

Aus dem Institut für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie
der Universität zu Lübeck
Direktor: Prof. Dr. med. Markus Schwaninger

Die zirkadiane Regulation des Orexin-Systems

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der Universität zu Lübeck
- Aus der Sektion Medizin –

vorgelegt von
Kathrin Ventzke
aus Elmshorn

Lübeck 2019

1. Berichterstatterin/Berichterstatter: Prof. Dr. rer. nat. Olaf Jöhren
2. Berichterstatterin/Berichterstatter: Prof. Dr. med. Johannes Klein
Tag der mündlichen Prüfung: 18.09.2019
Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 18.09.2019
- Promotionskommission der Sektion Medizin -

Meiner Mutter

Inhaltsverzeichnis

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	IV
1 EINLEITUNG	1
1.1 OREXINE	1
1.1.1 Entdeckung und Allgemeines	1
1.1.2 Verteilung Orexin-positiver und Orexin-Rezeptor exprimierender Neurone und Projektionen	3
1.1.3 Einflüsse des Orexin-Systems auf den Organismus	4
1.1.3.1 Schlaf-Wach-Verhalten	4
1.1.3.2 Nahrungsaufnahme/Energie-Homöostase	6
1.1.3.3 Alter	8
1.1.3.4 Schmerz	9
1.1.3.5 Effekte auf das Belohnungssystem	9
1.1.4 Weitere Erkrankungen	10
1.1.5 Weitere Wirkungen von Orexinen	10
1.1.5.1 Steroidsynthese/-Freisetzung	10
1.1.5.2 Zerebrale zelluläre Plastizität	11
1.1.5.3 HIF-1 (Hypoxia-Inducible Factor 1)	11
1.2 CHRONOBIOLOGIE	11
1.2.1 Zirkadiane Rhythmen und der Nukleus suprachiasmaticus (SCN)	11
1.2.2 Clock Genes	12
1.2.2.1 Bmal1	12
1.2.2.2 NFIL-3 (E4BP4)	13
1.2.2.3 DBP	13
1.2.2.4 PERIOD-Isoformen	14
1.2.3 Zirkadiane Rhythmik der Orexin-Expression	15
1.3 FRAGESTELLUNG	17
2 MATERIAL UND METHODEN	18
2.1 MATERIAL	18
2.1.1 Chemikalien	18
2.1.2 Primer	18
2.1.3 Enzyme/Nukleotide/Vektoren	19
2.1.4 Kits	20
2.1.6 Puffer und Lösungen	20
2.1.7 Medien und Zusätze	21
2.1.8 Verbrauchsmaterialien	21
2.1.9 Geräte	22

2.2 METHODEN.....	23
2.2.1 Organentnahme und Präparation	23
2.2.1.1 Licht-Effekt auf die Expression	24
2.2.1.2 Präparation der Gewebeproben.....	24
2.2.1.3 Homogenisieren der Gewebeproben	25
2.2.2 Zellversuche.....	25
2.2.2.1 Zellkultur.....	25
2.2.2.2 Versuch zum zirkadianen Rhythmus in mHypoA-Zellen.....	26
2.2.2.3 Versuch zur Transfektion des hOX ₂ R-Promotors in mHypoA- und NCI- Zellen	27
2.2.2.4 Versuch zum SF1 mutierten hOX ₂ R-Promotor in NCI-Zellen	29
2.2.3 RNA-Extraktion	31
2.2.3.1 Messung des RNA-Gehalts	32
2.2.4 cDNA	32
2.2.5 PCR (Polymerase Chain Reaction)	33
2.2.6 Primeroptimierung.....	35
2.2.7 Agarose-Gel-Elektrophorese	36
2.2.8 Reporter Gen Assay.....	36
2.3 STATISTIK	38
2.4 BEZUGSPARAMETER.....	39
3 ERGEBNISSE	40
3.1 ETABLIERUNG DER PCR FÜR DIE PRIMER MBMAL-1, MG6PC, MGCK, MPer2, MNFIL-3 UND MDBP	40
3.2 TAGESZEITABHÄNGIGE EXPRESSION DES PRÄPRO-OREXINS, DER OREXIN- REZEPTORSUBTYPEN SOWIE DER UHRENGENE.....	41
3.2.1 Hell-Dunkel-Expression (L/D).....	41
3.2.1.1 Cortex	42
3.2.1.2 Hypothalamus	45
3.2.1.3 Leber	48
3.2.1.4 Nebenniere.....	51
3.2.2 Dunkel-Dunkel-Expression	53
3.2.2.1 Cortex	53
3.2.2.2 Hypothalamus	55
3.2.2.3 Leber	57
3.2.2.4 Nebenniere.....	59
3.2.3 Licht-Effekt auf die Expression	60
3.2.3.1 Cortex.....	61
3.2.3.2 Hypothalamus	62

3.2.3.3 Leber	63
3.2.3.4 Nebenniere	64
3.3 ZELLVERSUCHE	65
3.3.1 24h-Zellversuch mit mHypoA-Zellen	65
3.3.1.1 Gen-Expression mHypoA-Zellen	65
3.3.1.2 PPO-Expression mHypoA-Zellen	67
3.3.2 Reporter Gen Assays	68
3.3.2.1 Aktivität des hOX ₂ R-Promotors in NCI- sowie mHypoA-Zellen	68
3.3.2.2 48h-Aktivität des hOX ₂ R-Promotors in NCI-Zellen	69
3.3.2.3 48h-Expression des hOX ₂ R-Promotor_mut SF1 in NCI-Zellen	70
4 DISKUSSION	71
4.1 Zirkadiane Regulation von PPO	71
4.2 ZIRKADIANE REGULATION DER OREXIN REZEPTOREN	72
4.3 UHRENGENE	74
4.4 LICHTEFFEKT AUF DIE EXPRESSION	75
4.5 ZIRKADIANE REGULATION DES HUMANEN OX ₂ R-PROMOTERS	76
4.5 AUSBLICK	78
5 ZUSAMMENFASSUNG	81
6 LITERATURVERZEICHNIS	82
7 DANKSAGUNG	101
8 LEBENSLAUF	102

Abkürzungsverzeichnis

AMV	Avian myeloblastosisvirus
ANOVA	analysis of variance (Varianzanalyse)
ARNTL	Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator-like protein 1
ATP	Adenosintriphosphat
Bmal1	s. ARNTL
BMI	Body mass index
bZIP	Basic Leucine Zipper Domain
cDNA	complementary DNA
CHO	Chinese Hamster Ovary Zellen
CLOCK	Circadian Locomotor Output Cycles Kaput (Gen)
CRY	Cryptochromes (Protein)
CSF	Cerebrospinal Fluid
CTP	Cytidintriphosphate
D/D	Dunkel-Dunkel-Expression (dark/dark)
D-Box	Destruction Box (konservierte Gen-Sequenz)
DBP	D site of albumin promoter (albumin D-box) binding protein,
DePCH2O	Diethylpyrocarbonate Wasser
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DNA	Deoxyribonucleid Acid
DTT	Dithiothreitol
E4BP4 -	NFIL-3
E-Box	Enhancer Box (DNA response element)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EEG	Elektroenzephalografie
ERK	Extracellular-signal Regulated Kinases
FCS	Fetal Calf Serum
G6PC	Glucose-6-Phosphatase, katalytische Untereinheit
GABA	Gamma-Aminobutyric acid - inhibitorischer Neurotransmitter
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GCK	Glucokinase
GPCR	G Protein-coupled receptor
GTP	Guanosintriphosphat
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid (2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure)
HIF	Hypoxia inducible factor

HLH	Helix-Loop-helix (Proteinstrukturmotiv)
mHypoA	Adult Mouse Hypothalamic Cell Line
K ⁺	Kalium
KCL	Kaliumchlorid
KT	Kammertemperatur Kryostat
L/D	Hell-Dunkel-Expression (light/dark)
MAP	Mitogen-activated protein
MgCl	Magnesium Chlorid
MOP3	s. ARNTL
MW	Molecular Weight
NaCl	Natrium Chlorid
NaHCO ₃	Natriumhydrogencarbonat
NCI	Human adrenal gland carcinoma cell line
NFIL-3	Nuclear factor, interleukin 3 regulated, (Protein)
NTP	Nukleosidtriphosphat
OD	Optical Density
OptiMem	Reduced-Serum Medium is an improved Minimal Essential Medium
OT	Objekttemperatur Kryostat
OX ₁ R	Orexin 1 Rezeptor
OX ₂ R	Orexin 2 Rezeptor
PAS	Domaine aus Per (period circadian protein), Arnt (aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator protein) und Sim (Single-minded protein)
PBS	Phosphate Buffered Saline (phosphatgepufferte Salzlösung)>
PCR	Protein Chain Reaction
PER	Gene encoding the period circadian protein homolog 1
PEST	Prolin (P), Glutamat (E), Serin (S) und Threonin (T)
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
PPO	Präpro-Orexin
REM	Rapid Eye Movement (Schlafphase)
RGA	Reporter Gene Assay
RHT	Retino-Hypothalamischer Trakt
RIGUI	PER1
RNA	Ribonucleic Acid
SCN	Suprachiasmatic Nucleus (Nukleus Suprachiasmaticus)
SF-1	Steroidogenic Factor 1
SV40	Simian-Virus 40
TAE-Puffer	TRIS-Acetat-EDTA-Puffer

TNM	Tuberomammillary Nucleus (Nukleus tuberomamillaris)
TRH	Thyreotropin Releasing Hormon
Tris-HCl	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TTP	Thymidintriphosphat
UDG	Uracil DNA Glycosylase
UTP	Uridintriphosphat
ZP	Zeitpunkt

1 Einleitung

1.1 Orexine

1.1.1 Entdeckung und Allgemeines

Die Neuropeptide Orexin A und B wurden erstmalig im Jahre 1998 beschrieben, zum einen von einem Forscherteam um Takeshi Sakurai in Texas, USA (1), zum anderen von einem Forscherteam um Luis de Lecea (2).

Sakurai et al. suchten in ihrer Studie nach endogenen Liganden verschiedener Orphan-Rezeptoren aus der Familie der G protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCR) (1). Sie isolierten hierbei endogene Peptid-Liganden für den Orexin-Typ-1-Rezeptor (OX₁R). OX₂R wurde aufgrund einer Sequenzhomologie zum OX₁R identifiziert. Der OX₁R weist Homologien zu den Rezeptoren für Neuropeptid Y, TRH, Cholezystokinin A und NK2 Neurokinin auf. Der OX₂R ähnelt stark dem OX₁R, die Sequenzidentität beträgt 64%. Beide Rezeptorgene zeigen einen hohen Grad an Konservierung: Der OX₁R weist eine 94%ige, der OX₂R eine 95%ige Homologie zwischen Mensch und Ratte auf. Orexin-Rezeptoren im Hypothalamus können nach Bindung von Orexin A primär G_q-, jedoch auch G_s-, G_o-, oder G_i-Proteine aktivieren (3). An welches G-Protein gekoppelt wird, hängt unter anderem davon ab, ob der Organismus sich momentan im Fastenzustand befindet und ob es sich um einen zentralen oder einen peripheren Rezeptor handelt. Orexin-Rezeptoren aktivieren weiterhin über die MAP-Kinasen ERK1/2 und p38. ERK scheint zellschützend zu sein, während der Signalweg über die mitogen-/stress-aktivierte Proteinkinase p38 im CHO-Zellversuch (unabhängig von p53 und Caspase) zur Apoptose der Zelle führt (4).

