diesen Kerngebieten ausgehend innervieren MCH-positive Fasern nahezu den gesamten Hypothalamus. In den SCN projizieren nur wenige Fasern (**A2**). Das umgebende Gewebe, wie die Area hypothalamica (AHC, **A2**) weist eine etwas höhere Anzahl Fortsätze auf. In caudal zum SCN gelegenen Kerngebieten, wie dem Hypothalamus lateralis (LH) und um die Fornix (f) waren reichlich Fasern vorhanden (**B2, C2**), während in den N. ventromedialis (VMH) und dem N. arcuatus (ARC) nur wenige MCH-positive Fortsätze ziehen (**C2**). Die in **A1-C1** dargestellten Schnitte wurden in einem anderen Maushirn hergestellt, als die für die immunzytochemische Färbung verwendeten (**A2-C2**), entsprechen aber den gleichen Schnittebenen. Die Pfeilspitzen in den Vergrößerungen deuten auf feine MCH-enhaltende Fasern. Abkürzungen siehe Abkürzungsverzeichnis. Maßstab 500µm, Vergrößerung 50µm

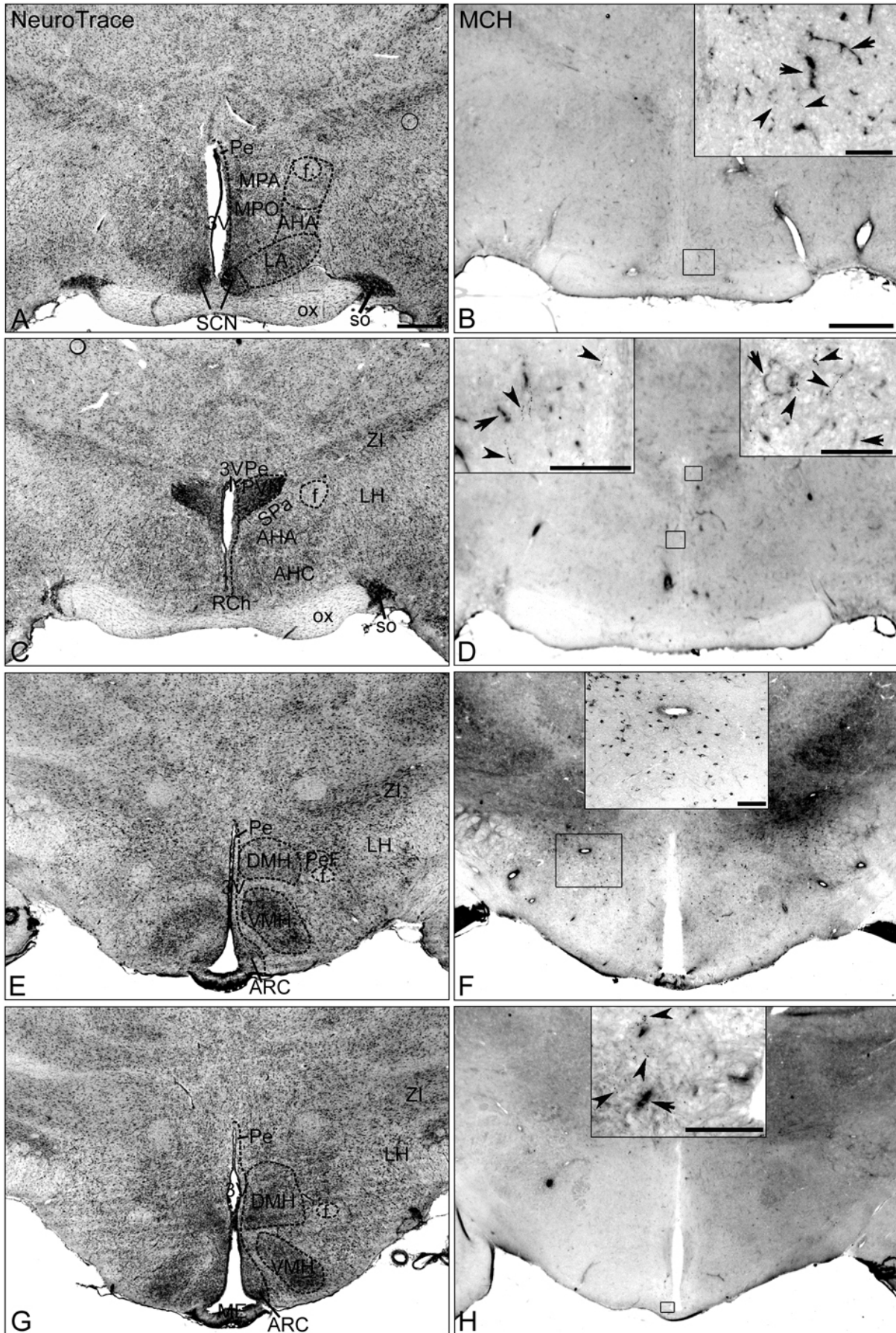


Abbildung 18: MCH-positive Neurone und Fasern im Hypothalamus der Ratte. A, C, E, G (linke Reihe): Coronalschnitte (Schnittdicke 25µm) durch den Hypothalamus einer Wistar-

Ratte, angefärbt mit dem Nissl-Farbstoff NeuroTrace zur Darstellung der Kerngebiete. **B, D, F, H (rechte Reihe)**: Immunzytochemische Färbung gegen MCH. MCH-exprimierende Zellen sind im Hypothalamus der Ratte lediglich im Hypothalamus lateralis (LH), dem um die Fornix (f) gelegenen N. perifornicalis (PeF), der Zona incerta (ZI) und dem N. dorsomedialis (DMH, **F, G**) angeordnet. MCH-positive Fasern ziehen dagegen nahezu in den gesamten Hypothalamus. Der SCN wird weniger stark innerviert als das umgebende Gewebe, wie die Area hypothalamica (AHA, AHC), der N. praeopticus medialis (MPO), die Area praeoptica (MPA, **B**). Im N. paraventricularis (PVN, **B**) und in caudal zum SCN gelegenen Kerngebieten, wie der Area retrochiasmatica (RCh, **D**), dem N. dorsomedialis (DMH), dem Hypothalamus lateralis (LH) sind reichlich Fasern vorhanden, während im N. ventromedialis (VMH) und N. arcuatus (ARC) nur wenige MCH-positive Fortsätze sichtbar sind (**F, H**).

Die Schnittebenen der abgebildeten Nissl-Färbungen in **A,C,E,G** entsprechen den Schnittebene der Abbildungen **B,D,F,H** (von rostral **A, B** nach caudal **G, H**). Die Pfeilspitzen kennzeichnen MCH-positive Fasern, die Pfeile Blutgefäße. Abkürzungen siehe Abkürzungsverzeichnis. Maßstab 500µm, Vergrößerungen 100µm

4.2 Der Nucleus suprachiasmaticus

Vasopressin- und VIP-exprimierende Neurone wurden bereits in der Einleitung (siehe 2.1) als spezifisch für den SCN vorgestellt. Beide Neuropeptide werden in unterschiedlichen Neuronenpopulationen im SCN synthetisiert (van Esseveldt et al. 2000, Moore et al. 2002), was sich in einer ungleichen räumlichen Verteilung widerspiegelt (Abb. 19).

Während VIP sowohl im Maus- als auch im Ratten-SCN vornehmlich in Zellen des ventralen Nucleus, der direkt an das Chiasma opticum angrenzt, und nur vereinzelt im medialen Bereich exprimiert wurde (Abb. 19B,D), lagen Vasopressin-positive Neurone nahezu über den gesamten SCN der Maus verteilt (Abb. 19A). Dagegen waren Vasopressin-positive Zellen bei der Ratte deutlich auf den dorsolateralen Teil begrenzt (Abb. 19C).

Zahlreiche Fortsätze der Vasopressin- und VIP-exprimierenden Neurone formten ein dichtes neuronales Netzwerk innerhalb des SCN und verließen das Kerngebiet anscheinend nicht. Auffällig war, dass im ventralen SCN weniger Vasopressin-positive Fasern vorkamen als VIP-positive Fortsätze im dorsomedialen Bereich.

Im Gegensatz zu der hohen Dichte an Vasopressin- und VIP-enthaltenden Fasern im SCN waren direkt an das Kerngebiet angrenzende Bereiche sowie weiter entfernte hypothalamische Gebiete wesentlich schwächer innerviert (siehe auch 4.1.1 und 4.1.2). Demnach waren die meisten Vasopressin- oder VIP-positiven Fasern innerhalb des SCN verschaltet und verließen das Kerngebiet nicht.

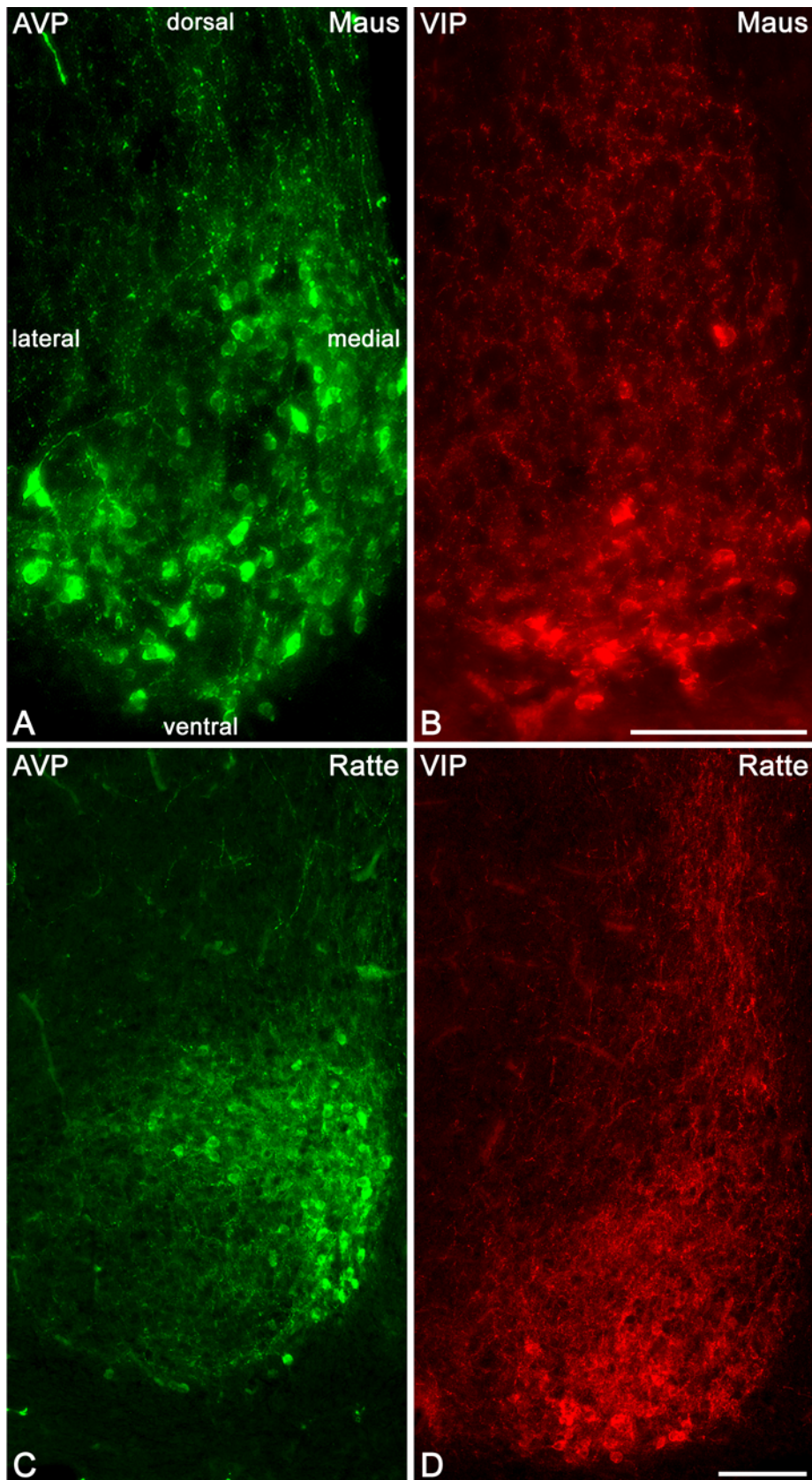


Abbildung 19: Verteilung der Neuropeptide Vasopressin und VIP im SCN. A-D: Die Fluoreszenzaufnahmen des SCN (Coronalschnitt, jeweils linke Seite abgebildet) zeigen, dass Vasopressin-positive Neurone in der CD1-Maus (A) nahezu über den gesamten Nucleus verteilt sind. Dagegen finden sich in der Wistar-Ratte Vasopressin-

positive Zellen (**C**) hauptsächlich im dorsalen Teil. VIP-exprimierende Neurone liegen in beiden Tierarten (**B** Maus; **D** Ratte) vornehmlich im ventralen SCN. Neuropeptid-enhaltende Fortsätze überdecken mit dichten Fasernetzen das Kerngebiet. Maßstab 100µm

4.2.1 GABA-Expression in Vasopressin- oder VIP-positiven Neuronen

Zur weiteren Charakterisierung der Vasopressin- und VIP-positiven Neurone wurden immunzytochemische Färbungen in der GAD67-GFP knock-in-Maus durchgeführt. Bei dieser Mauslinie fluoreszieren die GAD67-exprimierenden Neurone grün. Glutamat-Decarboxylase (GAD) ist für die Synthese von GABA aus Glutamat verantwortlich. Daher werden in dieser Arbeit die GAD67-exprimierenden Zellen als positiv für GABA angenommen. Ein Großteil der SCN-Zellen war GAD67-positiv und relativ gleichmäßig über das gesamte Kerngebiet verteilt. Die grüne Fluoreszenz war unterschiedlich stark ausgeprägt, ein Hinweis auf die ungleiche GAD67-Expression in den Zellen (Abb. 20C).

Die Verteilung der Neuropeptide bei der GAD67-GFP knock-in-Maus war im Wesentlichen vergleichbar mit der Verteilung bei der CD1-Maus. Mindestens zwei verschiedene Neuronenpopulationen im SCN bildeten Vasopressin oder VIP (Abb. 20), wobei beide Peptide niemals zusammen exprimiert wurden, wie der Literatur zu entnehmen ist (van Esseveldt et al. 2000). Ein Teil der Neurone bildete lediglich eines der beiden Neuropeptide (Abb. 20B,E; markiert mit ungefüllten Pfeilspitzen), während andere Neurone zusätzlich den GAD67 enthielten (Abb. 20B,E; gekennzeichnet durch gefüllte Pfeilspitzen). Eine quantitative Auswertung der immunzytochemischen Färbungen in der GAD67-GFP knock-in-Maus ergab, dass etwa die Hälfte der Vasopressin- beziehungsweise VIP-exprimierenden Zellen GAD67 exprimierte. Von 230 Vasopressin-positiven Neuronen waren 117 (51%) positiv für GAD67. Eine ähnliche Verteilung lag bei VIP-positiven Zellen vor. Hier waren 142 (54%) von 264 VIP-enhaltenden Neuronen GAD67-positiv. Spezifische Verteilungsmuster der GAD67-enhaltenden Vasopressin- oder VIP-exprimierenden Neurone im SCN waren nicht ersichtlich.

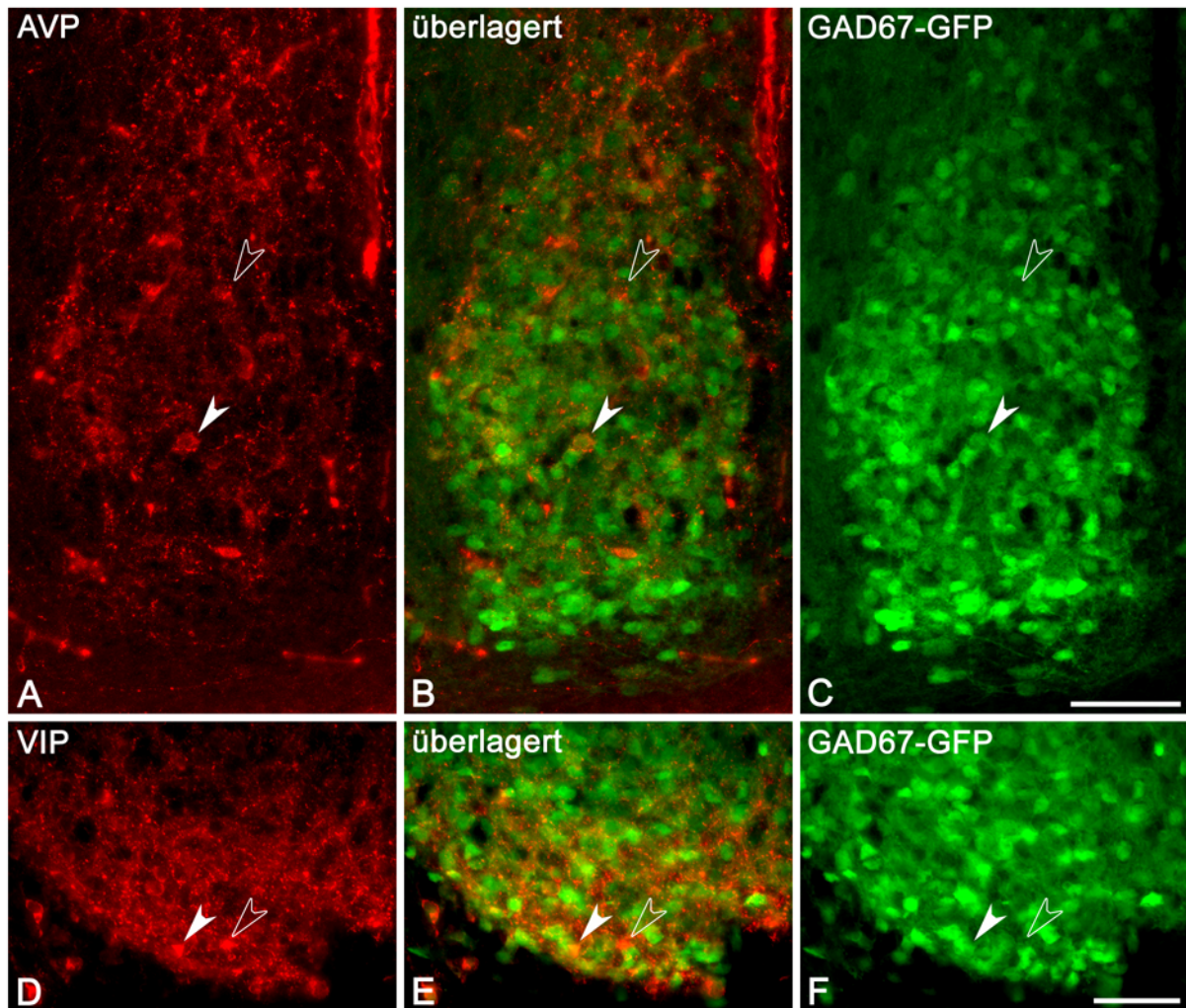


Abbildung 20: Zahlreiche Vasopressin- oder VIP-positive Neurone im SCN der Maus exprimieren GAD67. A-F: Fluoreszenzaufnahmen von Vasopressin (A) und VIP (D) mit GFP (C,F) in coronalen SCN-Schnitten der GAD67-GFP knock-in-Maus. **A-C:** Immunzytochemische Doppelmarkierung gegen Vasopressin (A, roter Kanal) und GFP zur Verstärkung des GAD67-GFP-Signals (C, grüner Kanal). Die ungefüllte Pfeilspitze deutet auf ein Neuron, das Vasopressin-positiv und nicht GAD67-positiv ist; die gefüllte auf eine Zelle, die sowohl Vasopressin, als auch GABA exprimiert und in der Überlagerung (B) rot/grün erscheint. **D-F:** Immunzytochemische Doppelmarkierung gegen VIP (D, roter Kanal) und GFP (F, grüner Kanal) im ventralen SCN. Die ungefüllte Pfeilspitze markiert ein Neuron, das positiv für VIP und nicht GAD67-positiv ist, die gefüllte eine Zelle, die sowohl VIP-, als auch GAD67-positiv ist. Dieses Soma erscheint in der Überlagerung (E) gelb. Maßstab 50µm

4.2.2 Afferente Projektionen aus dem lateralen Hypothalamus

Viele Fasern anderer hypothalamischer Nuclei projizieren in den SCN, wie beispielsweise Orexin A- oder MCH-positive Fortsätze, die dem lateralen Hypothalamus entspringen (Abb. 23). Zum lateralen Hypothalamus werden in dieser Arbeit der N. dorsomedialis (DMH), der Hypothalamus lateralis (LH), der N. perifornicalis (PeF) und die Zona incerta (ZI) gerechnet. Um aufzuklären, welche

Neurone des SCN durch diese Projektionen innerviert werden, wurden immunzytochemische Doppelmarkierungen gegen Vasopressin oder VIP mit Orexin A oder MCH durchgeführt.

Orexin A-positive Fasern durchzogen den gesamten SCN, ohne dass eine eindeutige lokale Verdichtung sichtbar war. Lediglich im Übergangsbereich zu umgebenden Kerngebieten war die Faserdichte höher. In der Regel waren die Projektionen ausgesprochen dünn, nur vereinzelt war der Faserdurchmesser recht groß (Abb. 21A). Weder bei der Ratte (nicht abgebildet) noch bei der Maus waren Verbindungen zu Vasopressin-positiven Perikarya oder auch Fortsätzen erkennbar (Abb. 21B). Dies wurde durch immunzytochemische Anfärbungen der Munc 13-1-EYFP-Maus bestätigt, bei der das präsynaptische Protein Munc 13-1 mit dem Fluorophor EYFP markiert ist und so einzelne Synapsen präzise lokalisiert werden können (siehe 2.6). Auf den Vasopressin-positiven Zellkörpern und Fortsätzen (nicht abgebildet) sowie auf den Orexin A-enthaltenden Projektionen waren zwar viele Synapsen zu sehen (Abb. 24I-K), allerdings konnten keine direkten Verbindungen zwischen den Orexin A-positiven Fasern und Vasopressin-exprimierenden Zellen gezeigt werden. Die Verteilung der Vasopressin-positiven Zellen und der Orexin A-enthaltenden Fasern war bei der Munc 13-1-EYFP-Maus identisch zu derjenigen in der CD1-Maus.

MCH-positive Fortsätze kamen in wesentlich geringerer Anzahl im SCN vor als Orexin A-positive Fasern (Abb. 21C). Der Vergleich der Bilder 21A mit C belegt, dass MCH-enthaltende Fasern deutlich filigraner sind als Orexin A-positive Projektionen. Immunzytochemische Doppelmarkierungen im SCN der Maus verdeutlichten, dass die MCH-positiven Fortsätze keine Vasopressin-exprimierenden Neurone innervierten (Abb. 21D). Interessanterweise waren im SCN der Ratte deutliche Kontaktstellen zwischen MCH- und Vasopressin-positiven Fasern erkennbar (Abb. 22). Diese Kontakte beschränkten sich auf den dorsalen Bereich des Kerngebiets und konnten lediglich vereinzelt gefunden werden.

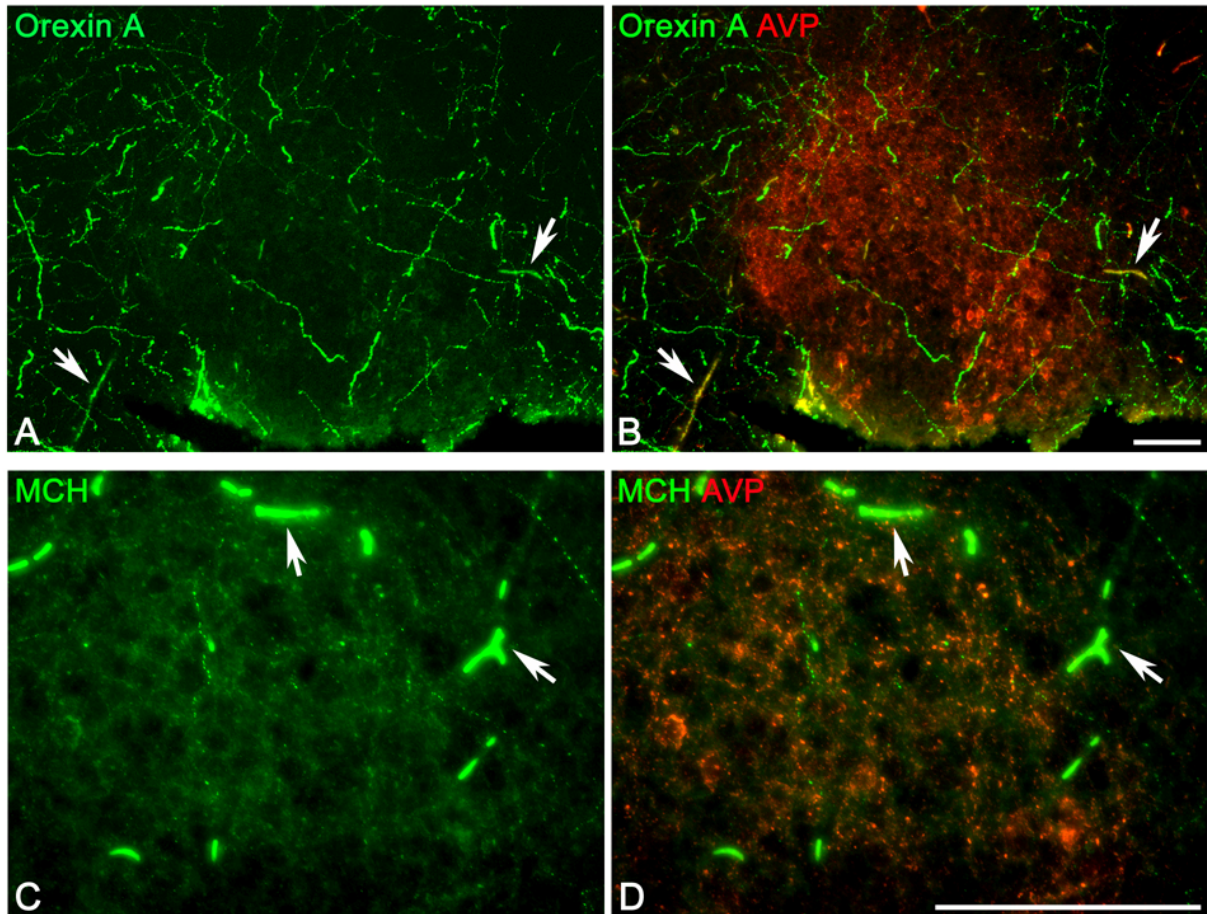


Abbildung 21: Orexin A- und MCH-positive Fasern projizieren nicht zu Vasopressin-exprimierenden Neuronen im SCN der Maus. **A, B:** Fluoreszenzaufnahmen gegen Orexin A (grün) und Vasopressin (rot) im SCN einer CD1-Maus. Sagittalschnitt als Projektion dargestellt. **A:** Orexin A-positive Fasern innervieren das gesamte Kerngebiet, jedoch in geringerer Dichte als das umliegende Gewebe. **B:** Die Überlagerung der Kanäle weist keine Kontaktstellen zwischen Vasopressin-enthaltenden Neuronen und orexinergen Projektionen auf. **C, D:** Fluoreszenzaufnahmen gegen MCH (grün) und Vasopressin (rot) im Coronalschnitt, als Projektion abgebildet. **C:** Feine MCH-positive Fasern projizieren in das gesamte Kerngebiet, allerdings in geringerer Dichte als in das umliegende Gewebe. **D:** Die Überlagerung der Kanäle weist keinerlei Kontaktpunkte zwischen Vasopressin-exprimierenden Neuronen und MCH-positiven Projektionen auf. Die Pfeilspitzen markieren MCH-positive (**D**) Fasern, die Pfeile Blutgefäße. Maßstab 100µm

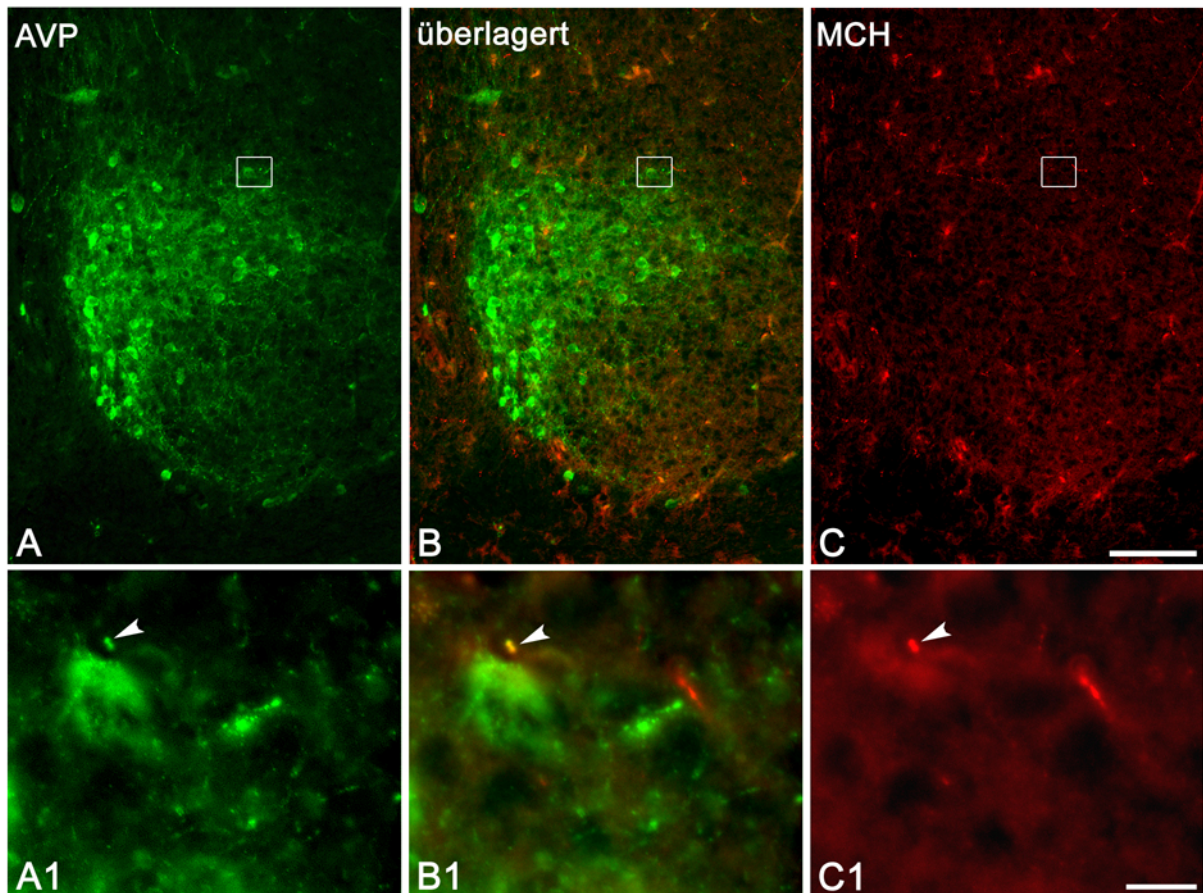


Abbildung 22: MCH-positive Fasern projizieren im dorsalen SCN der Ratte auf Vasopressin-positive Fortsätze. **A-C:** Fluoreszenzaufnahme der Neuropeptide Vasopressin (grün) und MCH (rot) eines Coronalschnitts im Bereich des SCN der Ratte. **A:** Die immunzytochemische Färbung gegen Vasopressin (grüner Kanal) verdeutlicht das Verteilungsmuster des Neuropeptids im SCN. **C:** Die Abbildung der immunzytochemischen Färbung gegen MCH (roter Kanal) zeigt, dass lediglich wenige, feine MCH-positive Fasern in den SCN ziehen. **B:** In der Überlagerung wird sichtbar, dass MCH-positive Fasern direkten Kontakt zu Vasopressin-positiven Fasern im dorsalen SCN herstellen. Der umrahmte Ausschnitt ist in **A1-C1** in höherer Vergrößerung und als Einzelbild dargestellt. Die Pfeilspitzen kennzeichnen die Kontaktstelle zwischen den Fasern. Maßstab A-C 100µm, A1-C1 10µm

Immunzytochemische Färbungen gegen VIP und Orexin A im SCN der Ratte zeigten, dass zwischen den VIP-exprimierenden Zellen zahlreiche Orexin A-positive Fasern entlang ziehen (Abb. 24).

Im ventralen SCN wurden vereinzelt bei hoher Vergrößerung Kontaktpunkte zwischen VIP-exprimierenden Zellkörpern und Orexin A-positiven Fasern sowie zwischen VIP- und Orexin A-positiven Fortsätzen sichtbar (Abb. 24 I,II), die sich allerdings auf den ventralen SCN beschränkten. Aufgrund des punktförmigen Aussehens dieser Berührungsstellen, ist von synaptischen Kontaktstellen auszugehen.

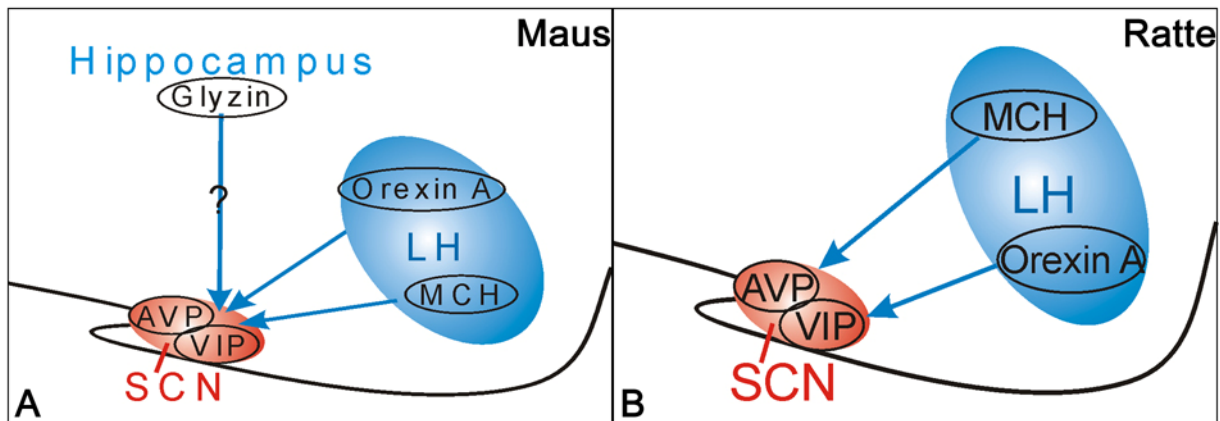


Abbildung 23: Eingangswege des SCN. **A:** Der SCN der Maus wird durch Orexin A- und MCH-positive Fasern innerviert, deren Zielzellen unbekannt sind. Glyzin-positive Fasern innervieren Vasopressin (AVP)-enthaltende Fortsätze im SCN. Der Ursprung der Glyzin-positiven Fasern könnte der Hippocampus sein. **B:** Im SCN der Ratte werden Vasopressin-exprimierende Neurone vereinzelt durch MCH-positive Fasern innerviert. Einige Orexin A-enthaltende Fortsätze des lateralen Hypothalamus (LH) projizieren auf VIP-exprimierende Neurone. Modifiziert nach Saper et al. 2005.

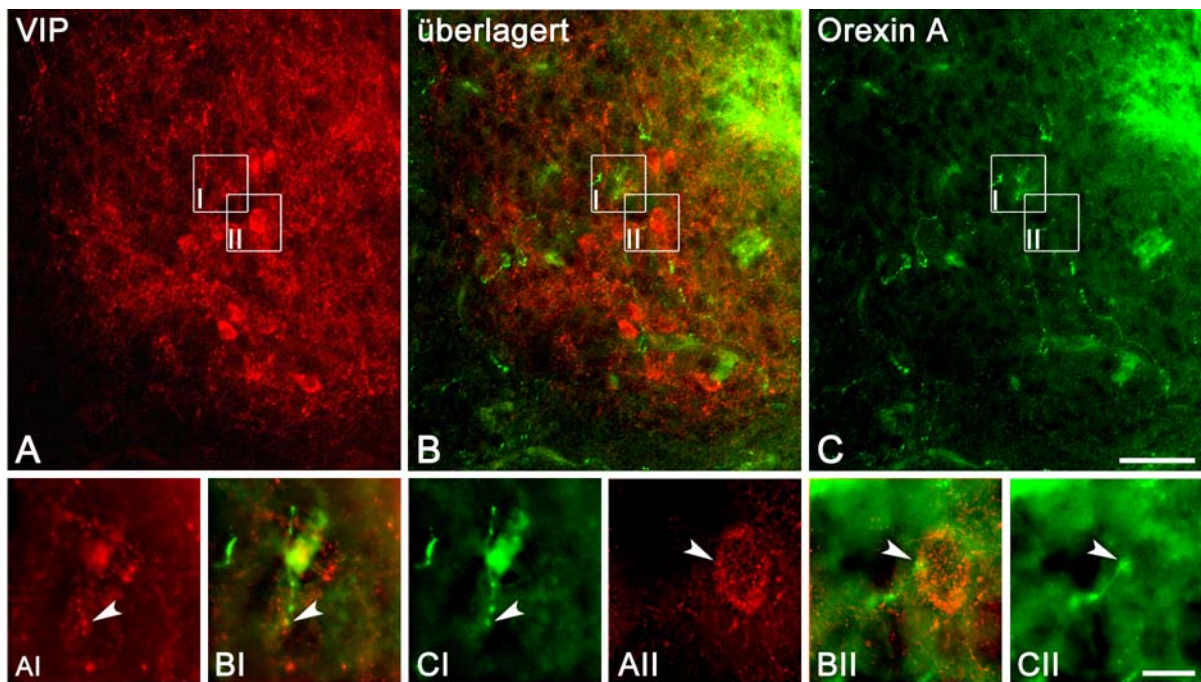


Abbildung 24: Orexin A-positive Projektionen innervieren VIP-exprimierende Neurone im SCN der Ratte. **A-C:** Fluoreszenzaufnahmen der Neuropeptide VIP (rot) und Orexin A (grün) im Coronalchnitt des ventralen SCN. **A:** Die immunzytochemische Färbung gegen VIP verdeutlicht das Verteilungsmuster VIP-exprimierender Zellen im ventralen Teil des SCN. **C:** Die immunzytochemische Färbung gegen Orexin A zeigt die relativ schwache Innervierung des SCN durch Orexin A-positive Projektionen. **B:** Aus der Überlagerung beider Kanäle wird deutlich, dass Orexin A-enthaltende Fasern sowohl auf VIP-positive Fortsätze (I), als auch Somata (II) projizieren. Die umrahmten Ausschnitte aus **A-C** sind in **AI-CII** in höherer Vergrößerung als Einzelbilder abgebildet. Die Kontaktpunkte sind durch Pfeilspitzen markiert. Maßstab A-C 50µm, AI-CII 10µm

Bei der CD1-Maus wurden keinerlei mögliche Kontaktstellen zwischen Orexin A-positiven Fasern und VIP-exprimierenden Neuronen gefunden. Die Identifizierung von Kontakten wurde durch das dichte Geflecht VIP-positiver Fortsätze im SCN erschwert. Aus diesem Grund wurden die Experimente bei der Munc 13-1-EYFP-Maus wiederholt, um eventuelle synaptische Kontakte besser zu erkennen (Abb. 25). Obwohl eine Vielzahl von Synapsen auf den VIP-exprimierenden Neuronen und Orexin A-positiven Fasern gezeigt werden konnten (Abbildung 25C-K), waren Berührungspunkte zwischen VIP-exprimierenden Neuronen und Orexin A-enthaltenden Projektionen nicht sichtbar (Abb. 25).

Überdies konnte kein eindeutiger Beweis für die Innervierung VIP-positiver Neurone durch MCH-positive Projektionen erbracht werden (nicht abgebildet).