Die Liganden der Rezeptoren benannte Sakurais Forschergruppe nach dem griechischen Wort ‚orexis‘ (Appetit) „Orexine“, da sie nach Verabreichung von Orexinen die Nahrungsaufnahme stimulierten (1). Sie identifizierten Orexin A als ein 33 Aminosäuren großes Peptid mit einem Molekulargewicht von 3562Da, während Orexin B, welches eine 46%ige Sequenzähnlichkeit zu Orexin A aufweist, 28 Aminosäuren groß ist und 2937Da aufweist. C-terminal findet sich im Orexin A eine Amidierung, N-terminal ein Pyroglutamyrest sowie im Verlauf zwei Disulfidbrücken. Orexin B besitzt ebenfalls eine C-terminale Amidierung, N-terminal jedoch ein verkürztes Ende. Das Peptid verläuft linear ohne Disulfidbrücken.

Beide Peptide werden durch proteolytische Spaltung aus einem gemeinsamen Vorläufer-Protein freigesetzt. Dieses Präpro-Orexin (PPO) ist ausschließlich im Hypothalamus (bzw. bei Ratten in geringer Anzahl in den Testis) im lateralen und posterioren Gebiet sowie perifornikal, subthalamisch in der Zona Incerta, subincerta und in subthalamischen Kerngebieten exprimiert (1) (5). Das humane PPO-Gen besteht aus einer Sequenz von 1432 Basenpaaren (6). Das 143 Basenpaare umfassende erste Exon enthält neben der untranslatierten 5'-Region einen kleinen, aus den ersten sieben Resten der

sekretorischen Signal-Sequenz bestehenden, Teil der kodierenden Region, während das zweite Exon mit der untranslatierten 3'-Region den gesamten Rest der kodierenden Region enthält. PPO zeigt eine 83%ige Sequenzhomologie (Mensch) und eine 95%ige Sequenzhomologie (Maus) gegenüber der Sequenz von Ratten auf (1).

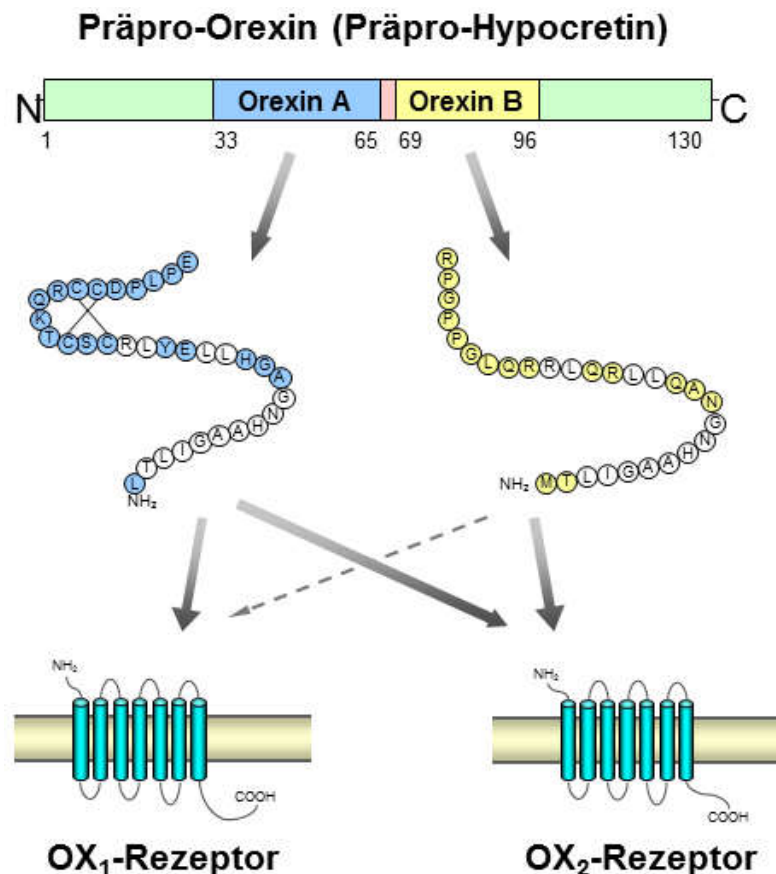


Abbildung 1: Präpro-Orexin, das Vorläufer-Protein der Orexine (© Olaf Jöhren). Modifiziert nach Jöhren O, Brüggemann N, Dominiak P (2004) Orexins (hypocretins) and adrenal function. Horm Metab Res 36:370-375

Orexin A weist eine hohe Affinität sowohl zum OX₁R als auch zum OX₂R auf, während Orexin B eine wesentlich geringere Affinität zum OX₁R zeigt als Orexin A und lediglich hochaffin an den OX₂R bindet (1). Somit ist Orexin A nicht selektiv, Orexin B jedoch selektiv.

Im Rahmen einer Studie zur Erstellung einer cDNA Datenbank des Hypothalamus von Ratten wurde von einer Forschergruppe um Kaare M. Gautvik unter anderem eine ,clone 35‘ (Präpro-Orexin) genannte cDNA entdeckt (7). Sie fanden eine bilateral symmetrische Expression ausschließlich in einigen Zellen des paraventrikulären hypothalamischen Gebiets sowie ependymalen Zellen. Aufgrund der Sequenz der clone 35 mRNA vermutete die Forschergruppe bereits 1996, dass sie für ein sekretorisches Protein mit einer Stelle

für proteolytische Spaltung kodierte. Sie vermuteten, dass es sich hierbei um einen Hormonvorläufer handeln könnte. 2 Jahre später untersuchten de Lecea et al. die Spaltprodukte von ‚clone 35‘, die sowohl eine Ähnlichkeit zueinander als auch mit dem Hormon Sekretin aufweisen, und vermutete eine Zugehörigkeit zur Inkretin-Familie (2). Der Name der Spaltprodukte, „Hypokretin“ (1 bzw. 2), wurde aus Hypothalamus und Inkretin zusammengesetzt. Die Gruppe vermutete des Weiteren einen spezifischen Rezeptor für Hypokretin 2.

1.1.2 Verteilung Orexin-positiver und Orexin-Rezeptor exprimierender Neurone und Projektionen

Orexin A und B exprimierende Neurone finden sich vor allem im lateralen, posterioren und ventralen Hypothalamus sowie dem perifornikalen Nukleus. Spezifischer in der subthalamischen Zona incerta, subincerta und in subthalamischen Nuklei (1) sowie im Bereich zwischen Fornix und dem mamillothalamischen Traktus (2).

Projektionen der Neurone ziehen in viele Bereiche des Gehirns. Sie reichen bis in weit entfernte Hirnareale, wie den olfaktorischen Bulbus und den Hirnstamm (8), wobei die numerische Distribution der Axone, beziehungsweise deren Dichte, nach angesteuertem Hirngebiet variiert (2) (8). So finden sich beispielsweise zahlreiche Projektionen zum zentralen Grau und Locus coeruleus, jedoch ziehen weniger unter anderem in die Nuclei tractus solitarii (2). In sehr geringer Anzahl finden sich auch Projektionen in den motorischen und sensorischen Kortex (8). Orexin A-immunreaktive Fasern steuern wesentlich mehr Bereiche an und sind dichter konzentriert als Orexin B-Fasern (9). Eine Arbeitsgruppe um Mintz untersuchte 2002 die Verteilung der Neurone und Projektionen in syrischen Hamstern im Vergleich zur Ratte (10). Ihre Resultate ließen sie darauf schließen, dass das Orexin-System einer starken Konservierung zwischen verschiedenen Arten unterliegt. Die topographische Untersuchung des Orexin-Systems in tagaktiven Ratten kam zu einem ähnlichen Ergebnis, nämlich einer Konsistenz des Systems zwischen den verschiedenen Nagerarten (11). Die Tatsache, dass sich Orexin A Fasern sowohl im dorsalen als auch medianen Raphekern und dem Locus coeruleus finden, ist ein Hinweis auf den Einfluss des Orexin-Systems auf die zirkadiane Rhythmik des Organismus (12).

Orexin-enthaltende Axone steigen von kranial hinab und innervieren das Rückenmark auf allen Etagen, von zervikal bis sakral. In drei Bereichen finden sich besonders hohe Axondichten: In der Marginalzone, einem Bereich dem Sinnes- und Schmerzempfindungen zugeordnet werden sowie im intermediolateralen und sakralen Bereich, was auf eine Rolle des Orexin-Systems bei der Regulation des sympathischen und parasympathischen Nervensystems hindeutet (13).

Bezüglich der Rezeptoren fand sich zentral eine insgesamt komplementäre Verteilung von

OX₁R und OX₂R (14). PPO konnte im Hoden von Ratten nachgewiesen werden (jedoch nicht in den Ovarien weiblicher Ratten). Das Produkt Orexin A selbst wurde im Rattenplasma detektiert. Die mRNA des OX₁R wurde in peripheren Geweben wie Nieren, Nebennieren, Schilddrüse, Eierstöcken, Hoden und Jejunum nachgewiesen, jedoch nur in geringen Mengen. OX₂R mRNA fand sich in den Nebennieren in vierfach höherer Menge als im Gehirn. Die unterschiedliche Distribution der peripheren Orexin-Rezeptoren deutet auf periphere Effekte von Orexinen hin. Die geschlechts-spezifische Expression lässt eine Beteiligung der Orexine an endokrinen Funktionen vermuten (5). Neuere Untersuchungen deuten auf unterschiedliche Expressionen der Orexin-Rezeptoren und somit differente neuronale Bahnen zwischen verschiedenen Chronotypen hin (15).

1.1.3 Einflüsse des Orexin-Systems auf den Organismus

1.1.3.1 Schlaf-Wach-Verhalten

Histaminerges System

Orexine depolarisieren histaminerge Neurone (TMN) über OX₁R und OX₂R, wobei OX₂R stärker exprimiert zu sein scheint (16). Da nach Aktivierung des H₁-Rezeptors der TMN durch Orexin A die Wachheit der Testtiere anstieg, wird vermutet dass der Effekt von Orexin A zumindest teilweise über eine Histaminausschüttung vermittelt wird (17). Die Neuronen beider Systeme liegen häufig nah beieinander und bilden gegenseitige Kontakte über Axone aus (16), eventuell findet eine Kommunikation der Neurone unter anderem über positive Feedbackloops statt (18). Die histaminergen Neurone des TMN, bzw. allgemein des Hypothalamus werden durch Orexin A und B erregt (16), wobei sowohl ein gleich starker Einfluss der beiden Hormone auf die Histaminfreisetzung im TMN festgestellt wurde (19), als auch ein stärkerer Effekt von Orexin A gegenüber Orexin B (bei intrazerebroventrikulärer Injektion) (20). Der Vorgang scheint durch den OX₂R vermittelt zu sein (19). Die Applikation eines H₁-Antagonisten führt zu einer Aufhebung des Wachheits-Effektes durch Orexin A (21).

Narkolepsie und Insomnie

Narkolepsie äußert sich durch attackenartige Schlafanfälle, vor allem bei Müdigkeit, aber zum Beispiel auch, wenn die betroffenen Personen stark Lachen müssen (22). Es kann schon im Kindesalter auftreten.

Narkolepsie scheint mit einem globalen Verlust von Orexinen, bzw. einem defizitären Orexin-System einherzugehen (23) (24). Ein Beitrag zur genetischen Prädisposition der Erkrankung scheint nicht zu existieren. In dieser Hinsicht wird jedoch ein Polymorphismus im PPO-Gen diskutiert (25). Orexin-defiziente (26), bzw. transgene Orexin/ataxin-3 Mäuse (27) zeigen einen der humanen Narkolepsie bzw. canarc-1 mutierten Hunden (einziges

monogenetisches Modell der Narkolepsie) ähnlichen Phänotyp. Das anti-narkoleptische Medikament Modafinil aktiviert auch im Mäuse-Modell Orexin enthaltende Neurone (26). In Hunden wird Narkolepsie durch eine Mutation im canarc-1-Gen verursacht, welches als Mutation in der für den OX₂R kodierenden Region identifiziert werden konnte (28).

Die humane Narkolepsie geht mit einem bis zu 95%igem Verlust an Orexin-Neuronen einher (29) verbunden mit einer Gliose, was ursächlich für einen degenerativen Prozess, der zum Verlust der Orexin-Neurone führt, spricht. Ein lokalisierter, quantitativ beschränkter Verlust der Orexin-Neurone vor allem im posterioren Hypothalamus durch Gliose ohne Verlust der Projektionen im anterioren Hypothalamus scheint eine Kataplexie, die häufig die Narkolepsie begleitet, zu verhindern (30).

Orexin A - Konzentrationen sind im Liquor humaner Narkoleptiker meist auf nicht messbare Werte gesunken (24), vermutlich liegt bei Einsetzen der Symptomatik bereits ein ausgeprägter Orexinmangel vor (31).

Die Orexin-Plasmakonzentration ist bei Narkoleptikern ebenfalls vermindert (32). Vorliegendem Orexin-Mangel folgt eine moderate jedoch signifikante Minderung der OX₁R-Expression, die für den OX₂R nicht beobachtet werden konnte (33). Der Erhalt der OX₂R könnte wichtig sein für eine eventuelle Therapie der Narkolepsie durch Orexine. Über den OX₂R ist bekannt, dass über Orexin B die MAP-Kinasen ERK1/2 aktiviert werden, ein Vorgang, der beeinflusst wird durch das Auftreten natürlicher Mutanten, welche wiederum mit Narkolepsie assoziiert sind (34).

Die Konzentration von Orexin A ist im CSF (cerebrospinal fluid) der Totenkopffäffchen (Saimiri) während der ersten ein bis drei Stunden des Tages niedrig (35). Da narkoleptische Menschen, die kein Orexin besitzen nach dem Schlafen in der Lage sind für bis zu drei Stunden wach zu bleiben, scheint Orexin in diesem Zeitraum keine Rolle zu spielen beim Erhalt eines Wachzustandes, ist jedoch im Anschluss essentiell (36). Die exogene Gabe von Orexin A an narkoleptische Hunde führte zu einer Reduktion der kataplektischen Symptome, einer veränderten Schlafphysiologie, sowie längeren Wachphasen (37). Narkoleptische Maus-Modelle zeigten nach einer Orexin-Gentherapie wieder normale Wachheitsmuster (38).

Inzwischen wird die Wirkung von Orexin A am Menschen mit narkoleptischen Probanden erforscht indem über intranasale Applikation Medikamente direkt ins zentrale Nervensystem überführt werden (39). Orexin A führte zu einer Modulation des Schlafes, unter anderem wurden die Häufigkeit der REM-Schlafphasen und die Übergänge von Wachphasen zum REM-Schlaf vermindert. Zudem zeigten die Probanden nach intranasaler Orexin A Applikation eine erhöhte Aufmerksamkeit (40). Der für den OX₂R selektive Agonist YNT-185 wurde kürzlich von dem Forscherteam Irukayama-Tomobe et al. entdeckt (41). Sie konnten nach Verabreichung eine Unterdrückung kataplexieähnlicher Episoden im Tiermodell darstellen.

Da ein Mangel an Orexinen zu Narkolepsie führt, liegt die Annahme nahe, dass eine Überaktivität von Orexin-Neuronen Insomnie verursachen könnte. In einem Zebrafisch-Modell konnte eben dies dargestellt werden (42). Die Überexpression von Orexin erhöhte die Bewegungsaktivität, verkürzte die Ruhezeiten und führte zu Ein- und Durchschlafstörungen. Eine neuere Studie mit an Narkolepsie mit Kataplexie erkrankten Probanden zeigte allerdings, dass auch stark erniedrigte Orexin A Level im Liquor mit einer Verlängerung der Einschlafzeit sowie unterbrochenem Schlaf assoziiert sind (43).

Weiterhin wurde die Vermutung geäußert, eine erhöhte Konzentration an Orexinen könne Ursache der verkürzten Schlafenszeiten von Dialyse-Patienten sein (44). Die Gabe eines dualen Orexin-Rezeptor-Antagonisten wie Almorexant (45) oder Suvorexant (46) zeigt einen schlaffördernden Effekt.

Stressreaktionen

Orexine scheinen an gewissen Stressreaktionen mitzuwirken, da bestimmte Stressoren die Ausschüttung von Orexinen erhöhen (47). Dies wiederum führt zumindest bei intrazerebroventrikulärer Injektion zu einer Erhöhung von Kortikosteron. Orexin-Neurone sind überdies mit verschiedenen sympathischen Systemen verbunden, so dass hier ein modulierender Einfluss naheliegt, im Sinne einer „Fight-or-Flight“-Reaktion oder der Regulation des Erregungsgrades (48). So zeigte sich in Orexin-defizienten Mäusen eine verminderte Reaktion auf emotionalen Stress, sowohl hinsichtlich des Verhaltens als auch kardiovaskuläre Aspekte betreffend, im Sinne eines verminderten sympathischen vasokonstriktorisches Tonus (49). Orexine scheinen direkt exzitatorisch auf präganglionäre sympathische Neurone zu wirken und könnten hierüber Einfluss auf das kardiovaskuläre System und die Energyhomöostase nehmen (50). Mäuse, denen intrazerebroventrikulär Orexin A zugefügt wurde, zeigten neben verlängerten Wachphasen auch deutliche stressassoziierte Symptome, wie zum Beispiel das Kauen auf nicht essbaren Gegenständen (51). Da Stress zu einer erhöhten Orexinausschüttung führt, was wiederum eine gesteigerte physikalische Aktivität bedingt, in dessen Folge noch mehr Orexin ausgeschüttet wird (s.o.) und Orexin in hohen Dosen analgetisch wirkt (siehe 1.1.3.6) steht zu vermuten, dass es sich hier um einen komplexen Vorgang im Rahmen der „Fight-or-Flight“-Reaktion handeln könnte.

1.1.3.2 Nahrungsaufnahme/Energie-Homöostase

Die primäre Lage der Orexin-Neurone im lateralen Hypothalamus sowie die weite axonale Verteilung in fast alle Hirnregionen lassen vermuten, dass das Orexin-System eine Vernetzung des Hypothalamus mit anderen Hirngebieten darstellt und einen Einfluss auf das Essverhalten hat, da die laterale Region des Hypothalamus stark mit der Regulation der Nahrungsaufnahme assoziiert ist (52). Beidseitige Zerstörungen in diesem Gebiet

führen zum Verlust spontaner Nahrungsaufnahme (53). Hierzu passt die Beobachtung, dass Orexin-Neurone durch Glukose und Leptin in ihrer Aktivität gehemmt werden (54). Wobei der Effekt, den Leptin auf das orexinerge System hat, intersexuelle Unterschiede aufzuweisen scheint (55).

Neben Verminderung des Hungergefühls bzw. des Appetits sind bei Zerstörung der Orexin-Neurone im lateralen Hypothalamus auch verminderter Durst und Gewichtsverlust zu beobachten (56). Fasten wiederum erhöht die Ausschüttung von Orexin-Hormonen in Ratten, allerdings nur während der Schlafphasen (57). Zusätzlich dazu findet eine Induktion der hypothalamischen Gen-Expression von OX_1R und OX_2R (3) sowie eine erhöhte Produktion von Präpro-Orexin statt (1). Eine Arbeitsgruppe, die die Auswirkungen des intermittierenden Fastens während des Ramadans untersuchte, fand während der Fastenstunden ebenfalls erhöhte Plasmaspiegel von Orexin A (58).

Orexin A und B stimulieren dosisabhängig die Nahrungsaufnahme. Fettreiche Nahrung scheint zu Beginn kurzzeitig exzitatorische Orexin-Synapsen zu dämpfen, worin Linehan et al. einen Mechanismus zur Vermeidung dauerhaft fettreicher Nahrungsaufnahme mutmaßen (59). Der Effekt verschwindet nach vier Wochen, so dass dies ein ursächlicher Faktor für Übergewicht sein könnte. Andererseits scheint aber auch Orexinmangel zu Übergewicht zu führen. Transgene Orexin/ataxin-Mäuse zeigten eine spät einsetzende Adipositas, obwohl sie im Vergleich mit gesunden Wurfgeschwistern weniger Nahrung zu sich nahmen (27). Darüber hinaus scheint auch der Zeitpunkt der Nahrungsaufnahme einen Orexin vermittelten Effekt auf den Metabolismus zu haben (60). Die Nahrungsaufnahme während der Ruhezeiten von Ratten führte zu zirkadianer Desynchronisation, in deren Folge Ramirez-Plascencia et al. eine Beeinträchtigung des Metabolismus vermuten. Menschliche Probanden mit idiopathischer Hypersomnie zeigten einen geringeren BMI als Patienten mit Narkolepsie, was indiziert, dass wahrscheinlich nicht der Bewegungsmangel durch Tagesmüdigkeit die Ursache des Übergewichts ist (61). Vielmehr scheint der bei Narkoleptikern vorliegende Orexinmangel mit einem Leptinmangel einherzugehen (62), wobei letzteres zu Übergewicht führt (63). Leptin wiederum unterdrückt in Fastenzeiten die erhöhte Produktion der Orexine (64). Des Weiteren scheinen Orexine das hypothalamische Insulin-Signaling zu beeinflussen (65). Der Orexinmangel weiblicher Orexin defizienter Mäuse führte in Verbindung mit hochkalorischer Nahrung zu starkem Übergewicht. Andererseits zeigen aber auch nicht übergewichtige Orexin defiziente Tiere eine verminderte Glukosetoleranz mit Insulinresistenz im Alter. Vermutlich aktiviert der Geschmack „süß“ Orexin-Neurone, die zu einer Erhöhung der Insulinsensitivität der Muskulatur sowie des Glukosemetabolismus führen (66). Wichtig in diesem Zusammenhang ist die Beobachtung, dass gealterte Ratten einen bis zu 40%igen Verlust an Orexin-Neuronen aufweisen, was das vermehrte Auftreten von Diabetes mellitus Typ 2 im höheren Alter teilweise erklären könnte (67).