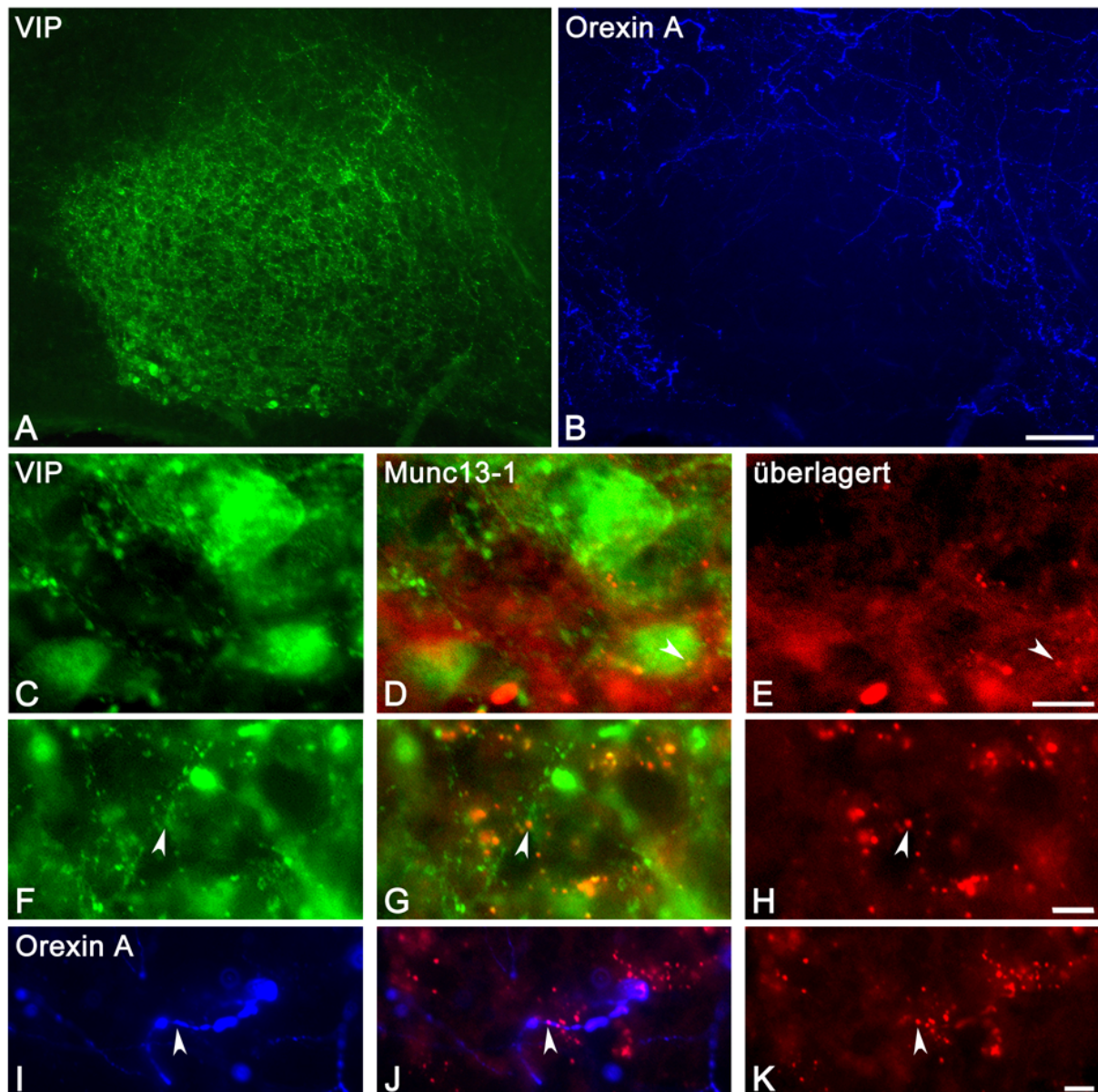


Abbildung 25: VIP-exprimierende Neurone im SCN bilden Synapsen aus. A, B: Immunzytochemische Färbung gegen VIP (grüner Kanal) und Orexin A (blauer Kanal) in

einem Sagitalschnitt der Munc 13-1-EYFP-Maus. VIP-exprimierende Neurone werden nicht von Orexin A-positiven Fasern innerviert. Das Verteilungsmuster der Neuropeptide in der Munc 13-1-EYFP-Maus entspricht dem in der CD1-Maus. **C-H**: Immunzytochemische Färbung gegen VIP (**C,F**, grüner Kanal) in einem anderen Hirnschnitt der Munc 13-1-EYFP-Maus (**E,H**, roter Kanal), als Einzelbilder in höherer Vergrößerung dargestellt. **D,G**: In den Überlagerungen markieren Pfeilspitzen Synapsen, die sowohl auf VIP-positiven Somata (**D**) als auch auf Fasern ausgebildet sind (**G**). **I-K**: Immunzytochemische Färbung gegen Orexin A (**I**, blauer Kanal) im SCN der Munc 13-1-EYFP-Maus (**K**, roter Kanal). **J**: In der Überlagerung ist eine auf den Orexin A-positiven Fasern liegende Synapse mit einer Pfeilspitze gekennzeichnet. Maßstab A, B 100µm, C-K 10µm

4.2.3 Glyzin-enthaltende Afferenzen zum N. suprachiasmaticus

Die mögliche Bedeutung von Glyzin im SCN ist bislang weitgehend unbekannt. Daher wurde unter Verwendung der GlyT2-EGFP-Maus untersucht, ob SCN-Neurone selbst Glyzin exprimieren beziehungsweise ob der SCN von glyzinerger Projektionen innerviert wird (Abb. 23).

In der GlyT2-EGFP-Maus zogen vereinzelt Glyzin-positiv Fortsätze in den SCN hinein, glyzinerge Somata konnten dagegen nicht gezeigt werden (Abb. 26C). Die Mehrzahl der in Richtung des Kerngebiets laufenden Glyzin-positiven Fasern endete allerdings bereits in der direkten Umgebung des SCN, wie der Region des N. periventricularis am 3. Ventrikel (Abb. 26C).

Immunzytochemische Anfärbungen in der GlyT2-EGFP-Maus zeigten, dass weder VIP-exprimierende Neurone, noch Orexin A- oder MCH-positive Fasern Glyzin enthalten oder Ziel glyzinerger Fortsätze sind (nicht abgebildet). Allerdings wurden Vasopressin-positiv Fasern im ventromedialen Nucleus von Glyzin-positiven Fasern innerviert (Abb. 26A-C), über deren Ursprung bislang nichts bekannt ist.

Die Verteilung der vier genannten Neuropeptide in der GlyT2-EGFP-Maus ist vergleichbar mit der in der CD1-Maus.

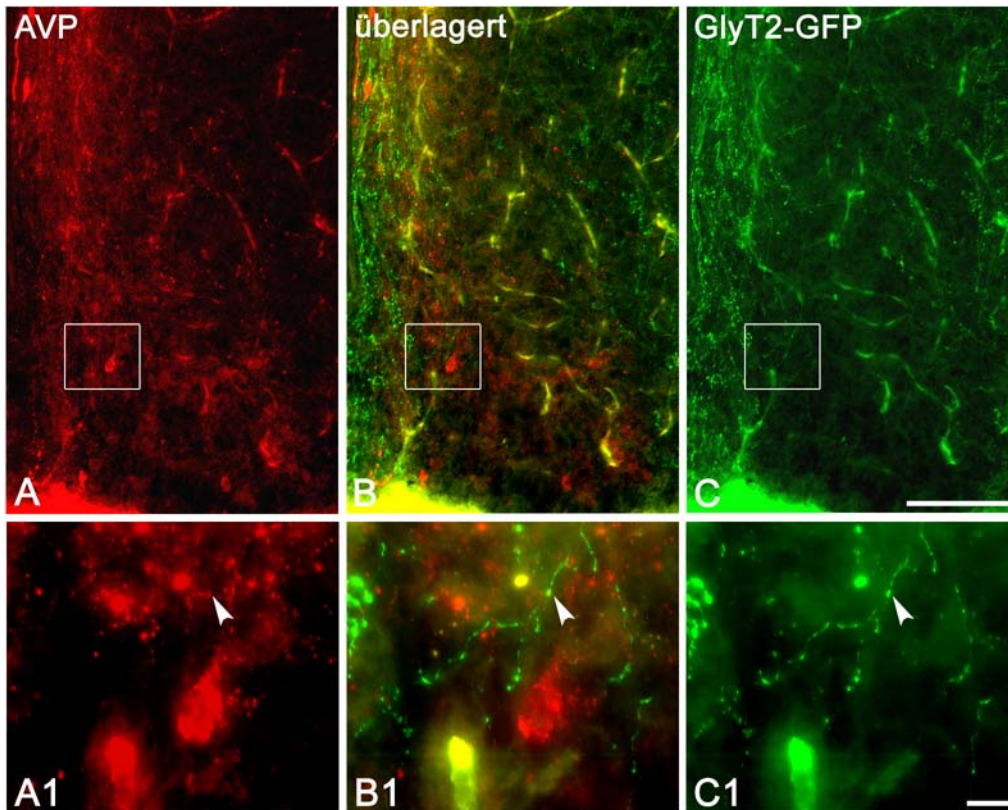


Abbildung 26: Glyzin-positive Fasern innervieren Vasopressin-positive Fortsätze im SCN der Maus. **A-C:** Fluoreszenzaufnahme des Neuropeptids Vasopressin (**A**, rot) im Coronalchnitt des SCN der GlyT2-EGFP-Maus (**C**, grün) als Projektion dargestellt (10x Objektiv). **A:** Immunzytochemische Färbung gegen Vasopressin; **C:** Immunzytochemische Färbung gegen GFP. **B:** Überlagerung beider Kanäle. **A1-C1:** Einzelbilder der umrahmten Ausschnitte aus **A-C** bei höherer Vergrößerung (63x Objektiv). Die Pfeilspitze markiert die Kontaktstelle zwischen Vasopressin-positivem Fortsatz und glyzinerger Faser Maßstab A-C 100µm, A1-C1 10µm

4.3 Der laterale Hypothalamus – Zielgebiet des N. suprachiasmaticus

In der vorliegenden Arbeit werden der Hypothalamus lateralis (LH), der am 3. Ventrikel gelegene N. dorsomedialis (DMH), der die Fornix umgebende N. perifornicalis (PeF) sowie die Zona incerta (ZI) zum lateralen Hypothalamus gezählt. Als spezifische Neuropeptide für diese Region wurden, durch immunzytochemische Färbungen, Orexin A und MCH identifiziert. Diese Neuropeptide wurden ausschließlich in Neuronen des lateralen Hypothalamus exprimiert, die unterschiedliche Neuronenpopulationen bildeten (Abb. 27). Die räumliche Ausdehnung der beiden Neuronentypen variierte von rostral nach caudal. Im rostralen Hypothalamus waren Orexin A- und MCH-exprimierende Neurone sowohl ventral als auch dorsal zur Fornix gelegen, dagegen im caudalen Teil nur dorsal zur

Fornix. Eindeutige Unterschiede zwischen den untersuchten Spezies, Maus und Ratte, waren nicht erkennbar (siehe auch 4.1.3 und 4.1.4). Beide Neuronenpopulationen waren eng untereinander vermischt und bildeten ein dichtes Fasernetz aus (Abb. 27), wobei die beiden Neuropeptide niemals zusammen in derselben Zelle gefunden wurde. In den Gehirnschnitten wurden Kontakte zwischen Orexin A- und MCH-positiven Dendriten, zwischen Somata und Dendriten sowie zwischen den Zellkörpern der beiden Neuronenpopulationen immunzytochemisch gezeigt (Abb. 27B,D). Vermutlich handelte es sich um synaptische Kontakte, da immunzytochemische Anfärbungen in der Munc 13-1-EYFP-Maus zahlreiche Synapsen erkennen ließen, die auf Orexin A-positiven Neuronen ausgebildet waren (nicht abgebildet). Daher ist es wahrscheinlich, dass Orexin A-positive Fortsätze bereits innerhalb des lateralen Hypothalamus verschaltet sind und nur ein Teil der Fasern in andere Hirnregionen projiziert.

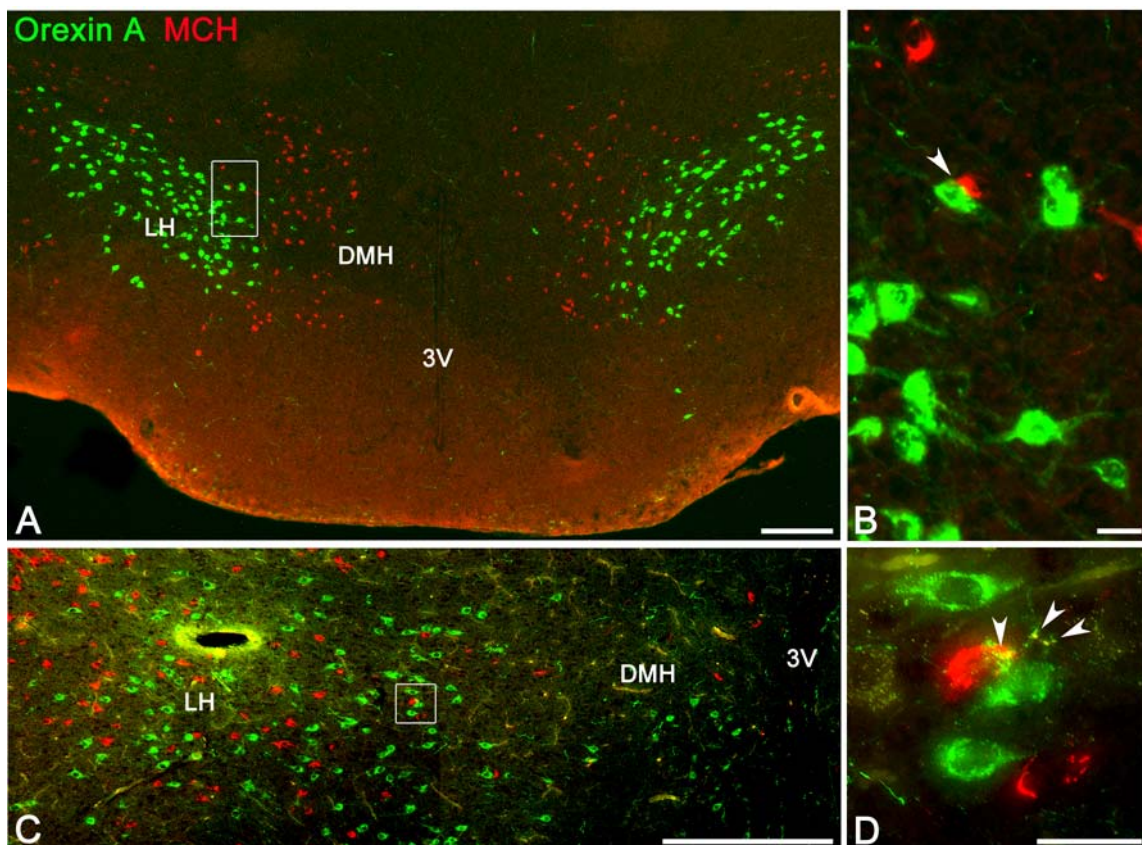


Abbildung 27: Verteilung Orexin A- und MCH-exprimierender Neurone im lateralen Hypothalamus. A-D: Immunzytochemische Färbungen gegen Orexin A (grüner Kanal) und MCH (roter Kanal) des N. dorsomedialis (DMH) und Hypothalamus lateralis (LH) der Maus (A, B) und Ratte (C, D) (coronale Schnittebene). A, C: Orexin A und MCH werden in verschiedenen Neuronenpopulationen exprimiert (als Projektion dargestellt). B: Detailansicht aus A (umrahmtes Rechteck) in höherer Vergrößerung als Einzelbild; die Pfeilspitze markiert den Kontakt zwischen einem Orexin A- und einem MCH-positiven Soma. D: Abbildung des umrahmten Ausschnitts aus C als

Einzelbild in höherer Vergrößerung, in dem die Pfeilspitzen sowohl Faser-Faser-, als auch Faser-Zellkörper-Kontakt zwischen einem MCH- und einem Orexin A- positivem Neuron kennzeichnen. 3V, 3.Ventrikel. Maßstab A, C 250µm; B, D 20µm

In 4.2.1 wurde der SCN als ein Zielgebiet Orexin A- und MCH-positiver Projektionen vorgestellt. Aus dieser Beobachtung ergaben sich folgende Fragestellungen:

Ziehen efferente Projektionen des SCN, Vasopressin- oder VIP-positive Fortsätze, in den lateralen Hypothalamus? Stehen diese Fasern in direktem Kontakt mit Orexin A- oder MCH-exprimierenden Neuronen?

Wie bereits in 4.1.1 und 4.1.2 gezeigt werden konnte, ziehen sowohl feine Vasopressin-, als auch VIP-positive Fasern in den lateralen Hypothalamus, deren Ursprung der SCN sein könnte (Abb. 28). Allerdings wurden auch im lateralen Hypothalamus einige wenige Vasopressin-positive Neurone (Abb. 29C), die eine eigene Zellpopulation bildeten, identifiziert, sodass anhand der verwendeten immunzytochemischen Methode der Ursprung der meisten Vasopressin-positiven Fasern nicht zweifelsfrei geklärt werden konnte.

Zur Darstellung möglicher Kontaktpunkte zwischen den unterschiedlichen Neuronenpopulationen wurden immunzytochemische Doppelmarkierungen gegen jeweils zwei Neuropeptide an coronalen Hypothalamusschnitten von Maus und Ratte durchgeführt. Die oben erwähnte Vasopressin-exprimierende Zellpopulation lag ventral zu den MCH-positiven Neuronen. Einige wenige, feine Vasopressin-positiv Fasern wurden inmitten der Orexin A- und MCH-exprimierenden Zellen gezeigt. Diese Fasern zogen teilweise nahe an Orexin A- oder MCH-exprimierenden Zellen vorbei, bildeten allerdings keine direkten Kontakte aus (Abb. 29A,C). Dorsal zum Chiasma opticum und zum N. supraopticus verliefen zahlreiche Vasopressin-positiv Fortsätze, die vermutlich aus dem N. supraopticus stammten (Abb. 29C).

Feine VIP-positive Fasern durchzogen den lateralen Hypothalamus (Abb. 29B,D). Diese Fasern bildeten ebenfalls keine direkten Kontakte zu Orexin A- oder MCH-positiven Neuronen aus, sodass nicht zweifelsfrei geklärt werden konnte, welchen Zelltyp diese Fasern innervieren. Ebenso blieb die Herkunft dieser Fortsätze ungeklärt, da sie mit Hilfe der hier durchgeführten immunzytochemischen Experimente nicht bis zu ihrem Ursprung zurückverfolgt werden konnten. Es ist aber nicht auszuschließen, dass die Somata teilweise im SCN liegen.

Die immunzytochemischen Befunde ergaben keine wesentlichen Unterschiede zwischen Maus und Ratte, daher ist in Abbildung 29 lediglich eine exemplarische Abbildung der Färbungen dargestellt.

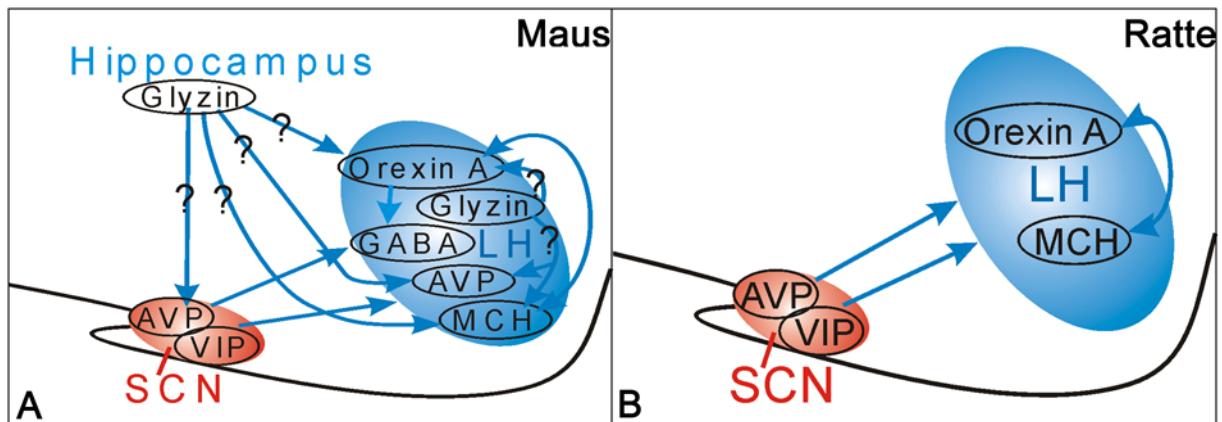


Abbildung 28: Eingangswege in den lateralen Hypothalamus. A: Der laterale Hypothalamus (LH) der Maus wird von Vasopressin- und VIP-positiven Fasern innerviert, deren Ursprung wahrscheinlich im SCN liegt. Zielzellen der Vasopressin-enthaltenden Fasern im LH sind beispielsweise GAD-positive Zellen. Im lateralen Hypothalamus gelegene Orexin A-, MCH- und Vasopressin-exprimierende Neurone werden durch Glyzin-positive Fortsätze innerviert, deren Ursprung im lateralen Hypothalamus selbst oder im Hippocampus liegen könnte. Orexin A- und MCH-exprimierende Neurone stehen in Verbindung zueinander. **B:** Auch in den lateralen Hypothalamus der Ratte ziehen Vasopressin- und VIP-enthaltende Fortsätze, die vermutlich dem SCN entspringen. Die Zielzellen dieser Fortsätze im LH sind unbekannt. Modifiziert nach Saper et al. 2005.

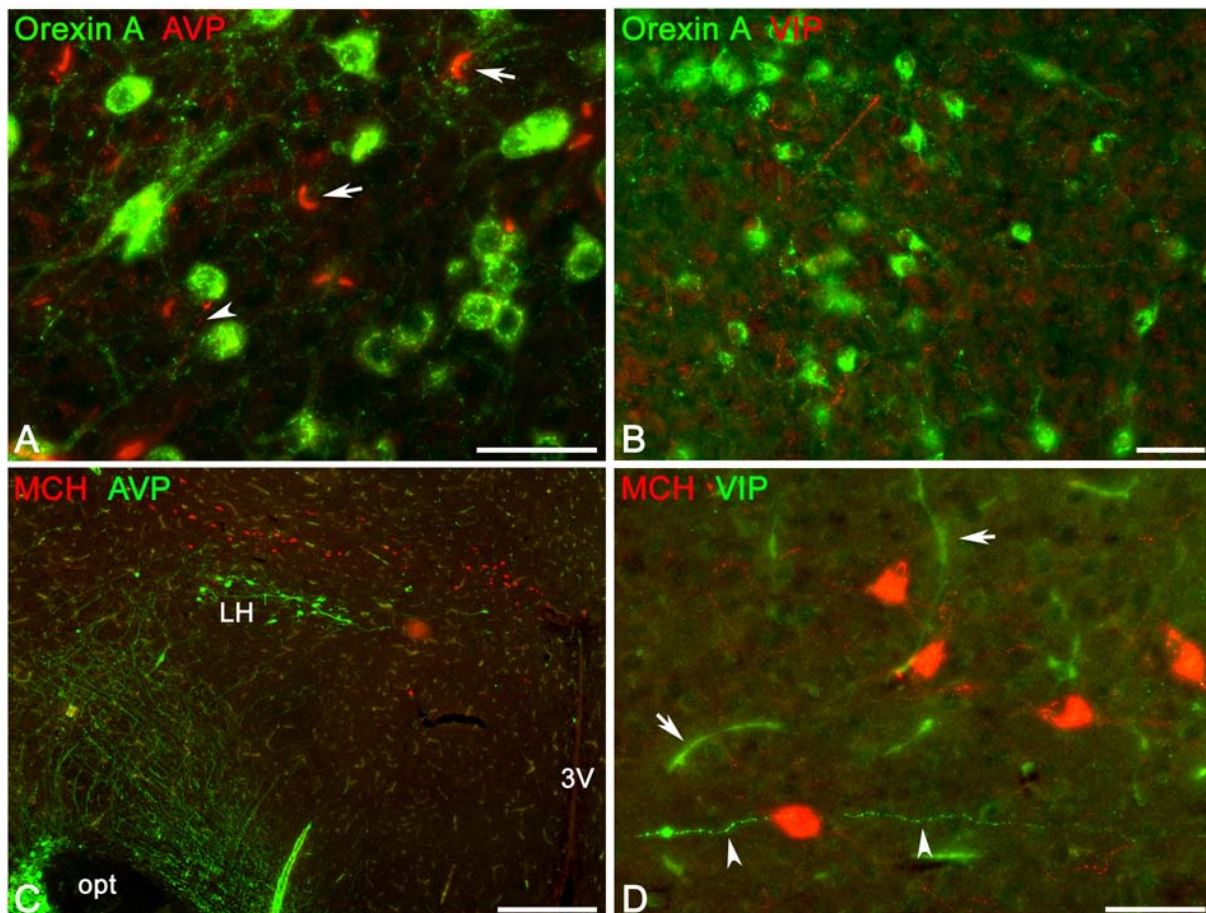


Abbildung 29: Orexin A- oder MCH-exprimierende Neurone bilden keine direkten Kontakte mit Vasopressin- oder VIP-positiven Fasern im lateralen Hypothalamus aus. **A:** Die immunzytochemische Färbung gegen Orexin A (grün) und Vasopressin (rot) verdeutlicht, dass vereinzelt, feine Vasopressin-positive Fasern (Pfeilspitze) zwischen Orexin A-exprimierenden Neuronen der Maus verlaufen, ohne Kontakte auszubilden. **B:** Immunzytochemische Färbungen gegen Orexin A (grün) und VIP (rot) zeigen feine VIP-positive Fasern bei der Maus, die Orexin A-exprimierende Neurone nicht direkt innervieren. **C:** Immunzytochemische Färbung bei der Ratte gegen MCH (rot) und Vasopressin (grün). Vasopressin-exprimierende Neurone bilden eine separate Neuronenpopulation, die keine direkten Kontakte zu MCH-positiven Zellen besitzen. **D:** Immunzytochemische Färbung gegen MCH (rot) und VIP (grün). Ein direkter Kontakt zwischen MCH-positiven Neuronen und VIP-positiven Fasern (Pfeilspitze) in der Maus ist nicht vorhanden. Die Pfeile markieren Blutgefäße. 3V, 3. Ventrikel; LH, lateraler Hypothalamus; opt, Tractus opticus. Maßstab A, B, D 50µm; C 500µm

4.3.1 Der Neurotransmitter GABA im lateralen Hypothalamus

Um zu klären mit welchen anderen Neuronengruppen Orexin A-, MCH- und Vasopressin-exprimierende Zellen sowie VIP-positive Fasern im lateralen Hypothalamus in direkter Verbindung stehen, wurden immunzytochemische Färbungen in der GAD67-GFP knock-in-Maus vorgenommen.

Orexin A: GAD67-positive beziehungsweise GABAerge Zellen waren in großer Zahl im lateralen Hypothalamus vorhanden und schienen eindeutig von den Orexin A-positiven Zellen abgegrenzt zu sein (Abb. 30A,B). Aus den Untersuchungen von über 2600 orexinergen Zellen in Fluoreszenzaufnahmen ging eindeutig hervor, dass Orexin A und GAD67 (bzw. GABA) nicht in denselben Neuronen exprimiert werden. Allerdings wurden GABAerge Neurone identifiziert, die durch perlschnurartig geformte Orexin A-positive Fasern innerviert wurden (Abb. 30, vergrößerte Einzelbilder). Diese perlschnurartige Struktur der Fasern deutet auf synaptische Kontaktstellen hin.

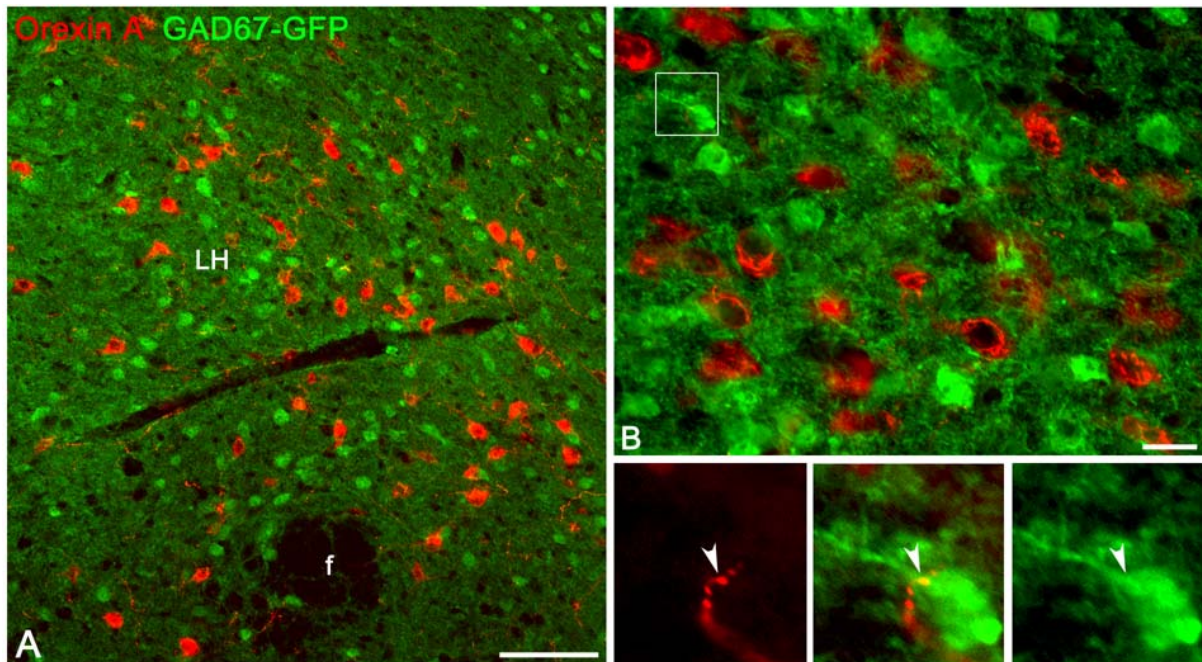


Abbildung 30: Orexin A und GAD67 werden im lateralen Hypothalamus nicht gemeinsam in einer Zelle exprimiert. **A, B:** Immunzytochemische Färbungen gegen Orexin A (rot) und GFP (grün), zur Verstärkung des GAD67-GFP-Signals, als Projektion abgebildet. Coronarschnitt im lateralen Hypothalamus (LH) der GAD67-GFP knock-in-Maus. Viele Orexin A und GAD67-positive Zellen liegen im LH und bilden zwei getrennte Zellpopulationen. **B:** Fluoreszenzaufnahme bei höherer Vergrößerung (40x Objektiv). Das eingerahmte Detail aus **B** ist in den unteren Abbildungen in Kanäle aufgetrennt und als Einzelbild dargestellt (links: Orexin A, rechts: GAD67-GFP; Mitte: Überlagerung). Die Pfeilspitze markiert die Kontaktstelle zwischen der GABAergen Zelle und der Orexin-enthaltenden Faser, die in der Überlagerung gelb erscheint. f, Fornix, LH, lateraler Hypothalamus. Maßstab A 100µm; B 20µm

MCH: Im Gegensatz zu den Orexin A-exprimierenden Neuronen waren viele MCH-positive Zellen im lateralen Hypothalamus auch positiv für GAD67 (Abb. 31). Etwa die Hälfte aller MCH-positiven Neurone exprimierte GAD67. Regionale Unterschiede konnten dabei im lateralen Hypothalamus nicht festgestellt werden, vielmehr schienen beide Neuronentypen gleichmäßig verteilt nebeneinander vorzukommen. Die quantitative Auszählung der Neuronenpopulationen für verschiedene Bereiche des lateralen Hypothalamus bestätigte dieses Resultat: im Hypothalamus lateralis (LH) waren 54% (927 von 1729) der MCH-exprimierenden Neurone positiv für GAD67, im N. dorsomedialis (DMH) 58% (224 von 384) und in der Zona incerta (ZI) waren 54% (187 von 347) der ausgezählten MCH-positiven Zellen auch GAD67-positiv.

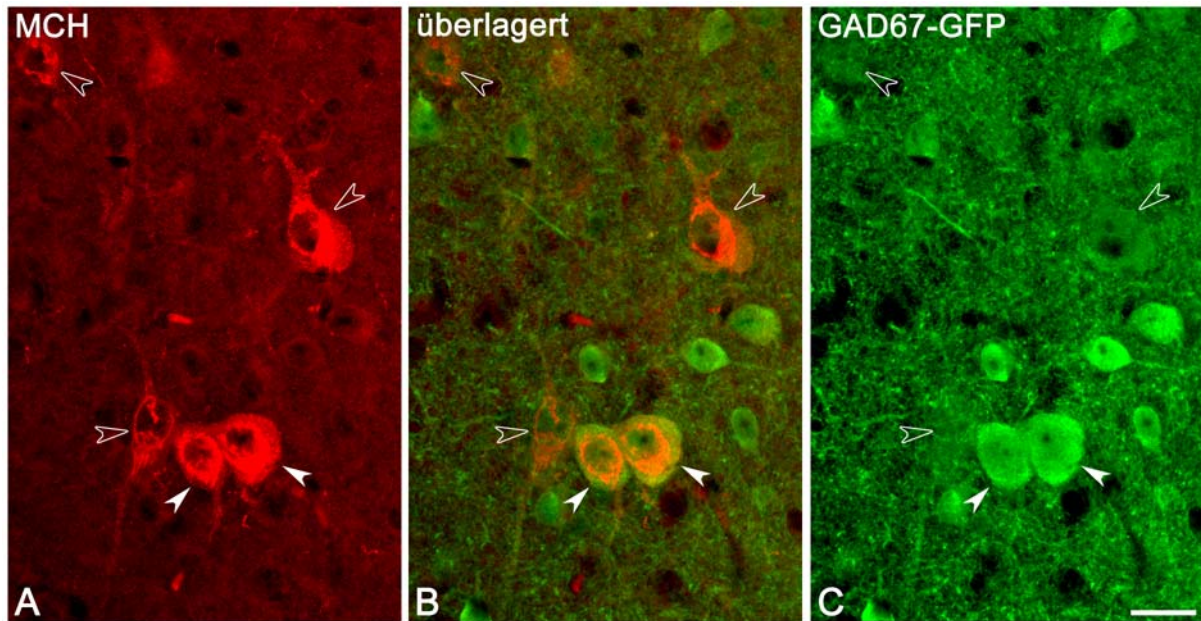


Abbildung 31: Zwei verschiedene MCH-positive Neuronenpopulationen im lateralen Hypothalamus der Maus. A-C: Fluoreszenzaufnahme des Neuropeptids MCH (rot) mit GAD67-GFP (grün) im Coronalchnitt des Hypothalamus lateralis der GAD67-GFP-knock-in-Maus. **A:** Immunzytochemische Färbung gegen MCH (roter Kanal). **C:** Immunzytochemische Färbung gegen GFP. **B:** Die Überlagerung verdeutlicht, dass mindestens zwei MCH-positive Neuronenpopulationen im lateralen Hypothalamus vorkommen. Eine Population exprimiert neben MCH auch GABA (gefüllte Pfeilspitzen), die zweite bildet lediglich MCH (ungefüllte Pfeilspitzen). Maßstab 20µm

Vasopressin: In der GAD67-GFP knock-in-Maus konnten im Gegensatz zu den Wildtyp-Mäusen beziehungsweise Ratten keine Vasopressin-positiven Zellkörper im lateralen Hypothalamus gefunden werden, sondern lediglich Vasopressin-enthaltende Fortsätze, die zum Teil direkt an GAD67-positiven Zellen entlang zogen und zu diesen Kontakte ausbildeten (Abb. 32A-C). Da die Struktur der Projektionen perlschnurartig war, handelte es sich wahrscheinlich meist um synaptische Kontaktpunkte.

VIP: Weit weniger VIP- als Vasopressin-positiv Fasern innervierten den lateralen Hypothalamus (Abb. 32D-F). Die VIP-positiven Projektionen schienen meist feiner. Zwischen VIP- und GAD-positiven Fasern konnten keine eindeutigen Kontaktstellen nachgewiesen werden.

In Abschnitt 4.2 wurde bereits dargelegt, dass etwa 50% der Vasopressin- oder VIP-positiven Neurone GAD67-positiv. Daher überraschte es keineswegs, dass nicht alle Vasopressin- oder VIP-positiven Fasern GABA enthalten (nicht abgebildet). Durch die GFP-Expression im Neuropil waren diese Projektionen häufig nicht vom Hintergrund zu unterscheiden.

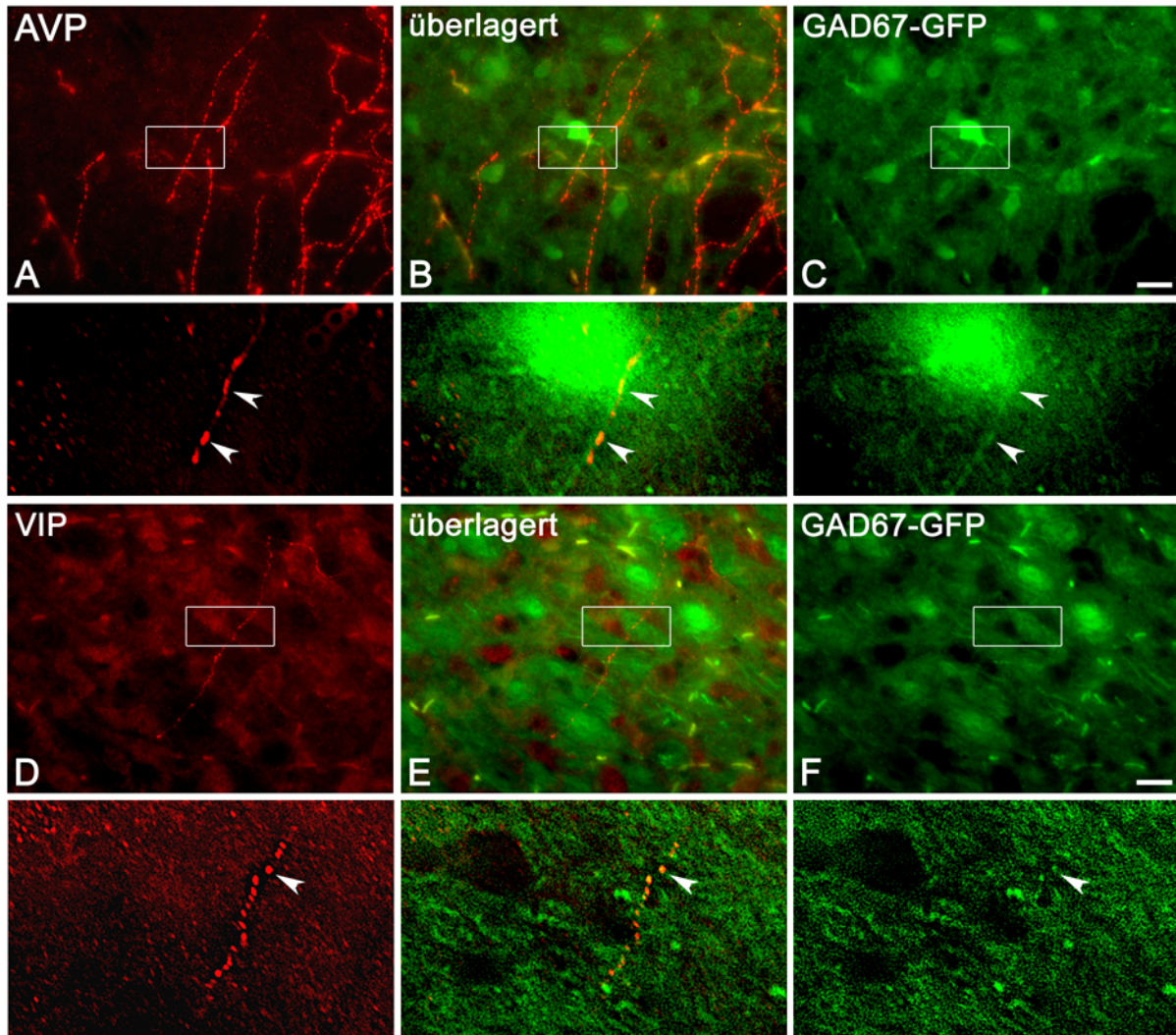


Abbildung 32: Vasopressin- und VIP-positive Fasern im lateralen Hypothalamus. **A-C:** Fluoreszenzaufnahmen von Vasopressin (rot) mit GFP (grün) im lateralen Hypothalamus der GAD67-GFP knock-in-Maus. **A:** Immunzytochemische Färbung gegen Vasopressin. **C:** Immunzytochemische Färbung gegen GFP. **B:** Überlagerung der beiden Kanäle. In den darunter liegenden Abbildungen sind die umrahmten Ausschnitte aus **A-C** vergrößert und als Einzelbilder dargestellt. Zur Optimierung der Auswertung wurden diese Bilder durch Dekonvolution berechnet. Die obere Pfeilspitze markiert den Berührungspunkt zwischen Vasopressin-enthaltender Faser und GAD-positivem Zellkörper, der gelb erscheint; die untere weist auf einen GABAergen Fortsatz, der parallel zur Vasopressin-positiven Faser verläuft. **D-F:** Fluoreszenzaufnahmen von VIP (rot) mit GFP (grün) im lateralen Hypothalamus der GAD67-GFP knock-in-Maus. **D:** Immunzytochemische Färbung gegen VIP. **F:** Immunzytochemische Färbung gegen GFP. **E:** Überlagerung der beiden Kanäle. In den darunter liegenden Abbildungen sind die umrahmten Ausschnitte aus **D-F** vergrößert und als Einzelbilder dargestellt. Zur Optimierung der Auswertung wurden die Bilder durch Dekonvolution berechnet. Die Pfeilspitzen kennzeichnen eine VIP-positive Faser, die auch GAD-positiv ist. Maßstab 20µm

4.3.2 Der Neurotransmitter Glyzin im lateralen Hypothalamus

Um mögliche Verschaltungen Glyzin-positiver Fasern im lateralen Hypothalamus genauer zu untersuchen, wurde die GlyT2-EGFP-Maus als Hilfsmittel verwendet.

Im lateralen Hypothalamus dieser Mauslinie war ein dichtes, grün-fluoreszierendes Fasernetz und sehr vereinzelt liegende, glyzinerge Somata sichtbar, die alleine nicht der Ursprung des dichten Fasergeflechts sein konnten (Abb. 33B). Dagegen lagen im Hippocampus zahlreiche Glyzin-positive Zellen, deren Fortsätze möglicherweise in den lateralen Hypothalamus ziehen (Abb. 33A). Aufgrund der Dichte des Fasergeflechts war es allerdings nicht möglich einzelne Projektionen zu verfolgen und präzise Aussagen über deren Verlauf zu treffen.