(siehe hierzu auch 1.1.3.3). Mit diesen Beobachtungen konform geht eine Studie von Kaczmarek et al. (68). In an Diabetes Typ 2 erkrankten Ratten steigerte Orexin A die Insulinempfindlichkeit der Zielzellen und verbesserte über diesen Mechanismus die Glukosekontrolle der Tiere.

Orexine regulieren möglicherweise auch den Tagesrhythmus von Oxytocin-Neuronen im paraventriculären Kern des Hypothalamus, deren Hormon wiederum Einfluss auf die Homöostase sowie die Regulierung des Körpergewichts hat (69). Orexin-Neurone des lateralen Hypothalamus scheinen über ihre Rezeptoren mittels Orexin A und B direkte exzitatorische Wirkung auf präganglionäre sympathische Neurone zu haben (50). So nehmen die Orexine eventuell Einfluss auf die sympathische Aktivierung der Leber, ähnlich der Beeinflussung des Pankreas. Hierhin ziehen ebenfalls Projektionen des lateralen Hypothalamus, was auf einen peripheren Einfluss des Orexin-Systems auf die Nahrungsaufnahme hindeutet (70). Unter Einfluss von Orexin A zeigten Mäuse eine gesteigerte spontane physikalische Aktivität mit korrelierender Steigerung des Sauerstoffkonsums, so dass eine Beteiligung des Orexin-Systems an der Aktivitätsthermogenese angenommen werden kann (71). Außerdem führte eine erhöhte Inanspruchnahme eines Laufrades bei Ratten zu einer erhöhten Aktivität Orexin exprimierender Zellen, während die Abwesenheit eines Laufrades und damit die Möglichkeit physischer Betätigung zu einer Verminderung der Neuronenaktivität führte (72). Diese Mechanismen können auch als Teil der „Fight-or-Flight“-Reaktion gesehen werden (s.o.)

1.1.3.3 Alter

Der Einfluss des Orexins auf den Alterungsprozess des Körpers bzw. Änderungen der zentralen und peripheren Orexin-Konzentration in Abhängigkeit vom Lebensalter ist zurzeit noch nicht vollständig geklärt. Während einerseits angenommen wird, dass die Funktion des Orexin-Systems im hohen Alter infolge Störung der zentralen Projektionen abnimmt, was dann zu Störungen des Schlaf-/Wachrhythmus führt (73), zeigte andererseits eine große Screening-Untersuchung der Orexin A-Konzentrationen im Liquor keine signifikanten Konzentrationsunterschiede in Abhängigkeit vom Lebensalter (74), im Plasma jedoch einen signifikanten Anstieg jenseits des 60. Lebensjahres (75). Im Rattenversuch wurde wiederum zu bestimmten Tageszeiten eine Verminderung der Orexin A-Konzentration im Liquor mit höherem Lebensalter festgestellt (76). Eine fragliche Abnahme der hypothalamischen Präpro-Orexin-mRNA steht zur Debatte, da sowohl eine Verminderung (im lateralen Hypothalamus) (77) als auch keine Abnahme der RNA (im posterioren Hypothalamus) gefunden wurde (76). Außerdem wiesen gealterte Ratten, wie oben erwähnt, einen bis zu 40%igen Verlust an Orexin-Neuronen auf, so dass dieser Mangel neben dem Diabetes mellitus Typ 2 auch ursächlich in altersassoziierte homöostatische Störungen sowie kognitive Dysfunktionen involviert sein könnte (67).

Andererseits ist es aber auch möglich, dass das Orexin-System durch Erkrankungen wie Alzheimer beeinträchtigt wird, so fand sich in erkrankten Probanden eine deutlich verminderte hypothalamische Neuronenzahl (78).

1.1.3.4 Schmerz

Wie oben erwähnt, projizieren Orexin-Neurone in viele Bereiche der gesamten Länge des Rückenmarks. Morphologisch wurde nachgewiesen, dass Orexin A höchstwahrscheinlich in die Schmerz-inhibition im Rückenmark involviert ist (79). Weiterhin an der spinalen Orexin vermittelten Schmerzmodulation beteiligt sind sowohl der OX_1R (80) als auch der Glycin-Rezeptor sowie der P2X-Purinerge Rezeptor (81). Exogen zugeführtes Orexin A zeigt sich wirksam gegenüber neuropathischen Schmerzen (82), akuten Schmerzereignissen in Form thermischer und chemischer Reize (80), sowie mechanischer Allodynie infolge Nervenschädigung (83). Orexin B ist meist wirkungslos (82) (80), dämpft jedoch die mechanische Allodynie ab, allerdings mit geringerer Potenz als Orexin A (81). Es wirkt zudem exzitatorisch auf bestimmte inhibitorische Rückenmarks-Neurone, was darauf hindeutet, dass es ebenfalls an der Schmerzmodulation beteiligt ist (84). Der analgetische Effekt von Orexin A scheint von der Potenz her mit dem von Morphin vergleichbar (85).

1.1.3.5 Effekte auf das Belohnungssystem

Orexin-Neurone des lateralen Hypothalamus projizieren unter anderem in das ventrale Tegmentum, ein Gebiet, das mit Belohnung vergesellschaftet ist (86). Orexin-Neurone werden unter anderem aktiviert durch Reize oder Signale, die darauf hinweisen, dass Drogen oder Essen als Belohnung erhältlich sind. Neben Orexinen scheinen noch andere hypothalamische Neuropeptide in das sogenannte ‚drogensuchende‘ Verhalten involviert zu sein (87). Orexine spielen eine Rolle im Belohnungssystem des Gehirns sowie bei Sucht, beim Drogenrückfall (86) und bei der Toleranzentwicklung gegenüber Morphinen (88). Orexin defiziente Mäuse (89), bzw. Tiere ohne Präpro-Orexin-Gen (90) zeigen eine deutlich geringere Morphin-Abhängigkeit (89) sowie weniger ausgeprägtes Morphin induziertes Verhalten (90). Exogen zugeführtes Orexin A oder eine exogene Aktivierung der Orexin-Neurone führt im Tierversuch zum Wiederaufleben einer Kokain- (91) oder Alkoholsucht (92). Dabei sind die Orexine vermutlich nicht verantwortlich für die Entwicklung zum Beispiel einer Vorliebe für Alkohol, sie führen aber bei Vorliegen bestimmter Reize oder Signale, die eine Verfügbarkeit der Droge induzieren zu einem Wiederaufleben des alkoholsuchenden Verhaltens. Orexinerge Projektionen in den Nukleus accumbens als Teil des Belohnungssystems beeinflussen weiterhin einen Rückfall zur Morphinaufnahme bei Vorliegen von Stress oder Nahrungsentzug (93).

Der OX₁R-Antagonist ist in der Lage das Wiederaufleben eines einmal gelöschten drogensuchenden Verhaltens zu blockieren (91), die Toleranzentwicklung gegenüber Morphinen aufzuheben (88) und die Aufnahme von Alkohol im Sinne eines geringeren Konsums zu modulieren (94). Weiterhin blockiert er das Wiederaufleben einer Kokainsucht durch Reize / Signale, die mit der Kokainsucht assoziiert waren (91).

1.1.4 Weitere Erkrankungen

Beim M. Parkinson findet sich ein mit der Krankheitsprogression korrelierender fortschreitender Verlust von Orexin-Neuronen im Hypothalamus, was ursächlich sein könnte für das Auftreten Narkolepsie ähnlicher Symptome bei der Parkinson-Krankheit (95).

Orexin A ist in der Lage über den OX₁R die neurogene Vasodilatation duraler und intrakranieller Blutgefäße zu inhibieren. Eine Orexin vermittelte Vasodilatation ist daher ein vermuteter Pathomechanismus der Migräne (96) (97).

Hohe Dosen intrathekalen Orexins A oder B verursachen epileptische Aktivitäten im Tiermodell, auch das totale EEG power Spektrum wird erhöht (98). Umgekehrt gibt es Hinweise darauf, dass die Blockade des Orexin A-Rezeptors die Krampfschwelle erhöhen und die Krampfdauer reduzieren könnte (99).

Orexine haben einen Einfluss auf die Alzheimererkrankung (100). Sie regulieren unter anderem die zirkadiane Rhythmik der Risikogene der Alzheimererkrankung. Erhöhte hypothalamische Orexinspiegel führen zu einer Verschlechterung der Erkrankung.

Die Konzentration von Orexin A im Liquor schwankt in Abhängigkeit von der Jahreszeit, ein Sachverhalt welcher einen Einfluss auf Wintermüdigkeit und das SAD (Seasonal Affective Disorder, sogenannte Winterdepression) unterstützt (101), beziehungsweise führt andauernde verminderte Tageslichtintensität zu Depressionen, Angst sowie Lern- und Gedächtnisproblemen, ein Symptomkomplex, der durch Orexin mediert wird (102).

1.1.5 Weitere Wirkungen von Orexinen

1.1.5.1 Steroidsynthese/-Freisetzung

Beide Orexin-Rezeptoren werden in der Nebennierenrinde erwachsener Ratten (5) (103) sowie des Menschen (104) exprimiert. Die dauerhafte Gabe von Orexin A und B führt zwar nicht zu einer Erhöhung der plasmatischen Konzentration von ACTH (103). Es findet sich aber eine erhöhte Plasmakonzentration für Kortikosteron, wobei Orexin A einen stärkeren Effekt verursacht als Orexin B (105). Nur Orexin A steigert dosisabhängig die Glukokortikoid-Ausschüttung (106). Die selektive Stimulation der Glukokortikoid-Freisetzung wird vermutlich über eine ausschließlich OX₁R-vermittelte Aktivierung des Adenylatcyclase / PKA-abhängigen Signalwegs gesteuert (107). Es wird vermutet, dass Orexine unter anderem über PKC-ERK1/2-Signalwege auch die Steroidgenese in der

menschlichen Nebenniere beeinflussen (108).

1.1.5.2 Zerebrale zelluläre Plastizität

Endogenes Orexin ist in die zirkadiane Modulation hippocampaler NMDA-Rezeptorfunktionen involviert (109). Hieraus schließt die Forschergruppe um Martina Perin, dass Orexine die zerebrale zelluläre Plastizität beeinflussen. Folglich kommt ihnen damit auch ein modulierender Einfluss hinsichtlich Erinnerungsvermögen und Schlaf-Wach-Zyklen zu.

1.1.5.3 HIF-1 (Hypoxia-Inducible Factor 1)

Orexine aktivieren den Hypoxia inducible Factor 1 (HIF-1) und führen gleichzeitig zu einer Down-Regulation seines Inhibitors, von Hippel-Lindau Protein (110). In der Folge kommt es zu einer erhöhten ATP-Produktion, womit die Rolle des Orexin-Hormon-Systems hinsichtlich Hunger und Wachheit weiter unterstrichen wird. Zusätzlich werden anscheinend weitere Hypoxie assoziierte Gene Downstream von HIF-1alpha durch Orexine aktiviert, so zum Beispiel VEGF und Erythropoetin (111). HIF-1 ist ein DNA-Bindeprotein mit Enhancer-Funktion, welches durch Hypoxie aktiviert (112) und durch Oxygenierung inaktiviert wird (113), und unter anderem in die Synthese glykolytischer Enzyme unter hypoxischen Zuständen involviert ist (114). Das von Hippel-Lindau Tumor Suppressor Gen verhindert die Stabilisierung der Alpha-Untereinheit von HIF und führt somit zu einer Inaktivierung der DNA-bindenden Funktion (115). Den Orexinen wird eine neuroprotektive Wirkung zugesprochen, die vermutlich unter anderem auch HIF-1alpha vermittelt ist (116). So scheint es über diesen Mechanismus zu einer Reduktion des Infarktvolumens nach Reperfusion eines zerebralen Infarktareals zu kommen.

1.2 Chronobiologie

1.2.1 Zirkadiane Rhythmen und der Nukleus suprachiasmaticus (SCN)

Bereits 1972 vermuteten Robert Moore und Victor Eichler, dass entweder der SCN selbst, zumindest aber Neurone dieser Region einen rhythmischen Einfluss auf die Nebennierenregion haben, indem sie die der Nebenniere übergeordnete Hypothalamus-Hypophysen-Achse kontrollieren (117). Im gleichen Jahr konnten sie eine neuronale Verbindung zwischen Ganglienzellen der Retina und der suprachiasmatischen Region darstellen (118). Dies untermauerte ihre Hypothese, dass der SCN ein zentraler Taktgeber ist und neuroendokrine Reaktionen auf Licht vermittelt. Der SCN kontrolliert den zirkadianen Schlaf-/Wach-Rhythmus im Sinne einer biologischen Uhr (119). Daneben gibt es auch oszillierende Gene (120) und es scheinen vom Nucleus suprachiasmaticus unabhängige peripher regulierte zirkadiane Rhythmen zu existieren, z.B. des Clock-Gens

mPer2, die organspezifisch die zirkadiane Genexpression steuern (121) und deren Entkopplung vom SCN durch bestimmte äußere Einflüsse (z.B. Fütterungszeiten) zumindest teilweise durch Glukokortikoid-Hormone inhibiert wird (122). Die Zellen dieser suprachiasmatischen Region bestimmen die vorherrschende Periode des zirkadianen Rhythmus im Organismus (123). Die – veränderliche – Phase des zentralen Schrittmachers wird durch Lichtsignale aus der Umgebung eingestellt und erhalten, welche via des RHT den SCN erreichen und hier die Genexpression induzieren (124). Hierbei ist Licht sehr geringer Intensität, ab ~180Lux, bei Menschen ausreichend, um die eingestellte Phase zu erhalten oder neue Phasen einzustellen (125). Da in der modernen Arbeitswelt meist ein Aufenthalt in beleuchteten Innenräumen nötig ist, kann davon ausgegangen werden, dass künstliches Licht (< 1000 Lux) heutzutage der Haupt-Synchronisator des Menschen ist.

Der SCN hängt von der Expression bestimmter Uhrengene ab (122). Von diesen sind zumindest 7 essentiell für die Funktion zirkadianer Uhren bei Säugern: Die 2 Period Isoformen mPer1 und mPer2, die 2 cryptochromen Isoformen mCry1 und mCry2, 2 PAS Helix-Loop-Helix Transkriptions-Faktoren kodierende Gene - Bmal1 und CLOCK -, sowie das Caseinkinase ϵ 1 kodierende Gen Tau. Der SCN projiziert sowohl in den medialen, als auch den lateralen Hypothalamus, was zusätzlich für seine Funktion als zentraler Rhythmus-Generator spricht (124). Neben diesen neuronal übertragenen Signalen finden sich zumindest bei Drosophila und Seidenmotten auch diffusionsfähige Signale zur Aufrechterhaltung zirkadianer Aktivitätsrhythmen (126). Vermutlich sind zur Synchronisation peripherer Oszillatoren verschiedene chemische Signale seitens des SCN vorhanden (127). Zumindest in der Leber konnte gezeigt werden, dass die Expression einiger der hepatischen Gene, Schlüssel-Enzyme metabolischer Leberfunktionen, abhängig war von einer funktionierenden Nebenniere (also der Glukokortikoid-Synthese) und unabhängig von der Expression der Uhrengene (128). Ungefähr 8 – 10 % aller pro Gewebe exprimierten Gene wird zirkadian reguliert, wobei diese Gene selten in einem weiteren Gewebe ebenfalls reguliert sind (129). Die Verteilung der zirkadianen Phasen ist spezifisch für jedes Gewebe.

Orexine beeinflussen das Ruhemembranpotential der SCN-Neuronen, beziehungsweise ist die Reaktion der SCN-Neurone auf Orexine von ihrem Erregungszustand abhängig (130). Weiterhin konnten in aktuelleren Arbeiten durch genomweite Assoziationsstudien (GWAS) neben Varianten der Uhrengene auch Varianten des OX2R-Gens (HCRT2) mit Chronotypen assoziiert werden (131) (132) (133).

1.2.2 Clock Genes

1.2.2.1 Bmal1

Bmal1, 1997 erstmalig von Masaaki Ikeda und Masahiko Nomura beschrieben, ist ein

Basis Helix-Loop-Helix/PAS-Protein, ein Transkriptionsfaktor, dessen Domänen beide eine hohe Homologie zu denen des Ah receptor nuclear translocator zeigen, daher wird Bmal1 häufig auch als ARNTL (ARNT-like, genauer ‚Brain And Muscle Arnt Like protein 1‘) bezeichnet (134). Die Expression von Bmal1 ist am ausgeprägtesten im Gehirn, im Skelettmuskel und im Herzen. Auch andere periphere Gewebe wie Auge, Niere und Lunge zeigen eine zirkadiane Expression von Bmal1 (135). Im SCN zeigt Bmal1 einen zirkadianen Rhythmus auf, wobei die maximale Gen-Expression während der Nacht bzw. zum Zeitpunkt des Dunkel-Licht-Überganges stattfindet (135) (136). Gemeinsam mit CLOCK, einem weiteren zirkadianen Gen scheint es als Heterodimer die oszillierende Transkription von Per1 zu steuern (137), zudem korrelieren Amplituden und Expressionslevel der mRNAs von Bmal1 und Per2 in verschiedenen Geweben, so dass Bmal1 generell wichtig zu sein scheint für die zirkadiane Expression der Per-Gene, wobei die Expression der Bmal1-mRNA sich jeweils antiphasisch zu der von Per1 und Per2 verhält (135). Der vollständige Verlust von Bmal1 führte in defizienten Mäusen zum Verschwinden zirkadianer Rhythmik und verminderter Aktivität (138), geringerem Körpergewicht (139), Symptomen vorzeitigen Alterns (140) sowie erhöhter Mortalität (141), Schlafstörungen mit verlängerten, allerdings zerstückelten, Schlafzeiten sowie abgeschwächter Kompensation akuten Schlafmangels (142). Die Überexpression von Bmal1 führt hingegen vermutlich zur erhöhten Lipogenese in muren Adipozyten (143).

1.2.2.2 NFIL-3 (E4BP4)

NFIL-3 gehört zur bZIP-Faktor-Familie, einer Gruppe von Transkriptionsfaktoren, die strukturelle Ähnlichkeiten aufweisen (144). bZIP-Faktoren sind Domänen in Polypeptiden, die an ihren Alpha-Helices Leucin-Seitenketten tragen, daher auch „Leucin-Zipper“ genannt (145). Sie gehören zu den DNA-Bindeproteinen und können über ihre Leucin-Seitenketten an Alpha-Helix-Motiven mit selbiger Struktur eines anderen Polypeptids interagieren. Die Heptadenmuster-Leucin-Domänen sind wichtig für die DNA-Bindfähigkeit und die Suppressor-Tätigkeit von NFIL-3 (146). Cowell et al. zeigten, dass ein cDNA Klon der von ihnen verwendeten cDNA Bibliothek, lambda P4, an den Adenovirus-Promotor E4 bindet, daher der alternative Name E4BP4 (144). NFIL-3 ist ein zu DBP (s.u.) antiphasisch exprimierter (147) transkriptionaler Repressor (144) (148) (149), der durch eine Casein-Kinase phosphoryliert und somit negativ reguliert wird (150). E4BP4 wird unter anderem durch Dexamethason induziert, was zu einer Negativregulation der Gene mit Bindungsstellen für E4BP4 führt (151). Es ist somit vermutlich an der Suppression proinflammatorischer Gene durch Glukokortikoide beteiligt.

1.2.2.3 DBP

DBP, D-Box Binding Protein, ist ein Transkriptionsaktivator, der an die D-Box des Albumin-

Promotors bindet (152). Während das Protein vor allem in der Leber vorkommt, findet sich die mRNA in vielen Körpergeweben. Die mRNA-Level zeigen eine rhythmische Oszillation im SCN mit der größten Expression am Morgen und der geringsten am Abend. Das Expressionsmuster der mRNA zeigt einen Vorsprung von vier Stunden gegenüber der Leber (153), sowie vier bis acht Stunden gegenüber dem zerebralen Kortex und dem kaudalen Putamen, insgesamt ist also das Expressionsmuster von DBP in extra-suprachiasmatischen Geweben zeitlich verschoben (154). Das Protein, welches in hohen Konzentrationen in der Leber akkumuliert, ist hier während der Morgenstunden nicht detektierbar und zeigt erst am Nachmittag einen steilen Anstieg mit einem Peak am frühen Abend (155). Defiziente Mäuse zeigen zwar ähnlich wie Bmal1 defiziente Tiere eine verminderte Bewegungsaktivität, jedoch keinen Verlust der zirkadianen Rhythmik, so dass DBP nur als zusätzliche Komponente der zirkadianen Aktivität angesehen werden kann (153). DBP bindet direkt an den Promotor des Clock-Gens mPer1, die Aktivierung erfolgt durch zusätzliche Bindung eines CLOCK- Bmal1-Heterodimers. Letzteres aktiviert auch die Transkription von DBP selbst über E-Boxen (156). Die zirkadiane Expression von DBP verläuft sowohl zentral als auch hepatisch antiphasisch zur Expression von NFIL-3 (147) und moduliert gemeinsam mit NFIL-3 die Länge des zirkadianen Rhythmus (157). DBP verlängert die zirkadiane Periode, während NFIL-3 diese verkürzt. Die Transkription von DBP wird reduziert durch mPer und komplett unterbunden durch CRY1 und CRY2 (156). Vermutlich haben auch Glukokortikoide einen negativ regulierenden Einfluss auf die Expression von DBP (155). Neben der Regulation der zentralen Uhr hat DBP auch modulierende Einflüsse auf die Schlafregulation (158).