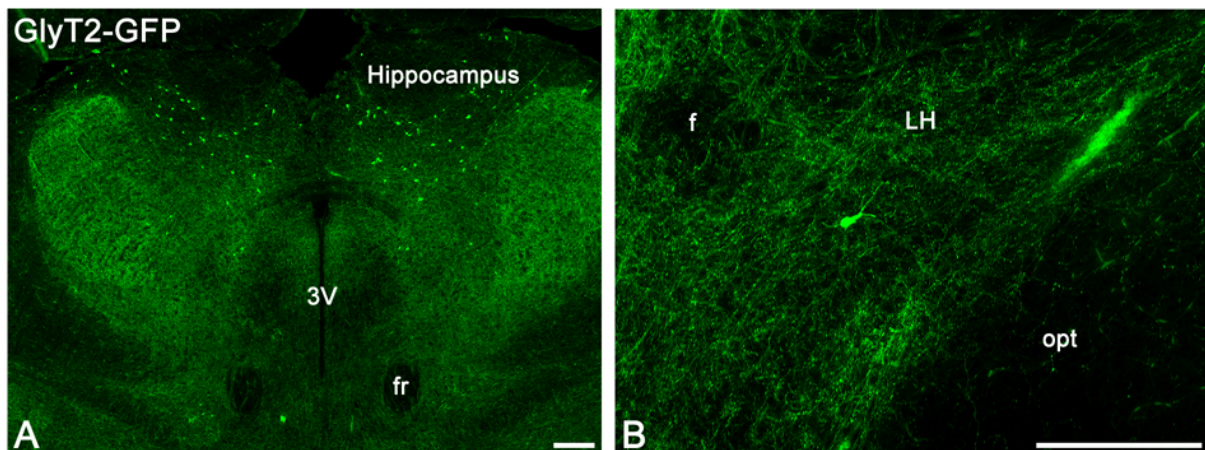


Abbildung 33: Coronale Ausschnitte aus dem Gehirn einer GlyT2-EGFP-Maus. A: Coronaler Schnitt durch den Hippocampus auf Höhe des posterioren Hypothalamus. In den hippocampalen Strukturen liegen Glyzin-positive Zellen. Der Hippocampus sowie benachbarte Gebiete sind von einem dichten Glyzin-enthaltenden Fasergeflecht durchzogen. **B:** Coronalchnitt durch den Hypothalamus lateralis (LH). Lediglich einzelne Zellen exprimieren Glyzin. Der LH ist von einem dichten Netz glyzinerger Projektionen durchzogen, die unzählige Verzweigungen und Verästelungen aufweisen. 3V, 3. Ventrikel, f, Fornix, fr, Fasciculus retroflexus. Maßstab 250µm

Orexin A / MCH: Immunzytochemische Färbungen gegen Orexin A und MCH zur Darstellung der Neuropeptide im lateralen Hypothalamus der GlyT2-EGFP-Maus zeigten, dass Glyzin-positive Fasern sowohl Orexin A- (Abb. 34AI-CI), als auch MCH-exprimierende (Abb. 34DII-FII) Somata innervieren und in direktem Kontakt zu Orexin A- (Abb. 34AII-CII) und MCH-enthaltenden Fortsätzen (Abb. 34DI-FI) stehen. Beide Neuronenpopulationen lagen eingebettet in einem dichten Netz Glyzin-enthaltender Fasern (Abb. 34B,E), die unzählige Varikositäten ausbildeten (Abb. 34C,F). Wahrscheinlich handelt es sich bei diesen Varikositäten um Synapsen.

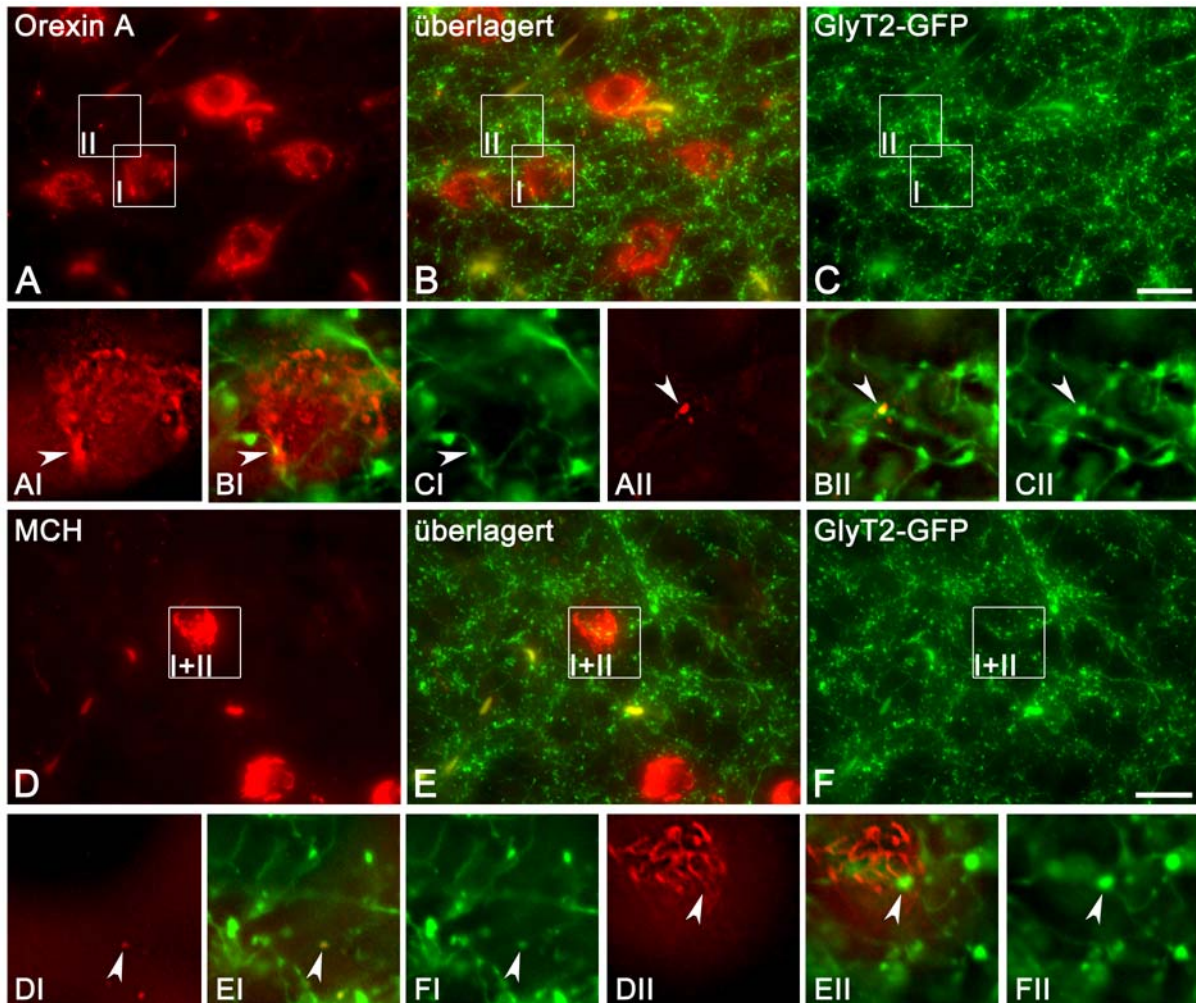


Abbildung 34: Orexin A- und MCH-positive Neurone im lateralen Hypothalamus werden durch Glyzin-positive Fasern innerviert. **A-C:** Immunzytochemische Färbungen gegen Orexin A (**A**, rot) und GFP (**C**, grün). Die Überlagerung in **B** zeigt, dass Orexin A-exprimierende Neurone in ein Geflecht aus Glyzin-enthaltenden Fasern eingebettet sind, die Varikositäten ausbilden. **AI-CII:** Darstellung der umrahmten Details aus **A-C** als vergrößerte Einzelbilder. **AI-CI:** Die Pfeilspitze markiert den Kontaktpunkt zwischen Orexin-positivem Soma und Glyzin-positiver Faser. **AII-CII:** Die Kontaktstelle zwischen Orexin A-enthaltender Faser und glyzinerem Fortsatz ist durch eine Pfeilspitze gekennzeichnet. **D-F:** Immunzytochemische Färbungen gegen MCH (**D**, rot) und GFP (**F**, grün). Die Überlagerung in **E** zeigt, dass MCH-positive Neurone in ein Netz aus glyzineren Fasern eingebettet sind, die Varikositäten ausbilden. **DI-FII:** Darstellung der umrahmten Details aus **D-F** als vergrößerte Einzelbilder. **DI-FI** entstammen einer anderen Ebene des Schnittes als **DII** bis **FII**. **DI-FI:** Die Pfeilspitze deutet auf einen Berührungspunkt zwischen MCH-positivem Fortsatz und Glyzin-enthaltender Faser. **DII-FII:** Die Kontaktstelle zwischen MCH-positivem Zellkörper und Glyzin-enthaltender Fortsatz ist durch eine Pfeilspitze markiert. **AI-FII:** Vergrößerungen wurden mittels Dekonvolution berechnet. Maßstab 20µm

Vasopressin: Die Vasopressin-exprimierenden Neurone im lateralen Hypothalamus bildeten teilweise lange Fortsätze von beachtlichem Durchmesser aus (Abb. 35A). Sowohl die Zellkörper (Abb. 35AI-CI, Pfeilspitze) als auch die Fortsätze wiesen

eindeutige Kontaktstellen mit Glyzin-positiven Fasern auf (Abb. 35AII-CII, Pfeilspitzen). Vermutlich handelte es sich dabei um synaptische Kontakte, da die Fasern reich an Varikositäten waren.

VIP: Nur wenige VIP-positive Fasern konnten im lateralen Hypothalamus gezeigt werden. Die Fortsätze schienen zum Teil mit Glyzin-enthaltenden Fasern Kontakte auszubilden (Abb. 35D-F). Genauso wie bei Orexin A-, MCH- und Vasopressin-positiven Fasern waren auch an diesen Punkten häufig an beiden Fortsätzen Verdickungen ausgebildet, ein Hinweis auf synaptische Kontaktstellen.

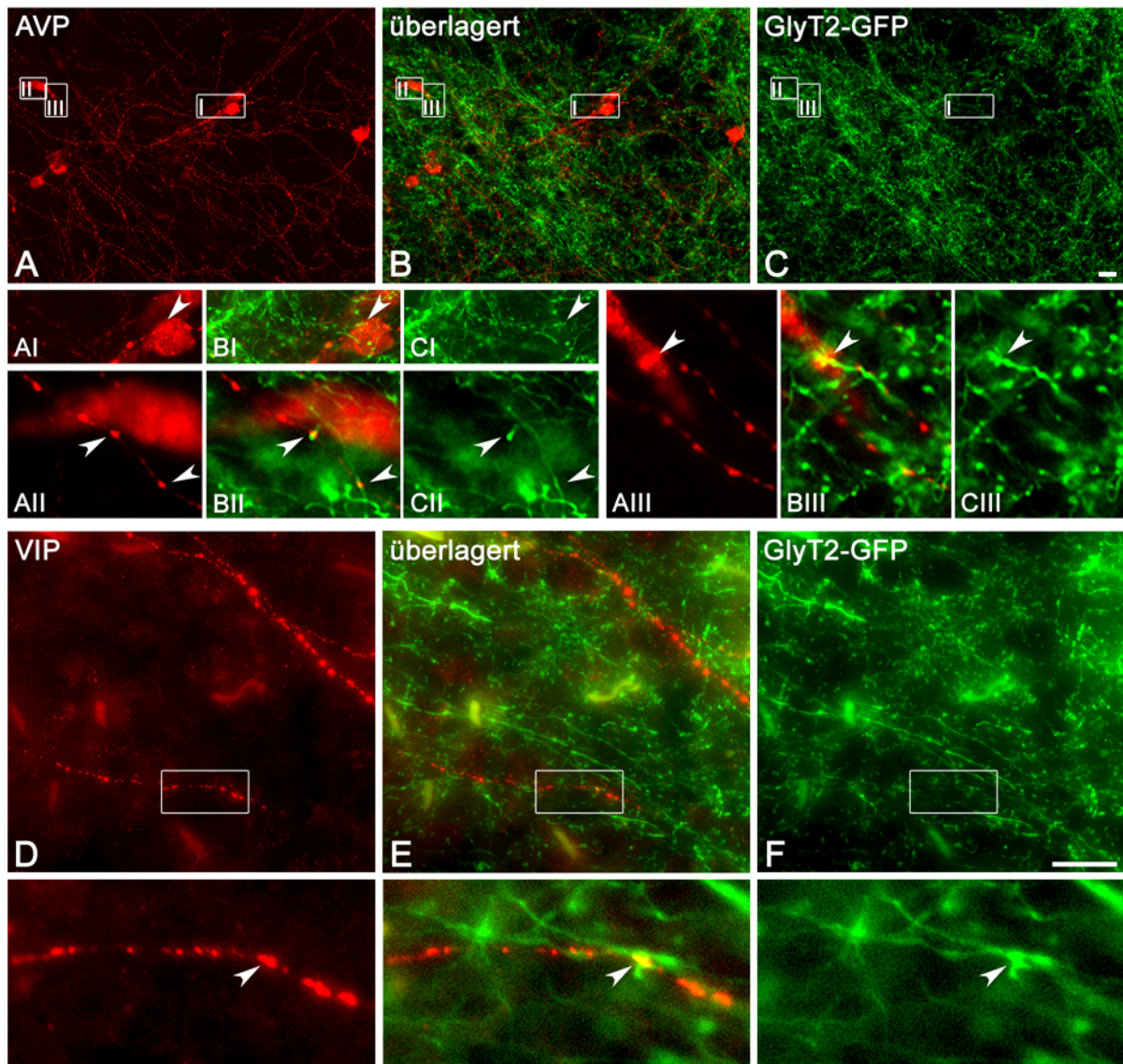


Abbildung 35: Vasopressin-exprimierende Neurone und VIP-positive Fortsätze sind mit glyzinerger Fasern im lateralen Hypothalamus der Maus verschaltet.

A: Vasopressin-positiv Neurone mit langen Fortsätzen. **C:** Immunzytochemische Färbung gegen GFP. **B:** Die Überlagerung verdeutlicht, dass Vasopressin-exprimierende Neurone im Hypothalamus lateralis (LH) der GlyT2-EGFP-Maus inmitten Glyzin-positiver Fasern liegen. **AI-CIII:** Vergrößerte Darstellung der in **A-C** umrahmten Ausschnitte als Einzelbilder. Die Pfeilspitzen deuten auf die Kontaktstellen zwischen Vasopressin-positivem Soma und

Glyzin-positiver Faser (**AI-CI**) sowie Vasopressin- und Glyzin-positiver Fasern (**AII-CIII**). **D**: Immunzytochemische Färbung gegen VIP. **F**: Immunzytochemische Färbung gegen GFP. **E**: Die Überlagerung verdeutlicht, dass VIP-positive Fortsätze neben Glyzin-positiven Fasern in den LH der GlyT2-EGFP-Maus ziehen. Unterhalb der Bilder **D**, **E** und **F** sind die umrahmten Details vergrößert und als Einzelbilder dargestellt. Die Pfeilspitzen markieren die Kontaktstelle zwischen VIP-positivem Fortsatz und glyzinerger Faser. Maßstab 20µm

4.3.3 Dopamin-positive Zellen im lateralen Hypothalamus

Im lateralen Hypothalamus der Ratte wurden in der Zona incerta Dopamin-positive Zellen durch immunzytochemische Färbungen gegen Tyrosinhydroxylase dargestellt (Abb. 36). Diese Zellen bildeten lange Fortsätze aus, die unter anderem Orexin A-positive Neuronenpopulationen innervieren. Immunzytochemische Doppelmarkierungen gegen Tyrosinhydroxylase und Orexin A zeigten, dass Dopamin und Orexin A in verschiedenen Zellpopulationen des lateralen Hypothalamus gebildet werden (Abb. 36A). Dopamin-positive und Orexin-exprimierende Neurone lagen dicht nebeneinander und schienen über ihre Fortsätze Kontakte miteinander auszubilden (Abb. 36B-D). Im lateralen Hypothalamus der Maus konnten allerdings keine Kontaktstellen zwischen Dopamin- und Orexin A-positiven Neuronen nachgewiesen werden (nicht abgebildet).

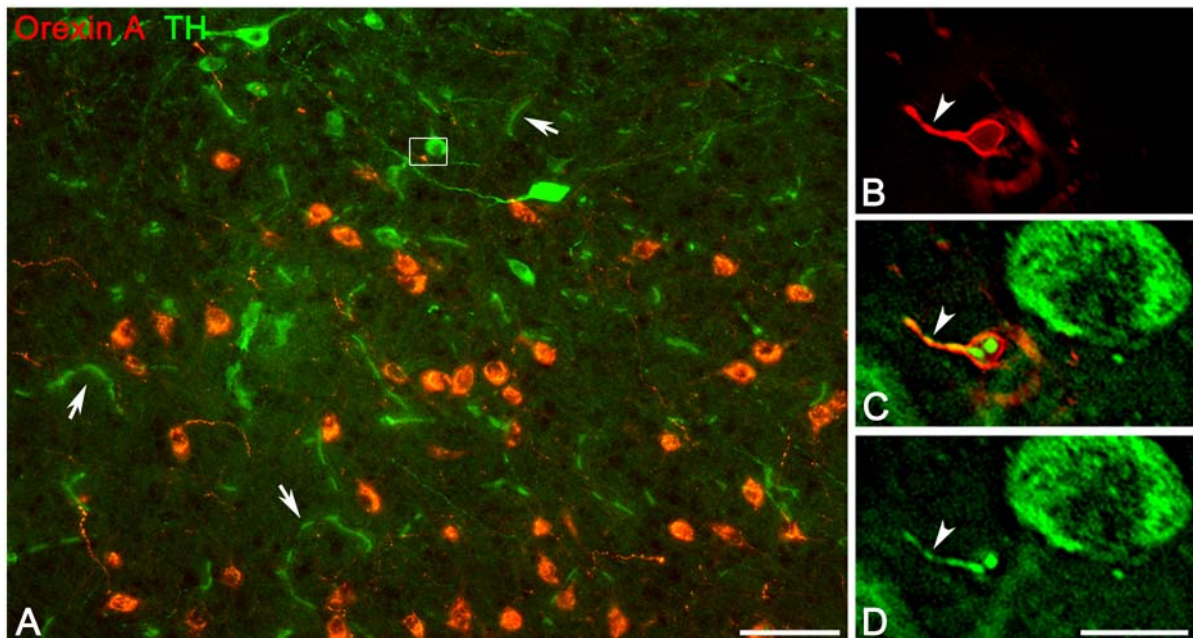


Abbildung 36: Dopamin- und Orexin-positive Zellen im lateralen Hypothalamus der Ratte. **A**: Immunzytochemische Färbung gegen Tyrosinhydroxylase (TH) (grüner Kanal) und Orexin A (roter Kanal) im Sagittalschnitt. Dopamin- und Orexin-positive Neurone bilden verschiedene Zellpopulationen. **B-D**: Vergrößerte Darstellung des in **A** umrahmten Ausschnitts, durch Dekonvolution berechnet. Die Überlagerung (**C**) zeigt, dass Orexin A-positive (**B**, rot) und Dopamin-positive (**D**, grün) Fasern in Kontakt stehen (markiert durch Pfeilspitze). Pfeile deuten auf Blutgefäße. Maßstab A 100µm, B-D 10µm

4.4 Der N. arcuatus – ein Zielgebiet des N. suprachiasmaticus

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden (Kapitel 4.1), dass der N. arcuatus in Maus und Ratte von Vasopressin-, VIP-, Orexin A- und MCH-positiven Fasern durchzogen wird (Abb. 38). Die Neuropeptide wurden in diesem Kerngebiet jedoch lediglich in Nervenfasern, niemals aber in Somata gefunden. Immunzytochemische Doppelfärbungen gegen Vasopressin und Orexin A beziehungsweise MCH sowie gegen VIP und Orexin A beziehungsweise MCH konnten keine direkten Kontakte zwischen den unterschiedlichen Neuropeptid-positiven Fortsätzen nachweisen (nicht abgebildet).

4.4.1 Der Neurotransmitter GABA im N. arcuatus

Im N. arcuatus der GAD67-GFP knock-in-Maus waren zahlreiche grün fluoreszierende GAD-positive Neurone gleichmäßig über das gesamte Areal des N. arcuatus verteilt.

Um die Frage zu klären, ob diese GAD67-positiven Neurone als Zielzellen der Vasopressin-, Orexin A-, MCH- oder VIP-positiven Projektionen dienen, wurden immunzytochemische Untersuchungen in der GAD67-GFP knock-in-Maus durchgeführt (siehe 2.6).

Vasopressin- oder Orexin A-enthaltende Fasern wurden nur vereinzelt in diesem Gebiet nachgewiesen (Abb. 37A,B). Eine genauere Betrachtung der Fluoreszenzfärbungen bei höherer Vergrößerung verdeutlichte, dass Vasopressin- positive Fasern zu GAD-positiven Zellkörpern beziehungsweise Fortsätzen projizieren und vermutlich Kontakte ausbilden (Abb. 37AI,AII). Woher die Vasopressin-enthaltenden Fasern stammen, die in den N. arcuatus projizieren, blieb ungeklärt (siehe auch 4.1.1).

Ein ähnliches Resultat wie für Vasopressin, ergaben die immunzytochemischen Anfärbungen gegen Orexin A im N. arcuatus. Nur vereinzelt schienen Orexin A-enthaltende Fasern GAD67- positive Neurone oder ihre Dendriten zu innervieren (Abb. 37B). Da Orexin A ausschließlich in Neuronen des lateralen Hypothalamus gebildet wird, besteht offenbar eine direkte Verbindung zwischen lateralem Hypothalamus und dem N. arcuatus.

In den vorliegenden Untersuchungen konnten keine Kontaktstellen zwischen VIP- oder MCH-positiven Fortsätzen und GAD67-positiven Neuronen des N. arcuatus

nachgewiesen werden. Außerdem war offenbar keines der Neuropeptide in den Fortsätzen mit GABA kolokalisiert.

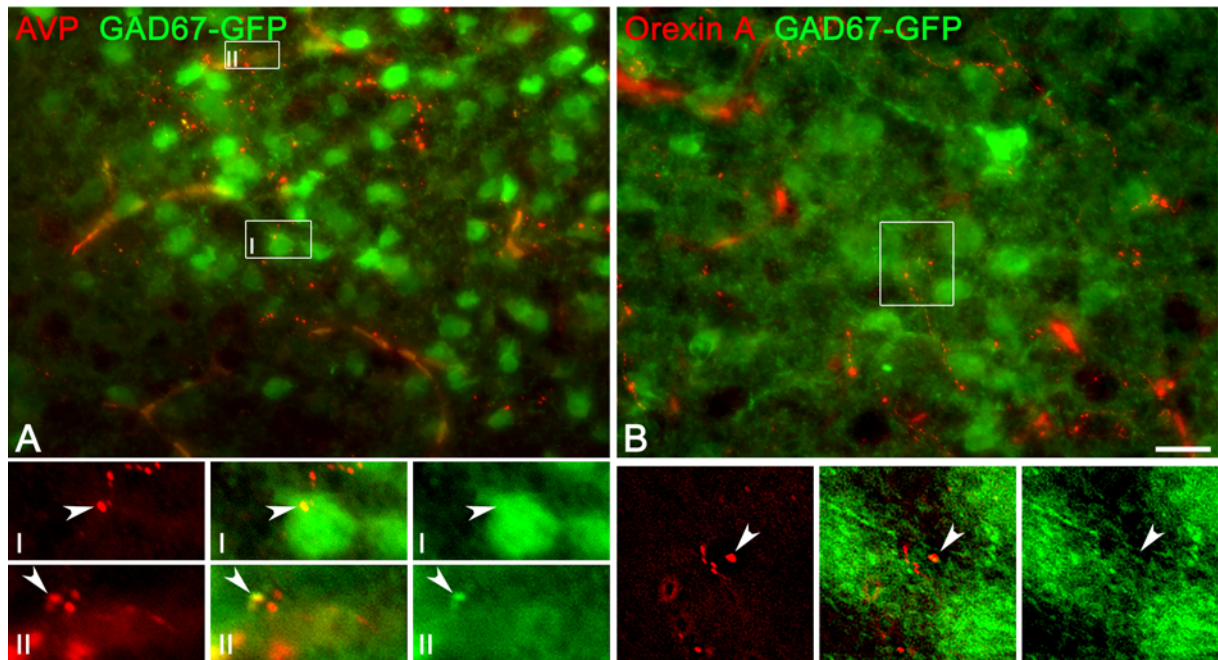


Abbildung 37: Vasopressin- und Orexin A-positive Fasern innervieren GAD-positive Zellen im N. arcuatus der Maus. **A:** Fluoreszenzaufnahme von Vasopressin-positiven Fasern (rot) und GAD67-positiver Zellen (grün) im Coronalchnitt des N. arcuatus der GAD67-GFP knock-in-Maus. Die in **A** umrahmten Ausschnitte sind unterhalb als vergrößerte Einzelbilder dargestellt und verdeutlichen, dass Vasopressin-positive Projektionen sowohl GAD67-positive Somata (I), als auch Fasern (II) innervieren (markiert durch Pfeilspitzen). Die Vergrößerungen zeigen die einzelnen Kanäle (links: Vasopressin; rechts: GABA) und die Überlagerung (Mitte). **B:** Fluoreszenzaufnahme von Orexin A-positiven Fasern (rot) und GAD-positiven Zellen (grün) im Coronalchnitt des N. arcuatus der GAD67-GFP knock-in-Maus. Das in **B** umrahmte Detail ist unterhalb als vergrößertes Einzelbild abgebildet (links: Orexin A; rechts: GABA; Mitte: Überlagerung) und durch Dekonvolution berechnet. Orexin A-positiv Projektionen kontaktieren GAD67-positive Fortsätze (gekennzeichnet durch Pfeilspitze). Maßstab 20µm

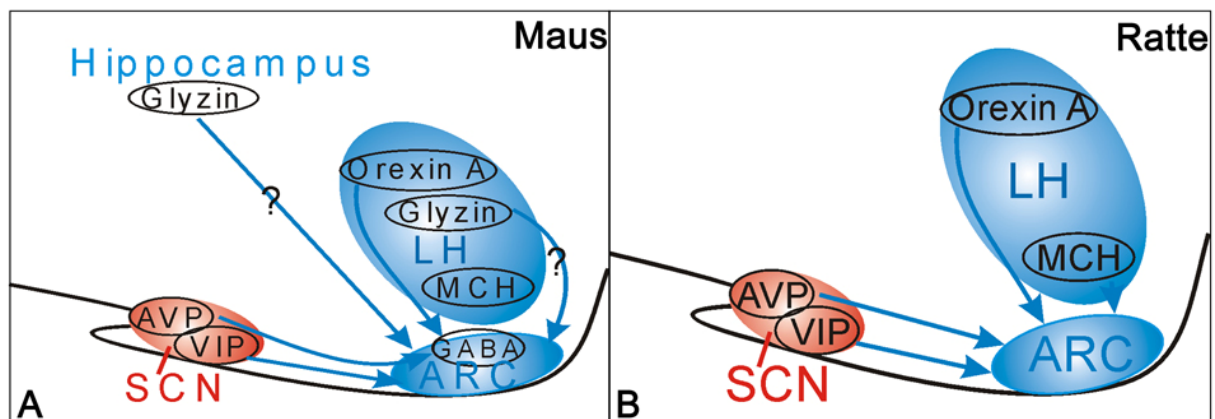


Abbildung 38: Eingangswege des N. arcuatus. **A:** Der N. arcuatus (ARC) der Maus wird durch Vasopressin (AVP)- und VIP-positiv Fortsätze innerviert, deren Quelle vermutlich der SCN ist. Außerdem ziehen Orexin A- und MCH-enthaltende Fasern aus dem lateralen

Hypothalamus (LH) in den ARC. Sowohl Vasopressin- als auch Orexin A-positive Fasern projizieren beispielsweise auf GAD-positive Zellen im ARC. Glyzin-positive Fortsätze innervieren ebenfalls Zellen im ARC, die jedoch nicht genauer bestimmt sind. Die Ursprungszellen der Glyzin-enthaltenden Fortsätze liegen vermutlich im Hippocampus oder lateralen Hypothalamus. **B:** In den ARC der Ratte projizieren Vasopressin- und VIP-positive Fortsätze, vermutlich aus dem SCN, sowie Orexin A- und MCH-enthaltende Fasern aus dem lateralen Hypothalamus. Die Zielzellen der Fasern im ARC sind unbekannt. Modifiziert nach Saper et al. 2005.

4.4.2 Der Neurotransmitter Glyzin im N. arcuatus

Zur genaueren Untersuchung der glyzinerger Nervenfasern im N. arcuatus wurden immunzytochemische Färbungen bei der GlyT2-EGFP-Maus durchgeführt.

Innerhalb dieses Kerngebiets wurden, wie im SCN, lediglich Glyzin-positive Fortsätze jedoch keine Somata nachgewiesen (Abb. 39). Diese Fortsätze durchzogen den gesamten Nucleus und hatten ein perlschnurartiges Aussehen. Immunzytochemische Anfärbungen zeigten, dass weder Vasopressin-, noch VIP- oder MCH-positive Fasern mit den Glyzin-enthaltenden Fortsätzen Kontaktstellen ausbilden (nicht abgebildet). Allerdings wurden eindeutige Kontakte zwischen Orexin A- und Glyzin-positiven Projektionen identifiziert, was exemplarisch in der Ausschnittsvergrößerung der Abbildung 39 gezeigt ist. Keines der untersuchten Neuropeptide war in denselben Fortsätzen wie Glyzin kolokalisiert.

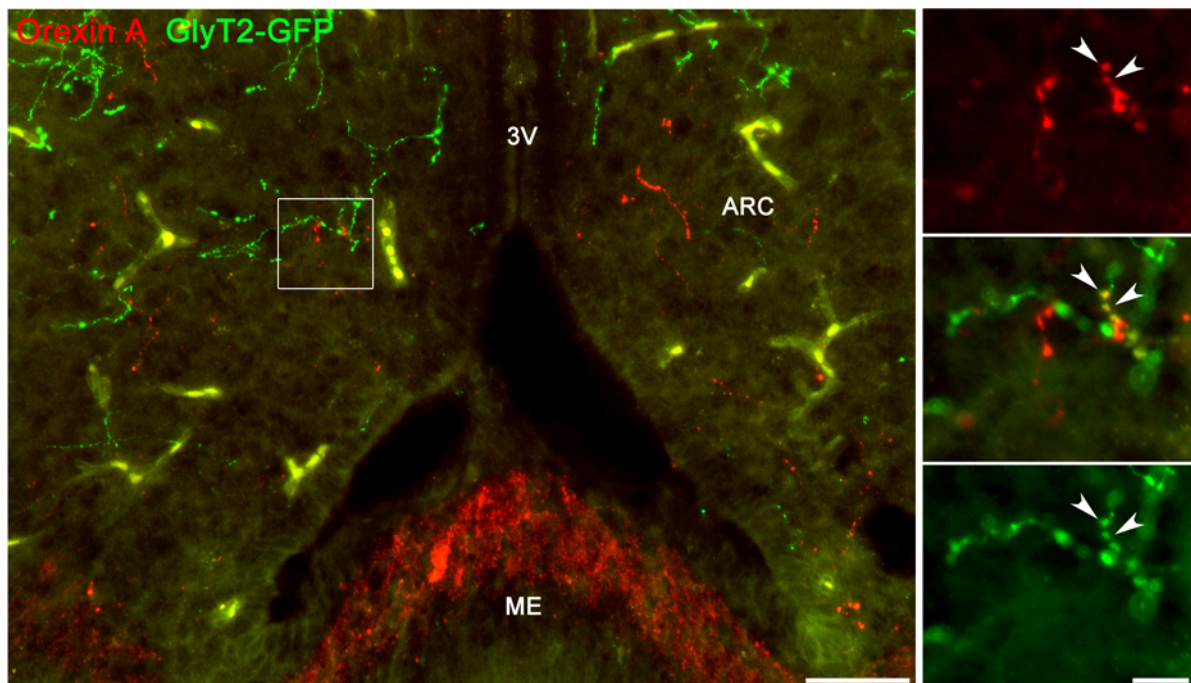


Abbildung 39: Orexin A-enthaltende Fasern kontaktieren Glyzin-positive Projektionen im N. arcuatus der Maus. A: Fluoreszenzaufnahme des Neuropeptids Orexin A (rot) mit GFP (grün, glyzinerger) im Coronalchnitt des N. arcuatus der GlyT2-EGFP-Maus. Der umrahmte Ausschnitt ist rechts als Einzelbild in höherer Vergrößerung und in Kanäle aufgetrennt dargestellt (oben: Orexin A; unten: GFP (Glyzin); Mitte: überlagert). Die

Pfeilspitzen kennzeichnen Kontaktstellen zwischen Orexin A- und Glyzin-positiven Fasern im N. arcuatus. 3V, 3. Ventrikel; ARC, N. arcuatus; ME, Eminentia mediana. Maßstab 50µm, Vergrößerung 10µm

4.5 Immunzytochemische Untersuchung primärer Zellkulturen

Die in dieser Arbeit verwendeten Zellkulturen wurden unter der Prämisse untersucht, dass es sich um histiotypische Zellkulturen handelt. Daher sollten die kultivierten Zellen die gleichen Neuropeptide und Neurotransmitter exprimieren sowie synaptische Verbindungen ausbilden wie Neurone im intakten Gewebe.

In einem ersten Schritt wurden dissoziierte Zellen des SCN, des lateralen Hypothalamus oder des N. arcuatus auf Deckgläsern ausplattiert und kultiviert. In diesen Kulturen konnten sowohl Gliazellen als auch Neurone mit immunzytochemischen Markern für diese Zelltypen nachgewiesen werden (Abb.40). Die Gliazellschicht und ihre Fortsätze bildeten eine dichte, geschlossene Zellschicht auf den Deckgläsern aus. Auf dieser Zellschicht lagen kleine, runde Neurone mit teilweise bis zu mehreren hundert Mikrometer langen Fortsätzen (Abb. 40B,E).

Das Vorhandensein einer Gliazellschicht war für die Kultivierung der Neurone unerlässlich. Eine Hemmung der Proliferation der Gliazellschicht führte innerhalb weniger Tage zu einem Absterben der Neuronenkulturen. Um die Untersuchung der verschiedenen Neurone, deren Fortsätze und mögliche Kontaktstellen zu anderen Zellen innerhalb der Kulturen zu verbessern, wurde versucht, die Dichte der Gliazellschicht durch eine Veränderung des Nährmediums zu kontrollieren. Durch eine anfängliche Kultivierung der Zellen in serumfreien Neurobasal A-Medium, gefolgt von normalem DMEM/F12-Medium gelang es das Wachstum der Neurone zu fördern und das der Gliazellen einzuschränken. Diese Prozedur führte zu einer deutlich verbesserten Kultivierung der Neurone und einer Einschränkung des Gliazellwachstums (Abb. 40G-I).

Isolierte Neurone des Hypothalamus bildeten unter Kulturbedingungen nach einigen Tagen kleine neuronale Netze aus, die über Synapsen miteinander verbunden sind. Dies konnte durch immunzytochemische Anfärbungen gegen das präsynaptische Protein Synapsin I gezeigt werden. Ein Großteil der kultivierten Zellen des N. arcuatus, des lateralen Hypothalamus und des SCN hatten schon nach wenigen Tagen ein dichtes Netz von Zellfortsätzen ausgebildet, die durch Synapsen miteinander verknüpft waren (Abb. 41). Die Mehrzahl aller Neurone bildete in den Zellkulturen Synapsen aus, die als rote Punkte sichtbar und meist am Rand der

Zellkörper und der Fortsätze ausgebildet waren (Abb. 41E) und den Fasern so ein perlschnurartiges Aussehen verliehen.

Dies lässt den Schluss zu, dass die interzelluläre Signalübertragung auch in Zellkulturen weitgehend auf Synapsen beruht.

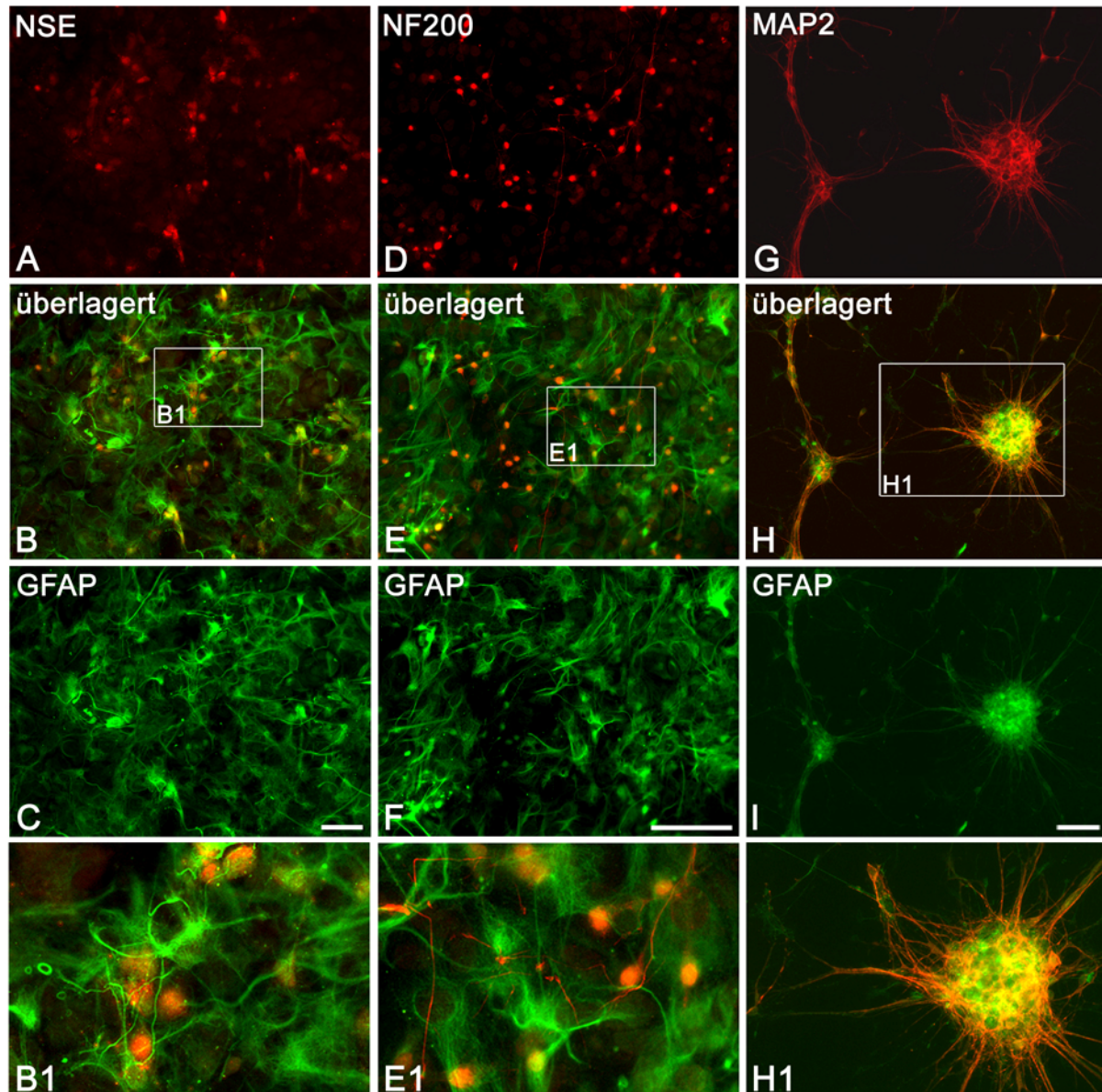


Abbildung 40: Neurone und Gliazellen in Zellkulturen. A-F: SCN-Zellkultur der Maus, für 8 Tage in DMEM/F12 kultiviert. **A:** Immunzytochemische Färbung gegen den Neuronenmarker NSE (rot). **C:** Immunzytochemische Färbung gegen GFAP (grün), einem Marker für Gliazellen. **B:** Die Überlagerung verdeutlicht, dass sich die Neurone auf einer dichten Gliazellschicht ansiedeln. **D:** Immunzytochemische Färbung gegen das neuronale Filament NF200 (rot). **F:** Immunzytochemische Färbung gegen GFAP (grün). **E:** Die Überlagerung der Kanäle zeigt, dass auf der Gliazellschicht liegende Neurone teilweise lange Fortsätze ausbilden und sich damit vernetzen. **G-I:** Hypothalamische Zellkultur von Ratten (Alter: E16), 8 Tage in Neurobasal-A kultiviert. **G:** Immunzytochemische Färbung mit dem Neuronenmarker MAP2. **I:** Immunzytochemische Färbung gegen GFAP. **H:** Die Überlagerung verdeutlicht, dass sich unter Verwendung von Neurobasal A die Zellen zu

Zellhaufen zusammenlagern, da die Fortsätze der Gliazellen unzureichend ausgebildet sind und den Neuronen nicht genügend Stabilität bieten. **B1, E1, H1**: Vergrößerte Darstellung der in **B,E,H** umrahmten Ausschnitte. Maßstab 50µm

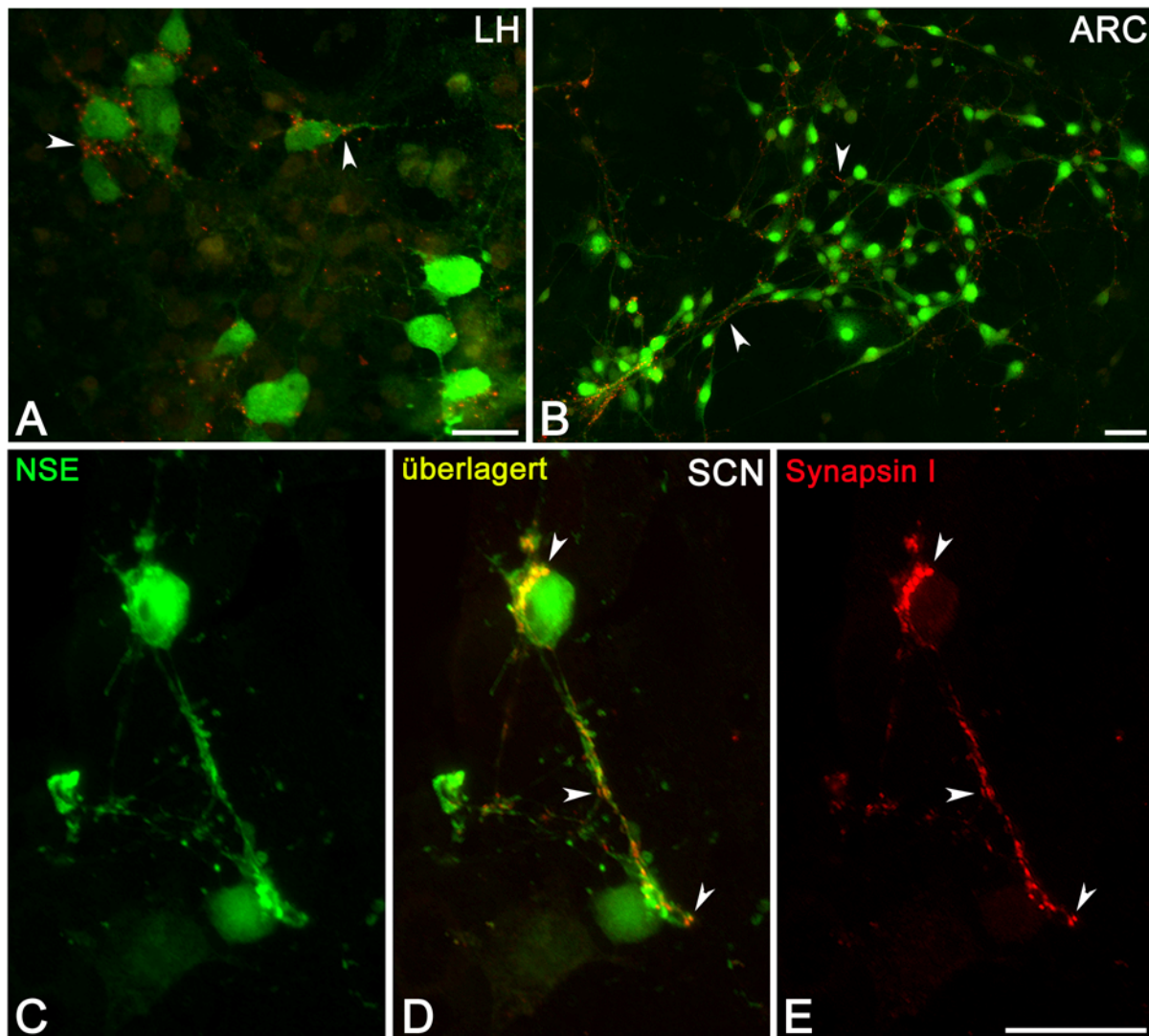


Abbildung 41: Neurone in hypothalamischen Zellkulturen bilden Synapsen aus. **A:** Kultivierte Zellen des Hypothalamus lateralis (LH) der Ratte (7 Tage in Kultur). **B:** Kultivierte Zellen des N. arcuatus (ARC) der Ratte (4 Tage in Kultur). Die abgebildeten Fluoreszenzaufnahmen immunzytochemischer Färbungen gegen NSE (grün) und Synapsin I in **A** und **B** belegen, dass die Neurone lange Fortsätze ausbilden und teilweise sowohl auf den Zellkörpern als auch auf den Fasern Synapsen ausbilden. **C-E:** Auf Deckgläsern kultivierte SCN-Zellen der Ratte (12 Tage in Kultur). Immunzytochemische Färbung gegen NSE (grün) und Synapsin I (rot). Die Synapsen sind als rote Punkte an Somata und Fortsätzen der Neurone sichtbar und exemplarisch mit Pfeilspitzen gekennzeichnet. Maßstab 25µm

4.5.1 Nachweis spezifischer Neuropeptide in den Zellkulturen

In vivo exprimieren verschiedene hypothalamische Kerngebiete spezifische Neuropeptide. Zur Charakterisierung der Zellkulturen wurde mit immunzyto-

chemischen Färbungen untersucht, ob die isolierten Zellen diese typischen Neuropeptide ebenfalls enthalten.