1.2.2.4 PERIOD-Isoformen

Per1, oder RIGUI, benannt nach einer alten chinesischen Sonnenuhr, ist ein bHLH/PAS-Protein (159). Per1 scheint endogen reguliert zu sein (ein Hauptcharakteristikum zirkadianer Gene), da die zirkadiane Expression auch unter konstanter Dunkelheit weitergeführt wird. Ein Phasen-Shift im Licht-Dunkel-Zyklus führt allerdings auch zu einem Shift der Expression von mPer1. Per ist vermutlich in der Lage, über PAS-PAS-Interaktionen mit anderen Molekülen zu dimerisieren (160).

Per2 ist ebenfalls ein Homolog des Drosophila Period Gens mit einer über 40%igen Aminosäure-Sequenzidentität zu Per1 und weist wie dieses die Dimerisation-Domäne PAS auf (161). Es scheint regulierend auf mPer1 zu wirken (162). Eine Fehlfunktion von mPer2 führt zur Verkürzung der zirkadianen Periode sowie dem Verlust der zirkadianen Rhythmik in konstanter Dunkelheit (162) und einer Phasenverschiebung mit früher einsetzender Aktivität am Morgen und früherem Einschlafen am Abend (163). Eine Missense-Mutation (164), bzw. ein single-nucleotid Polymorphismus (165) im hPer2-Gen scheinen ursächlich beteiligt zu sein am FASP-Syndrom (familial advanced sleep phase

syndrom), deren Betroffene eine um vier Stunden vorgezogene zirkadiane Periodik aufweisen (164). Per2 scheint weitreichende Einflüsse im Organismus zu haben. Ein Verlust an diesem Gen führt unter anderem zu einem Aufheben der zirkadianen Rhythmik von IFN-gamma, einem Zytokin, dass in die Immunantwort des Organismus involviert ist (166). Weiterhin zeigt sich unter einer mPer2-Mutation ein erhöhter extrazellulärer Glutamatspiegel im Gehirn durch eine Reduktion des Glutamattransporters der Astrozyten. In der Folge kommt es zu einem erhöhten Alkoholkonsum (167).

Das dritte Gen der Per-Familie, Per3, zeigt beim Menschen eine 52% Homologie mit hPer1, sowie 51% mit hPer2 und enthält ebenfalls eine PAS-Region (161). Es zeichnet sich durch fehlende Lichtinduzierbarkeit aus (168), verliert seinen Rhythmus unter verschiedenen externen Lichtverhältnissen nicht (169) und scheint insgesamt nicht wie Per1 und Per2 zu den rhythmuskontrollierenden Komponenten im SCN zu gehören (170). Die Expression von mPer1 und mPer2 im SCN zeigt eine vier- (171) bzw. acht-stündige (172) Phasenverschiebung unter normalen Hell-/Dunkelkonditionen, in konstanter Dunkelheit wird mPer2 vier Stunden zeitverzögert zu mPer1 exprimiert. Verantwortlich für Phasenshifts in der Genexpression infolge Änderungen des Tag-Nacht-Rhythmus scheint mPer1 zu sein, da seine Expression durch einen Lichtpuls induzierbar ist (171). mPer2 reagiert verzögert auf Lichtpulse (172), mPer3 zeigt gar keine Induzierbarkeit (168). Sowohl mPer1 als auch mPer2 ändern den zirkadianen Rhythmus ihrer Expression in Abhängigkeit von festen Essenszeiten, was auch bei Läsionen im SCN zur Rückgabe eines vormals aufgehobenen Rhythmus in der Expression von mPer1 und mPer2 führt (173). mPer2 zeigt weiterhin auch unter SCN-Läsion peripher eine fortbestehende zirkadiane Rhythmik, allerdings phasenverschoben zwischen den einzelnen Geweben, was eine Kontrolle auf Gewebeebene unabhängig vom SCN vermuten lässt (121). Unter konstantem 24-stündigem Lichteinfluss verlängert sich die zirkadiane 24h-Phase von mPer1 im SCN, die von mPer2 im SCN verkürzt sich. Dieses Phänomen nimmt zu, je heller das Licht wird (174). Zusätzlich beginnt mPer1 mit zunehmender Lichtintensität zu arrhythmisieren, während mPer2 seinen Rhythmus behält und erst unter konstanter Langzeitlichtexposition arrhythmisiert (169).

1.2.3 Zirkadiane Rhythmik der Orexin-Expression

Die Aktivierung der Orexin-Neurone im Hypothalamus steht unter zirkadianer Kontrolle und reagiert auf Licht-/Dunkelpulse (175). Vermutlich unterscheidet sich das Orexin-System in verschiedenen Hirnarealen voneinander hinsichtlich des Zeitpunktes der höchsten Expression sowie des Ausmaßes der zirkadianen Fluktuation (176). Orexin-Neurone zeigen sowohl in tag- als auch in nachtaktiven Tieren einen zirkadianen Rhythmus, welcher während des subjektiven Tages der Nager eine erhöhte Aktivität der Orexin-Neurone zeigt (177). Somit zeigen auch tagaktive Tiere den zunächst vornehmlich

bei nachtaktiven Tieren nachgewiesenen Rhythmus der Orexin-Expression (178). Beide Peptidhormone sowie der OX_1R sind in der humanen Retina vorhanden, was für eine Rolle in der Synchronisierung zirkadianer Rhythmen spricht (179). Die Rhythmik der Orexin-Konzentration im Liquor von Ratten verschwindet bei Läsion des Nukleus suprachiasmaticus (180). Orexin A zeigt tageszeitabhängige Schwankungen in der Höhe seiner Expression in den Bereichen der Brücke sowie der präoptischen hypothalamischen Region, Gebiete die mit Erwachen, Schlaf und zirkadianem Rhythmus assoziiert sind, so dass sich hieraus eine Rolle der Orexine bei der Regulation von Schlaf-Wach-Rhythmen ableiten lässt (181). Hierfür spricht auch, dass der Locus coeruleus die höchste Innervationsdichte orexinerger Nerven im Gehirn aufweist (182) (183). Auch ließ sich im humanen Liquor eine geringfügige Schwankung der Orexin A-Konzentration im 24-Stunden-Verlauf feststellen, allerdings mit niedrigeren Konzentrationen am späten Nachmittag als in der zweiten Nachthälfte (184), bzw. der geringsten gemessenen Konzentration um die Mittagszeit (185). Fujiki et al. fanden hingegen höhere Konzentrationen an Orexin A im Liquor während des subjektiven Tages, welche im Verlauf der Nacht abnahmen (57). Des Weiteren ist die neuronale Aktivität der Orexin-Neurone während Wachphasen gesteigert (177) und höhere zerebrale Dosen an Orexin A erhöhen wiederum den Grad des Wachstatus während des Tages (21). Die Regulation der Orexin A-Konzentration scheint zum Teil unabhängig von dem zirkadianen Schrittmacher zu sein, da bei Überschreiten des Einschlafzeitpunktes und somit Verlängerung des Tages ein Absinken der Konzentration von Orexin A nicht beobachtet wurde (35). Dies bietet pharmakologische Ansatzpunkte zur Therapie von sowohl Narkolepsie als auch Insomnie. Die Gabe von Orexin oder dessen Antagonist könnte eine Behandlung für die beiden vorgenannten Krankheitsbilder darstellen, ohne die Nebenwirkungen, die die zur Zeit genutzten sedierenden Antidepressiva bzw. Benzodiazepine zur Therapie der Insomnie mit sich bringen (186). Orexin-Neurone des lateralen Hypothalamus haben zumindest teilweise synaptische Verbindungen sowohl zu glutamatergen als auch zu GABAergen Neuronen, was eine Steuerung der Aktivität der Orexin-Neurone erlaubt und so entweder erweckende und muskeltonische (exzitatorisch durch Glutamat) beziehungsweise schlaffördernde und muskelatonische (inhibitorisch durch GABA) Einflüsse vermittelt (187). In Abhängigkeit von ihrem Wirkort zeigen Orexine einen tageszeitlichen Rhythmus mit Erhöhung oder Verminderung der Orexin-Konzentration. Zum Beispiel steigt die Orexin A-Konzentration im Bereich der Brücke (einem Gebiet, dass mit Wachheit und Aufmerksamkeit vergesellschaftet ist) im Tagesverlauf an, während sie im präoptischen/anteriore Hypothalamus sinkt, eine Region die wiederum mit Schlafregulation und zirkadianer Rhythmik in Verbindung steht (181). Die Orexin A-Expression im lateralen Hypothalamus und medialen Thalamus steigt während des subjektiven Tages an und fällt in der Nacht ab (188). Änderungen im Licht-Dunkel-

Rhythmus beeinflussen die Orexin A-Expression nicht akut, Schlaf-Entzug jedoch schon - in Form erhöhter Expression während der erzwungenen Wachphase - während im normalen Zyklus keine Korrelation zwischen der Länge der Schlaf-/Wachphasen und der Höhe der Orexin A-Konzentration ermittelbar ist (188). In Abwesenheit eines täglichen Licht-/Dunkel-Zyklus persistiert die zirkadiane Sezernierung von Orexin A, während eine beidseitige SCN-Läsion sie aufhebt, so dass nicht der externe Tagesrhythmus, sondern der interne Taktgeber verantwortlich ist für die zirkadiane Rhythmik der Orexine (189). Allerdings wurde auch in SCN-lädierten Ratten eine Erhöhung der Orexin A Liquor-Konzentration als Antwort auf Schlafentzug gesehen, so dass hier eine von der zirkadianen Rhythmik unabhängige Regulation des Orexins stattfindet.

1.3 Fragestellung

Die Expression des Vorläufer-Proteins Präpro-Orexin scheint insgesamt zirkadian reguliert zu sein, ebenso wie die peripheren Konzentrationen der beiden Hormone (181). Während es eine Reihe Studien zur zirkadianen Rhythmik von Orexin A und einige zu Orexin B gibt, ist jedoch nicht bekannt, ob auch die Rezeptoren einer zirkadianen Rhythmik unterliegen.