SCN: In kultivierten Zellen des SCN konnten sowohl Vasopressin- als auch VIP-exprimierende Neurone gezeigt werden (Abb. 42A-F). Die teilweise nur schwach angefärbten Vasopressin-positiven Zellkörper waren rund, hatten einen Durchmesser von etwa 10µm und bildeten Fortsätze bis zu einer Länge von etwa 100µm aus (Abb. 42A-C).

Die eher spindelförmig geformten VIP-positiven Zellkörper hatten ebenfalls einen Durchmesser von circa 10µm (Abb. 42D-F). Allerdings waren im Gegensatz zu Vasopressin-Neuronen nur die Somata angefärbt, nicht aber die Zellfortsätze.

Beide, Vasopressin- und VIP-exprimierende Neurone, schienen direkte Verbindung zu anderen Neuronen zu besitzen, die aber in der vorliegenden Studie nicht identifiziert wurden.

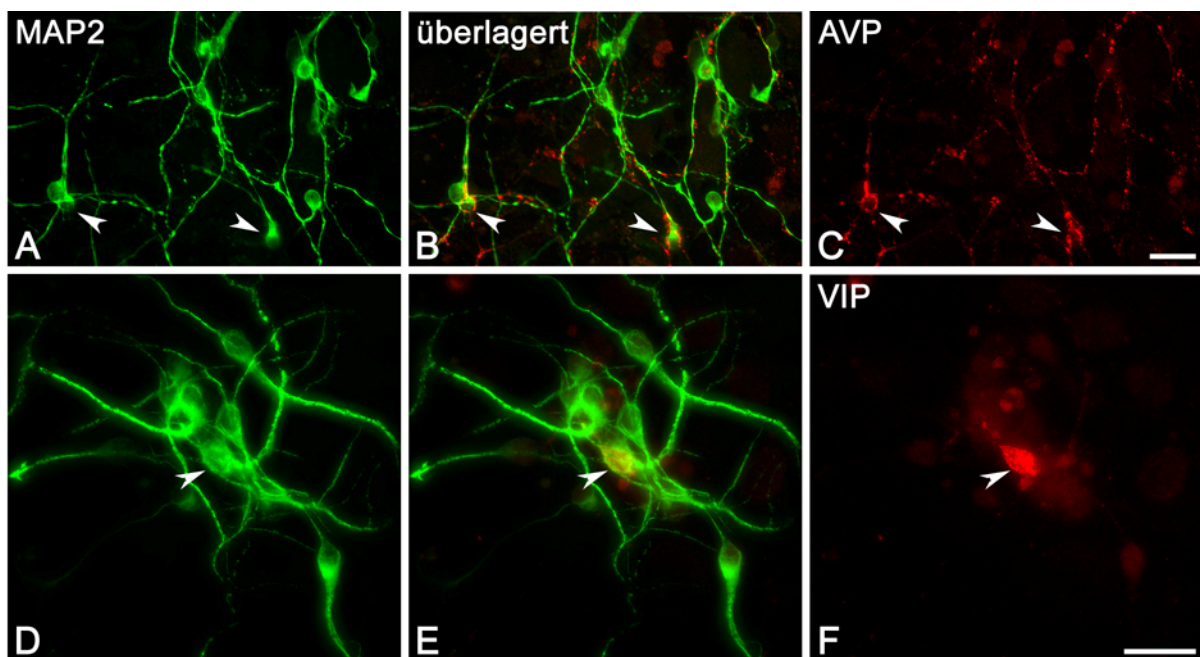


Abbildung 42: Vasopressin- und VIP-positive Neurone in Kulturen des SCN. A-C: Fluoreszenzaufnahme von MAP2 (grün) mit Vasopressin (rot) einer Zellkultur des SCN, 1 Woche in Kultur. **A:** Immunzytochemische Färbung gegen den Neuronenmarker MAP2. **C:** Immunzytochemische Färbung gegen Vasopressin. **B:** Die Überlagerung zeigt, dass Vasopressin-positive Neurone (Pfeilspitzen) in direktem Kontakt mit anderen Neuronen stehen und teilweise lange Fortsätze ausbilden. D-F: Fluoreszenzaufnahme von MAP2 (grün) mit VIP (rot) einer Zellkultur des SCN, 4 Tage in Kultur. **D:** Immunzytochemische Färbung gegen MAP2. **F:** Immunzytochemische Färbung gegen das Neuropeptid VIP. **E:** Die Überlagerung zeigt ein VIP-exprimierendes Neuron (markiert Pfeilspitze), das scheinbar in direktem Kontakt mit anderen Neuronen steht. Maßstab 20µm.

Lateraler Hypothalamus: In den Zellkulturen des lateralen Hypothalamus wurden Orexin A- und MCH-exprimierende Neurone immunzytochemisch als zwei verschiedene Neuronenpopulationen identifiziert (Abb. 43). Die meist spindelförmigen Zellkörper der Orexin A- und MCH-positiven Zellen hatten einen Durchmesser von etwa 15µm. Die Fortsätze der Orexin A-positiven Zellen erreichten in Kultur eine Länge von mehr als 150µm, hatten häufig ein perlschnurartiges Aussehen und besaßen zahlreiche Verzweigungen. Sie schienen nicht nur miteinander in direktem Kontakt zu stehen, sondern auch Verbindungen mit anderen Neuronen herzustellen (Abb. 43A-C). Die MCH-positiven Fortsätze waren filigraner als die orexinergen und häufig stärker verzweigt (nicht abgebildet), erreichten jedoch ebenfalls teilweise beachtliche Längen (Abb. 44A,B).

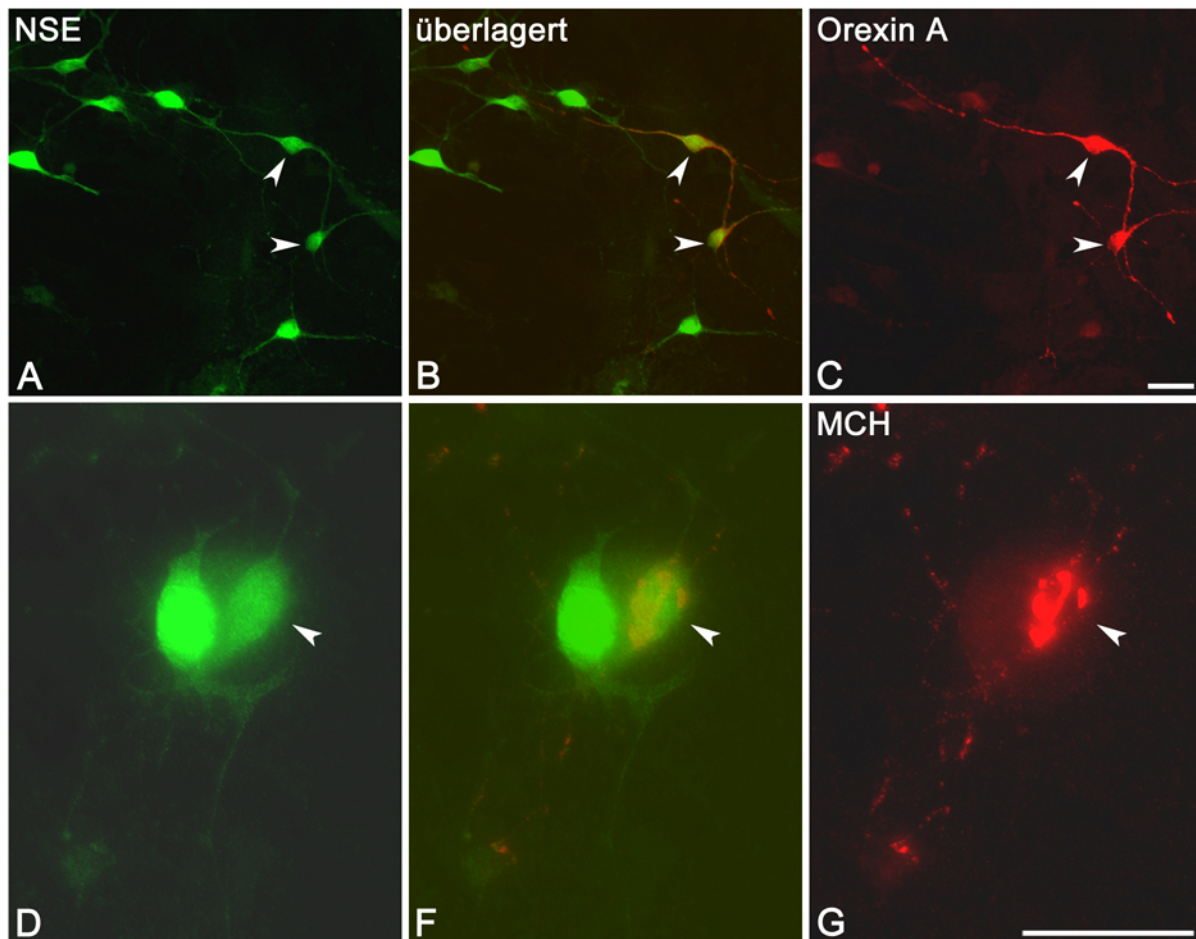


Abbildung 43: Kultivierte Neurone des lateralen Hypothalamus exprimieren Orexin A oder MCH. A-C: Fluoreszenzaufnahme von Zellen des lateralen Hypothalamus der Ratte angefärbt gegen NSE (grün) mit Orexin A (rot); 1 Woche in Kultur. A: Immunzytochemische Färbung gegen NSE. C: Immunzytochemische Färbung gegen Orexin A. Die Orexin A-positiven Neurone (markiert mit Pfeilspitzen) bilden lange Fortsätze und scheinen miteinander in Kontakt zu stehen. B: Die Überlagerung der Färbungen verdeutlicht, dass nur Neurone Orexin A exprimieren. Orexin A-exprimierende Neurone bilden offenbar direkten Kontakt mit anderen Neuronen in Kultur aus. D-F: Fluoreszenzaufnahme von Zellen des

lateralen Hypothalamus der Ratte angefärbt gegen NSE (grün) mit MCH (rot); 1 Woche in Kultur. **D:** Immunzytochemische Färbung gegen NSE. **F:** Immunzytochemische Färbung gegen MCH. MCH-exprimierende Neurone (markiert mit Pfeilspitze). **E:** Die Überlagerung der Färbungen verdeutlicht, dass nur Neurone MCH exprimieren. MCH-positive Zellen bilden scheinbar direkten Kontakt mit anderen Neuronen in Kultur. Maßstab 20µm

Beide Neuronenpopulationen bildeten zahlreiche Synapsen auf Zellkörpern und Fortsätzen aus (Abb. 44). Orexin A-positive Fasern projizierten zu MCH-positiven Zellen und umgekehrt wurden Orexin A-exprimierende Neurone von MCH-positiven Fasern innerviert. An den Kontaktstellen waren eindeutig Synapsen erkennbar (Abb. 44A,B). Diese Ergebnisse decken sich mit den Befunden an Gehirnschnitten in Kapitel 4.3, in denen gezeigt werden konnte, dass Orexin A- und MCH-exprimierende Neurone des lateralen Hypothalamus in direktem Kontakt miteinander stehen.

N. arcuatus: In Zellkulturen des N. arcuatus konnten immunzytochemisch keine Vasopressin-, VIP-, Orexin A- oder MCH-exprimierenden Neurone identifiziert werden. Dies entspricht den schon an intakten Hirnschnitten erhobenen Befunden (siehe 4.4).

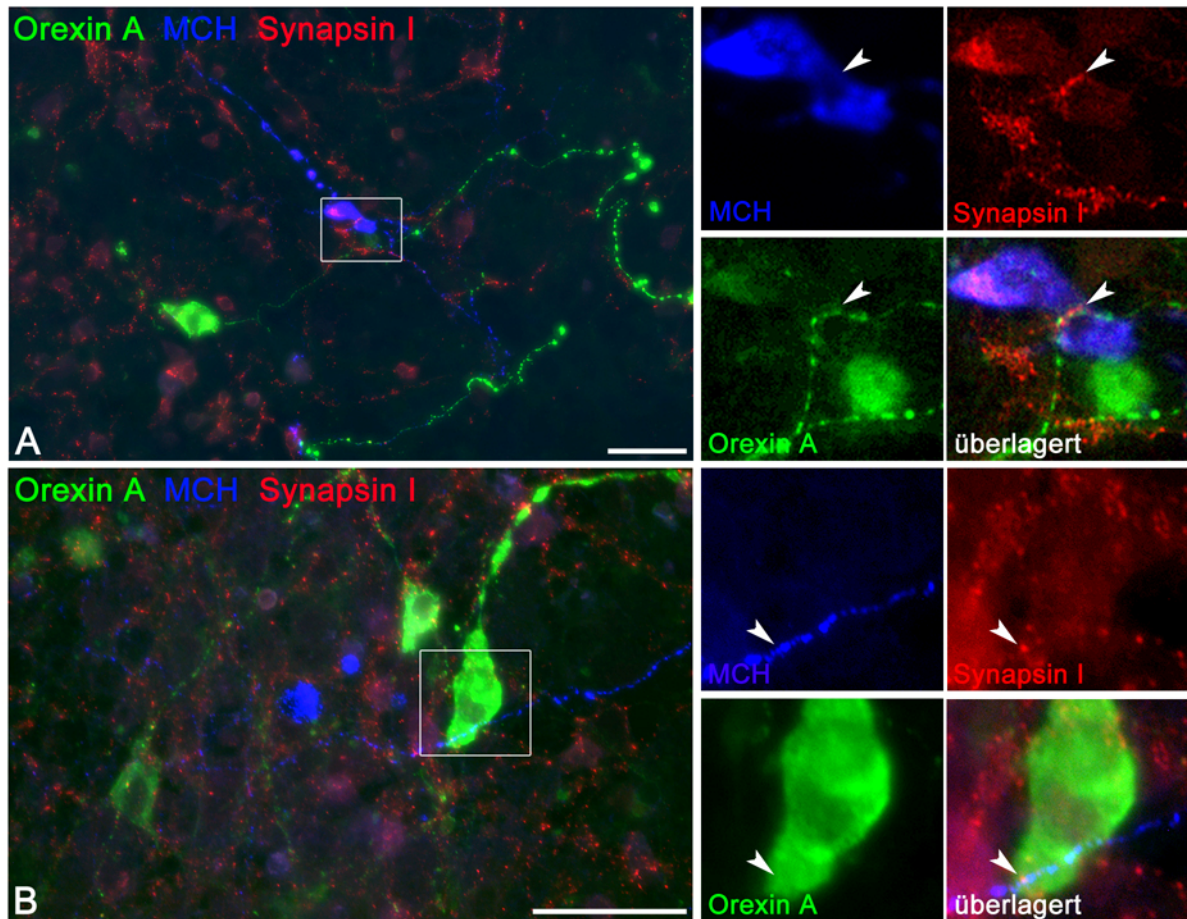


Abbildung 44: Orexin A- und MCH-exprimierende Neurone bilden in Kultur Synapsen aus. **A, B:** Immunzytochemische Dreifachfärbung gegen Orexin A (grüner Kanal), MCH (blauer Kanal) und den präsynaptischen Marker Synapsin I (roter Kanal) in einer Zellkultur des Hypothalamus lateralis der Ratte, 1 Woche kultiviert. In der Kultur sind zahlreiche Synapsen sichtbar, die auch auf Orexin A- und MCH-positiven Zellkörpern und Fortsätzen ausgebildet sind. **A:** Das umrahmte Detail dieser Projektion ist als Einzelbild vergrößert und in Kanäle aufgetrennt nebenstehend abgebildet. Zwei MCH-exprimierende Zellkörper in direkter Nachbarschaft zu einem Orexin A-positivem Soma. Eine Orexin-enthaltende Faser läuft an den MCH-positiven Zellkörpern entlang und kontaktiert diese über Synapsen (markiert durch Pfeilspitze). **B:** Der umrahmte Ausschnitt dieser Projektionen ist als Einzelbild vergrößert und in Kanäle aufgetrennt nebenstehend dargestellt. Ein Orexin A-exprimierendes Soma wird über eine Synapse (gekennzeichnet durch Pfeilspitze) von einem MCH-positiven Fortsatz innerviert. Maßstab 50µm

4.5.2 Neurotransmitter im Hypothalamus

Neben den oben genannten Neuropeptiden wurde das Vorkommen verschiedener Neurotransmitter in den Zellkulturen immunzytochemisch untersucht.

GABA: Durch die Kultivierung von Zellen der GAD67-GFP knock-in-Maus wurde eine erste Unterteilung der Zellen in GAD67-positiv und GAD67-negativ möglich. So waren beispielsweise viele Neurone des N. arcuatus (Abb. 45) und des SCN GAD-positiv (nicht abgebildet). Diese GABAergen Neurone, aber auch Zellen, die nicht

GABAerge waren, bildeten auf den Somata und Fortsätzen Synapsen aus und schienen in gegenseitigem Kontakt zu stehen.

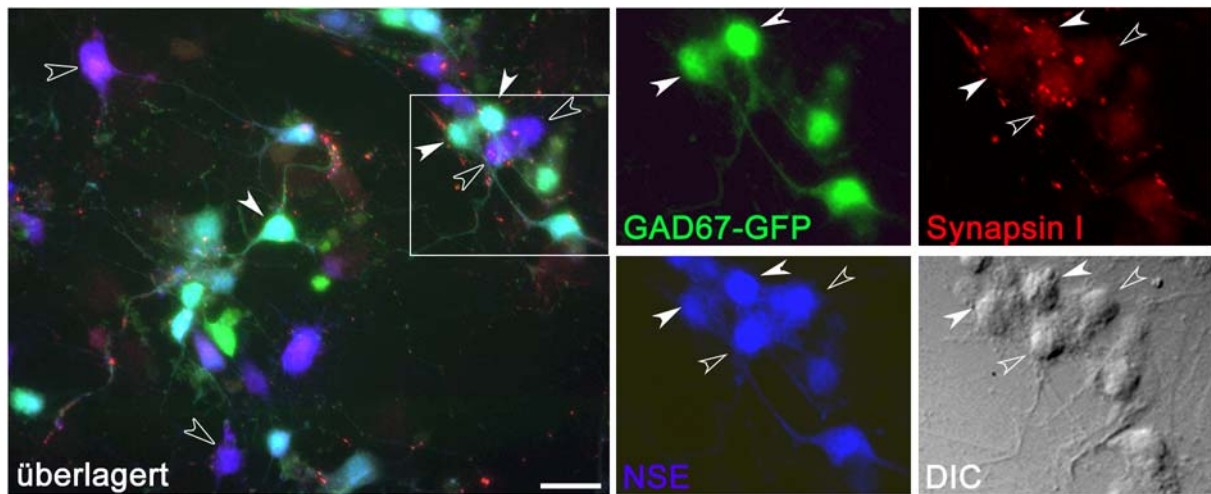


Abbildung 45: Viele Neurone des N. arcuatus sind GAD-positiv bilden Synapsen aus. ARC-Zellen von GAD67-GFP knock-in-Mäusen, 2 Wochen kultiviert. Immunzytochemische Dreifachfärbung gegen den Neuronenmarker NSE, gegen GFP und gegen den präsynaptischen Marker Synapsin I. Die Überlagerung zeigt, dass sowohl GABAerge, als auch nicht-GABAerge Neurone Synapsen auf den Somata und Fortsätzen ausbilden. Zur besseren Betrachtung ist der umrahmte Ausschnitt der Überlagerung rechts vergrößert, in Kanäle aufgetrennt und mit zugehöriger Normarski-Optik (DIC) abgebildet. Die gefüllten Pfeilspitzen kennzeichnen die GABAergen Neurone, die ungefüllten die nicht-GABAergen. Maßstab 20µm

Zellkulturen des lateralen Hypothalamus waren ebenfalls reich an GAD-exprimierenden Zellen (Abb. 46). Allerdings fanden sich auch hier Zellen, die nicht grün fluoreszierten und damit negativ für GAD waren.

Beide Neuronentypen schienen mit anderen Neuronen der Kultur in direkter Verbindung zu stehen. Dieses Ergebnis deckte sich mit den Befunden an Hirnschnitten (siehe 4.3.1), die zeigten, dass im lateralen Hypothalamus sowohl GAD-positiv als auch GAD-negativ MCH-exprimierende Neurone vorkommen.

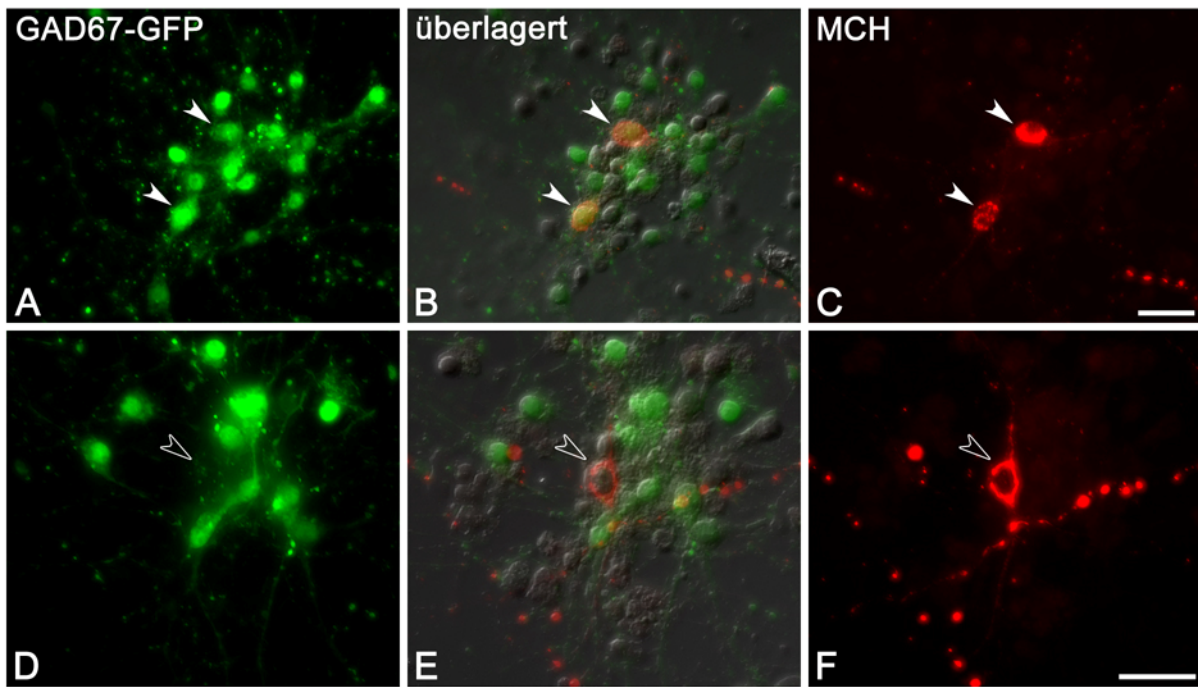


Abbildung 46: GAD-positive und GAD-negative MCH-exprimierende Neurone in Zellkulturen des lateralen Hypothalamus. Zellkultur des Hypothalamus lateralis von GAD67-GFP knock-in-Mäusen, 4 Tage kultiviert. **A-F:** Immunzytochemische Färbung gegen GFP (grün; **A, D**) und gegen MCH (rot; **C, F**). **A, D:** Zellkulturen des lateralen Hypothalamus sind reich an GAD67-positiven Neuronen, die teilweise in direktem Kontakt zueinander stehen. **C, F:** MCH-exprimierende Neurone in Kultur mit feinen Fortsätzen. **B, E:** Überlagerung der Kanäle mit entsprechender Normarski-Optik. Zwei verschiedene MCH-positive Neuronenpopulationen können unterschieden werden: GAD-positive (**B**, markiert durch gefüllte Pfeilspitzen) und GAD-negative (**E**, gekennzeichnet durch ungefüllte Pfeilspitze). Maßstab 20µm

Dopamin: Ein weiterer Neurotransmitter, der in Zellkulturen mit Hilfe eines Antikörpers gegen Tyrosinhydroxylase nachgewiesen wurde, ist Dopamin (Abb. 47, Abb. 48). Tyrosinhydroxylase (TH) ist ein Enzym, das zur Synthese von Dopamin benötigt wird. In kultivierten Zellen der Ratte wurde Dopamin in Neuronen von etwa 10µm Durchmesser nachgewiesen (Abb. 47). Die langen Fortsätze dieser Neurone kontaktierten sowohl Fasern anderer Dopamin-positiver Neurone, als auch Dopamin-negative Neurone.

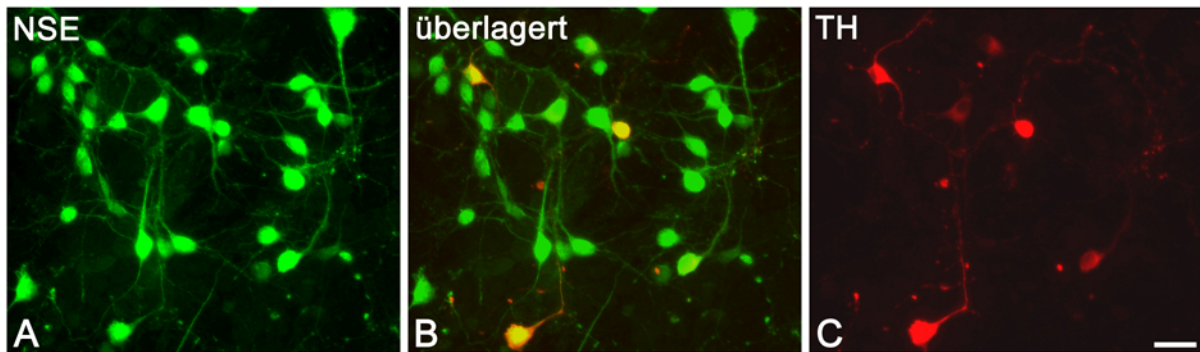


Abbildung 47: Dopamin-positive Neurone in kultivierten Zellen des N. arcuatus der Ratte. A-C: Zellen des N. arcuatus der Ratte für 4 Tage kultiviert. **A:** Immunzytochemische Färbung gegen NSE. **C:** Immunzytochemische Färbung gegen TH, zur Darstellung Dopamin-positiven Zellen. **B:** Die Überlagerung der Kanäle zeigt, dass einige Neurone des N. arcuatus Dopamin-positiv sind und wahrscheinlich mit anderen Neuronen in Kontakt stehen. Maßstab 20µm

In Zellkulturen des N. arcuatus der Maus fanden sich ebenfalls dopaminerge Neurone (Abb. 48). Diese Neurone exprimierten neben Dopamin auch GABA und schienen zudem in direktem Kontakt mit GABA-exprimierenden Zellen zu stehen, wie Untersuchungen bei der GAD67-GFP knock-in-Maus bewiesen.

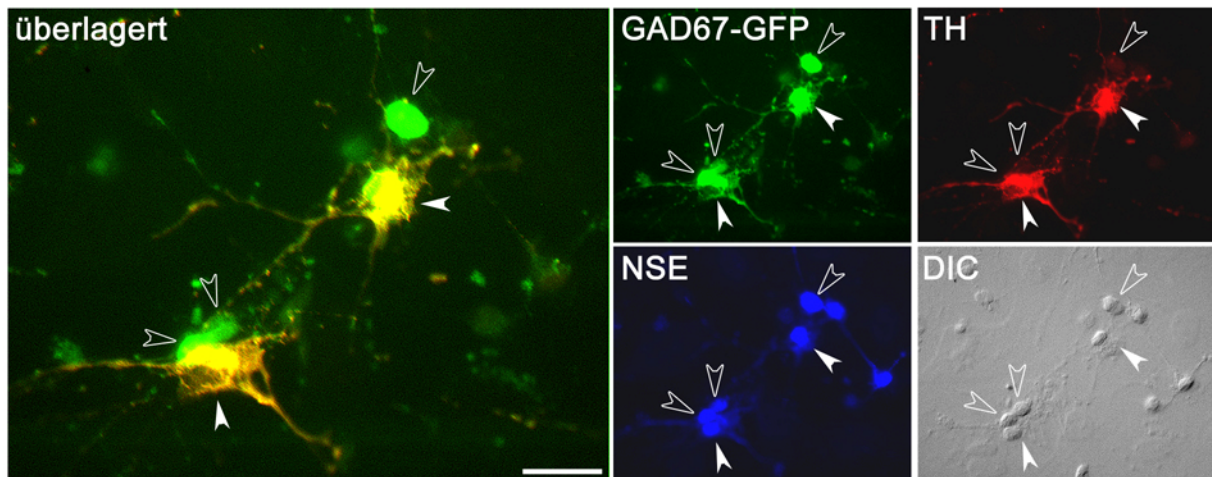


Abbildung 48: GAD-positive Neurone des N. arcuatus exprimieren Dopamin. Zellkultur des N. arcuatus der GAD67-GFP knock-in-Mäuse; 4 Tage in Kultur. **Links:** Überlagerung der immunzytochemischen Färbungen gegen TH (rot) und gegen GFP. **Rechts:** Verkleinerte Darstellung der Überlagerung links, mit zusätzlicher Abbildung der dazugehörigen immunzytochemischen Färbung gegen NSE (Neuronenmarker) und Normarski-Optik (DIC). Die gefüllten Pfeilspitzen deuten auf Somata, die Dopamin und GABA exprimieren. Die ungefüllten Pfeilspitzen markieren Neurone, die GABAerg sind. Beide Neuronenpopulationen stehen scheinbar in direktem Kontakt zueinander. Maßstab 20µm

In Zellkulturen des lateralen Hypothalamus konnten ebenfalls Dopamin-positive Zellen identifiziert werden (Abb. 49). Diese Neurone exprimierten weder Orexin A, noch MCH. Allerdings wurden Orexin A- und MCH-enhaltende Neurone durch

dopaminerge Fasern innerviert und es wurden Berührungspunkte zwischen Dopamin- und Orexin A- beziehungsweise MCH-positiven Zellen gefunden.

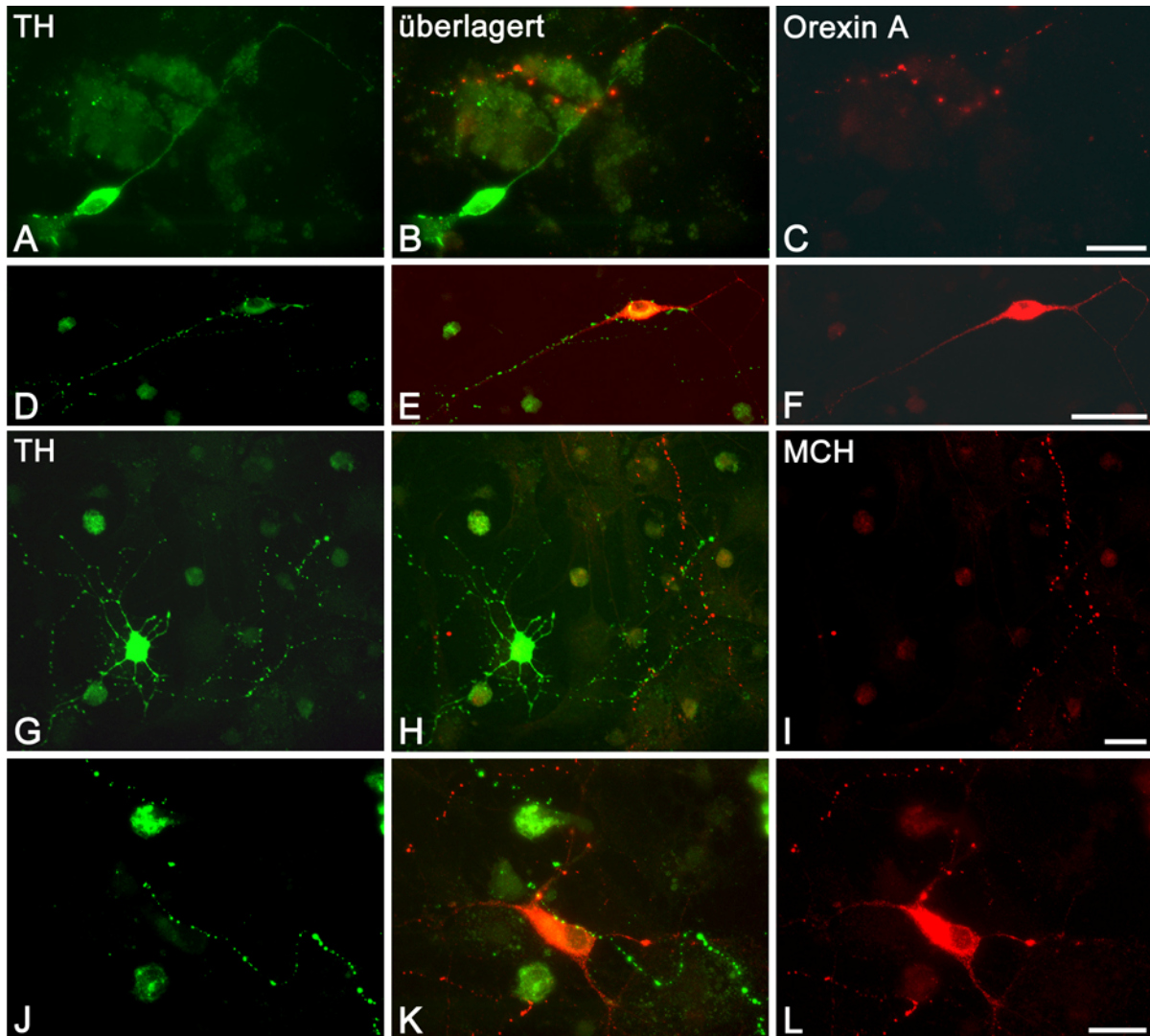


Abbildung 49: Orexin A- und MCH-exprimierende Neurone in Zellkulturen des lateralen Hypothalamus stehen in direktem Kontakt mit Dopamin-positiven Neuronen. A-L: Kultivierte Zellen des Hypothalamus lateralis der Ratte, 5 Tage in Kultur. **A, D:** Immunzytochemische Färbungen gegen TH. **C, F:** Immunzytochemische Färbungen gegen Orexin A. **B, E:** Überlagerung der Kanäle, die zeigt, dass dopaminerge Fasern Kontakt mit Orexin A-positiven Zellkörpern und Fortsätzen haben. **G, J:** Immunzytochemische Färbungen gegen TH. **I, L:** Immunzytochemische Färbungen gegen MCH. **H, K:** Überlagerung der Kanäle zeigt Kontaktpunkte der Dopamin-enthaltenden Fasern mit MCH-positiven Zellkörpern und Fortsätzen. Maßstab 20µm

Acetylcholin: Neben GABA und Dopamin wird auch der Neurotransmitter Acetylcholin in Zellen des Hypothalamus exprimiert. So wurden in Zellkulturen des SCN cholinerge Neurone durch immunzytochemische Färbungen gegen Cholinacetyltransferase (ChAT) gefunden (Abb. 50). Cholinerge Neurone stehen über ihre Fortsätze in direktem Kontakt mit Fortsätzen anderer Zellen. In Zellkulturen

des N. arcuatus fanden sich ebenfalls Kontaktpunkte zwischen Dopamin- und Acetylcholin-positiven Neuronen (Abb. 50D-F). Dopamin und Acetylcholin wurden nicht in denselben Zellkörpern gebildet.

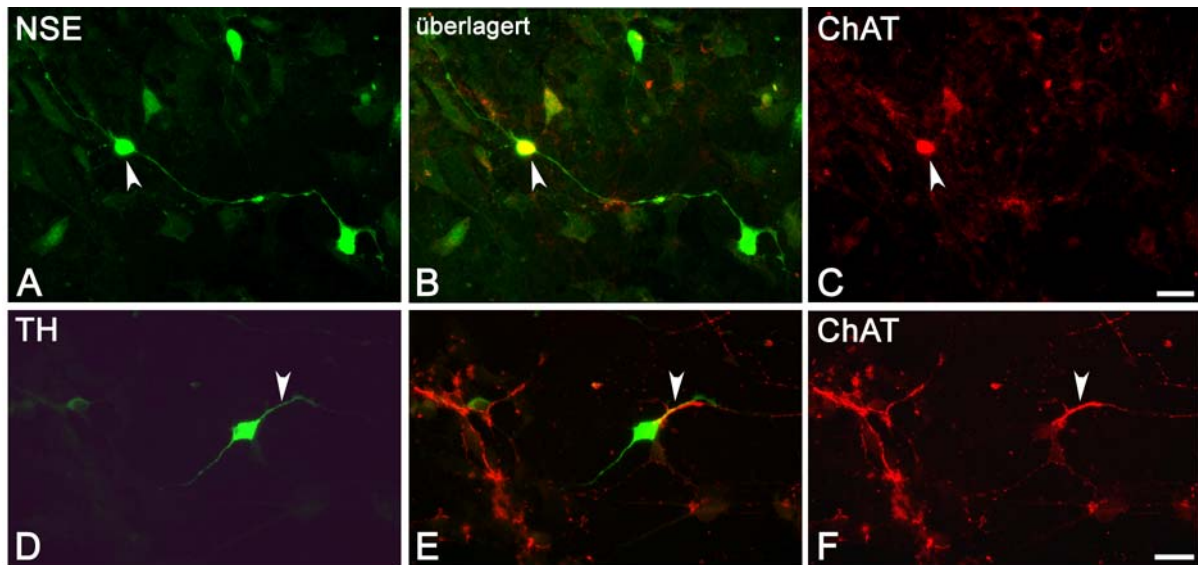


Abbildung 50: Neurone in Zellkulturen des Hypothalamus bilden Acetylcholin. **A-C:** Zellen des SCN der Zellen, 16 Tage in Kultur. **A:** Immunzytochemische Färbung gegen NSE. **C:** Immunzytochemische Färbung gegen ChAT zum Nachweis cholinergener Neurone. **B:** Die Überlagerung der Kanäle zeigt, dass ein SCN-Neuron Acetylcholin bildet (markiert durch Pfeilspitze) und über einen Zellfortsatz mit einem anderen Neuron in Verbindung steht. **D-F:** Zellen des N. arcuatus der Ratte, 10 Tage in Kultur. **D:** Immunzytochemische Färbung gegen Tyrosinhydroxylase (TH). **F:** Immunzytochemische Färbung gegen ChAT. **E:** Überlagerung der Kanäle zeigt Verbindungen zwischen cholinergen Fasern und dopaminergen Zellen (gekennzeichnet durch Pfeilspitze). Maßstab 20µm

5 Diskussion

Der SCN des Hypothalamus ist der Sitz der inneren Uhr, die circadiane Rhythmen erzeugt. Das Signal dieser Rhythmen wird durch neuronale Verbindungen und diffusile Faktoren in andere hypothalamische Kerngebiete übertragen. Dadurch werden circadiane Schwankungen physiologischer Prozesse und unbewussten Verhaltens durch externe Bedingungen synchronisiert. Umgekehrt wirken die hypothalamischen Kerngebiete modulatorisch auf die circadiane Uhr ein (Reuss 1996, Abrahamson et al. 2001, Saper et al. 2005).

Bis zum jetzigen Zeitpunkt konnte nicht geklärt werden, wie genau das circadiane Signal verbreitet wird. Allerdings wurden in den letzten Jahren einige Faktoren identifiziert, die vermutlich bei der Signalübertragung eine Rolle spielen.

Vasopressin- und VIP-exprimierende Neurone des SCN sind zum Teil spontan aktiv, bilden circadiane Rhythmen aus und projizieren in Areale des Hypothalamus, zu denen der laterale Hypothalamus und der N. arcuatus im posterioren Hypothalamus zählen. Diese Kerngebiete steuern physiologische Vorgänge, die circadianen Rhythmen unterliegen, wie der Schlaf-Wach-Rhythmus und die Nahrungsaufnahme (Abrahamson et al. 2001, Welsh et al. 2005). Umgekehrt werden SCN-Neurone durch Projektionen aus dem posterioren Hypothalamus innerviert (Abrahamson et al. 2001) und die circadiane Rhythmik physiologischen Parametern entsprechend korrigiert.

In der vorliegenden Arbeit sollten mögliche Kommunikationswege und neuroaktive Substanzen, über die das circadiane Signal verbreitet wird identifiziert werden. Außerdem sollten Kommunikationspfade gefunden werden, über die circadiane Rhythmen durch andere hypothalamische Nuclei moduliert werden können. Daher wurde immunzytochemisch die Verbreitung zweier im SCN synthetisierter Neuropeptide (Vasopressin und VIP) sowie zweier ausschließlich in Zielgebieten des SCN gebildeter Neuropeptide (Orexin A und MCH) untersucht. Diese Neuropeptide spielen bei der Regulation circadian schwankender Prozesse eine wichtige Rolle (van Esseveldt et al. 2000).

Anhand von Studien im Hypothalamus verschiedener transgener Mäuse, die als Marker für spezifische Neurotransmitter und Synapsen eingesetzt wurden, sollten die Neuropeptid-exprimierenden Zellpopulationen innerhalb der Nuclei detaillierter charakterisiert werden. Außerdem sollten durch immunzytochemische Untersuchung

primärer Zellkulturen Verschaltungen und Interaktionen zwischen den Neuronen eingehender beleuchtet werden.

5.1 Neuropeptide im Hypothalamus

Die Verteilungen Vasopressin-, VIP-, Orexin A- und MCH-haltiger Somata und Projektionen im Hypothalamus sind bei Ratte und Maus vergleichbar. Die durchgeführten immunzytochemischen Untersuchungen verschafften einen Überblick, ließen jedoch meist keine präzisen Aussagen über den Ursprung und Verlauf bestimmter Fasern zu. Die Dichte immunoreaktiver Zellkörper und Fortsätze war in den Serienschnitten stellenweise zu hoch und konnten daher nicht einzeln betrachtet werden. In der Literatur beschriebene Tracing-Studien wurden zur Rekonstruktion der neuronalen Verbindungen zu Hilfe genommen (Björklund et al. 1987, Watts et al. 1987, Watts & Swanson 1987, Abrahamson et al. 2001).

Vasopressin / VIP: Die Expressionsmuster Vasopressin- und VIP-positiver Somata und deren Fortsätze im Hypothalamus stimmte mit den von verschiedenen Autoren bereits beschriebenen überein (Björklund et al. 1987, Watts & Swanson 1987, Abrahamson et al. 2001, Abrahamson & Moore 2001).

Sowohl Vasopressin- als auch VIP-enthaltende Fasern wurden in hypothalamischen Zielgebieten des SCN gefunden. In den Kerngebieten des lateralen Hypothalamus wie dem N. dorsomedialis und dem Hypothalamus lateralis war die Dichte Vasopressin-positiver Projektionen höher als die der VIP-positiven, was sich mit den Untersuchungsergebnissen von Watts und Swanson in der Ratte deckt (Watts & Swanson 1987).

Anhand der durchgeführten immunzytochemischen Studien konnte meist kein genauer Faserursprung bestimmt werden. Allerdings wurden der N. paraventricularis und der N. supraopticus als Hauptquelle Vasopressin-positiver Fasern im Hypothalamus bestimmt, was ebenso von Swanson und Watts postuliert wurde (Watts & Swanson 1987). Tracing-Studien belegten, dass den SCN dorsocaudal verlassende Vasopressin-enthaltende Fasern über die subparaventriculäre Zone in den lateralen Hypothalamus ziehen (Watts & Swanson 1987, Abrahamson et al. 2001, Abrahamson & Moore 2001b). Des Weiteren wurde gezeigt, dass die aus dem N. paraventricularis entspringenden Projektionen sich lateral und dorsal zum Tractus opticus ausbreiten, wo sie sich mit den Vasopressin-positiven Fasern aus dem N. supraopticus vereinigen. Diese Fasern verlaufen ventral zum 3. Ventrikel zur

Eminentia mediana und ziehen überwiegend zur Neurohypophyse (Björklund et al. 1987).

Während die Vasopressin-positiven Neurone eher medial am N. periventricularis aus dem SCN projizierten, traten VIP-positive Fasern, ebenfalls dorsocaudal aber lateral, aus dem Kerngebiet und verliefen ebenso über die subparaventriculäre Zone in den lateralen Hypothalamus. Sowohl Watts und Swanson als auch Abrahamson und Kollegen veranschaulichten durch Tracing-Studien, dass VIP-exprimierende Neurone des SCN in den N. dorsomedialis und den Hypothalamus lateralis des posterioren Hypothalamus projizieren (Watts & Swanson 1987, Abrahamson et al. 2001b, Abrahamson & Moore 2001). Im Hypothalamus stellt der SCN das einzige Kerngebiet dar, das VIP-exprimierende Neurone beinhaltet. Die Neuropeptidhaltigen Zellen liegen hauptsächlich im ventralen und vom optischen Trakt innervierten Teil des Nucleus und projizieren von dort aus zu verschiedensten Kerngebieten (van Esseveldt et al. 2000). Durch die immunzytochemischen Färbungen wurden unter anderem im lateralen Hypothalamus VIP-positive Fasern gefunden, deren Ursprung höchstwahrscheinlich der SCN ist. Allerdings kann nicht ausgeschlossen werden, dass einige der VIP-enthaltende Fasern von extrahypothalamischen VIP-exprimierenden Neuronen stammen. Björklund und Kollegen beschrieben beispielsweise VIP-exprimierende Zellen im Cortex und einigen hippocampalen Strukturen, deren Fortsätze jedoch relativ kurz sein sollen (Björklund et al. 1987). Einige Zellen des Hippocampus könnten trotzdem in den posterioren Hypothalamus projizieren.

Ein weiteres Gebiet des posterioren Hypothalamus, das durch Vasopressin- und VIP-positive Fasern innerviert wurde, ist der N. arcuatus. Auch dieses Kerngebiet wurde von Watts und Kollegen bereits als Ziel von SCN-Projektionen identifiziert, die über die Area retrochiasmatica das Kerngebiet innervieren (Watts et al. 1987, Kriegsfeld & Silver 2006). Allerdings ziehen vom Sitz der inneren Uhr lediglich vereinzelt Fasern zum N. arcuatus. Einige waren positiv für Vasopressin oder VIP, was zum Teil schon von anderen Autoren beschrieben wurde (Abrahamson & Moore 2001b, Gerhold et al. 2001, Mahoney et al. 2007).

Das Verteilungsmuster Vasopressin- und VIP-enthaltender Fasern im Hypothalamus überlappt größtenteils, lediglich in der Dichte der Projektionen gibt es erhebliche Unterschiede.

Orexin A / MCH: Die Neuropeptide Orexin A und MCH wurden in dieser Arbeit nur in zwei unterschiedlichen Neuronenpopulationen des lateralen Hypothalamus nachgewiesen. Dieses Ergebnis deckt sich mit früheren Ergebnissen von *in situ* Hybridisierungsanalysen und immunzytochemischen Studien (Bittencourt et al. 1992, Broberger et al. 1998, de Lecea et al. 1998, Sakurai et al. 1998, Abrahamson & Moore 2001a, Guan et al. 2002).

Die Expressionsmuster beider Neuropeptide in diesem Gebiet waren ähnlich. Orexin A-positive Zellen lagen vornehmlich im Hypothalamus lateralis und dem um die Fornix befindlichen N. perifornicalis. Ferner wurden einige Zellen im N. dorsomedialis und der Zona incerta gefunden. MCH-positive Zellkörper fanden sich in den gleichen Kerngebieten, nur die Anzahl der Zellen in der Zona incerta und dem N. dorsomedialis war höher als die der orexinergen Neurone. Außerdem waren die MCH-haltigen Neurone eher in einem Zellhaufen (Cluster) angeordnet, was sich mit den Befunden von Broberger und Kollegen deckt (Broberger et al. 1998).

Orexin A- oder MCH-positive Fasern wurden im gesamten Hypothalamus gefunden, auch im SCN und im N. arcuatus. Demnach bestehen direkte Verbindungen zwischen dem lateralen Hypothalamus und dem SCN beziehungsweise zwischen dem N. arcuatus und dem SCN. Sie wurden teilweise bereits früher beschrieben (Broberger et al. 1998, Abrahamson et al. 2001) und werden bei der Betrachtung der einzelnen Kerngebiete genauer besprochen.

Im direkt den SCN umgebendem Gewebe war die Dichte der Orexin A- oder MCH-enthaltenden Fasern wesentlich höher als im SCN selbst. Möglicherweise werden die meisten aus dem lateralen Hypothalamus projizierenden Fortsätze in diesem Bereich verschaltet, da die Projektionen in die Regulation verschiedener Prozesse involviert sind.

Eine besonders hohe Dichte an Orexin A- und MCH-positiven Fasern war im lateralen Hypothalamus zu beobachten, was darauf hindeutet, dass viele Fortsätze innerhalb dieser Region verschaltet sind und nicht in andere Bereiche projizieren.

5.2 Der Nucleus suprachiasmaticus

5.2.1 Die Neuropeptidexpression und Transmitterverteilung im SCN

Vasopressin und VIP werden in zwei getrennten Neuronenpopulationen des SCN exprimiert (van Esseveldt et al. 2000). Die unterschiedliche Färbeintensität der Neurone lässt darauf schließen, dass der Neuropeptidgehalt in den Zellen variiert.

Das Neuropeptid VIP konnte im SCN von Maus und Ratte im ventralen Teil immunzytochemisch gefunden werden. Vasopressin-positive Neurone waren im SCN der Maus über das gesamte Kerngebiet verteilt, während sie bei der Ratte vornehmlich im dorsalen Teil lagen. Beide Neuropeptide überdeckten mit dichten Fasernetzen den gesamten SCN. Verglichen mit der Anzahl der Projektionen innerhalb des Kerngebiets war der Teil der Vasopressin- oder VIP-enthaltenden Fortsätzen, die das Kerngebiet verließen, gering. Demnach scheinen die meisten Fasern innerhalb des SCN verschaltet zu werden und lediglich eine geringere Anzahl innerviert externe Nuclei. Van den Pol und Kollegen fanden beispielsweise bei ihren immunzytochemischen Studien Axone Vasopressin-positiver Zellen, die andere Vasopressin-exprimierende Neurone des SCN innervierten (van den Pol 1986).

Interne Verschaltungen sind unter anderem für die Synchronisation der SCN-Zellen notwendig. Yamaguchi und Kollegen trennten den ventralen vom dorsalen SCN und stellten fest, dass der isolierte dorsale Teil zwar Rhythmen beibehält, deren Phasen sich jedoch verschieben und die Rhythmen somit desynchronisieren. Die Rhythmen des ventralen SCN blieben synchron. Demnach spielen die anatomische Aufteilung und die neuronalen Verbindungen innerhalb des Kerngebiets eine entscheidende Rolle bei der Synchronisation (Yamaguchi et al. 2003, Liu et al. 2007).

Die VIP-positiven Fortsätze scheinen stark im dorsalen SCN verschaltet zu werden, da auch dort ein dichtes Fasernetz vorhanden war. Vermutlich wird so die über den retinohypothalamischen Trakt im ventralen SCN eintreffende Lichtinformation in den dorsalen Teil transferiert und von dort aus in weitere Hirnstrukturen geleitet.

Die Untersuchungsergebnisse in der Munc 13-1-EYFP-Maus lassen darauf schließen, dass die Signalübertragung im SCN größtenteils über Synapsen verläuft, da unzählige Synapsen gefunden wurden, die auf den Somata und Fortsätzen der Vasopressin- und VIP-positiven Neuronen lagen. Ein Großteil dieser Synapsen (Decavel & van den Pol 1990, Liu et al. 2007), über die sich die individuellen SCN-

Neurone synchronisieren (Honma et al. 2000), dürfte GABA als primären Transmitter ausschütten (Reghuandanan & Reghuandanan 2006).

GABA ist der bedeutendste hemmende Neurotransmitter des SCN und wird von den meisten Zellen des Kerngebiets exprimiert (Reghuandanan & Reghuandanan 2006). Dies konnte auch durch Studien am SCN der GAD67-GFP knock-in-Maus gezeigt werden, deren GAD67-positiven Zellen grün fluoreszieren und als GABA-positiv angesehen werden (Tamamaki et al. 2003). Die GAD67-positiven Neurone waren gleichmäßig über das Kerngebiet verteilt, was dem Ergebnis immunzytochemischer Untersuchungen von Moore und Sefl entspricht (Moore & Sefl 1993). Viele der neuroaktiven Substanzen des SCN sind mit GABA kolokalisiert (van Esseveldt et al. 2000, Abrahamson & Moore 2001). Zu ihnen zählen auch die Neuropeptide Vasopressin und VIP. In der GAD67-GFP knock-in-Maus waren etwa 50% der Vasopressin- oder VIP-positiven Neurone GAD67-positiv. Aufgrund der unterschiedlichen Expressionsstärke von GFP in den Zellen der GAD67-GFP knock-in-Maus, war es manchmal schwierig zu entscheiden, ob eine Zelle als GABAerg gewertet werden konnte oder nicht. Dazu kam, dass GFP auch im Neuropil exprimiert wurde. Aus diesem Grund wurden lediglich die Zellen als GABAerg beziehungsweise GAD-positiv angesehen, die eindeutig GFP-positiv waren.

Besonders durch elektrophysiologische Untersuchungen des SCN wurde in den letzten Jahren die Bedeutung von GABA gezeigt. Die Applikation von GABA auf SCN-Neurone bewirkte nicht nur eine Phasenverschiebung, sondern synchronisierte auch die elektrische Aktivität einzelner SCN-Neurone oder des ventralen und dorsalen SCN (Liu & Reppert 2000, Albus et al. 2005). GABA ist demnach ein Kandidat, der bei der Weiterleitung des circadianen Signals eine Rolle spielt und möglicherweise mit einer oder mehreren neuroaktiven Substanzen des SCN zusammen wirkt.

5.2.2 Innervation von SCN-Neuronen durch Orexin A- und MCH-positive Fortsätze

Anhand von Tracing-Studien wurde bewiesen, dass der laterale Hypothalamus und der SCN in direkter Verbindung zueinander stehen, da Projektionen gefärbt werden konnten, die vom SCN zum lateralen Hypothalamus und in umgekehrte Richtung verlaufen (Watts & Swanson 1987, Watts et al. 1987, Moga & Moore 1997, Abrahamson et al. 2001, van Esseveldt et al. 2000).

In dieser Arbeit wurden sowohl Orexin A- als auch MCH-enthaltende Fasern im SCN gefunden, deren Ursprung im lateralen Hypothalamus liegen musste, da nur dort Neurone diese beiden Neuropeptide exprimieren.

Die Fortsätze der OrexinA- und MCH-positiven Zellen projizierten gleichmäßig in den gesamten SCN. Aufgrund des heterogenen Vorkommens neuroaktiver Substanzen im SCN war davon auszugehen, dass nicht nur ein Neuronentyp dieses Nucleus durch die Fasern innerviert wurde. Allerdings wurden in dieser Arbeit in erster Linie Vasopressin- und VIP-exprimierende Neurone als mögliche Zielzellen untersucht.

Im SCN der Maus wurden weder Vasopressin-enthaltende Somata noch Fortsätze als Ziel Orexin A- oder MCH-positiver Fasern identifiziert. Auch im SCN der Ratte konnten immunzytochemisch keine möglichen Kontaktstellen zwischen Orexin A-positiven Fortsätzen und Vasopressin-exprimierenden Neuronen gezeigt werden. Allerdings innervierten MCH-positive Fasern im dorsalen Ratten-SCN vereinzelt Vasopressin-enthaltende Fasern.

VIP-positive Neurone im SCN wurden weder bei der Maus noch bei der Ratte durch MCH-enthaltende Fortsätze innerviert. Orexin A-positive Fortsätze projizierten dagegen bei der Ratte eindeutig auf VIP-exprimierende Neurone im ventromedialen SCN. Das traf für den SCN der Maus nicht zu.

Bei den hier beschriebenen Kontakten schien es sich vornehmlich um synaptische Kontakte zu handeln. Die Untersuchungen in der Munc 13-1-EYFP-Maus verdeutlichten, dass sowohl die Vasopressin- als auch VIP-exprimierenden Neurone und Orexin A-positiven Fortsätze reich an Synapsen sind. Es ist davon auszugehen, dass dies ebenso in der Ratte zutrifft. Immunzytochemische Färbungen an primären hypothalamischen Ratten-Zellkulturen verdeutlichten, dass die meisten Neurone Synapsen ausbilden (Abb. 41; Literatur: Klisch et al. 2006).

Bei Maus und Ratte scheinen unterschiedliche Verbindungen zwischen den einzelnen Kerngebieten zu bestehen. Möglicherweise variieren auch die Wege der Signalübertragung bei diesen beiden Tierarten, da bei der Maus Orexin A-enthaltende Fortsätze nicht direkt auf VIP-exprimierende Neurone und MCH-enthaltende Fasern nicht direkt auf Vasopressin-exprimierende Zellen projizieren. Denkbar wäre, dass diese SCN-Neuronenpopulationen von den Fasern aus dem lateralen Hypothalamus indirekt innerviert werden oder außerhalb des Kerngebiets miteinander verschaltet sind. Die subparaventriculäre Zone wird sowohl durch Fasern aus dem SCN, als auch von Projektionen aus dem lateralen Hypothalamus

innerviert (Watts & Swanson 1987, Saper et al. 2005). Durch Läsion dieser hypothalamischen Struktur konnte bewiesen werden, dass die Amplitude der circadianen Rhythmen des Schlaf-Wach-Zyklus und der Körpertemperatur reduziert werden (Saper et al. 2005). Beide Rhythmen werden durch Areale des lateralen Hypothalamus reguliert. Somit ist die subparaventriculäre Zone wichtig für die Signalübertragung von SCN zum lateralen Hypothalamus und umgekehrt.

Über den Effekt von Orexin A oder MCH auf SCN-Neurone ist bislang nur wenig bekannt. Farkas und Kollegen stellten fest, dass die Applikation von Orexin A in geringerer Dosierung einen erregenden Effekt auf SCN-Neurone hat, während die Zugabe einer höheren Dosierung die Aktivität hemmt (Farkas et al. 2002). Die von der Arbeitsgruppe Meissl durchgeführten elektrophysiologischen Untersuchungen an kultivierten Zellen des SCN zeigten ebenfalls, dass Orexin A sowohl hemmende als auch erregende Wirkung auf einige Neurone hat (nicht publiziert).

Über welche Mechanismen Orexin wirkt ist weiterhin unklar. Torrealba und Kollegen beschrieben an Orexin-enthaltenden Fasern zwei Arten von Vesikeln (Torrealba et al. 2003). Zum einen kleine Vesikel, die Glutamat enthalten und zum anderen größere Vesikel, die Orexin beinhalten. Möglicherweise sind auch den SCN innervierende Fasern mit zweierlei Vesikeln ausgestattet. Orexin A könnte modulierend auf die Glutamatausschüttung wirken. Das würde erklären, warum Orexin lediglich geringe Effekte auf SCN-Zellen hat.

5.2.3 Glyzin im N. suprachiasmaticus

Mit Hilfe der GlyT2-EGFP-Maus wurden in dieser Arbeit erstmals glyzinerge Fasern im SCN gefunden. Rampon und Kollegen beschrieben keinerlei glyzinerge Fasern im SCN der Ratte (Rampon et al. 1996). Demzufolge gibt es eventuell Unterschiede zwischen diesen Tierarten. Die verschiedenen Ergebnisse bei Maus und Ratte könnten jedoch auch methodisch bedingt sein. Der Glyzin-Gehalt könnte für die immunzytochemische Detektion zu gering sein.

Genauso wie bei den Orexin A- und MCH-positiven Fasern fiel bei den glyzinergeren Projektionen auf, dass in dem SCN angrenzenden Gewebe die Faserdichte höher war als im SCN selbst. Vermutlich werden viele der glyzinergeren Fasern, die in Richtung des SCN projizieren dort anderweitig verschaltet. Das könnte ein Hinweis für die Verwicklung von Glyzin in die Regulation verschiedener physiologischer Abläufe sein.

Obwohl Glyzin im SCN ausgeschüttet wird, wurden keinerlei glyzinerge Zellen nachgewiesen. Daher entspringen die Fasern anderen Bereichen des Gehirns. Im lateralen Hypothalamus wurden vereinzelt glyzinerge Zellen gefunden, ebenso in hippocampalen Strukturen, die als Quelle der hypothalamischen Fasern in Frage kommen. Der Hippocampus ist zentrale Schaltstation des limbischen Systems, das der Verarbeitung von Emotionen dient. Saper und Kollegen beschrieben nicht-photische emotionale Eingänge ausgehend von diesen Hirnstrukturen in den Hypothalamus, die circadiane Rhythmen regulieren (Saper et al. 2005). Genauere Aussagen über den Ursprung glyzinerger Fasern im SCN können aufgrund der hohen Dichte und starken Verzweigungen der Projektionen nicht getroffen werden.

Die Bedeutung und Funktion dieses hemmenden Neurotransmitters im SCN ist bisher unbekannt. Elektrophysiologische Untersuchungen an dissoziierten SCN-Zellen der Ratte zeigten einen Glyzin-Effekt auf die neuronale Aktivität der Zellen (Ito et al. 1991). Interessanterweise unterliegt die Glyzinausüttung in organotypischen Schnittkulturen des Ratten-SCN einem circadianen Muster, das vermutlich an die circadiane Schwankung des Vasopressin-Gehalts gekoppelt ist (Shinohara et al. 1998).

Im SCN selbst konnten lediglich im ventromedialen Teil Vasopressin-positive Fasern als Ziel Glyzin-positiver Projektionen immunzytochemisch erkannt werden. Welche anderen Neuronentypen innerviert wurden, blieb ungeklärt. VIP-exprimierende Neurone hatten ebenso wenig direkten Kontakt zu glyzinerger Fasern wie Orexin A- oder MCH-positive Projektionen. Allerdings könnten diese auch indirekt durch den Neurotransmitter Glyzin beeinflusst werden oder außerhalb des SCN miteinander verschaltet sein, möglicherweise in der subparaventriculären Zone.

5.3 Zielgebiete des N. suprachiasmaticus

Der laterale Hypothalamus und der N. arcuatus sind als Zielgebiete des SCN bekannt (Watts et al. 1987, Watts & Swanson 1987, Thompson & Swanson 1998, van Esseveldt et al. 2000, Abrahamson & Moore 2001b). Efferente Projektionen des SCN scheinen hauptsächlich Vasopressin- oder VIP-positiv zu sein (Reghuandanan & Reghuandanan 2006).

5.3.1 Der Hypothalamus lateralis

Die Neuropeptide Orexin A und MCH wurden im Bereich des lateralen Hypothalamus von zwei getrennten Neuronenpopulationen exprimiert (Abb. 26 und

Literatur: Steininger et al. 2004, Abrahamson et al. 2006, Swanson et al. 2005). Unterschiede zwischen Maus und Ratte waren nicht ersichtlich. Immunoreaktive Projektionen der Neuronenpopulationen innervierten alle untersuchten Kerngebiete des Hypothalamus. Im lateralen Hypothalamus existierte ein dichtes Fasernetz, was vermuten ließ, dass Orexin A- und MCH-positive Axone innerhalb des Kerngebiets enden. Tatsächlich konnten Kontakte zwischen Neuronen beider Neuronengruppen sowie zwischen Neuronen derselben Neuronenpopulation beobachtet werden. Überwiegend schien es sich um reziproke synaptische Kontakt zu handeln, was frühere Untersuchungen bestätigt (Guan et al. 2002). Die in der Munc 13-1-EYFP-Maus durchgeführten Studien im lateralen Hypothalamus zeigten unzählige Synapsen auf, die unter anderem auf Orexin-positiven Neuronen zu finden waren.

In Zellkulturen des lateralen Hypothalamus wurden eindeutig synaptische Kontakte zwischen Orexin A- und MCH- exprimierenden Neuronen gefunden.

Die Interaktion zwischen Orexin A- und MCH-positiven Neuronen spielt in der circadianen Regulation der Nahrungsaufnahme eine Rolle, in die beide Neuropeptide verwickelt sind (Martynska et al. 2005).

Durch Tracing-Studien wurde bekannt, dass Vasopressin- und VIP-enthaltende Fortsätze aus dem SCN den lateralen Hypothalamus innervieren (Watts et al. 1987, van Esseveldt et al. 2000, Abrahamson et al. 2001). Abrahamson und Kollegen zeigten, dass Vasopressin- und VIP-positive Fortsätze aus dem SCN der Ratte zu Orexin A- und MCH-exprimierenden Neuronen projizieren und mit diesen direkte Kontakte herstellen (Abrahamson et al. 2001). Dieses Ergebnis konnte hier allerdings weder in der Maus noch in der Ratte durch immunzytochemische Färbungen bestätigt werden. Der Verlauf Vasopressin- oder VIP-positiver Fasern im lateralen Hypothalamus lag zwar teilweise direkt an Orexin A- oder MCH-exprimierenden Neuronen, jedoch waren keinerlei Anzeichen für direkte Kontaktpunkte erkennbar. Möglicherweise war die in dieser Arbeit verwendete Methode nicht empfindlich genug, um diese Kontakte zu zeigen.

Im lateralen Hypothalamus der Maus wurden allerdings eindeutig Vasopressin-positive Fasern gefunden, die GAD-positive Neurone innervieren. Über den Ursprung dieser Fasern können lediglich Mutmaßungen angestellt werden. Möglicherweise handelt es sich um Fasern aus dem SCN, aber auch der N. paraventricularis kommt in Frage. Von beiden Nuclei ist bekannt, dass Vasopressin-

enthaltende und GABA-positive Fortsätze zu GABA-positive Zellen des lateralen Hypothalamus projizieren (Buijs et al. 1994).

Die Vasopressin-positiven Fasern konnten jedoch nicht eindeutig als GABAerg identifiziert werden, da diese Untersuchung in der GAD67-GFP knock-in-Maus durchgeführt wurde. Wie bereits erwähnt waren in dieser transgenen Mauslinie die GABAergen Axone nur schwer sichtbar, da GFP auch im Neuropil exprimiert wurde (Tamamaki et al. 2003). Buijs und Kollegen beschrieben Vasopressin-positive und GABAerge Fasern des SCN, die zum N. dorsomedialis ziehen (Buijs et al. 1994).

VIP-enthaltende Fortsätze waren nur spärlich im lateralen Hypothalamus vorhanden und schienen auch zu GAD-positiven Zellen keinerlei Kontakte auszubilden.

GABA ist im lateralen Hypothalamus reichlich vorhanden. Die durchgeführten immunzytochemischen Studien ergaben, dass zwischen 50 und 60% der MCH-exprimierenden Neurone GAD-positiv sind. Demnach existieren mindestens zwei verschiedene MCH-produzierende Neuronenpopulationen (siehe auch Meister 2007). Eine besondere Verteilung der Neuronenpopulationen innerhalb der Regionen des lateralen Hypothalamus war nicht ersichtlich. Die MCH-exprimierenden Neurone, die kein GAD beziehungsweise GABA bilden, produzieren stattdessen wahrscheinlich Glutamat. Das Gleiche gilt für die Orexin A-exprimierenden Neurone, die grundsätzlich kein GAD aufwiesen. Allerdings stehen diese Neurone zum Teil in direktem Kontakt mit GAD-positiven Zellen.

Vermutlich werden über die Verbindung zwischen SCN und den Gebieten des lateralen Hypothalamus unter anderem die circadianen Rhythmen des Schlaf-Wach-Rhythmus und der Nahrungsaufnahme moduliert.

Ein weiterer hemmender Neurotransmitter im Hypothalamus ist Glyzin. Rampon und Kollegen beschrieben bereits im lateralen Hypothalamus von Ratten Glyzin-positiv Fasern (Rampon et al. 1996). Dieser Befund konnte durch die Verwendung der GlyT2-EGFP-Maus in der Maus bestätigt werden. Neben einem dichten Netz Glyzin-enthaltende Fasern wurden zusätzlich in diesem Gebiet des Hypothalamus vereinzelt Glyzin-positiv Zellen gezeigt.

Orexin A-, MCH- und Vasopressin-positiv Neurone des Kerngebiets wurden durch glyzinerge Fasern innerviert, deren Ursprung aufgrund der hohen Faserdichte und den unzähligen Verzweigungen nicht bestimmt werden konnte, aber zu einem kleinen Teil im lateralen Hypothalamus und in Zellen des Hippocampus vermutet wird. Hierbei handelt es sich eventuell um nicht-photische Signalwege in den

Hypothalamus vom Cortex oder dem limbischen System ausgehend, die circadiane Rhythmen steuern.

Die Funktion von Glyzin und dessen Wirkung auf Neurone des lateralen Hypothalamus ist weitgehend unbekannt. Yamanaka und Kollegen beschrieben bei einigen wenigen Orexin A-exprimierenden Neuronen einen Effekt von Glyzin auf das Membranpotential (Yamanaka et al. 2003).

Besonders bei der GlyT2-EGFP-Maus wurden immunzytochemisch Vasopressin-positive Neurone mit langen und massiven Fortsätzen im lateralen Hypothalamus gefunden. Die Expression dieses Neuropeptids im lateralen Hypothalamus der verschiedenen verwendeten Mauslinien und der Ratte war sehr variabel. In der GAD67-GFP knock-in-Maus beispielsweise wurden keinerlei Vasopressin-exprimierende Zellkörper in dieser Region identifiziert. Durch eine empfindlichere Methode könnte Vasopressin im lateralen Hypothalamus der unterschiedlichen Mauslinien gefunden werden. Eventuell variiert der Vasopressin-Gehalt in verschiedenen Mauslinien, was auf saisonale Schwankungen zurückgeführt werden könnte (Hermes et al. 1990).

Eine weitere Gruppe von Zellen, bei denen direkte Verbindungen zu Orexin A-positiven Neuronen nachgewiesen werden konnten, sind Dopamin-positive Zellen. Allerdings konnten Kontaktstellen zwischen diesen beiden Zellpopulationen lediglich im lateralen Hypothalamus der Ratte und nicht in der Maus gezeigt werden. In Zellkulturen des lateralen Hypothalamus der Ratte wurden direkte Verbindungen zwischen dopaminergen Zellen und Orexin A- beziehungsweise MCH-positiven Neuronen gefunden. Weder Orexin A noch MCH konnten zusammen mit Dopamin gefunden werden.

Dopaminerge Fasern projizieren aus verschiedensten Bereichen des Gehirns zu Orexin A- und MCH-positiven Neuronen (Bubser et al. 2005, Sita et al. 2003). Daher ist es schwer, Aussagen über mögliche Funktionen im lateralen Hypothalamus zu treffen. Dopamin hyperpolarisiert Orexin A-enthaltende Zellen, allerdings ist nicht endgültig geklärt, ob dies über Dopamin-Rezeptoren geschieht (Yamanaka et al. 2003, Bubser et al. 2005). Die Wirkung und mögliche Wirkmechanismen im Zusammenspiel von Orexin und Dopamin sowie zwischen MCH und Dopamin sind bisher weitgehend unbekannt.

5.3.2 Der Nucleus arcuatus

Der N. arcuatus wurde durch Tracing-Studien als Zielgebiet des SCN identifiziert (Watts & Swanson 1987, Watts et al. 1987, Abrahamson & Moore 2001a, Abrahamson et al. 2001). Immunzytochemisch wurden Vasopressin- und VIP-enhaltende Fasern in diesem Kerngebiet nachgewiesen, die zumindest teilweise, aus dem SCN stammen. Über diese Bahnen werden wahrscheinlich die Rhythmen der Nahrungsaufnahme und das Körpergewicht circadian moduliert, die durch Neurone im N. arcuatus als Antwort auf periphere Signale reguliert werden (Schwartz & Gelling 2002).

Der N. arcuatus und der laterale Hypothalamus stehen in direkter Verbindung miteinander. Orexin A- und MCH-positive Fortsätze projizieren aus dem lateralen Hypothalamus zu Neuronen des N. arcuatus. Einige Zielzellen dieser Projektionen konnten bereits identifiziert werden, wie Neuropeptid Y- oder AGRP, die beide appetitanregend wirken (Schwartz & Gelling 2002). Umgekehrt projizieren Neuropeptid Y-haltige Zellen des N. arcuatus zu Orexin A- und MCH-positiven Neuronen, die ebenfalls die Nahrungsaufnahme stimulieren (Broberger et al. 1998, Elias et al. 1998). Die Verbindung zwischen dem N. arcuatus und dem lateralen Hypothalamus sind essentiell für die Regulation der Nahrungsaufnahme.

Der hemmende Neurotransmitter GABA scheint im N. arcuatus, genauso wie im SCN und dem lateralen Hypothalamus, eine wichtige Rolle zu spielen, da die meisten Zellen GABA bildeten. Im N. arcuatus der GAD67-GFP knock-in-Maus waren die GAD-positiven Zellen gleichmäßig verteilt.

Vasopressin- und Orexin A- positive Fasern innervierten vereinzelt GAD- positive Zellen im N. arcuatus. Da viele der GABAergen Zellen auch Neuropeptid Y enthalten, könnten diese Verbindungen bei der Regulation der Nahrungsaufnahme eine Rolle spielen.

Anhand der immunzytochemischen Färbungen in der GAD67-GFP knock-in-Maus war es nicht zweifelsfrei möglich, Aussagen darüber zu treffen, ob Vasopressin-, Orexin A- oder MCH-positive Fortsätze im N. arcuatus GAD-positiv sind. Wie bereits erörtert, ist die Identifizierung der grün fluoreszierenden und damit GAD67- enthaltenden Axone in dieser Mauslinie im ebenfalls GFP-exprimierenden Neuropil sehr schwierig.

Der hemmende Transmitter Glyzin war im N. arcuatus, wie im SCN, lediglich in Fasern nachzuweisen, eine Übereinstimmung mit den Befunden von Rampon in der

Ratte (Rampon et al. 1996). Diese Fasern werden, wie die GAD-positiven Projektionen, vereinzelt von Orexin-enthaltenden Fortsätzen innerviert. Über die Wirkung und Funktion im N. arcuatus können keine Aussagen getroffen werden.

5.4 Histiotypische Zellkulturen

Im Rahmen dieser Arbeit wurden stabile Zellkulturen angelegt, deren Neuropeptidexpressionsmuster mit denen im intakten Gewebe übereinstimmte. Durch die überschaubare Anzahl von Zellen, konnten Kontakte zwischen Neuronenpopulationen dargestellt werden.

Die Zellkulturen bieten ein sehr gutes Modell zur immunzytochemischen und elektrophysiologischen Charakterisierung von Zellen.

Leider variierte die Qualität der Zellkulturen stark. Die Zellen entwickelten sich zeitweise aufgrund eines Bakterienbefalls sehr schlecht. Trotz intensivster Bemühungen konnten die Bakterien oder deren Quelle nicht genau bestimmt werden. Auch die Applikation verschiedener Antibiotika brachte nur zum Teil eine Besserung.

Bei der Herstellung der Zellkulturen konnte nicht ausgeschlossen werden, dass umliegendes Gewebe der Kerngebiete mit ausgestanzt wurde. Beispielsweise wurden in Kulturen des SCN cholinerge Zellen nachgewiesen, die im intakten Tier nicht vorkommen (Rao et al. 1987). Allerdings projizieren cholinerge Fasern in den SCN und der Neurotransmitter scheint in die Regulation der circadianen Rhythmik involviert zu sein (Rao et al. 1987, Semba 2004). Die in den Zellkulturen nachgewiesenen cholinergen Zellen stammten vermutlich aus dem Neuropil zwischen N. periventricularis und Area hypothalamica.

5.5 Der Neurotransmitters Glyzin im circadianen System: Ein Ausblick

Der SCN ist der Schrittmacher des circadianen Systems in Säugetieren (Reuss 1996). Die in diesem Kerngebiet erzeugten Rhythmen werden über Projektionen und diffusible Faktoren mittels diverser Neurotransmitter, Neuropeptide und Modulatoren in verschiedene hypothalamische Nuclei transferiert. Umgekehrt wird die circadiane Rhythmik durch Eingänge aus diesen hypothalamischen Kerngebieten moduliert und so den physiologischen Eigenschaften des Individuums angepasst (van Esseveldt et al. 2000).

In dieser Arbeit wurden der SCN selbst und zwei seiner Zielgebiete näher untersucht, der laterale Hypothalamus und der N. arcuatus. Beide Kerngebiete

stehen in direkter und indirekter Verbindung mit der inneren Uhr, beide steuern physiologische Prozesse, wie die Regulation der Ernährung und des Energiehaushalts, die circadianen Rhythmen unterliegen (Meister 2007).

Das heterogene Vorkommen von Neuropeptiden und Neurotransmitter in den drei Nuclei legt die Vermutung nahe, dass mehrere neuroaktive Substanzen bei der Übertragung des circadianen Signals oder bei der modulatorischen Rückkopplung zu den SCN-Neuronen eine Rolle spielen. Die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen verstärkten die Vermutung, dass die Neuropeptide Vasopressin, VIP, Orexin A und MCH diese Rolle bei der Signalübertragung zwischen hypothalamischen Kerngebieten spielen.

Über den hemmenden Neurotransmitter Glyzin ist bisher im Zusammenhang mit dem circadianen System nur wenig bekannt. Durch Verwendung der GlyT2-EGFP-Maus wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass glyzinerge Fasern den SCN, den lateralen Hypothalamus und den N. arcuatus innervieren und mit Neuropeptid-haltigen Somata und Fasern (AVP, VIP, Orexin A, MCH) in direktem Kontakt stehen.

Die Glyzinausüttung unterliegt im SCN einer circadianen Rhythmik, die offenbar an die des Vasopressins gekoppelt ist (Shinohara et al. 1998). Unklar ist bisher, wie die Verschaltung innerhalb der Kerngebiete funktioniert und welche Rezeptoren dabei eine Rolle spielen. Die Glyzinrezeptoren und deren Untereinheiten sind besonders ausführlich in der Retina beschrieben (Heinze et al. 2007). Da gegen jede Glyzinrezeptor-Untereinheit Antikörper verfügbar sind, könnte auch im Hypothalamus die Rezeptorverteilung lichtmikroskopisch untersucht und so Rückschlüsse auf die Funktion des Neurotransmitters im Hypothalamus gezogen werden.

Außerdem könnten durch weitere immunzytochemische Studien der Neuropeptid-Expression sowie elektrophysiologischen Experimenten in der GlyT2-EGFP-Maus Zielzellen der glyzinerger Fasern charakterisiert werden.

Um Aussagen über die Ursprungszellen der Glyzin-enthaltenden Fasern treffen zu können, bieten sich Tracing-Studien an. Dadurch könnte bestimmt werden, in welchen physiologischen Prozessen Glyzin eine Rolle spielt.

6 Zusammenfassung

Viele physiologische Prozesse, wie zum Beispiel der Schlaf-Wach-Rhythmus, die Nahrungsaufnahme, die Aktivität, sowie unbewusstes Verhalten unterliegen circadianen Rhythmen. Diese Rhythmen werden durch die circadiane Uhr erzeugt, deren Sitz der SCN im Hypothalamus ist. Der SCN übermittelt das circadiane Signal in viele verschiedene Gehirnregionen (Reuss 1996).

Die circadianen Rhythmen werden einerseits durch Umweltreize, wie Licht oder Nahrungsverfügbarkeit, eingestellt. Diese externen Signale beeinflussen direkt den SCN oder andere hypothalamische Nuclei, wie den lateralen Hypothalamus oder den N. arcuatus. Andererseits werden die circadianen Rhythmen jedoch auch an die physiologischen Parameter des Individuums angepasst.

Diese externen und internen Signale werden durch den Signalaustausch zwischen den hypothalamischen Nuclei integriert. Zur Untersuchung dieser gegenseitigen Verbindungen wurden immunzytochemische Studien an Gehirnschnitten von Maus und Ratte durchgeführt, um das Vorkommen verschiedener Neuropeptide in Zellkörpern und Fortsätzen der Neurone in den entsprechenden hypothalamischen Gebieten aufzuzeigen.