Wir stellen hier die Frage nach einer zirkadianen Kontrolle der Expression beider Orexin-Rezeptoren im Allgemeinen, spezifisch in Abhängigkeit des Expressionsortes (zentral oder peripher) sowie im Hinblick auf die zirkadiane Expression des PPOs und im Vergleich zu den bekannten Uhrgenen. Des Weiteren soll differenziert werden, ob der mutmaßliche Rhythmus vollständig extern oder vollständig intern oder sowohl intern als auch extern kombiniert kontrolliert wird.

Dazu soll die Genexpression der Orexin-Rezeptoren OX_1R und OX_2R sowie *Bmal1*, *Per2*, *NFIL-3* und *DBP* in Gehirn, Hypothalamus, Leber und Nebenniere von Mäusen über 24 Stunden alle vier Stunden untersucht werden. Die Expression dieser Gene soll im Zellversuch wiederholt werden. Zusätzlich soll bei Vorliegen einer zirkadianen Rhythmik der hOX_2R -Promotor in murinen und humanen Zellen auf das Vorliegen eines zirkadianen Rhythmus untersucht werden, um die molekular zugrunde liegenden Mechanismen weiter zu entschlüsseln.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

	Firma
Isopentan (2-Methylbutan)	
Proteinase K Solution 5 ml (20 mg/ml)	Applied Biosystems, <i>Foster City, CA, USA</i>
Diethylpyrocarbonat (DEPC) für DePC-H ₂ O	
Rnase OUT	Invitrogen™ by Life Technologies, <i>Grand Island, NY, USA</i>
DTT	Invitrogen™ by Life Technologies, <i>Grand Island, NY, USA</i>
Renilla Luciferase Assay Substrate (100X)	Promega, <i>Madison, WI, USA</i>
Lipofectamin	Invitrogen™ by Life Technologies, <i>Grand Island, NY, USA</i>
Stop & Glo Substrat	Promega, <i>Madison, WI, USA</i>

2.1.2 Primer

Alle Primer wurden bezogen von Invitrogen™ by Life Technologies, *Grand Island, NY, USA*

Primernamen (Größe Amplikon)		µg	OD	µg/OD	MW (µg/µmol)	nmol
mβ-Actin (140 bp)	F	123,77	4,4	28	6422,2	19,3
		ATGGAATCCTGTGGCATCCAT				
	R	111,14	3,8	29	6373,2	17,4
		TTCTGCATCCTGTCAGCAATG				
mGAPDH (144 bp)	F	701.41	24.20	29	6469.2	108
		ATGTGTCCGTCGTGGATCTGA				
	R	239.65	09.00	27	6465.2	37.1
		TGAAGTCGCAGGAGACAACCT				
mOX ₁ R (145 bp)	F	356,06	13,2	27	5893,8	60,5
		TTGGTGCGGAACTGGAAAC				
	R	206,03	6,9	30	6318,2	32,6
		CCATCAGCATCTTAGCCGTCT				

2 Material und Methoden

mOX₂R (112 bp)	F	339,83	11,1	31	6380,2	53,3
		TTCCCGGAAGTTCTTCTGTGG				
mPPO (137 bp)	R	387,48	14,2	27	6385,2	60,6
		TCAGCAGCAACAGCGCTAATC				
	F	154,19	5,1	30	6349,2	24,3
		TGTTCTGCGTCTCTACGAA				
mARNTL (101 bp)	R	236,78	8,2	29	5835,8	40,6
		TGGTTACCGTTGGCCTGAA				
	F	113,19	4,1	28	6416,2	17,6
		TCAAATGTGGAACCCCTAGGCC				
mPer2 (113 bp)	R	70,75	2,5	28	6407,2	11,1
		TAGTTGCTGGTCACCCCAAAG				
	F	120,64	3,8	32	5666,8	21,3
		TTCTCCCATTCGATTCCGC				
mNFIL-3 (110 bp)	R	115,28	4,2	27	6431,2	17,9
		TGTGCCTCCCAATGATGAAAG				
	F	115,89	4,2	28	6087	19
		TGGTCCCTCAAATCGGAACA				
mDBP (119 bp)	R	111,86	4	28	6376,2	17,6
		TCGGAACCTTATAGCCACCG				
	F	107,98	4	27	5822,8	18,6
		TGCCCGAAGAACGTCATGA				
mGCK (121 bp)	R	124,06	4,6	27	6354,2	19,5
		CCCCAACATGCTAAGAGCACA				
	F	130,35	4,6	28	6336,2	20,6
		CATCCTGCTCAACTGGACCAA				
mG6PC (120 bp)	R	110,7	3,7	30	6247,2	17,7
		CATTGCCACCACATACCATCTC				
	F	108,43	3,4	32	6088	17,8
		TCTTGTTTGGTTTCGCGCTT				
Oligo(dT)20	R	65,87	2,3	29	6438,2	10,2
		TGTC AAGGTGGACCCATTCTG				
Oligo(dT)20		von Invitrogen™ by Life Technologies, <i>Grand Island, NY, USA</i>				

2.1.3 Enzyme/Nukleotide/Vektoren

Enzym	Firma
Accumax	Sigma Aldrich, <i>St. Louis, MO, USA</i>
Accutase	Biowest, <i>Nuaillé, Frankreich</i>

Cloned AMV RT	Invitrogen™ by Life Technologies, <i>Grand Island, NY, USA</i>
Platinum® Taq DNA polymerase	Invitrogen™ by Life Technologies, <i>Grand Island, NY, USA</i>
Trypsin	Biochrom, <i>Berlin, Deutschland</i>
dNTP-Mix	Applied Biosystems Ambion® by Life Technologies <i>Grand Island, NY, USA</i>
Renilla	Promega, <i>Madison, WI, USA</i>
Firefly	Promega, <i>Madison, WI, USA</i>
pGL4.19	Promega, <i>Madison, WI, USA</i>

2.1.4 Kits

Kit	Firma
Cloned AMV First-Strand cDNA Synthesis Kit	Invitrogen™ by Life Technologies, <i>Grand Island, NY, USA</i>
Platinum® SYBR® Green qPCR SuperMix-UDG w/ROX	Invitrogen™ by Life Technologies, <i>Grand Island, NY, USA</i>
Dual-Luciferase® Reporter Assay	Promega, <i>Madison, WI, USA</i>

2.1.5 Zelllinien

mHypoA-Zellen	Adulte Maus-Hypothalamus-Zelllinie
NCI-Zellen	human adrenocortical carcinoma cells

2.1.6 Puffer und Lösungen

	Firma
Lysepuffer	Applied Biosystems, <i>Foster City, CA, USA</i>
Dulbecco's PBS-Puffer w/o Ca & Mg, sterile	PAA the cell culture company, <i>Pasching, Austria</i>
RT buffer (5X cDNA Synthesis Buffer)	Invitrogen™ by Life Technologies, <i>Grand Island, NY, USA</i>
TE-Puffer	UltraPure™ EDTA: GIBCO® BRL by Life Technologies <i>Grand Island, NY, USA</i> TrisHCl: SIGMA chemical (SIGMA-ALDRICH Corporation) <i>St. Louis, MO, USA</i>
Passivlysepuffer	Promega, <i>Madison, WI, USA</i>

(RGA)	
Renilla Luciferase Assay Buffer	Promega, <i>Madison, WI, USA</i>
Renilla Luciferase Assay Lysis Buffer, 5X	Promega, <i>Madison, WI, USA</i>
Stop & Glo Puffer	Promega, <i>Madison, WI, USA</i>
Wash Solution 1 (RNA)	Applied Biosystems, <i>Foster City, CA, USA</i>
Wash Solution 2 (RNA)	Applied Biosystems, <i>Foster City, CA, USA</i>
Elution Solution (RNA)	Applied Biosystems, <i>Foster City, CA, USA</i>

2.1.7 Medien und Zusätze

	Firma
mHypoA-Medium	PAA the cell culture company, <i>Pasching, Österreich</i>
NCI-Medium	PAA the cell culture company, <i>Pasching, Österreich</i>
FCS 2% (Fetal calf serum)	Sigma Aldrich, <i>St. Louis, MO, USA</i>
Penicillin/ Streptomycin	Biochrom, <i>Berlin, Deutschland</i>
Insulin	Sigma Aldrich, <i>St. Louis, MO, USA</i>
Apo-transferrin	Sigma Aldrich, <i>St. Louis, MO, USA</i>
Sodium selenit	Sigma Aldrich, <i>St. Louis, MO, USA</i>
Horse Serum	Life Technologies, <i>Carlsbad, CA, USA</i>
Opti-MEM® I Reduced Serum Media	Invitrogen™ by Life Technologies, <i>Grand Island, NY, USA</i>

2.1.8 Verbrauchsmaterialien

Material	Größe	Firma
Eppendorfgefäße „Micro Tube“	2,0 ml, 0,5 ml, 0,2 ml	Sarstedt, <i>Nümbrecht, Germany</i>
Falcon-Röhrchen „Cellstar® Tubes“	15ml, 50ml	Greiner Bio-One <i>Frickenhausen, Germany</i>
Glas-Pipetten	150 mm, 230 mm	Greiner Bio-One <i>Frickenhausen, Germany</i>
PCR-Platten „Multiply PCR-Platte neutral“	96-Well	Sarstedt, <i>Nümbrecht, Germany</i>
Pipettenspitzen „Pipette Tip“	1000, 500, 20???	Sarstedt, <i>Nümbrecht, Germany</i>

RNA-Auffangplatten	Siehe PCR-Platten	
Total RNA-Purification Tray	96-Well	Applied Biosystems <i>Foster City, CA, USA</i>
Rundboden Cups	2, 0 ml	Sarstedt, <i>Nümbrecht, Germany</i>
Stabpipetten „Cellstar® Serological Pipette“	5ml, 10ml, 20ml	Greiner Bio-One <i>Frickenhausen, Germany</i>
Zellkultur-Platten „Cellstar® 24 Well Cell Culture Plate sterile with lid“	24-Well	Greiner Bio-One <i>Frickenhausen, Germany</i>
Zellkulturflaschen „Cellstar® Cell Culture Flasks“	75 cm ² , 250 ml, PS, red cap, sterile	Greiner Bio-One <i>Frickenhausen, Germany</i>

2.1.9 Geräte

Gerät	Firma	
<u>Kryostat</u> Leica CM3050 S	Leica Microsystems Wetzlar, Germany	
<u>Homogenisator</u> ULTRA-TURRAX® T 8	IKA Werke GmbH & Co. KG Staufen, Germany	
ABI PRISM® 6100 Nucleic Acid PrepStation	Applied Biosystems by Life Technologies Carlsbad, California, USA Darmstadt, Germany	
<u>NANO-Drop 2000</u> UV-Vis Spectrophotometer	Thermo Fisher Scientific, NanoDrop products Wilmington, Delaware, USA	
TGradient Thermocycler	Biometra Goettingen, Germany	
ABI PRISM 7000 Sequence Detection System	Applied Biosystems by Life Technologies Carlsbad, California, USA Darmstadt, Germany	
<u>RGA</u> FluoStar Optima	BMG Labtech GmbH Ortenberg/Germany	
Brutschrank	Binder Tuttlingen	
Mikroskop Zeiss IM 35	Carl Zeiss Microscopy GmbH Göttingen, Deutschland	
Zentrifugen	Centrifuge 5415D (cDNA-Enzyme)	Eppendorf Hamburg, Germany
	Jouan GR 412 (PCR)	Jouan GmbH Unterhaching, Germany
	Megafuge 1.0	Heraeus Holding GmbH

(Zellen)	<i>Hanau, Germany</i>
Vortexer: Reax Top	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG <i>Schwabach, Germany</i>
Pipetten (10, 20, 100, 200, 1000 µl)	Eppendorf <i>Hamburg, Germany</i>
Zählkammer Fuchs Rosenthal Tiefe 0,200mm; 0,0625 mm²	Glaswarenfabrik Karl Hecht GmbH & Co KG – "Assistent" <i>Sondheim/Rhön, Germany</i>
Rüttler (zur Zelllyse)	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG <i>Schwabach, Germany</i>

2.2 Methoden

Sämtliche Arbeitsmaterialien wurden, soweit nicht anders ausgewiesen, vor Verwendung auf Raumtemperatur erwärmt.