Untersucht wurden Vasopressin und VIP, die im SCN selbst synthetisiert werden, sowie Orexin A und MCH, die in den Zielgebieten des SCN vorkommen. Die Verteilungen der Neuropeptide bei Ratten und Mäusen stimmten weitgehend überein. Lediglich die Vasopressin-Expression im SCN weist Abweichungen im Vergleich der beiden Spezies auf. Weiterhin gibt es unterschiedliche Verbindungen zwischen den hypothalamischen Kerngebieten: Im SCN der Ratte, jedoch nicht im SCN der Maus, innervieren Orexin A-enthaltende Fasern VIP-exprimierende Zellen, sowie MCH-positive Fortsätze Vasopressin-enthaltende Neurone. Demzufolge variiert die Signalübertragung im Hypothalamus der Maus und der Ratte.

GABA und Glyzin sind wichtige hemmende Neurotransmitter im ZNS. Daher wurden die transgenen Mauslinien GAD67-GFP knock-in und GlyT2-EGFP als Marker für GAD67-positive beziehungsweise Glyzin-positive Zellen verwendet. Gehirnschnitte dieser Mauslinien wurden immunzytochemisch gegen die oben genannten Neuropeptide gefärbt, um die Neuronenpopulationen in den hypothalamischen Kerngebieten zusätzlich zu charakterisieren.

Viele Vasopressin- oder VIP-exprimierende Zellen im SCN sind GAD67-positiv. Im lateralen Hypothalamus sind einige MCH-positive Zellen GAD67-positiv. Orexin A-

enthaltende Zellen sind nicht positiv für GAD67. Orexin A-positive und GAD67-positiv Zellen sind miteinander durch direkte Kontakte verbunden.

Der hemmende Neurotransmitter Glyzin wird von wenigen Zellen im lateralen Hypothalamus gebildet. Glyzin ist dort weder mit Orexin A, MCH oder Vasopressin kolokalisiert. Der gesamte Hypothalamus ist von einem dichten Netz stark verzweigter, Glyzin-enthaltender Fasern überzogen, deren Ursprung im Rahmen dieser Arbeit nicht eindeutig geklärt werden konnte.

Die glyzinerger Fasern innervieren im lateralen Hypothalamus Orexin A-, Vasopressin- und MCH-exprimierende Neurone. Glyzinerger Fasern projizieren im lateralen Hypothalamus auf VIP-positive Fortsätze und im SCN auf Vasopressin-enthaltende Fortsätze. Der hemmende Neurotransmitter Glyzin spielt vermutlich eine bedeutende Rolle bei der Signalübertragung zwischen Hypothalamus und anderen Gehirnbereichen. Damit wirkt Glyzin vermutlich auf diverse physiologische Abläufe ein, die durch hypothalamische Kerngebiete gesteuert und reguliert werden. Neben der Untersuchung der hypothalamischen Nuclei in Gehirnschnitten wurden die Zellen dieser Kerngebiete in histiotypischen primären Zellkulturen charakterisiert. Die Neuropeptid-Expressionen sowie synaptische Verbindungen wurden an den kultivierten Zellen untersucht. Der Vergleich der Neuropeptid-Expression bei Gehirnschnitten und bei Zellkulturen bestätigte, dass histiotypische Zellkulturen ein geeignetes Modell für Studien von Einzelzell- und Netzwerkeigenschaften sind. Die Ausbildung von zahlreichen Synapsen innerhalb nur weniger Tage bestätigt, dass die Signalübertragung in den Zellkulturen wie vermutlich auch im Hypothalamus überwiegend synaptischer Natur ist.

7 Literaturverzeichnis

Abrahamson EE, Moore RY (2001a) The posterior hypothalamic area: chemoarchitecture and afferent connections. *Brain Research* 889: 1-22.

Abrahamson EE, Moore RY (2001b) Suprachiasmatic nucleus in the mouse: retinal innervation, intrinsic organization and efferent projections. *Brain Research* 916: 172-191.

Abrahamson EE, Leak RK, Moore RY (2001) The suprachiasmatic nucleus projects to posterior hypothalamic arousal systems. *Neuroreport* 12: 435-440.

Abrahamson EE, Moore RY (2006) Lesions of suprachiasmatic nucleus efferents selectively affect rest-activity rhythm. *Molecular and Cellular Endocrinology* 252: 46-56.

Albus H, Vansteensel MJ, Michel S, Block GD, Meijer JH (2005) A GABAergic mechanism is necessary for coupling dissociable ventral and dorsal regional oscillators within the circadian clock. *Current Biology* 15: 886-893.

Aton SJ, Huettner JE, Straume M, Herzog ED (2006) GABA and Gi/o differentially control circadian rhythms and synchrony in clock neurons. *PNAS* 103: 19188-19193.

Bittencourt JC, Presse F, Arias C, Peto C, Vaughan J, Nahon JL, Vale W, Sawchenko PE (1992) The Melanin-Concentrating Hormone System of the Rat-Brain - An Immunization and Hybridization Histochemical Characterization. *Journal of Comparative Neurology* 319: 218-245.

Bjoerklund A, Hokfelt T, Swanson LW (1987) *Handbook of Chemical Neuroanatomy, Volume 5: Integrated Systems of the CNS, Part I Hypothalamus, Hippocampus, Amygdala, Retina.* Elsevier.

Bouret SG, Draper SJ, Simerly RB (2004) Formation of projection pathways from the arcuate nucleus of the hypothalamus to hypothalamic regions implicated in the neural control of feeding behavior in mice. *Journal of Neuroscience* 24: 2797-2805.

Broberger C, de Lecea L, Sutcliffe JG, Hokfelt T (1998) Hypocretin/orexin- and melanin-concentrating hormone-expressing cells form distinct populations in the rodent lateral hypothalamus: Relationship to the neuropeptide Y and Agouti gene-related protein systems. *Journal of Comparative Neurology* 402: 460-474.

Bubser M, Fadel JR, Jackson LL, Meador-Woodruff JH, Jing DQ, Deutch AY (2005) Dopaminergic regulation of orexin neurons. *European Journal of Neuroscience* 21: 2993-3001.

Buijs RM, Hou YX, Shinn S, Renaud LP (1994) Ultrastructural Evidence for Intra-Nuclear and Extranuclear Projections of Gabaergic Neurons of the Suprachiasmatic Nucleus. *Journal of Comparative Neurology* 340: 381-391.

de Lecea L, Kilduff TS, Peyron C, Gao XB, Foye PE, Danielson PE, Fukuhara C, Battenberg ELF, Gautvik VT, Bartlett FS, Frankel WN, van den Pol AN, Bloom FE, Gautvik KM, Sutcliffe JG (1998) The hypocretins: Hypothalamus-specific peptides

with neuroexcitatory activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95: 322-327.

Decavel C, vandenPol AN (1990) Gaba - A Dominant Neurotransmitter in the Hypothalamus. *Journal of Comparative Neurology* 302: 1019-1037.

Deurveilher S, Semba K (2005) Indirect projections from the suprachiasmatic nucleus to major arousal-promoting cell groups in rat: Implications for the circadian control of behavioural state. *Neuroscience* 130: 165-183.

Elias CF, Saper CB, Maratos-Flier E, Tritos NA, Lee C, Kelly J, Tatro JB, Hoffman GE, Ollmann MM, Barsh GS, Sakurai T, Yanagisawa M, Elmquist JK (1998) Chemically defined projections linking the mediobasal hypothalamus and the lateral hypothalamic area. *Journal of Comparative Neurology* 402: 442-459.

Farkas B, Vilagi I, Detari L (2002) Effect of Orexin-A on discharge rate of rat suprachiasmatic nucleus neurons in vitro. *Acta Biologica Hungarica* 53: 435-443.

Gao XB, van den Pol AN (2001) Melanin concentrating hormone depresses synaptic activity of glutamate and GABA neurons from rat lateral hypothalamus. *Journal of Physiology-London* 533: 237-252.

Gerhold LM, Horvath TL, Freeman ME (2001) Vasoactive intestinal peptide fibers innervate neuroendocrine dopaminergic neurons. *Brain Research* 919: 48-56.

Guan JL, Uehara K, Lu S, Wang QP, Funahashi H, Sakurai T, Yanagizawa M, Shioda S (2002) Reciprocal synaptic relationship between orexin- and melanin-concentrating hormone-containing neurons in the rat lateral hypothalamus: a novel circuit implicated in feeding regulation. *International Journal of Obesity* 26: 1523-1532.

Heinze L, Harvey RJ, Haverkamp S, Wassle H (2007) Diversity of glycine receptors in the mouse retina: Localization of the alpha 4 subunit. *Journal of Comparative Neurology* 500: 693-707.

Hermes MLHJ, Buijs RM, Massonpevet M, Pevet P (1990) Seasonal-Changes in Vasopressin in the Brain of the Garden Dormouse (*Eliomys-Quercinus* L). *Journal of Comparative Neurology* 293: 340-346.

Hillebrand JJG, de Wied D, Adan RAH (2002) Neuropeptides, food intake and body weight regulation: a hypothalamic focus. *Peptides* 23: 2283-2306.

Honma S, Shirakawa T, Nakamura W, Honma K (2000) Synaptic communication of cellular oscillations in the rat suprachiasmatic neurons. *Neuroscience Letters* 294: 113-116.

Horvath TL, Bechmann I, Naftolin F, Kalra SP, Leranath C (1997) Heterogeneity in the neuropeptide Y-containing neurons of the rat arcuate nucleus: GABAergic and non-GABAergic subpopulations. *Brain Research* 756: 283-286.

Ito C, Wakamori M, Akaike N (1991) Dual Effect of Glycine on Isolated Rat Suprachiasmatic Neurons. *American Journal of Physiology* 260: C213-C218.

- Kalla S., Stern M., Basu J., Varoqueaux F., Reim K., Rosenmund C., Ziv N.E., Brose N (2006) Molecular Dynamics of a Presynaptic Active Zone Protein Studied in Munc13-1-Enhanced Yellow Fluorescent Protein Knock-In Mutant Mice. *The Journal of Neuroscience* 26: 13054-13066.
- Kawauchi H, Kawazoe I, Tsubokawa M, Kishida M, Baker BI (1983) Characterization of Melanin-Concentrating Hormone in Chum Salmon Pituitaries. *Nature* 305: 321-323.
- Klisch C, Mahr S, Meissl H (2006) Circadian activity rhythms and phase-shifting of cultured neurons of the rat suprachiasmatic nucleus. *Chronobiology International* 23: 181-190.
- Kriegsfeld LJ, Silver R (2006) The regulation of neuroendocrine function: Timing is everything. *Hormones and Behavior* 49: 557-574.
- Krout KE, Kawano J, Mettenleiter TC, Loewy AD (2002) CNS inputs to the suprachiasmatic nucleus of the rat. *Neuroscience* 110: 73-92.
- Leak RK, Moore RY (2001) Topographic organization of suprachiasmatic nucleus projection neurons. *Journal of Comparative Neurology* 433: 312-334.
- Lembo PMC, Grazzini E, Cao J, Hubatsch DA, Pelletier M, Hoffert C, St Onge S, Pou C, Labrecque J, Groblewski T, O'Donnell D, Payza K, Ahmad S, Walker P (1999) The receptor for the orexigenic peptide melanin-concentrating hormone is a G-protein-coupled receptor. *Nature Cell Biology* 1: 267-271.
- Liu AC, Lewis WG, Kay SA (2007) Mammalian circadian signaling networks and therapeutic targets. *Nature Chemical Biology* 3: 630-639.
- Liu C, Reppert SM (2000) GABA synchronizes clock cells within the suprachiasmatic circadian clock. *Neuron* 25: 123-128.
- Ludwig M, Leng G (2006) Dendritic peptide release and peptide-dependent behaviours. *Nature Reviews Neuroscience* 7: 126-136.
- Mahoney MM, Ramanathan C, Smale L (2007) Tyrosine hydroxylase positive neurons and their contacts with vasoactive intestinal polypeptide-containing fibers in the hypothalamus of the diurnal murid rodent, *Arvicanthis niloticus*. *Journal of Chemical Neuroanatomy* 33: 131-139.
- Marcus JN, Aschkenasi CJ, Lee CE, Chemelli RM, Saper CB, Yanagisawa M, Elmquist JK (2001) Differential expression of orexin receptors 1 and 2 in the rat brain. *Journal of Comparative Neurology* 435: 6-25.
- Martynska L, Wolinska-Witort E, Chmielowska M, Bik W, Baranowska B (2005) The physiological role of orexins. *Neuroendocrinology Letters* 26: 289-292.
- Meister B (2007) Neurotransmitter in key neurons of the hypothalamus that regulate feeding behavior and body weight. *Physiology & Behavior*.
- Moga MM, Moore RY (1997) Organization of neural inputs to the suprachiasmatic nucleus in the rat. *Journal of Comparative Neurology* 389: 508-534.

- Moore RY, Speh JC (1993) Gaba Is the Principal Neurotransmitter of the Circadian System. *Neuroscience Letters* 150: 112-116.
- Moore RY, Speh JC, Leak RK (2002) Suprachiasmatic nucleus organization. *Cell and Tissue Research* 309: 89-98.
- Morin LP, Allen CN (2006) The circadian visual system, 2005. *Brain Research Reviews* 51: 1-60.
- Morin LP (2007) SCN Organization Reconsidered. *J Biol Rhythms* 22: 3-13.
- Paxinos G, Franklin KBJ (2001) *The Mouse Brain*
- Peyron C, Tighe DK, van den Pol AN, de Lecea L, Heller HC, Sutcliffe JG, Kilduff TS (1998) Neurons containing hypocretin (orexin) project to multiple neuronal systems. *Journal of Neuroscience* 18: 9996-10015.
- Qu DQ, Ludwig DS, Gammeltoft S, Piper M, Pellemounter MA, Cullen MJ, Mathes WF, Przypek J, Kanarek R, Maratos-Flier E (1996) A role for melanin-concentrating hormone in the central regulation of feeding behaviour. *Nature* 380: 243-247.
- Rampon C, Luppi PH, Fort P, Peyron C, Jouvet M (1996) Distribution of glycine-immunoreactive cell bodies and fibers in the rat brain. *Neuroscience* 75: 737-755.
- Rao ZR, Yamano M, Wanaka A, Tatehata T, Shiosaka S, Tohyama M (1987) Distribution of Cholinergic Neurons and Fibers in the Hypothalamus of the Rat Using Choline-Acetyltransferase As A Marker. *Neuroscience* 20: 923-934.
- Reghunandanan V, Reghunandanan R (2006) Neurotransmitters of the suprachiasmatic nuclei. *Journal of Circadian Rhythms* 4: 1-20.
- Reuss S (1996) Components and connections of the circadian timing system in mammals. *Cell and Tissue Research* 285: 353-378.
- Rossi M, Choi SJ, O Shea D, Miyoshi T, Ghatei MA, Bloom SR (1997) Melanin-Concentrating hormone acutely stimulates feeding, but chronic administration has no effect on body weight. *Endocrinology* 138: 351-355.
- Sakurai T, Amemiya A, Ishii M, Matsuzaki I, Chemelli RM, Tanaka H, Williams SC, Richardson JA, Kozlowski GP, Wilson S, Arch JRS, Buckingham RE, Haynes AC, Carr SA, Annan RS, McNulty DE, Liu WS, Terrett JA, Elshourbagy NA, Bergsma DJ, Yanagisawa M (1998) Orexins and orexin receptors: A family of hypothalamic neuropeptides and G protein-coupled receptors that regulate feeding behavior (vol 92, pg 573, 1998). *Cell* 92: U29.
- Saper CB, Lu J, Chou TC, Gooley JJ (2005) The hypothalamic integrator for circadian rhythms. *Trends in Neuroscience* 28: 152-157.
- Schwartz MW, Gelling RW (2002) Rats lighten up with MCH antagonist. *Nature Medicine* 8: 779-781.
- Semba K (2004) Links between the suprachiasmatic nucleus and sleep-wake centers: Finding pathways. *Sleep and Biological Rhythms* 2: 27-29.

- Shinohara K, Honma S, Katsuno Y, Abe H, Honma K (1998) Circadian release of amino acids in the suprachiasmatic nucleus in vitro. *Neuroreport* 9: 137-140.
- Sita LV, Elias CF, Bittencourt JC (2003) Dopamine and melanin-concentrating hormone neurons are distinct populations in the rat rostromedial zona incerta. *Brain Research* 970: 232-237.
- Steininger TL, Kilduff TS, Behan M, Benca RM, Landry CF (2004) Comparison of hypocretin/orexin and melanin-concentrating hormone neurons and axonal projections in the embryonic and postnatal rat brain. *Journal of Chemical Neuroanatomy* 27: 165-181.
- Swanson LW, Sanchezwatts G, Watts AG (2005) Comparidon of melanin-concentrating hotmone and hypocretin/orexin mRNA expression patterns in a new parceling scheme of the lateral hypothalamic zone. *Neuroscience Letters*.
- Taheri S, Bloom S (2001) Orexins/hypocretins: waking up the scientific world. *Clinical Endocrinology* 54: 421-429.
- Tamamaki N, Yanagawa Y, Tomioka R, Miyazaki JI, Obata K, Kaneko T (2003) Green fluorescent protein expression and colocalization with calretinin, parvalbumin, and somatostatin in the GAD67-GFP knock-in mouse. *Journal of Comparative Neurology* 467: 60-79.
- Thompson RH, Swanson LW (1998) Organization of inputs to the dorsomedial nucleus of the hypothalamus: a reexamination with Fluorogold and PHAL in the rat. *Brain Research Reviews* 27: 89-118.
- Torrealba F, Yanagisawa M, Saper CB (2003) Colocalization of orexin and glutamate immunoreactivity in axon terminals in the tuberomammillary nucleus in rats. *Neuroscience* 119: 1033-1044.
- Valassi E, Scacchi M, Cavagnini F (2007) Neuroendocrine control of food intake. *Nutrition, Metabolism & Cardiovascular Diseases* 1-10.
- van den Pol AN, Gorcs T (1986) Synaptic Relationships Between Neurons Containing Vasopressin, Gastrin-Releasing Peptide, Vasoactive Intestinal Polypeptide, and Glutamate-Decarboxylase Immunoreactivity in the Suprachiasmatic Nucleus - Dual Ultrastructural Immunocytochemistry with Gold-Substituted Silver Peroxidase. *Journal of Comparative Neurology* 252: 507-521.
- van den Pol AN, Gao XB, Obrietan K, Kilduff TS, Belousov AB (1998) Presynaptic and postsynaptic actions and modulation of neuroendocrine neurons by a new hypothalamic peptide, Hypocretin/Orexin. *Journal of Neuroscience* 18: 7962-7971.
- van Esseveldt LKE, Lehman MN, Boer GJ (2000) The suprachiasmatic nucleus and the circadian time-keeping system revisited. *Brain Research Reviews* 33: 34-77.
- Wagner S, Castel M, Gainer H, Yarom Y (1997) GABA in the mammalian suprachiasmatic nucleus and its role in diurnal rhythmicity. *Nature* 387: 598-603.

Watts AG, Swanson LW, Sanchezwatts G (1987) Efferent Projections of the Suprachiasmatic Nucleus .1. Studies Using Anterograde Transport of Phaseolus-Vulgaris Leukoagglutinin in the Rat. *Journal of Comparative Neurology* 258: 204-229.

Watts AG, Swanson LW (1987) Efferent Projections of the Suprachiasmatic Nucleus .2. Studies Using Retrograde Transport of Fluorescent Dyes and Simultaneous Peptide Immunohistochemistry in the Rat. *Journal of Comparative Neurology* 258: 230-252.

Welsh DK, Logothetis DE, Meister M, Reppert SM (1995) Individual Neurons Dissociated from Rat Suprachiasmatic Nucleus Express Independently Phased Circadian Firing Rhythms. *Neuron* 14: 697-706.

Willie JT, Chemelli RM, Sinton CM, Yanagisawa M (2001) To eat or to sleep? Orexin in the regulation of feeding and wakefulness. *Annual Review of Neuroscience* 24: 429-458.

Yamaguchi S, Isejima H, Matsuo T, Okura R, Yagita K, Kobayashi M, Okamura H (2003) Synchronization of cellular clocks in the suprachiasmatic nucleus. *Science* 302: 1408-1412.

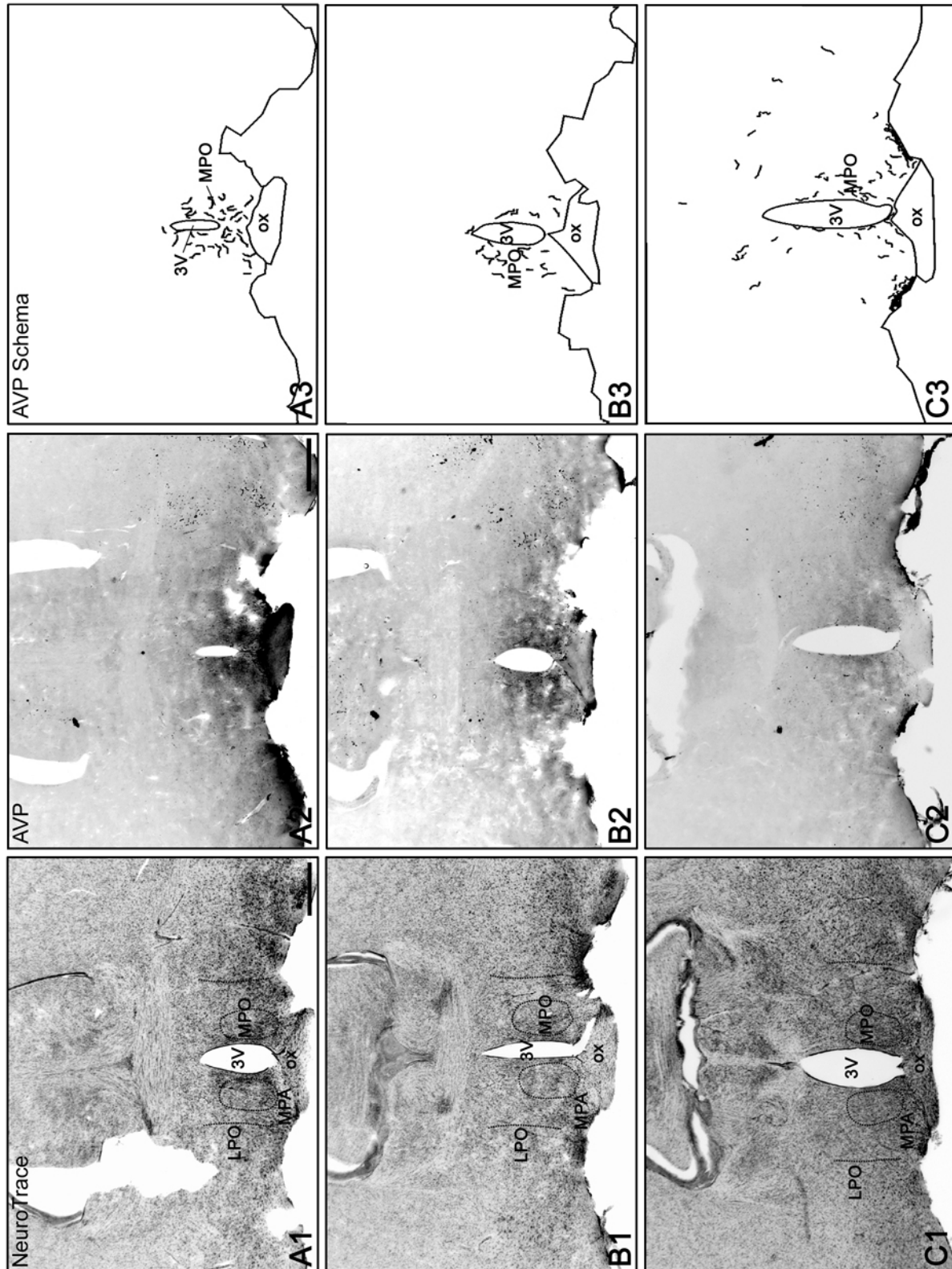
Yamanaka A, Muraki Y, Tsujino N, Goto K, Sakurai T (2003) Regulation of orexin neurons by the monoaminergic and cholinergic systems. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 303: 120-129.

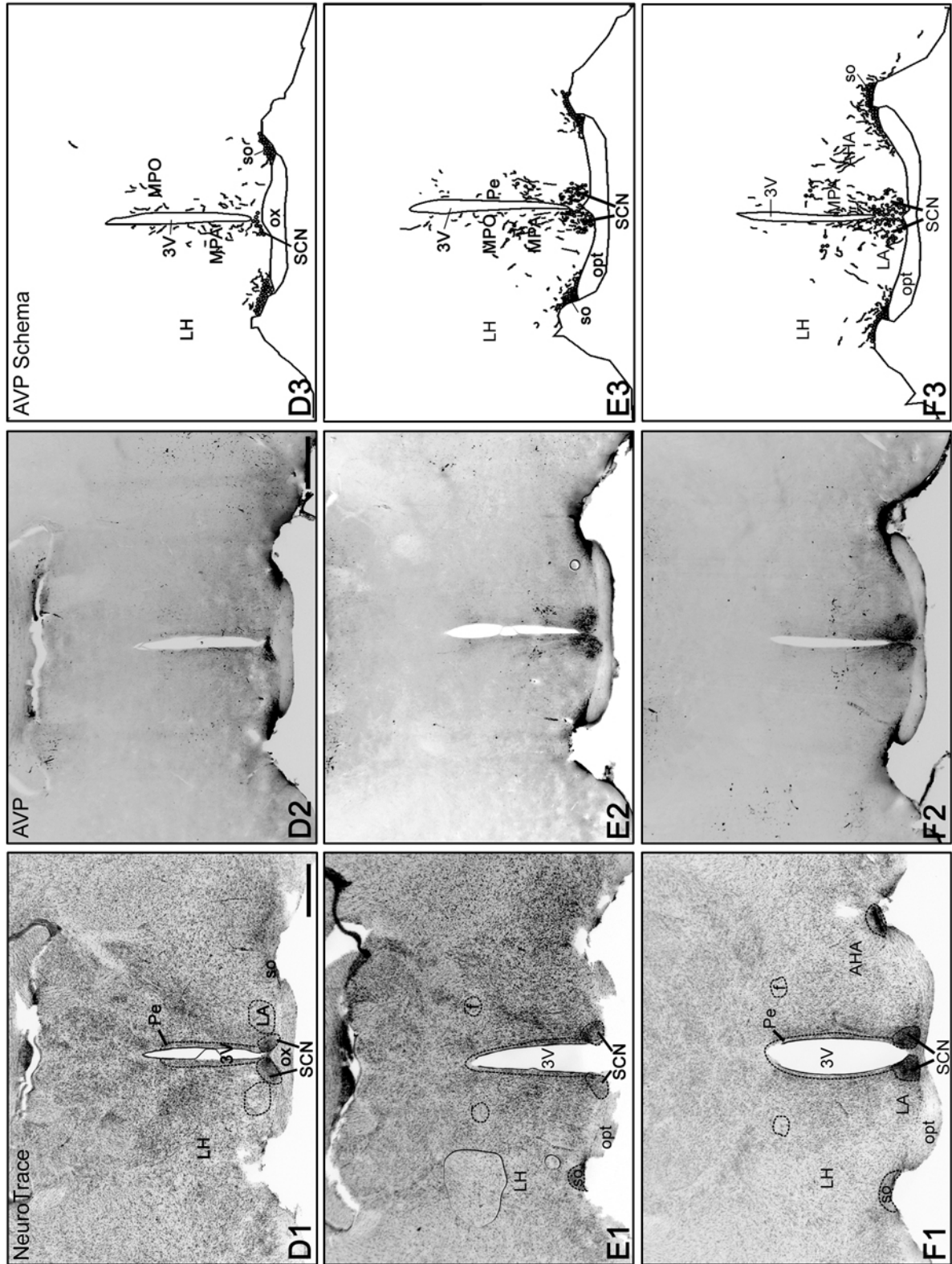
Yoshida Y, Fujiki N, Nakajima T, Ripley B, Matsumura H, Yoneda H, Mignot E, Nishino S (2001) Fluctuation of extracellular hypocretin-1 (orexin A) levels in the rat in relation to the light-dark cycle and sleep-wake activities. *European Journal of Neuroscience* 14: 1075-1081.

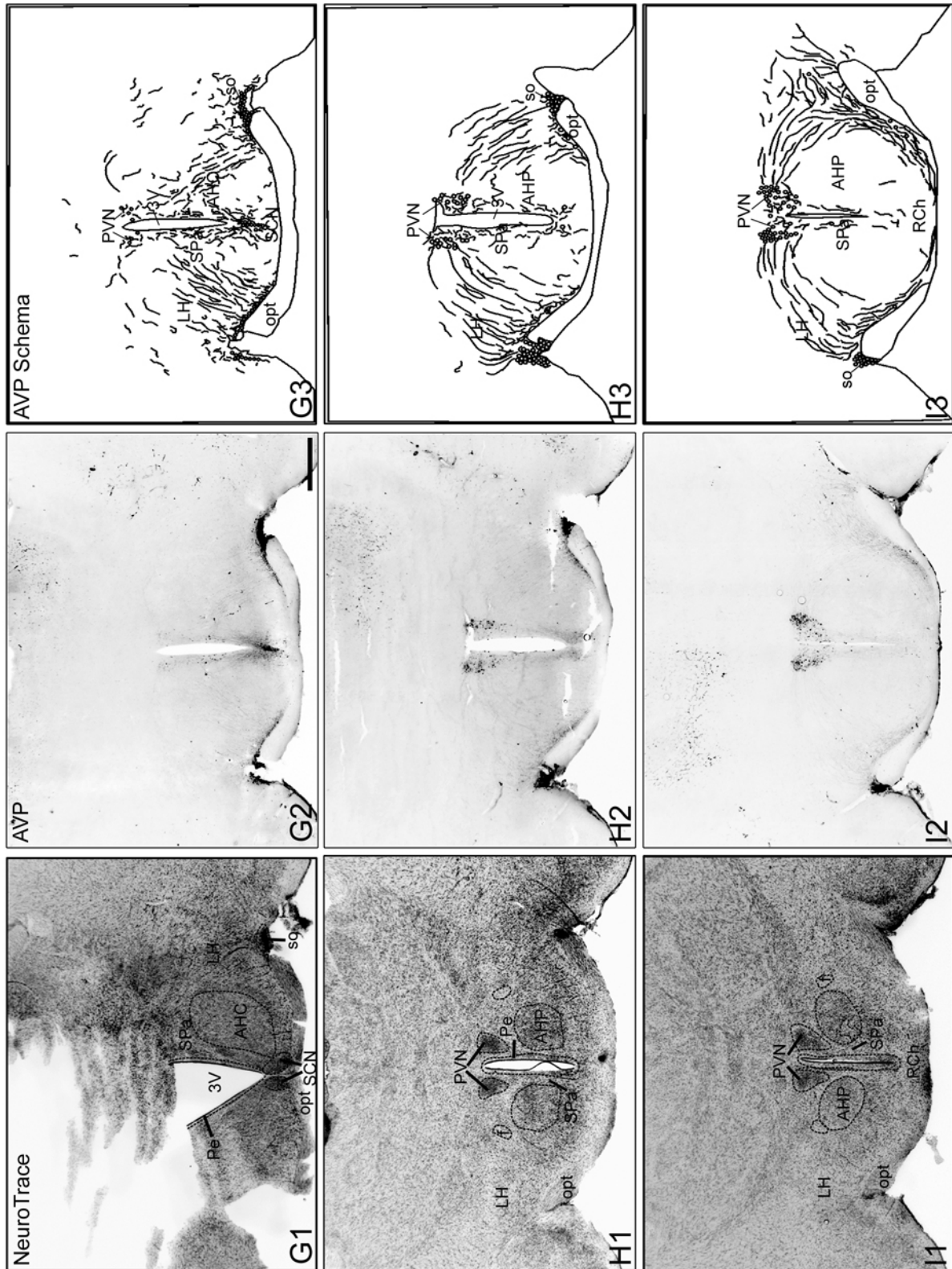
Zeilhofer HU, Studler B, Arabadzisz D, Schweizer C, Ahmadi S, Layh B, Bosl MR, Fritschy JM (2005) Glycinergic neurons expressing enhanced green fluorescent protein in bacterial artificial chromosome transgenic mice. *Journal of Comparative Neurology* 482: 123-141.

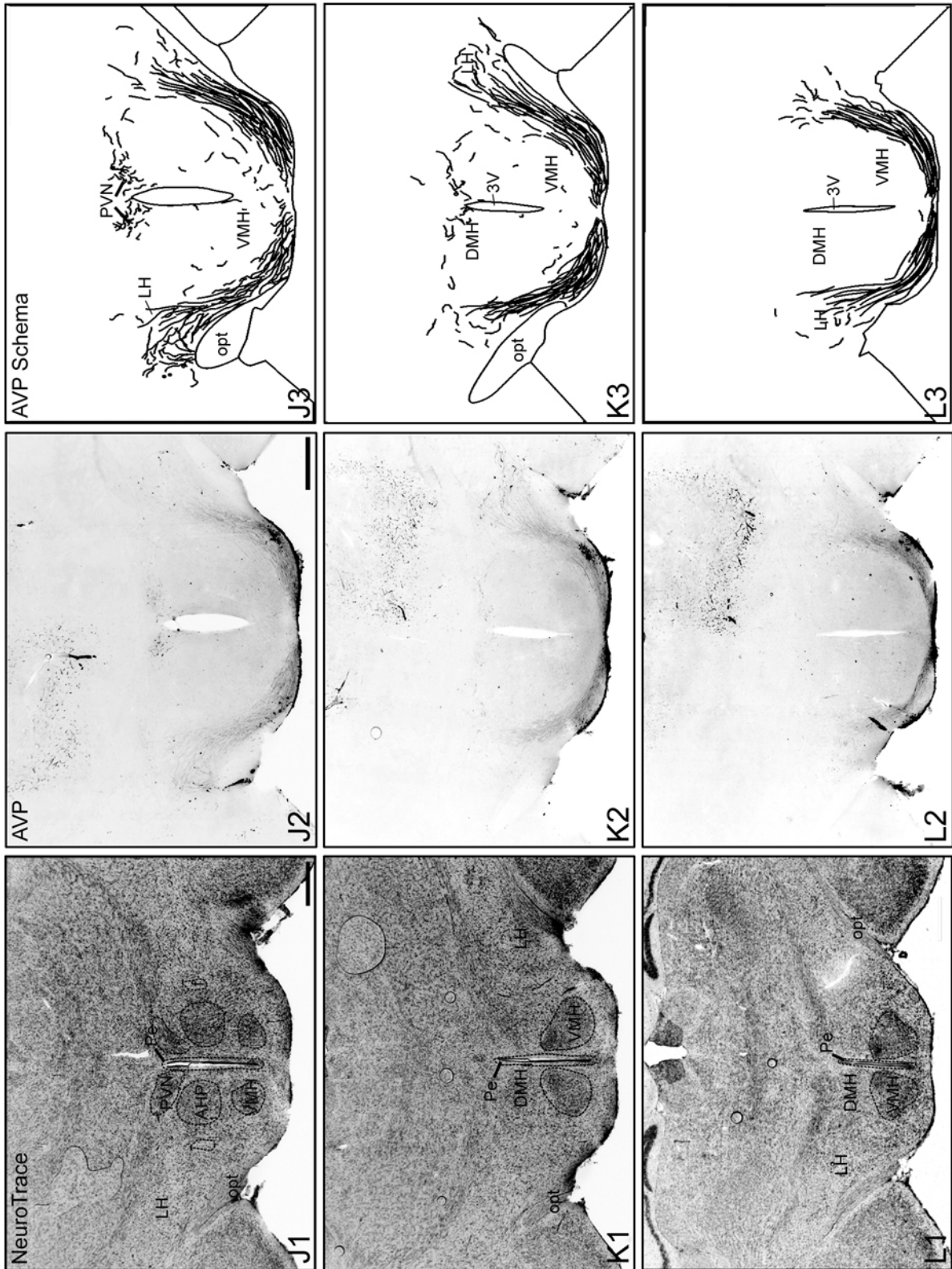
8 Anhang

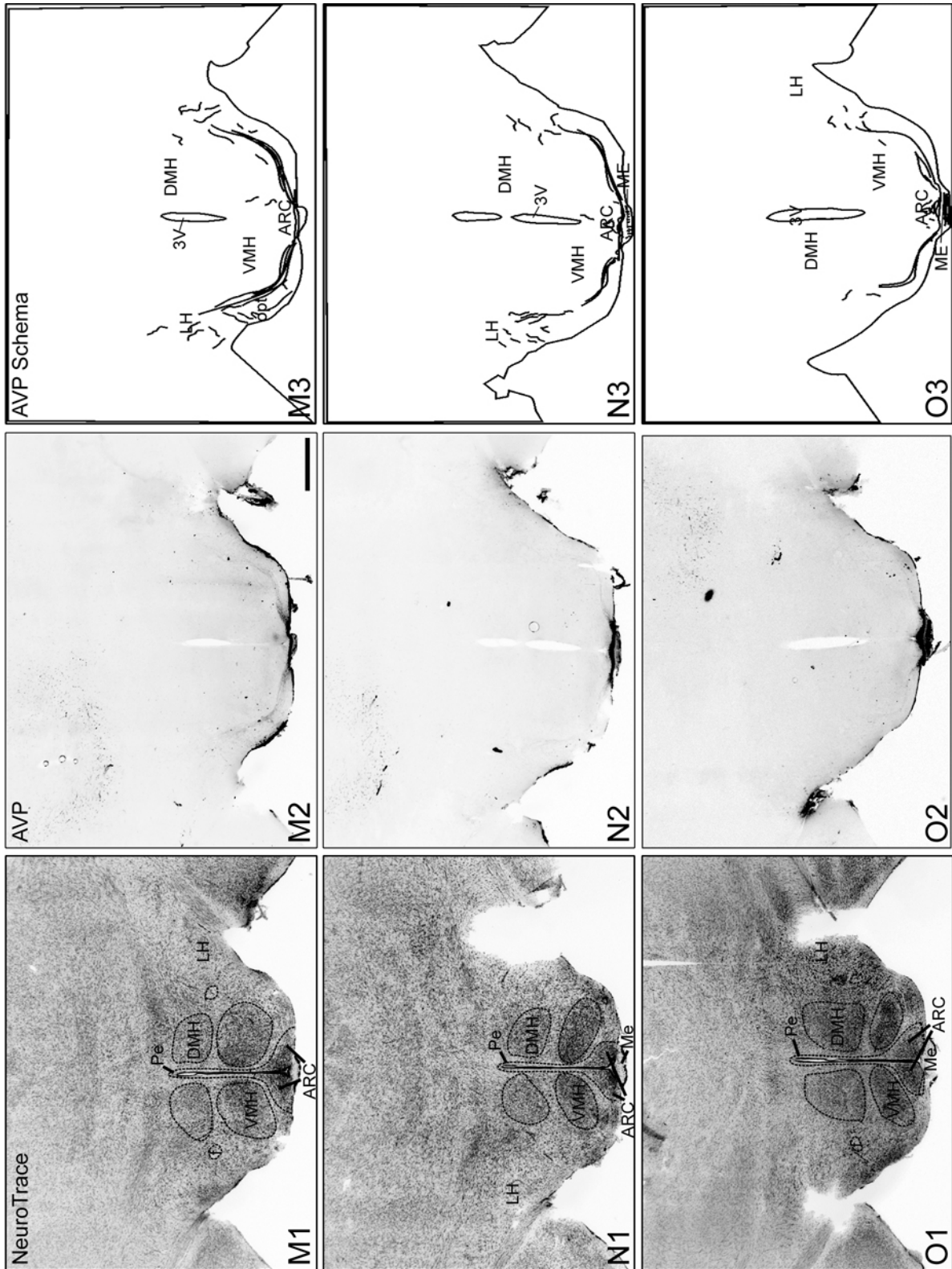
8.1 Vasopressin-Verteilung im Hypothalamus der Maus











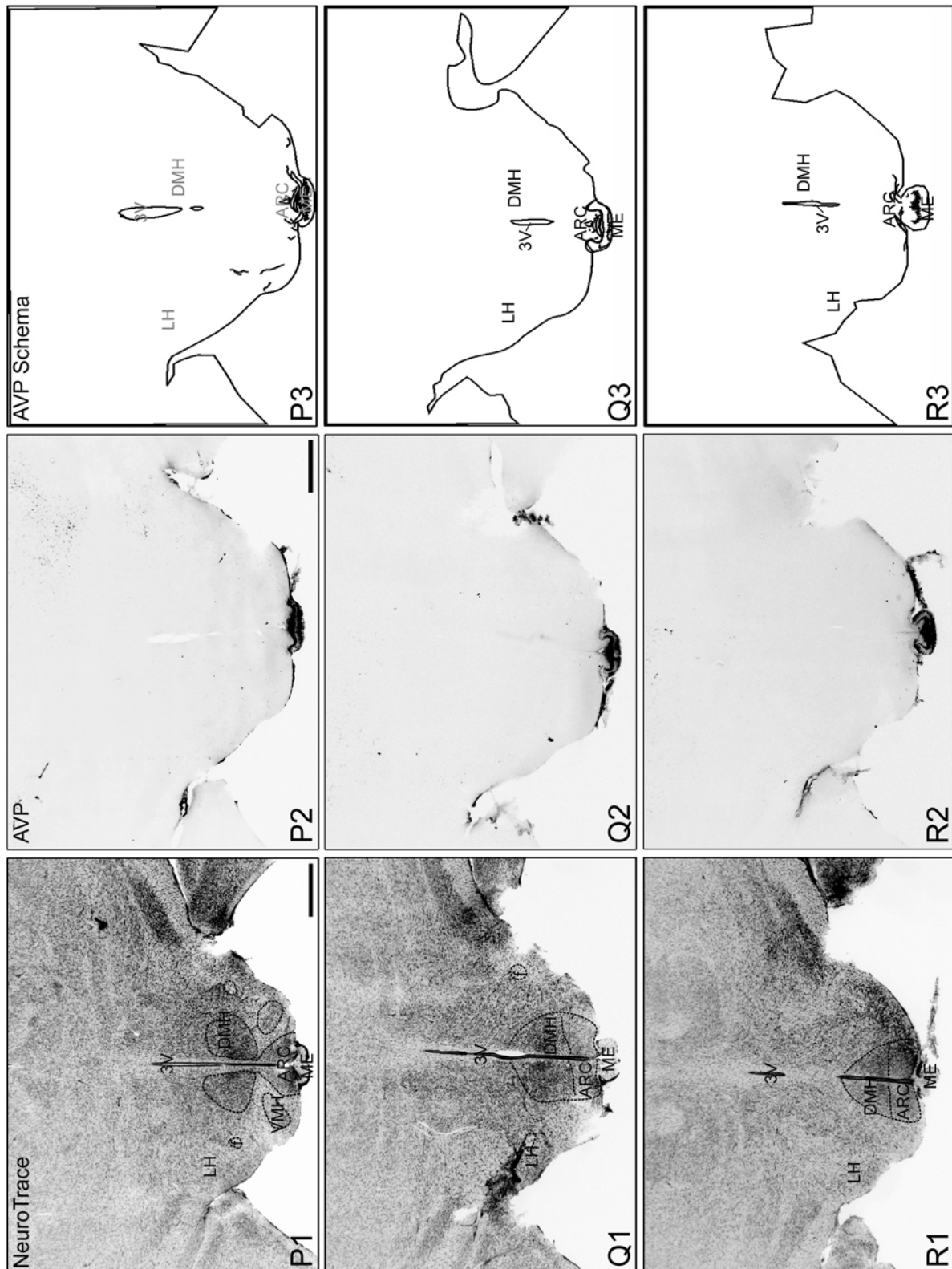
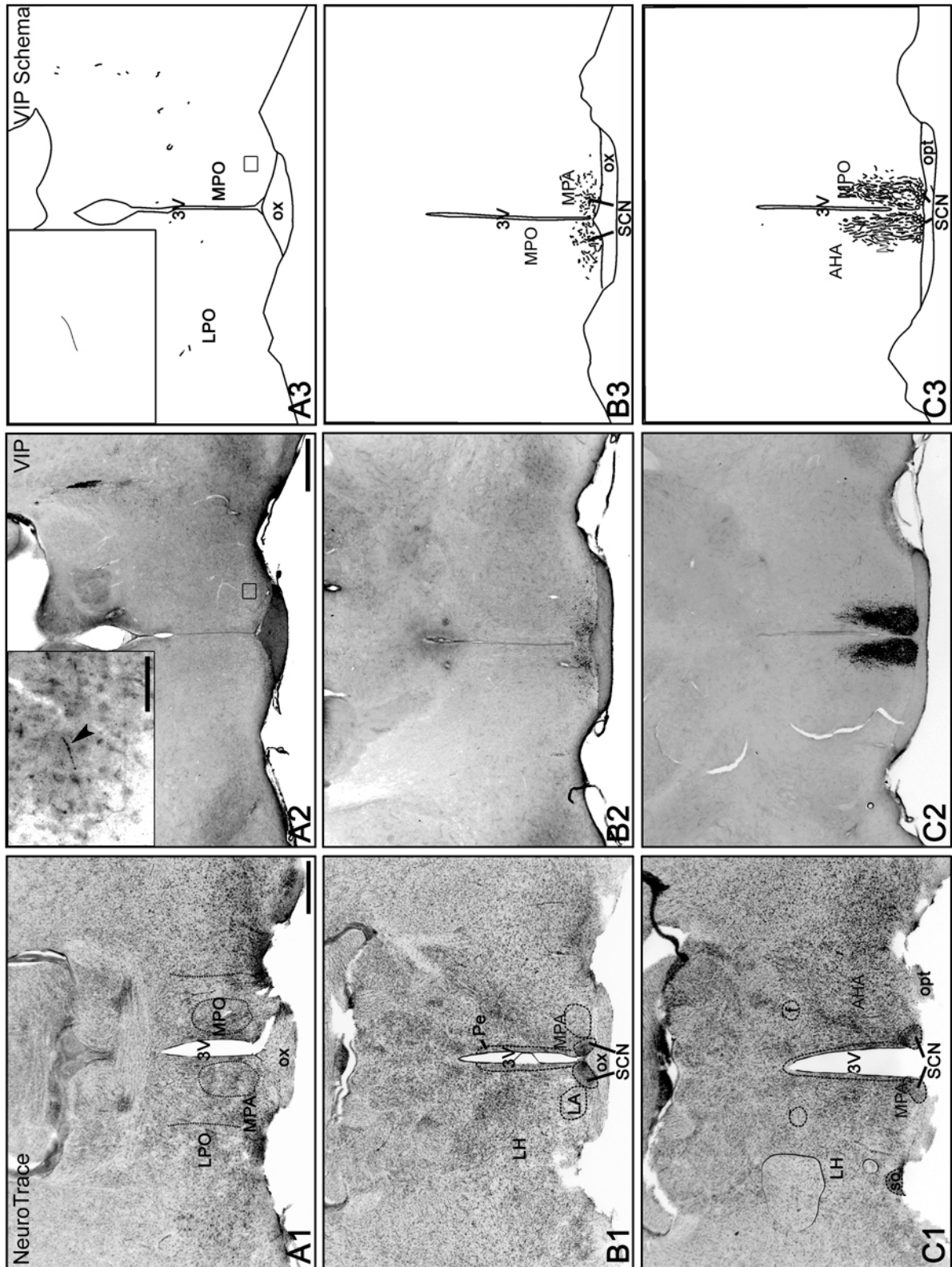


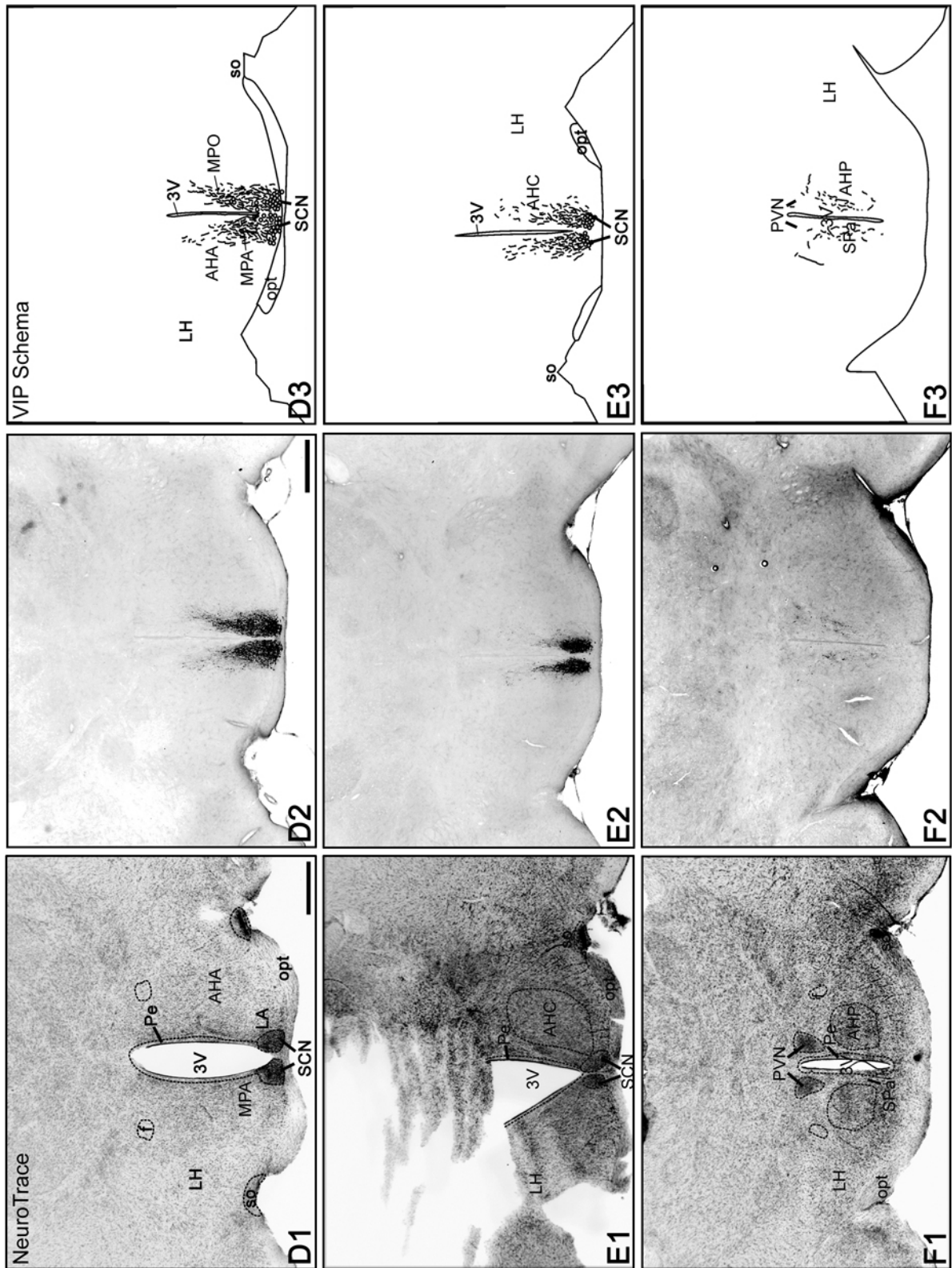
Abbildung 51: Die Vasopressin-Verteilung im Hypothalamus der Maus. A1-R1 (links): Coronschnitte durch den Hypothalamus einer CD1-Maus, angefärbt mit dem fluoreszierenden Nissl-Farbstoff NeuroTrace zur Darstellung der Kerngebiete (Schnittdicke 25 μ m). **A2-R2 (Mitte):** Immunzytochemische Färbung gegen Vasopressin im Hypothalamus der CD1-Maus (coronale Schnittebene). **A3-R3 (rechts):** Schematische Darstellung der Vasopressin-exprimierenden Somata durch Kreise und der Vasopressin-enthaltenden Fortsätze durch Linien (A2-R2).

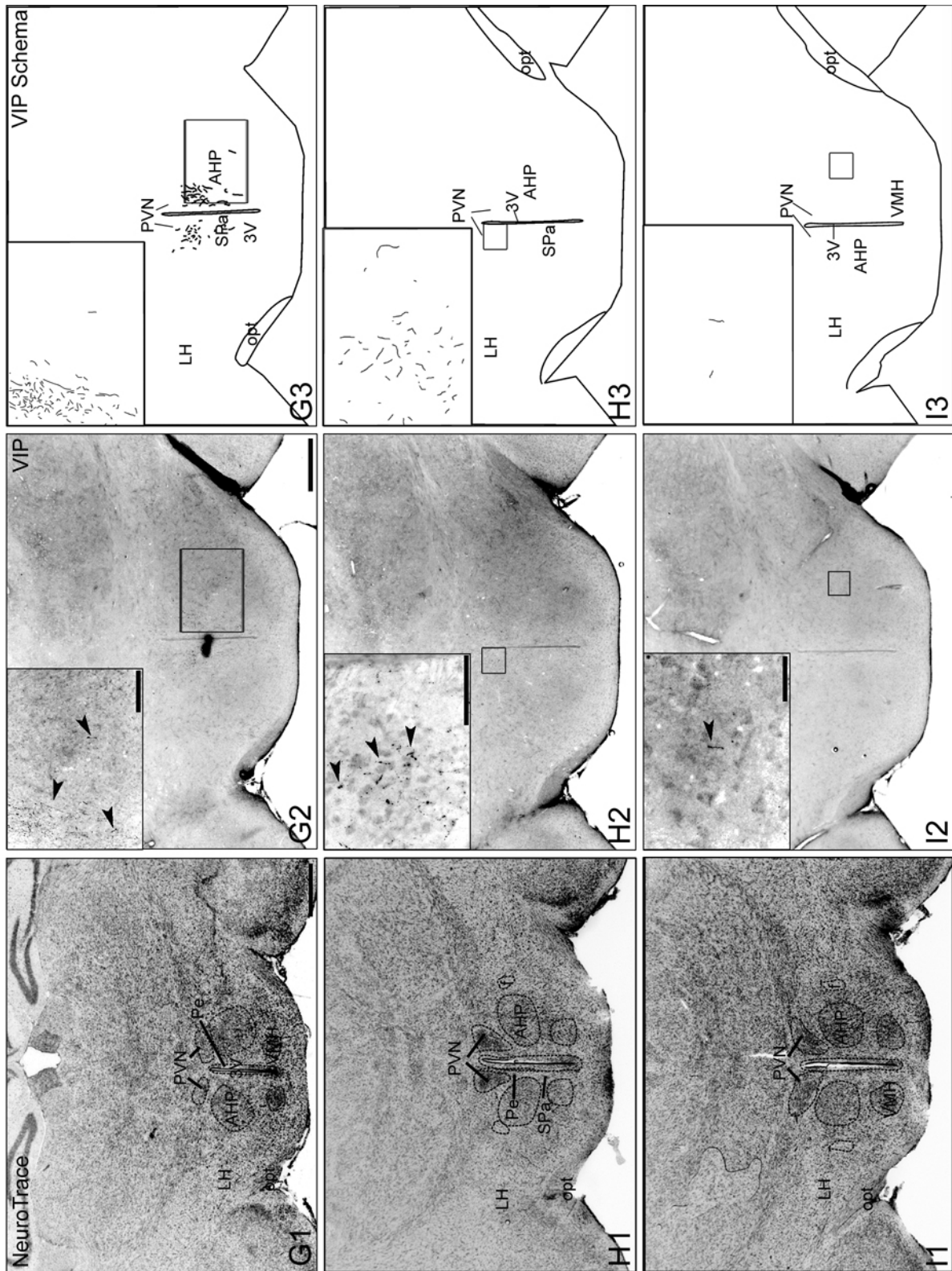
Vasopressin-exprimierende Neurone liegen im Hypothalamus der Maus vorwiegend im SCN (**D2-G2**), dem N. paraventricularis (PVN, **G2-J2**), dem N. supraopticus (so, **D2-I2**) sowie vereinzelt im N. periventricularis (Pe, **E2-I2**) und dem Hypothalamus lateralis (LH, **I2-J2**). Vasopressin-positive Fortsätze entspringen den oben genannten Kerngebieten und innervieren beispielsweise die Area praeoptica (MPA, **A2-F2**) den N. lateroanterior hypothalami (LA, **D2**), die Area hypothalamica (AHA/AHC/AHP, **F2-I2**), die Area retrochiasmatica (RCh, **I2**), den N. hypothalamicus ventromedialis (VMH, **J2-P2**) und den N. arcuatus (ARC, **M2-R2**). Zur besseren Ansicht der Vasopressin-positiven Somata und Fortsätze wurden die Fluoreszenzaufnahmen der Coronalschnitte mit benachbarten Schnitten, die mit Nissl-Farbstoff angefärbt wurden, verglichen und schematisiert. Alle Schnittserien sind von rostral (**A**) bis caudal (**R**) angeordnet.

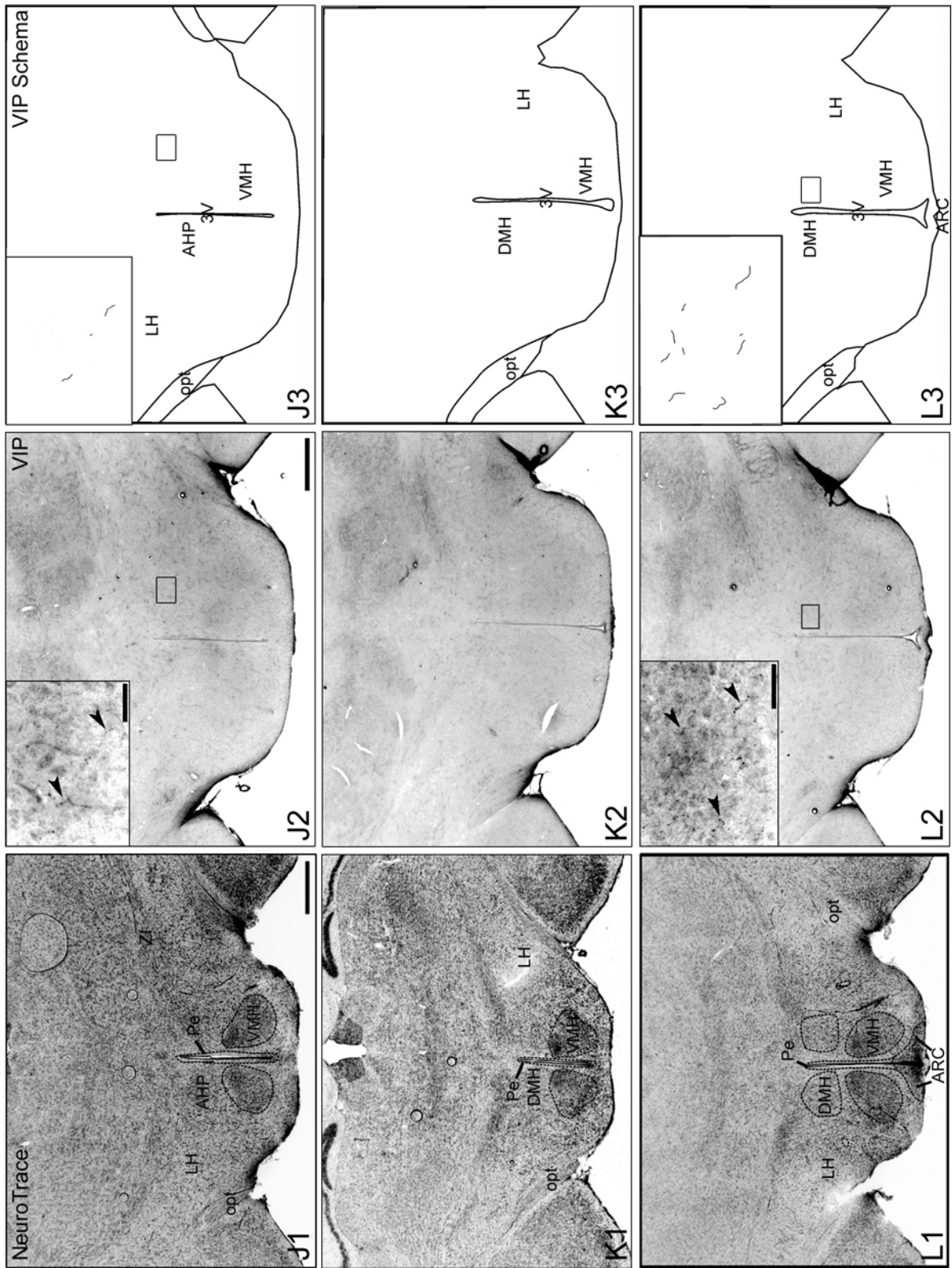
3V, 3. Ventrikel; AHA/AHC/AHP, Area hypothalamica anterior/central/posterior ; ARC N. arcuatus; LA, N. lateroanterior hypothalami; LH, Hypothalamus lateralis; LPO, Area praeoptica lateralis; ME, Eminantia mediana; MPA, Area praeoptica medialis; MPO, Nucleus praeopticus medialis, opt, Tractus opticus, ox, Chiasma opticum; Pe, N. periventricularis; RCh, Area retrochiasmatica; SCN, N. suprachiasmaticus; so, N. supraopticus; SPa, subparaventriculäre Zone; VMH, N. hypothalamicus ventromedialis; ZI, Zona incerta. Maßstab 500µm

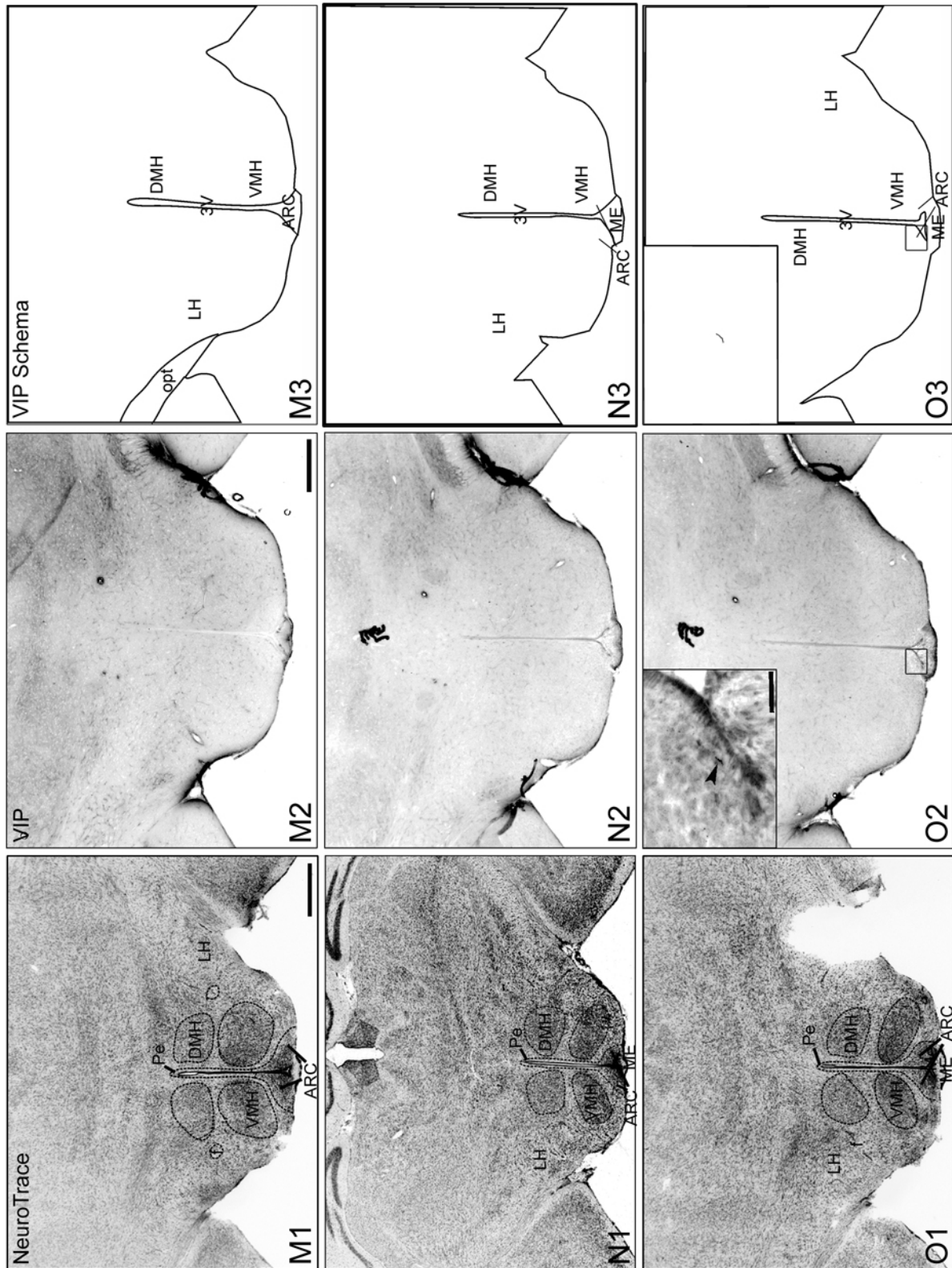
8.2 VIP-Verteilung im Hypothalamus der Maus











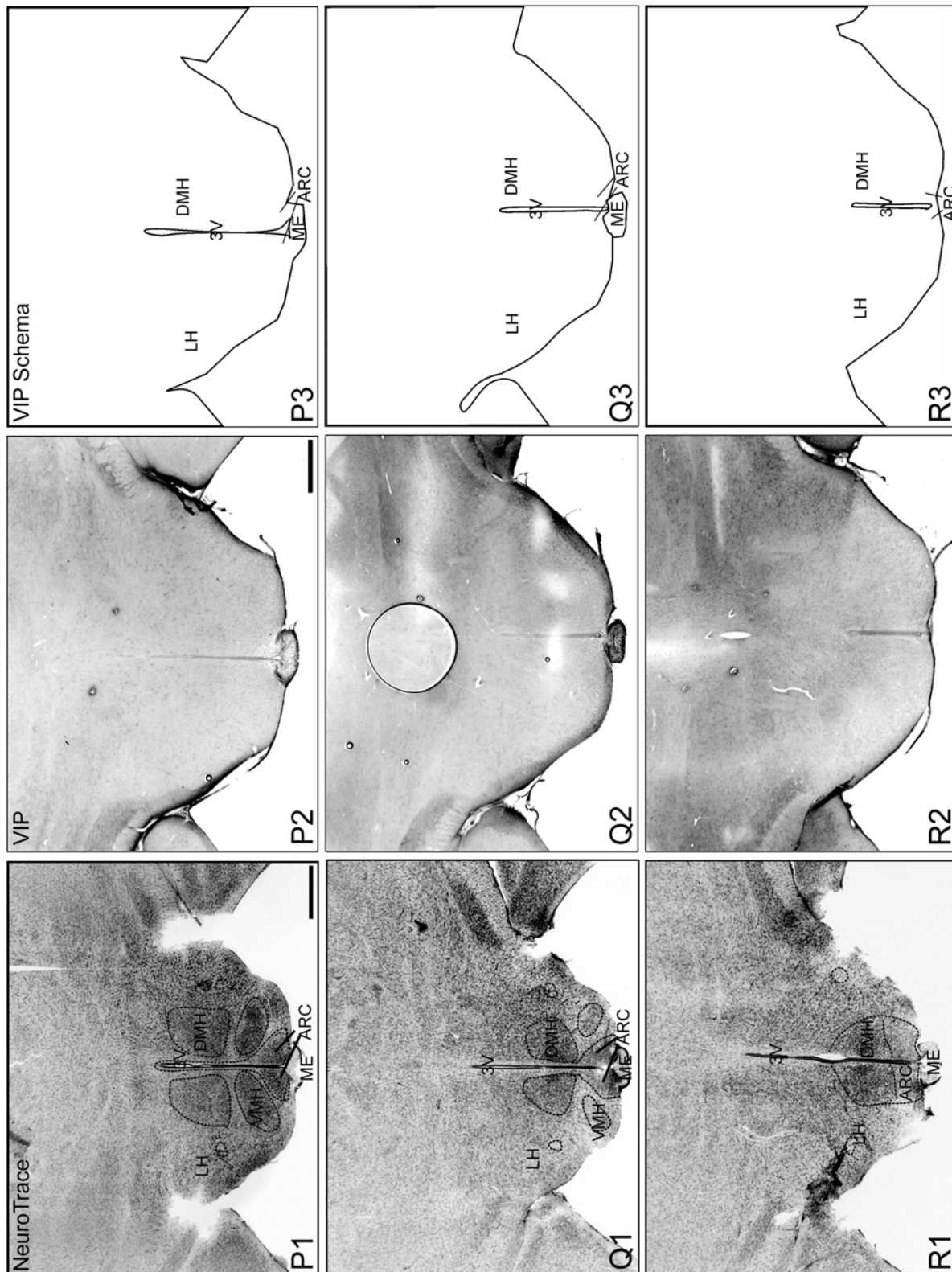


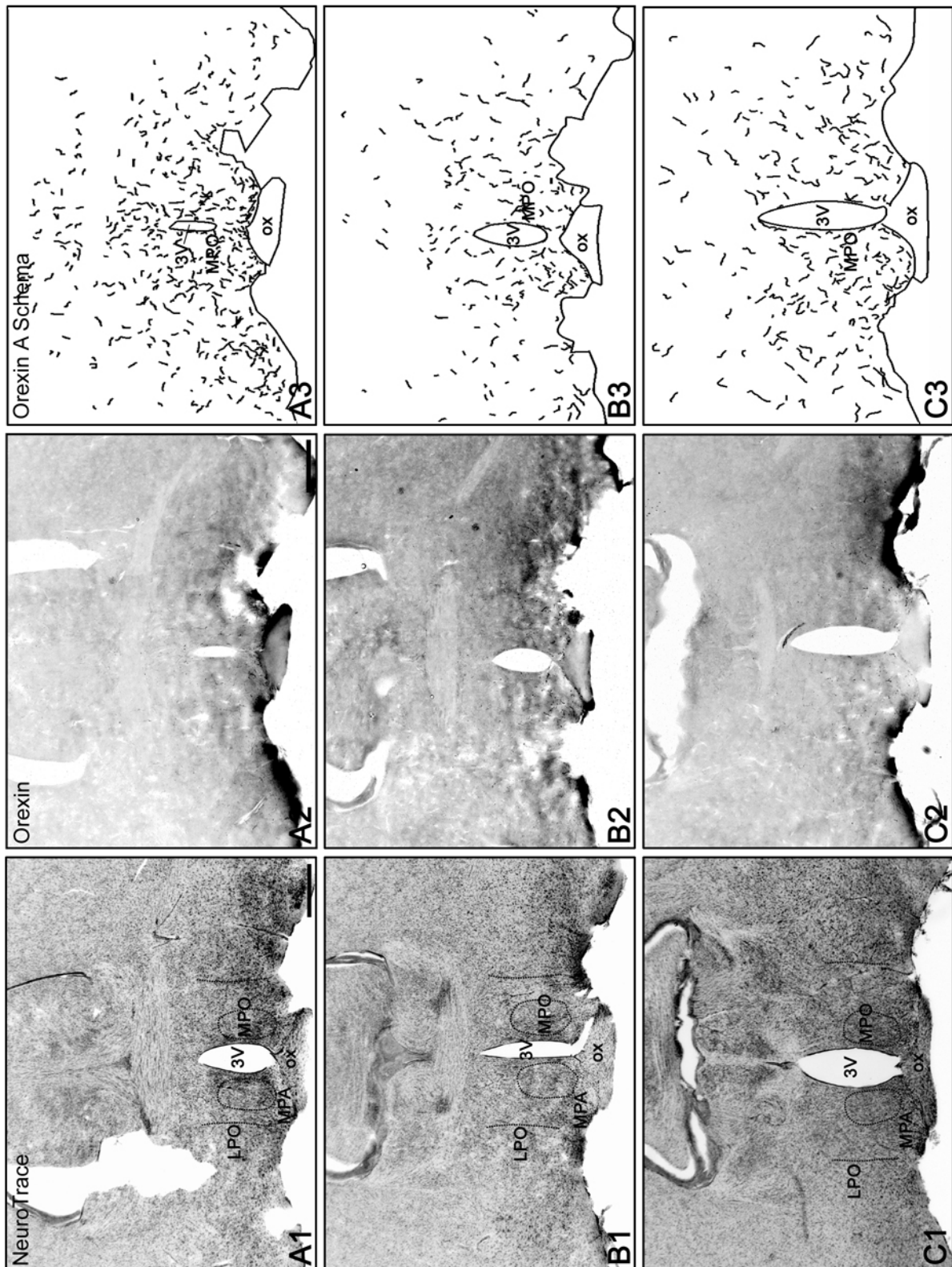
Abbildung 52: VIP-Verteilung im Hypothalamus der Maus. A1-R1 (links): Coronale Schnittserie durch den Hypothalamus einer CD1-Maus, angefärbt mit dem Nissl-Farbstoff NeuroTrace zur Darstellung der Kerngebiete. **A2-R2 (Mitte):** Immunzytochemische Färbung gegen VIP. **A3-R3 (rechts):** Schematische Darstellung der VIP-positiven Somata (Kreise) und Fortsätze (Linien).

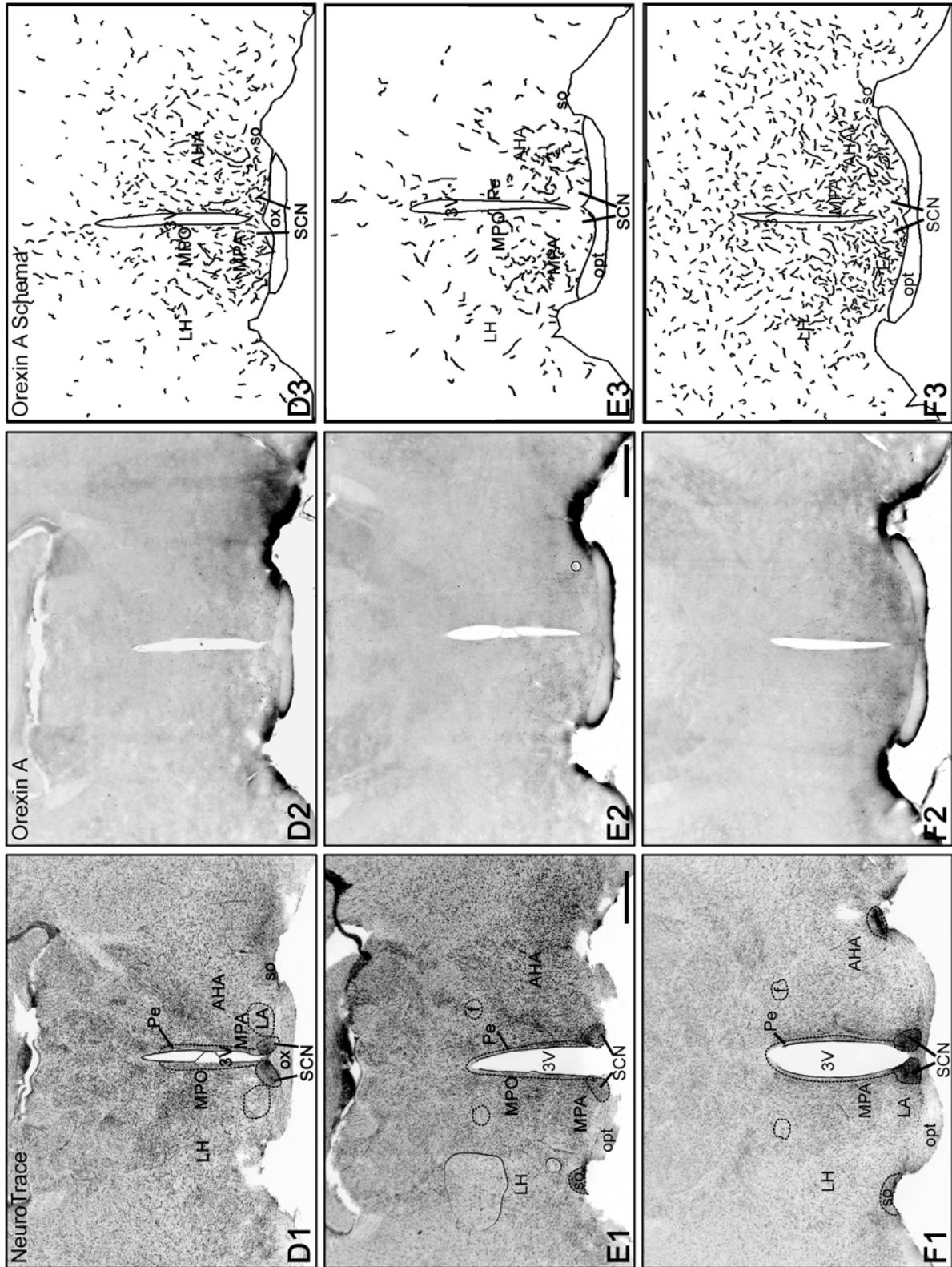
VIP-exprimierende Zellkörper liegen im Hypothalamus der Maus ausschließlich im SCN (**B2-E2**). Dieses Kerngebiet ist von einem dichten Netz VIP-positiver Fasern überdeckt.

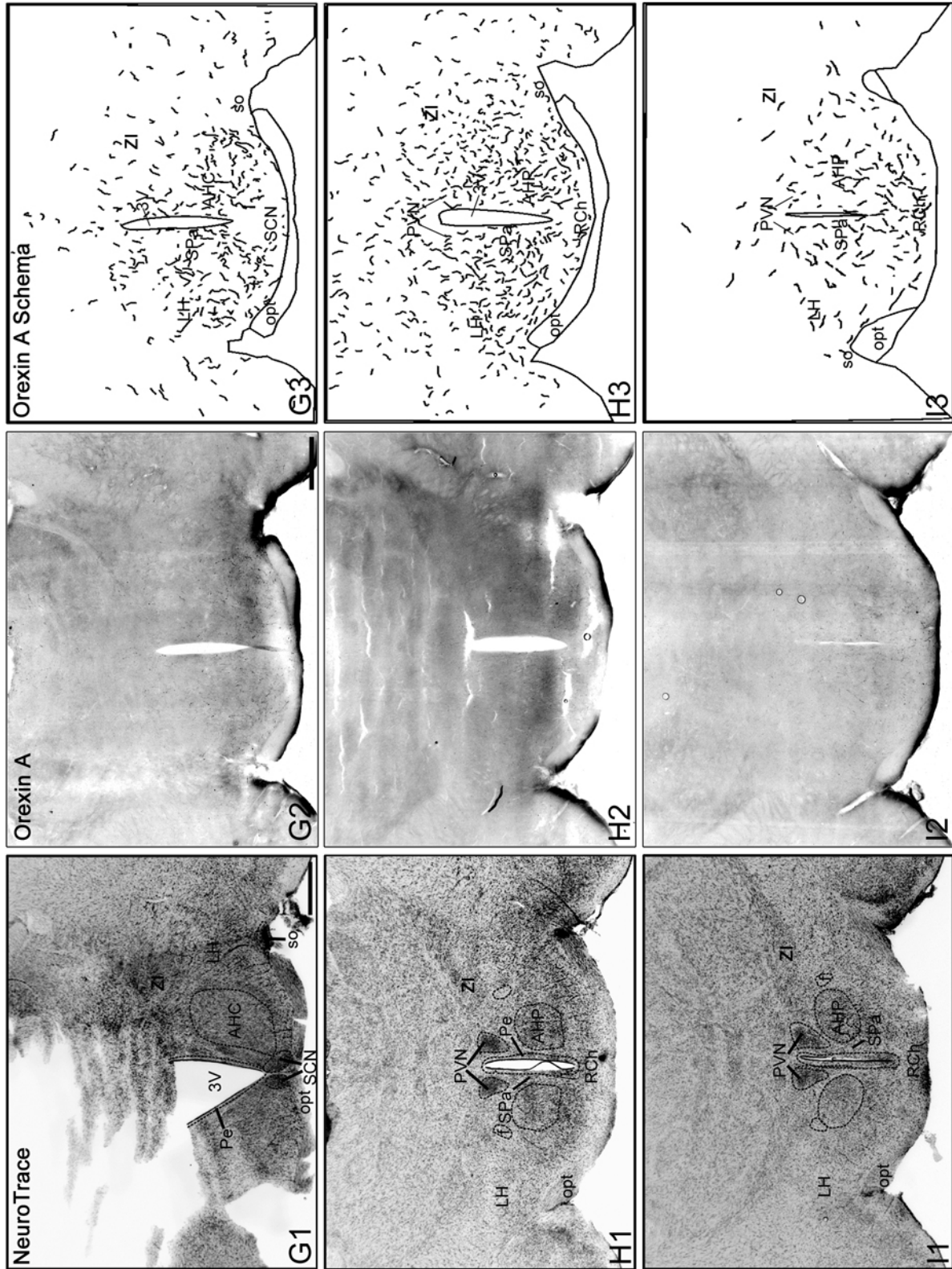
Benachbarte hypothalamische Nuclei wie die Area paeoptica (MPA) und der N. praeopticus lateralis (MPO) sind von wenigen feinen Fortsätzen durchzogen (**A2-D2**). In andere Zielgebiete des SCN, wie der N. dorsomedialis (DMH, **L2**) und der N. arcuatus (ARC, **O2**) ziehen lediglich einzelne filigrane Fasern. Die Pfeilspitzen deuten auf VIP-positive Projektionen. Zum Vergleich wurden mit einem Nissl-Farbstoff angefärbte Schnitte zugeordnet (**A1-R1**). Diese Schnitte wurden aus einem anderen Maushirn hergestellt. Sie entsprechen jedoch der gleichen Schnittebene.

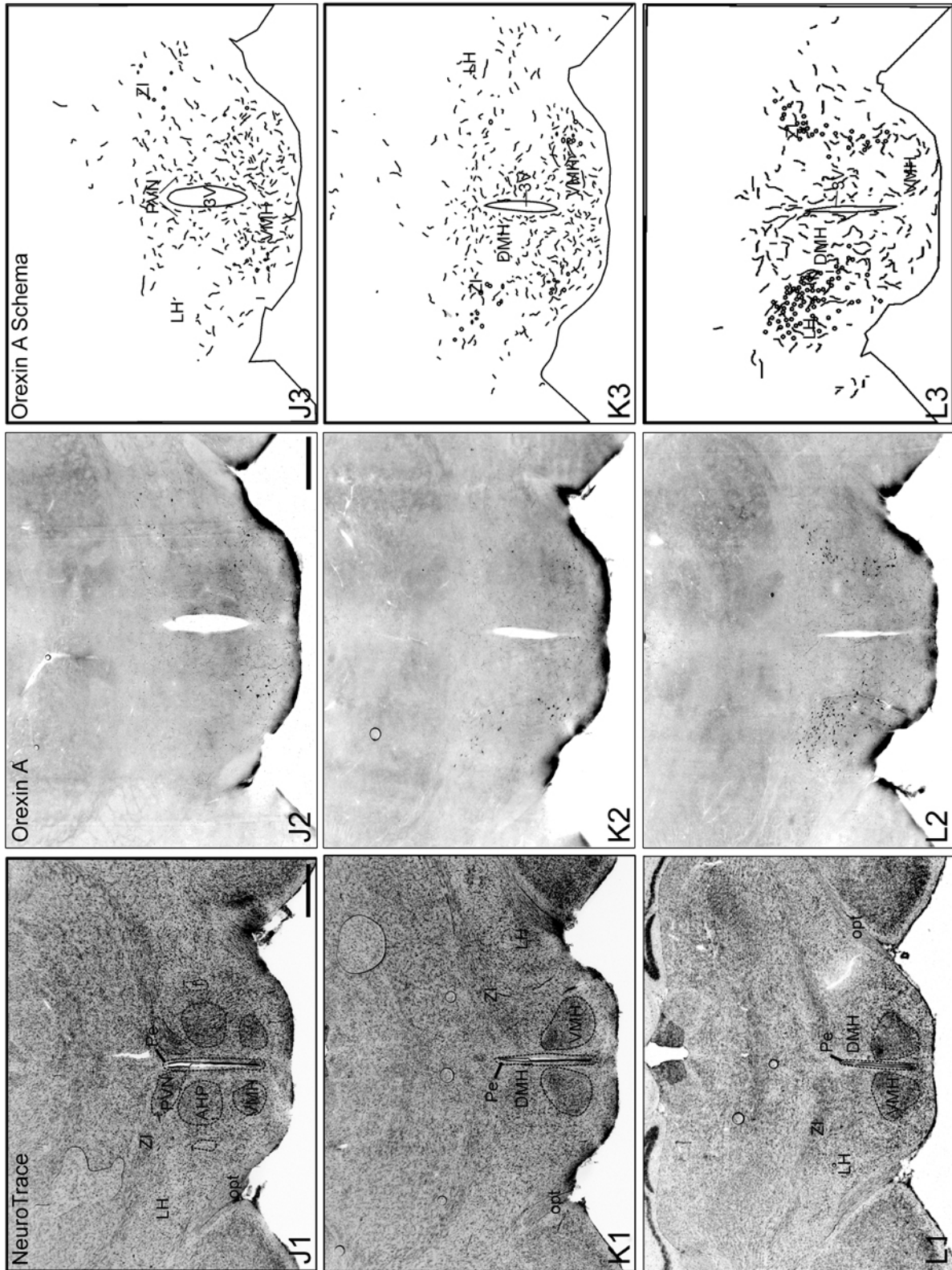
Die Abstände der einzelnen coronalen Schnitte (Schnittdicke 25µm) durch den Hypothalamus von rostral (**A**) nach caudal (**R**) betragen etwa 100µm. Abkürzungen siehe Abkürzungsverzeichnis. Maßstab der Übersichtsaufnahmen 500µm, Maßstab der Vergrößerungen 50µm

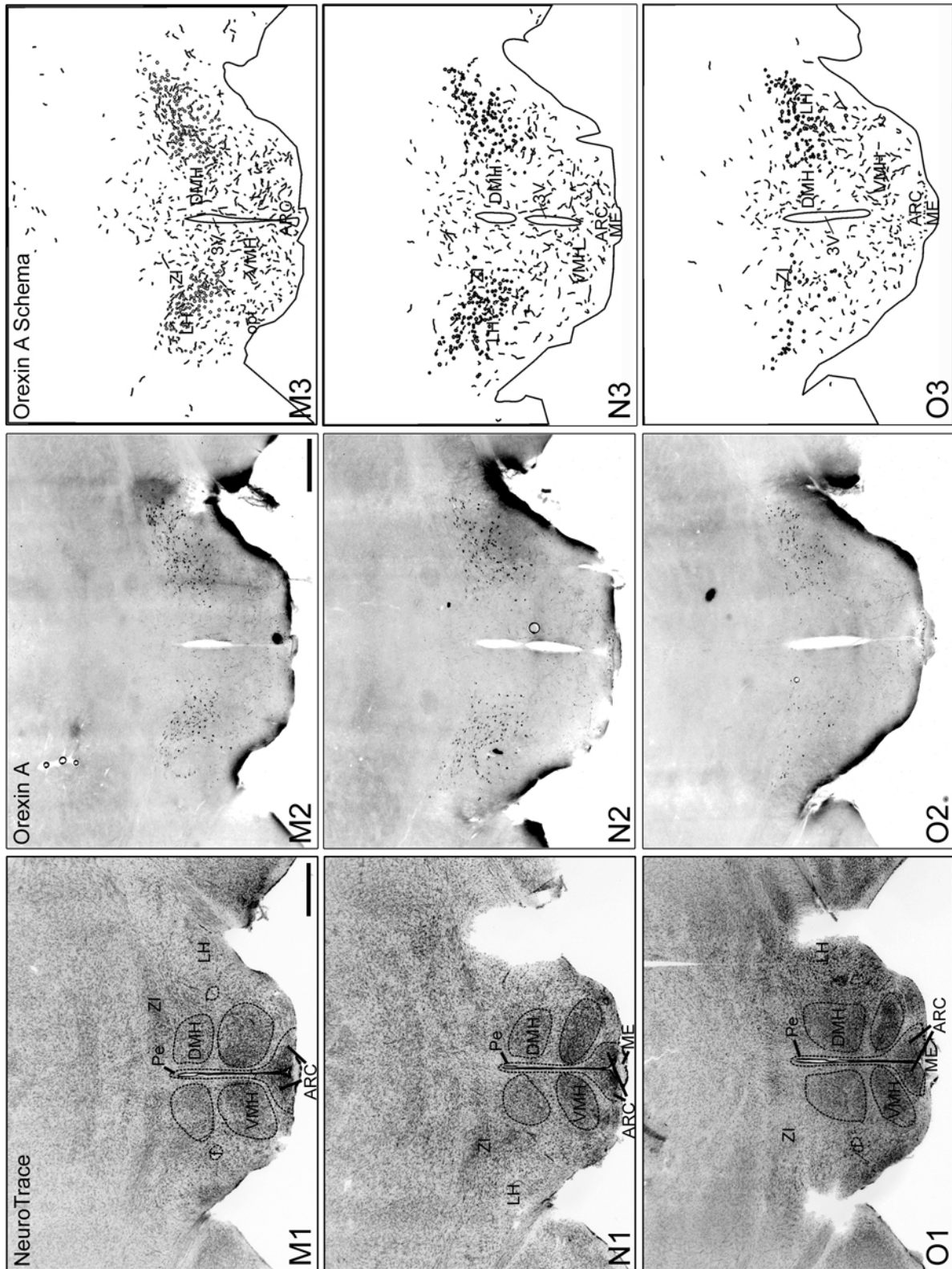
8.3 Orexin A-Verteilung im Hypothalamus der Maus











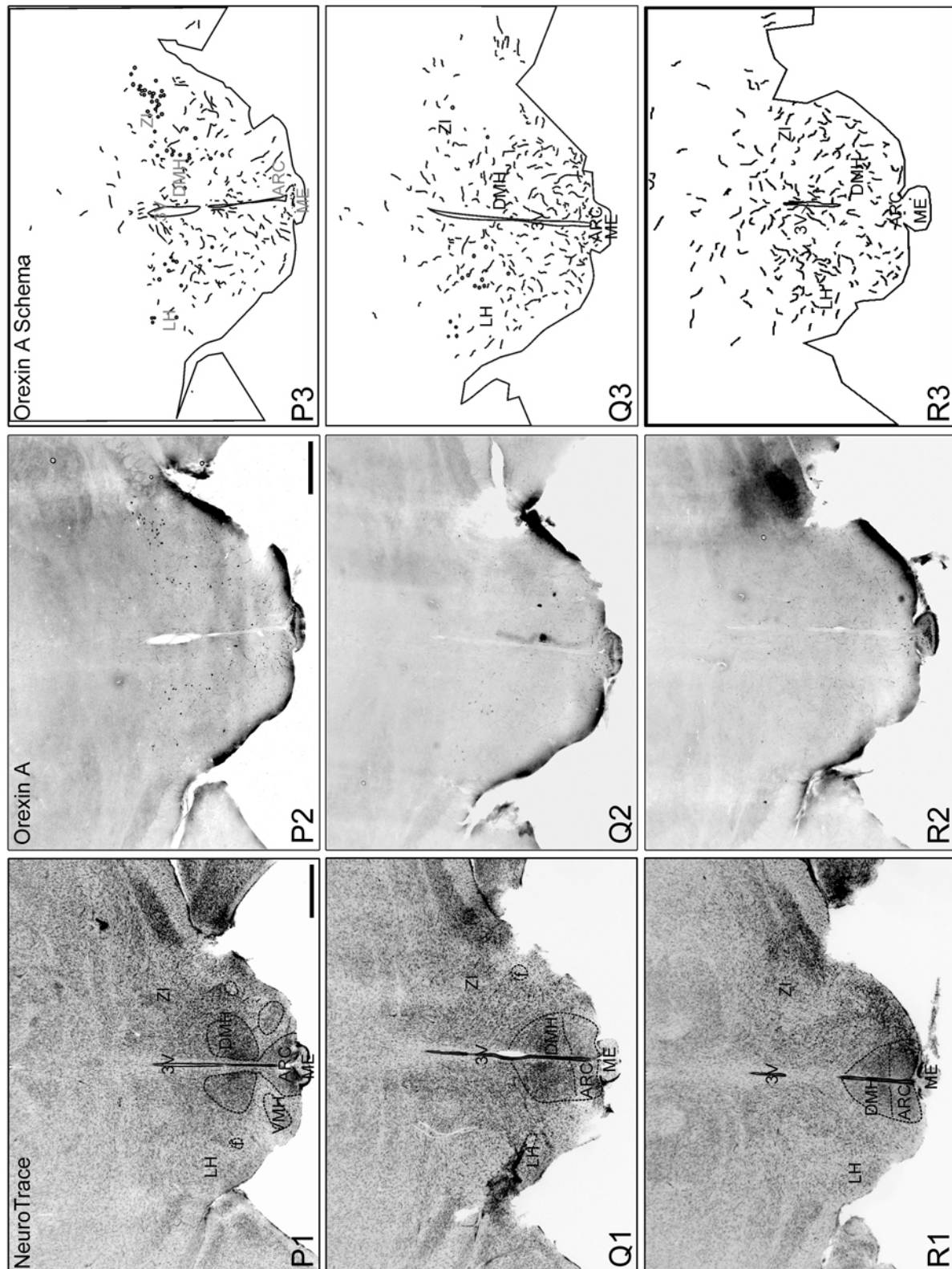


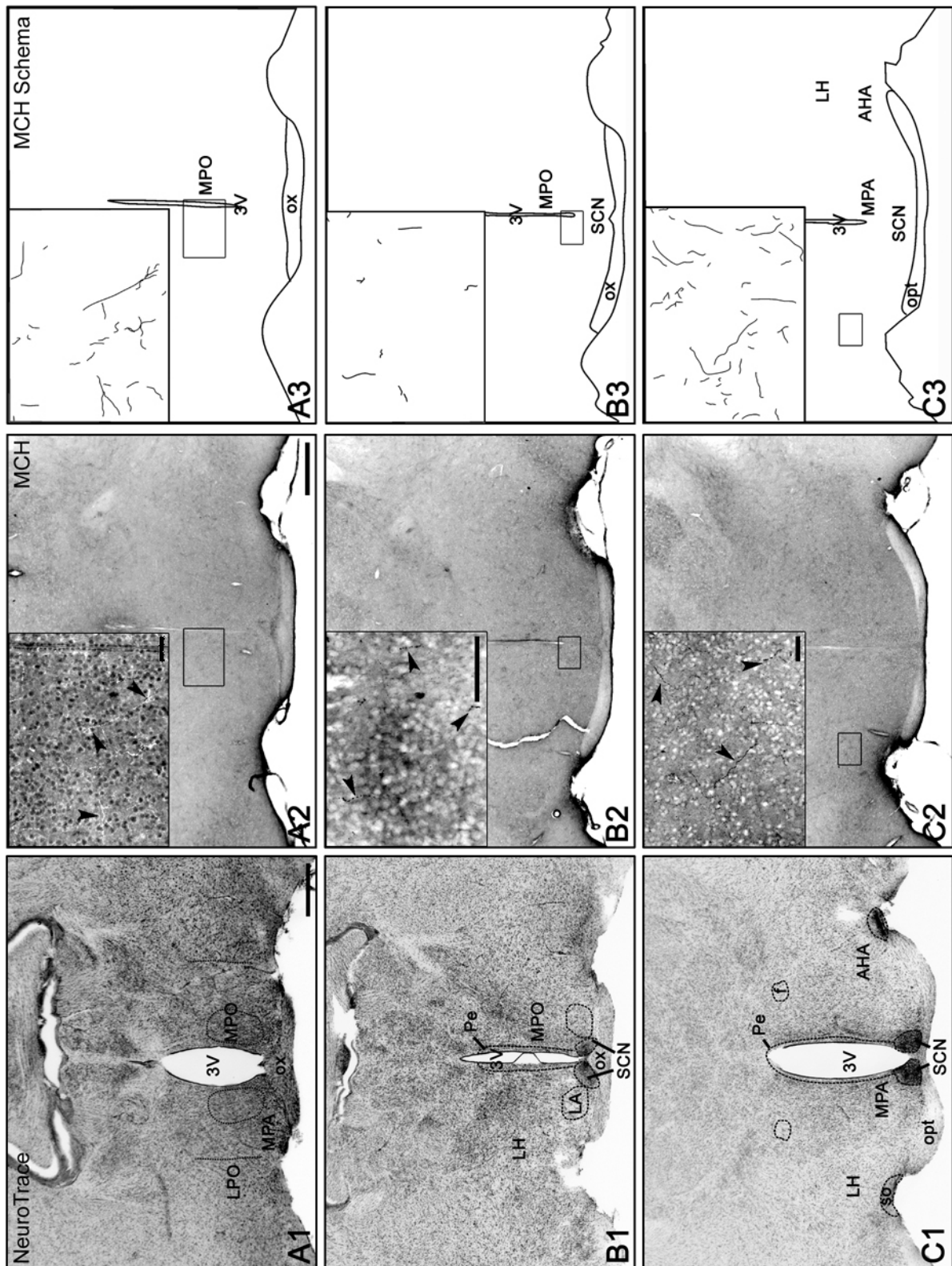
Abbildung 53: Orexin A-Verteilung im Hypothalamus der Maus. A1-R1 (links): Coronale Schnittserie durch den Hypothalamus einer CD1-Maus, angefärbt mit dem Nissl-Farbstoff NeuroTrace zur Darstellung der Kerngebiete. **A2-R2 (Mitte):** Immunzytochemische Färbung gegen Orexin A. **A3-R3 (rechte Reihe):** Schematische Darstellung der Orexin A-positiven Somata (Kreise) und Fortsätze (Linie).

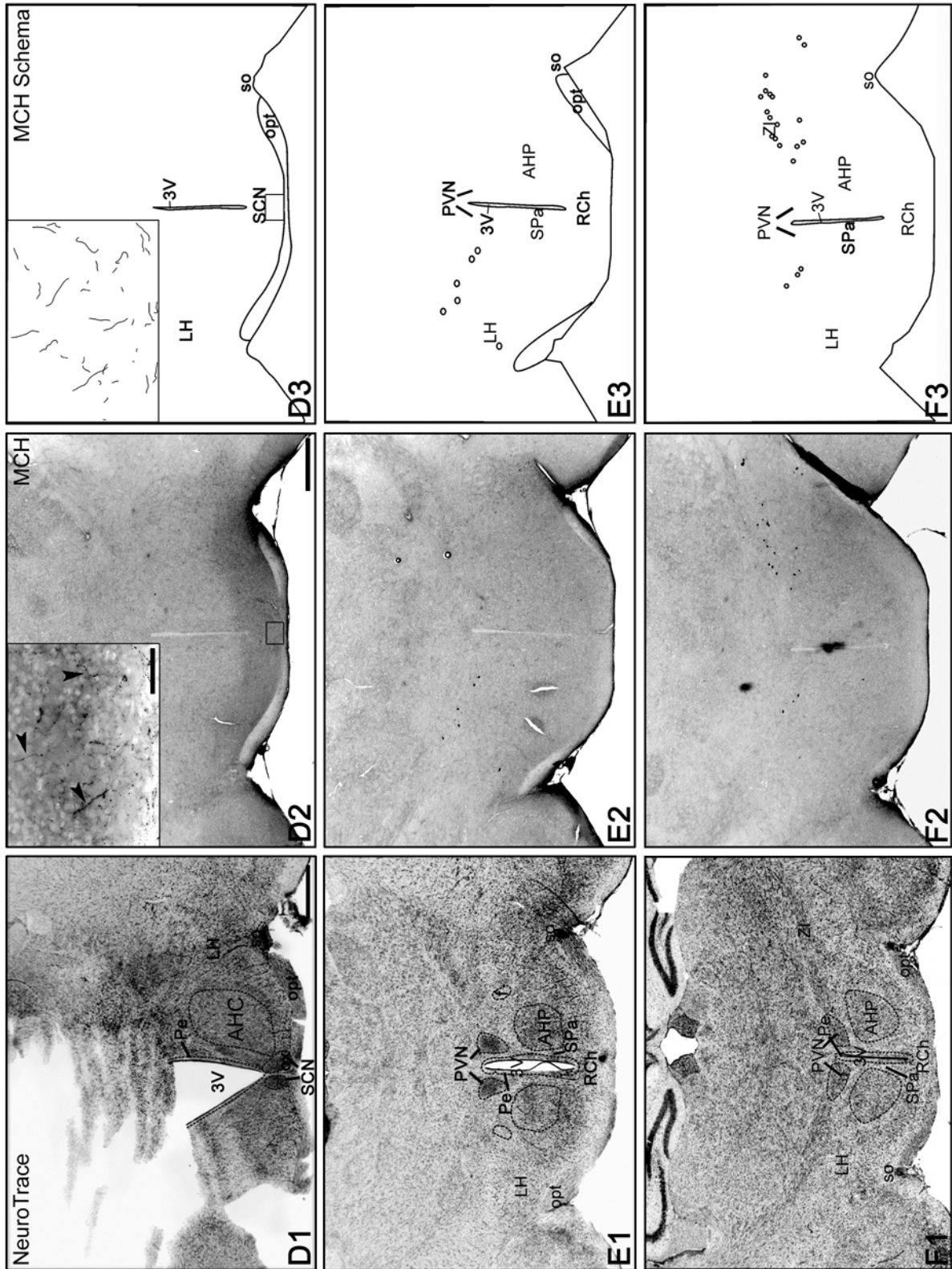
Orexin A-exprimierende Zellen liegen im Hypothalamus der Maus im Hypothalamus lateralis (LH, **J-Q**), um die Fornix (f, **M-Q**), in der Zona incerta (ZI, **J-Q**) und im N. dorsomedialis

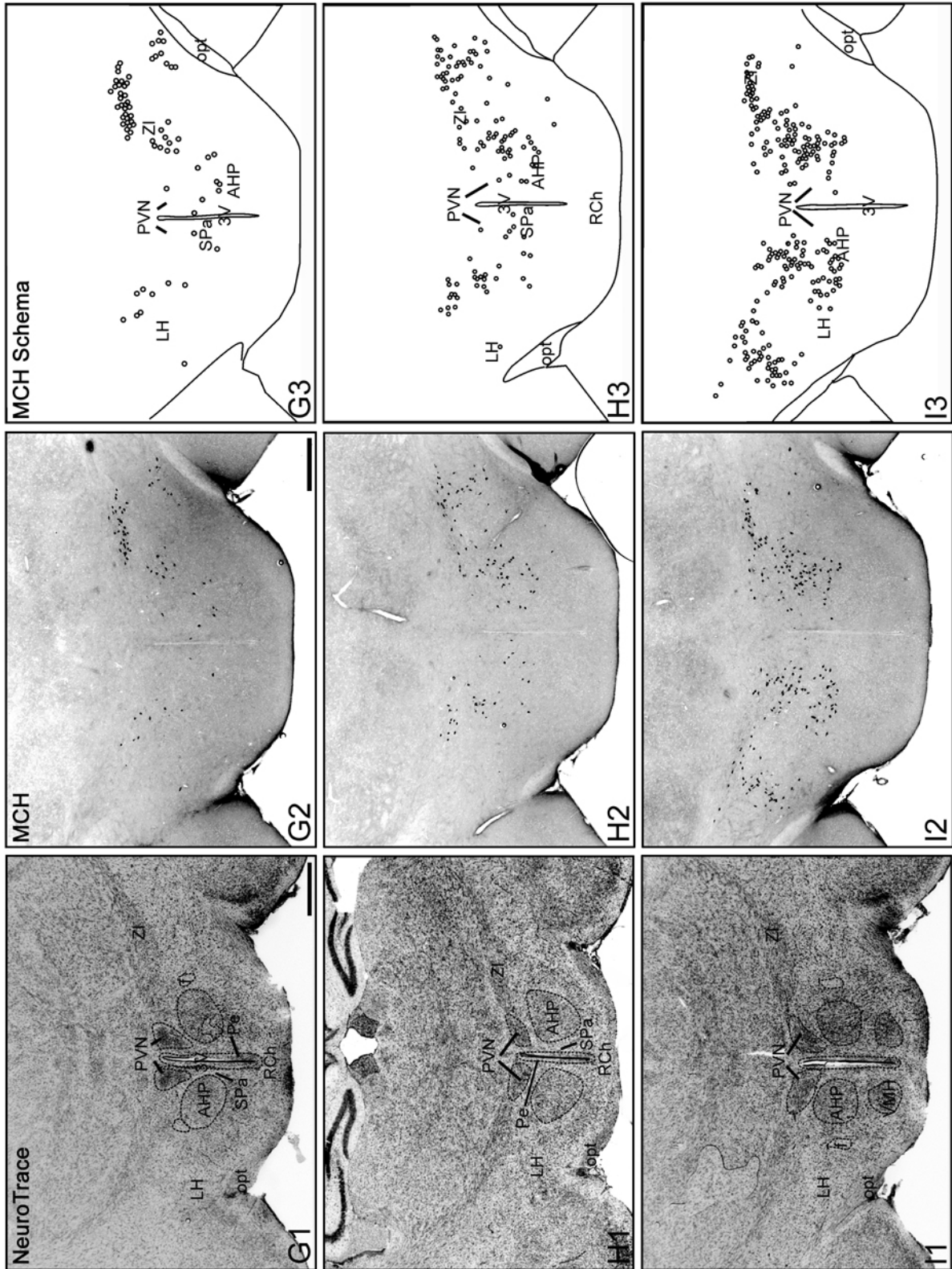
(DMH, **L-Q**). Orexin A-positive Fasern ziehen nahezu in den gesamten Hypothalamus. Der SCN wird weniger stark innerviert als das umgebende Gewebe, wie zum Beispiel die Area hypothalamica (AHA/AHC/AHP, **D-G**), der N. praeopticus medialis (LPO, **A-E**), der Area praeoptica (MPA, **A-F**) und der N. paraventricularis (PVN, **H-J**). In caudal zum SCN gelegenen Kerngebieten, wie beispielsweise der Area retrochiasmatica (RCh, **H, I**), dem N. dorsomedialis (DMH, **K-R**), dem Hypothalamus lateralis (LH, **G-R**) und dem N. ventromedialis (VMH, **J-O**) sind ebenfalls reichlich Fasern vorhanden, während im N. arcuatus (ARC, **N-R**) nur wenige Orexin A-positive Fortsätze gezeigt werden.

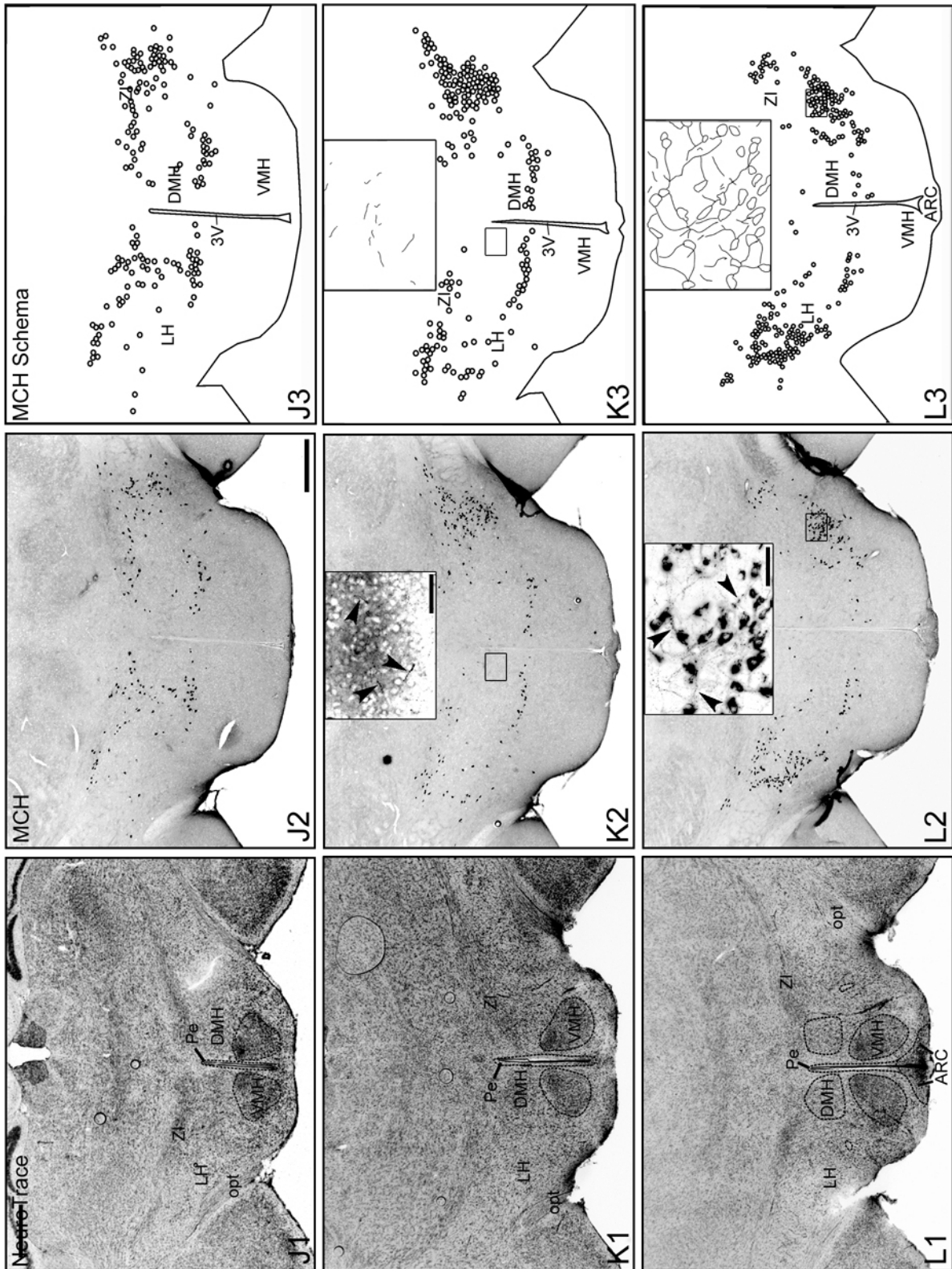
Zur besseren Betrachtung der Lage der Orexin A-positiven Neurone und Fasern wurden die Fluoreszenzaufnahmen der Coronalschnitte (Schnittdicke 25µm; von rostral, **A**, nach caudal, **R**) mit benachbarten Schnitten, die mit einem Nissl-Farbstoff angefärbt wurden (**A1-R1**), verglichen und schematisiert (**A3-R3**). Abkürzungen siehe Abkürzungsverzeichnis. Maßstab 500µm

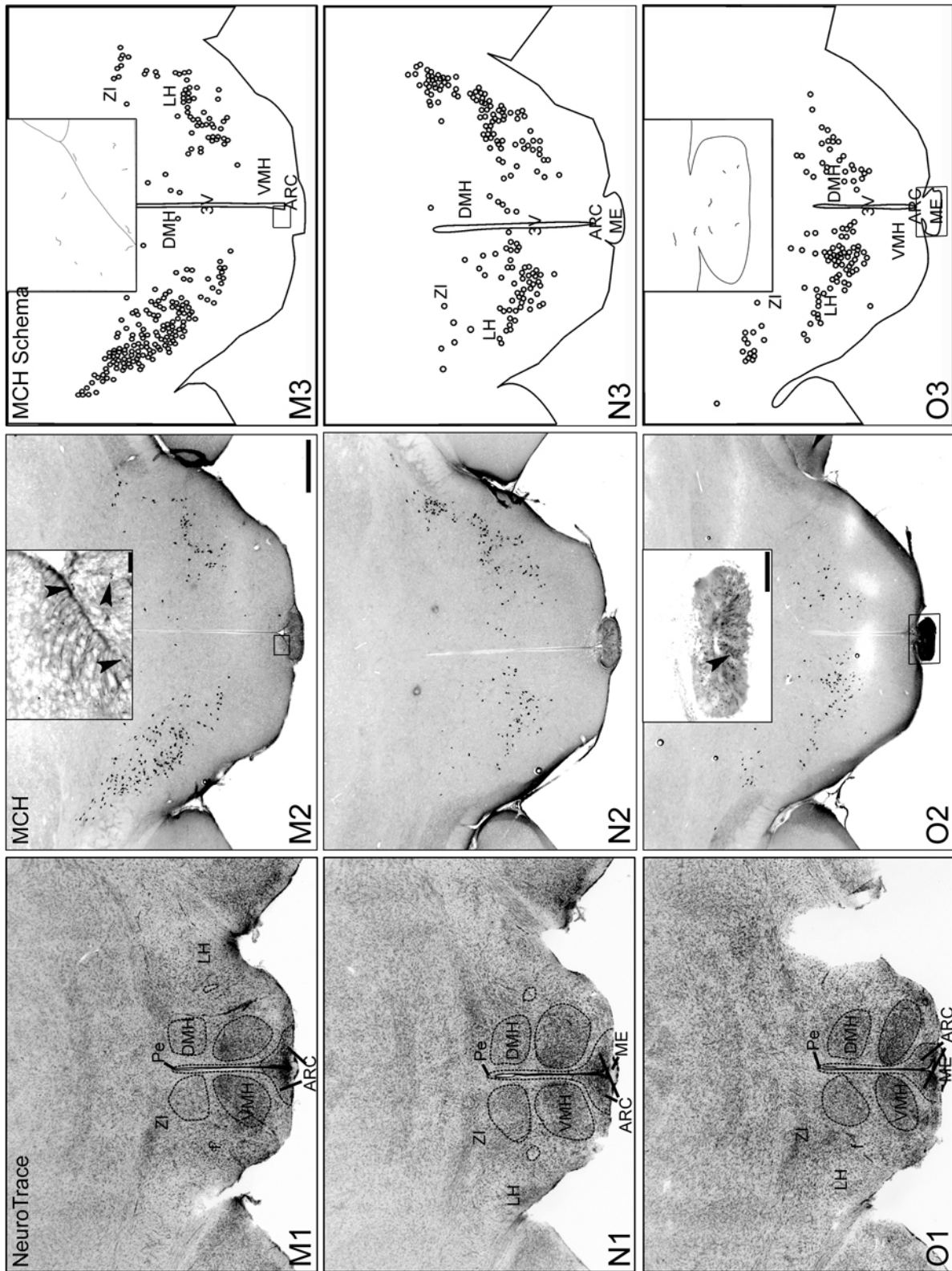
8.4 MCH-Verteilung im Hypothalamus der Maus











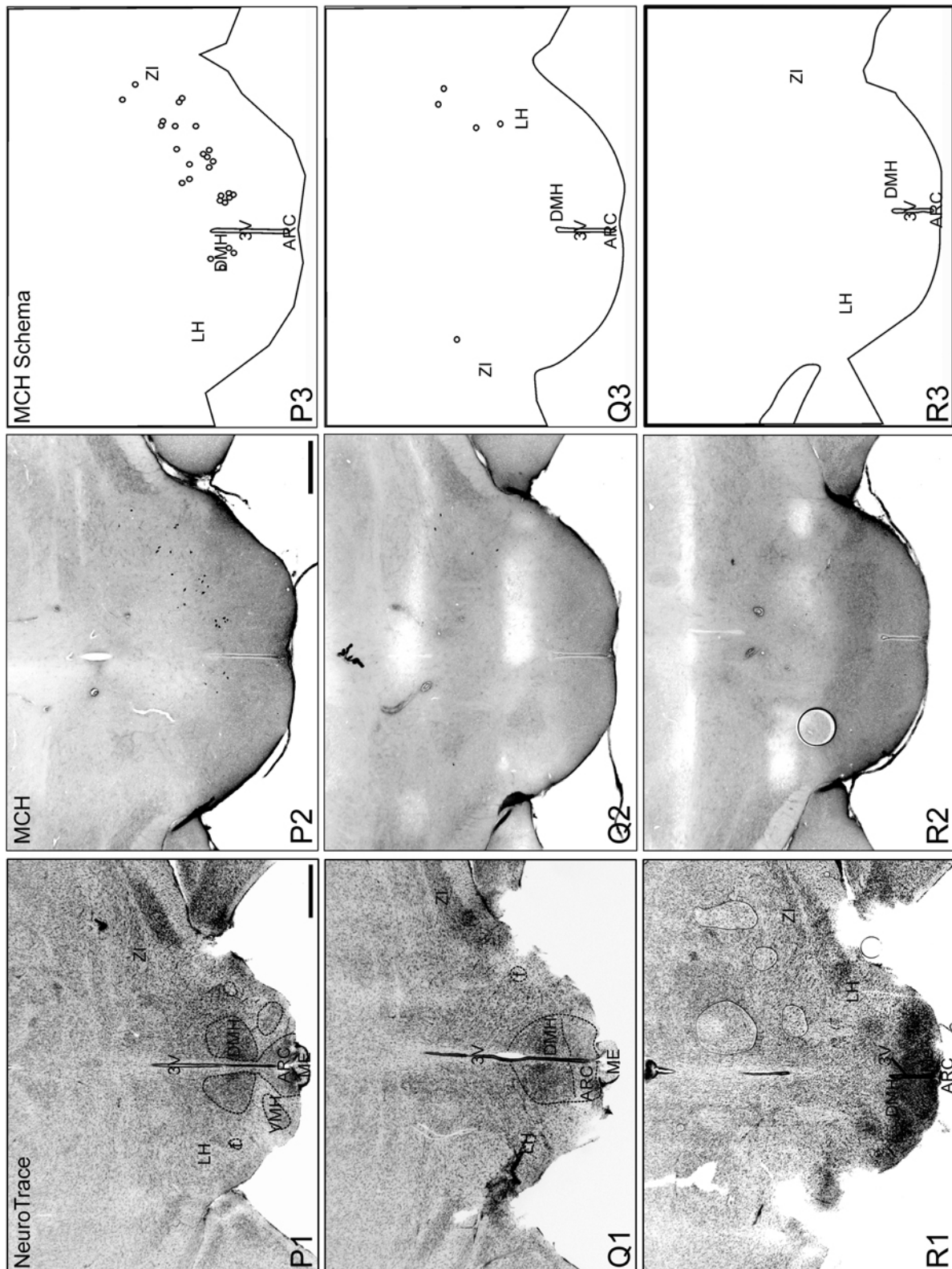


Abbildung 54: MCH-Verteilung im Hypothalamus der Maus. A1-R1 (links): Coronale Schnittserie durch den Hypothalamus einer CD1-Maus., angefärbt mit dem fluoreszierenden Nissl-Farbstoff NeuroTrace zur Darstellung der Kerngebiete. **A2-R2 (Mitte):** Immunzytochemische Färbung gegen das Neuropeptid MCH. **A3-R3 (rechts):** Schematische Darstellung der MCH-positiven Somata (Kreise) und Fortsätze (Linie).

MCH-exprimierende Zellen sind im Hypothalamus der Maus im Hypothalamus lateralis (LH), der Zona incerta (ZI, **E2-Q2**), dem N. dorsomedialis (DMH, **J-P**) und dem N. perifornicalis

(PeF, **G-Q**), sowie vereinzelt im N. periventricularis (Pe, **G2, H2, K2, L2, N2**) angeordnet. Von diesen Kerngebieten ausgehend innervieren MCH-positive Fasern nahezu den gesamten Hypothalamus. In den SCN projizieren nur wenige Fasern (**B2-D2**). Das umgebende Gewebe, wie beispielsweise die Area hypothalamica (AHA/AHC/AHP, **C2-I2**), den N. praeopticus medialis (MPO) und die Area praeoptica (MPA, **A2-C2**) weisen eine etwas höhere Anzahl an Fortsätzen auf. In caudal zum SCN gelegenen Kerngebieten, wie dem Hypothalamus lateralis (LH) und um die Fornix (f) sind reichlich Fasern vorhanden (**E2-R2**), während in den N. ventromedialis (VMH, **I2-P2**) und den N. arcuatus (ARC, **L2-R2**) nur wenige MCH-positive Fortsätze ziehen. Die Fortsätze sind mit Pfeilspitzen in den Vergrößerungen gekennzeichnet. Zum Vergleich wurden den immunzytochemischen Färbungen mit Nissl-Farbstoff angefärbte Schnitte zugeordnet. Diese Schnitte wurden aus einem anderen Maushirn hergestellt, entsprechen jedoch der gleichen Schnittebene. Abkürzungen siehe Abkürzungsverzeichnis. Maßstab 500µm, Vergrößerung 50µm

9 Danksagung

Ich bedanke mich ganz herzlich bei Herrn Professor Günther Fleissner für die Begutachtung dieser Doktorarbeit und die freundliche Betreuung.

Herzlichen Dank an Herrn Professor Wässle für die Möglichkeit meine Doktorarbeit am Max-Planck-Institut für Hirnforschung anfertigen zu dürfen, die vielseitige Unterstützung während dieser Zeit und die Begutachtung.

Für die Bereitstellung des Dissertationsthemas bedanke ich mich bei Herrn Professor Hilmar Meissl.

Mein besonderer Dank gilt Dr. Silke Haverkamp und Dr. Susanne tom Dieck, die mir durch ihre Unterstützung und unendliche Geduld die Fertigstellung meiner Arbeit erst ermöglichten.

Liane, Birgitte Marshallsay, Christopher, Dana, Susu und Steppi danke ich für die wunderschöne, heitere und schokoladenreiche Zeit in den Kinderzimmern. Darüber hinaus danke ich Brigitte Marshallsay für ihre immerwährende Fürsorge und Herzlichkeit, Steppi für die detaillierte Einführung in die PCR und die bereitwillige Verfügbarkeit als Testesserin sowie Dana für das mehrfache und zügige Korrekturlesen der Arbeit.

Christopher und Driss danke ich für die kompetente und kreative Hilfe in Computerfragen, ohne die ich manchmal verzweifelt wäre.

Für sonstige technische und administrative Unterstützung danke ich Felicitas Boij, Irmgard Odenthal, Birgit Ott und Peer.

Ein Dankeschön an die gesamte Neuroanatomische Abteilung für die tolle Arbeitsatmosphäre und Hilfsbereitschaft in allen Fragen. Besonders zu nennen sind außer meinen Zimmergenossen noch Brigitte Müller, Silke, Driss, Diana, Anika, Frau Odenthal, Jan, Martin, Michiel und Christian, die mich die Zeit im MPI in schöner Erinnerung behalten lassen.

Dank auch an meine liebste Freundin Julia, die stets ein offenes Ohr hatte und mir nach Kräften geholfen hat.

Nicht zuletzt danke ich meiner Familie, vor allem meinem Vater, meiner Schwester Rike und Alexander, die mich auch in schwierigen Phasen stets liebevoll in jeglicher Hinsicht unterstützt haben.

10 Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, Sabine Mahr, dass ich diese Doktorarbeit selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Frankfurt am Main,

11 Curriculum Vitae

Persönliche Daten

Name	Sabine Mahr
Geburtsdatum	28.01.1980
Geburtsort	Hildburghausen
Nationalität	deutsch
Adresse	Rothschildallee 52 60389 Frankfurt am Main
Telefon	+49 69 17526080
Mobil	+49 163 5107326
E-Mail	SabineMahr@gmx.net



Studium

12/2003 - 05/2008	Promotion zum Dr. phil. nat. am Max-Planck-Institut für Hirnforschung Frankfurt/Main zur Übertragung circadianer Signale zwischen dem Nucleus suprachiasmaticus und anderen Kerngebieten des Hypothalamus
01/2003 - 09/2003	Diplomarbeit zur Melatoninbiosynthese im lichtempfindlichen Pinealorgan von Fischen
10/1998 - 09/2003	Diplomstudium der Biologie an der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt/Main

Schulausbildung

09/1991 - 06/1998	Gymnasium "Georgianum" in Hildburghausen, Abitur
09/1986 - 06/1991	Grundschule und Polytechnische Oberschule in Eisfeld

Publikation

Circadian activity rhythms and phase-shifting of cultured neurons of the rat suprachiasmatic nucleus.

C. Klisch, S. Mahr, H. Meissl

Chronobiology International, 2006; Vol 23(1-2), pp 181-190

Referenzen

Prof. Dr. Heinz Wässle
Max-Planck-Institut für Hirnforschung
Abteilung Neuroanatomie
Deutschordenstraße 46
60528 Frankfurt am Main
Tel. +49 69 96769-219
E-Mail: waessle@mpih-frankfurt.mpg.de

Dr. Susanne tom Dieck
Max-Planck-Institut für Hirnforschung
Deutschordenstrasse 46
60528 Frankfurt am Main
Tel. +49 69 96769-259
E-Mail: tomdieck@mpih-frankfurt.mpg.de

Sonstige Fähigkeiten

Sprachkenntnisse	Englisch	fließend in Wort und Schrift
	Spanisch	Grundkenntnisse
	Kroatisch	Grundkenntnisse
	Latein	Latinum

EDV

Text- und Bildverarbeitung (Microsoft Office, Photoshop, Corel Draw),
mikroskopische Bildaufnahme (Axiovision, LSM Pascal)
Tabellenkalkulationsprogramm und grafische Darstellung
(Excel, Sigma Plot)

Private Interessen

Reisen, Literatur, Sport, Musik