2.2.1 Organentnahme und Präparation

Zur Untersuchung der Genexpression der Gene (siehe Ergebnisteil) auf Vorliegen eines zirkadianen Rhythmus im Verlauf von 24 Stunden wurden 12-Wochen alte männliche Mäuse (C57BL/6N Mouse, Stamm-Code: 027, Charles River Laboratories, Sulzfeld, Deutschland) zur Organentnahme verwendet. Für die Tötung der Mäuse sowie für die D/D-Experimente lagen folgende Genehmigungen durch das Ministerium für Landwirtschaft, Umwelt und ländliche Räume des Landes Schleswig-Holstein vor: 9/A64/11 und V312-7224.122-4.

Die Mäuse wurden nach Erhalt für eine Woche ungestört in einem Tierraum untergebracht, um Stress durch den Transport zu reduzieren. Die Lichttaktung setzte sich zusammen aus 12 Stunden Licht und 12 Stunden Dunkelheit (L/D), bzw. vollkommene Dunkelheit (D/D). Alle Mäuse hatten jederzeit freien Zugang zu Futter und Trinkwasser.

Für die Tötung wurde die jeweilige Anzahl pro Zeitpunkt in einen separaten Raum verbracht, um den Stress für die verbliebenen Mäuse zu minimieren.

Direkt nach der Dekapitation wurden folgende Organe entnommen und in Isopentan (2-Methylbutan) auf Trockeneis schockgefroren:

- Gehirn (komplett)
- Hypophyse
- Niere, rechte oder linke
- Nebennieren, beide

2 Material und Methoden

- Leber, partiell
- viszerales Fett, Bereich Milz/Niere links

Die Aufbewahrung der Organe erfolgte in 50 ml – Falconröhrchen bei -80°C.

Die Dekapitation von jeweils sechs Mäusen fand zu sieben Zeitpunkten (ZP), alle vier Stunden, statt. Die ZP 0h, 4h und 8h fielen in die Lichtphase, die ZP 12h, 16h, 20h und 24h in die Dunkelphase. Zum ZP 0 Stunden waren die Mäuse nach der 12-stündigen Dunkelphase fünf Minuten lang Licht ausgesetzt. Zum ZP 12h befanden sich die Mäuse fünf Minuten lang in Dunkelheit nach der 12-stündigen Lichtphase. Der ZP 24h wurde kurz vor das Einschalten des Lichtes gelegt.

Die Dekapitation während der Dunkelphase fand in einem lichtdicht abgedunkelten Raum unter Rotlicht statt. Die Mäuse wurden in einer lichtdichten Transportbox dorthin verbracht.

2.2.1.1 Licht-Effekt auf die Expression

Zum ZP 24h wurden sechs von insgesamt 12 Mäusen direkter Lichteinstrahlung (Raumlicht) ausgesetzt. Zum ZP 25h wurde jeweils nacheinander eine Maus aus der Licht- sowie eine Maus aus der Dunkelgruppedekapitiert.

2.2.1.2 Präparation der Gewebeproben

Die Gewebeproben wurden aus dem -80°C-Gefrierschrank auf Trockeneis zum Kryostaten (KT -15°C, OT -15°C) transportiert, auf dem Objektisch einige Minuten angetaut und wie folgt zugeschnitten:

Schnittführung Gehirn

- Hypothalamus
 - *horizontal*
 - Chiasma opticum
 - kaudal der Ncll. Mamillaris
 - *transversal*
 - kranial der Commissurae anteriores
 - kranial des Corpus callosum
 - *sagittal*
 - Sulcus bds.
- Cortex
 - ein Hemisphärenteil

Leberpräparat

- Von der Leber wurde ein Stück auf die Größe eines Cortex-

Hemisphärenteils zugeschnitten (etwa 10 x 10 x 5 mm).

Nebenniere

- Die Nebenniere wurde von umliegendem Fettgewebe gereinigt.

Alle zugeschnittenen Proben wurden einzeln in 2 ml-Rundboden-Reaktionsgefäßen bei -80°C aufbewahrt.

2.2.1.3 Homogenisieren der Gewebeproben

Auf jede gefrorene Gewebeprobe wurde direkt nach Entnahme aus dem -80°C-Gefrierschrank 0,5 ml Lysepuffer (2-(4-Morpholino) ethanesulfonic Acid, Guanidin-HCL, Polysorbate 20, Sodium chloride) + PBS (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 12 mM Gesamt-Phosphat (HPO₄²⁻ und H₂PO₄⁻)) 1:2 gegeben. Jede Probe wurde dann mittels Homogenisator zerkleinert und im Lysepuffer durch das enthaltene Guanidin/Waschmittel-Reagenz suspendiert (190). Zu jeder Probe wurden 10 µl Proteinase K (= 20 µl/ml Lysepuffer) gegeben. Die Serinprotease des Pilzes *Tritirachium album Limber* spaltet neben der Carboxylgruppe aliphatischer und aromatischer Aminosäuren Peptidbindungen (191). Zum einen führt die Zugabe dieser Protease zur Eliminierung von Nukleasen aus den Proben (191), zum anderen wird hierdurch ein Verstopfen des RNA-Trays durch die in den Gewebeproben enthaltenen Proteine gemindert, deren Zerkleinerung durch den Lysepuffer und die Homogenisierung häufig nicht ausreichend ist (190). Die Proben wurden nach Zusatz von Proteinase K für 60 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Von jeder hergestellten Probe wurde jeweils die RNA extrahiert, eine cDNA hergestellt und die Genexpression verschiedener Gene mittels PCR gemessen (siehe unten).

2.2.2 Zellversuche

Untersucht wurde

- die Genexpression verschiedener Gene (siehe 3.3.1.2 und 3.3.1.3) auf das Vorkommen eines zirkadianen Rhythmus im Verlauf von 24 Stunden (siehe 2.2.2.2)
- der hOX₂R-Promotor in mHypoA- und NCI-Zellen auf das Vorkommen eines zirkadianen Rhythmus über 24 Stunden (siehe 2.2.2.3), sowie
- der hOX₂R-Promotor und seine SF-1-mutierte Form in NCI-Zellen auf das Vorkommen eines zirkadianen Rhythmus über 48 Stunden (siehe 2.2.2.4)

2.2.2.1 Zellkultur

mHypoA-Zellen

2 Material und Methoden

Zusätze zum mHypo-Medium: FCS 2% (fetal calf serum)

Das Medium wurde aus den Zellkulturflaschen abgesaugt und die adhärennten Zellen mit 10 ml PBS-Pufferlösung gewaschen. Durch Zugabe und Einwirkung von 3 ml Trypsin für 1,5 – 2 Minuten lösten sich die Zellen vom Flaschenboden. Mikroskopisch konnte dies als Zusammenziehen der Zellen zu einer Kugelform beobachtet werden. Nach Absaugen des Trypsins wurden die Zellen mittels 10 ml Medium in eine Suspension überführt. Für eine Subkultivierung wurde Medium mit Pen/Strep, für Versuche Medium ohne Pen/Strep verwendet. Aus der Suspension wurden 0,5 ml für eine Subkultivierung 2x/Woche in eine neue Zellkulturflasche umgesetzt, sowie 0,25 ml für eine Subkultivierung 1x/Woche. Diese Flaschen wurden jeweils mit 12 ml Medium + Pen/Strep aufgefüllt.

Für die Versuche wurde die Zellsuspension zunächst mit weiteren 5 ml Medium ohne Pen/Strep verdünnt. Hiervon wurden 15 µl in die Fuchs-Rosenthal-Zählkammer gegeben und ausgezählt. Die Zellsuspension wurde dann mit Medium ohne Pen/Strep bis auf $2 \cdot 10^5/\text{ml}$ weiter verdünnt.

NCI-Zellen (H295R-Zellen)

Zusätze zum NCI-Medium waren FCS 2% (Fetal calf serum), Penicillin/Streptomycin 100 µg/ml, Insulin 66 nmol, Apo-transferrin 100 mg/10ml und Sodium selenit 5 mg/ml (1:100).

Das zugesetzte Medium wurde aus den Zellkulturflaschen abgesaugt und die adhärennten Zellen zweimal mit 10 ml PBS-Pufferlösung gewaschen. Durch Zugabe und Einwirken von 3 ml Accutase (Dulbecco's PBS 0.5 mM EDTA•2Na) und Inkubation für 5 Minuten im Brutschrank bei 37°C lösten sich die Zellen vom Flaschenboden. Die Zellsuspension wurde in ein steriles 15 ml Falconröhrchen transferiert und für 5 Minuten bei 600g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und dem Pellet zum Suspendieren 100 µl Accutase zugesetzt. Nach manueller Durchmischung erfolgte eine Inkubation im Brutschrank bei 37°C für 4-6 Minuten. Den Zellen wurde im Anschluss 8 ml frisches NCI-Medium (DMEM Ham's F-12 with L-Glutamine Cat E15-813) zugegeben, wovon je 1,5 ml und 2,5 ml zur Subkultivierung (1x/Woche) auf zwei neue Zellkulturflaschen aufgeteilt wurden. Jeder Flasche wurden anschließend 13 ml frisches NCI-Medium zugesetzt. Ein weiterer Milliliter Zellsuspension wurde für die Versuche mit 12 ml Medium verdünnt, wovon wiederum 15 µl in die Fuchs-Rosenthal-Zählkammer gegeben wurden; das Auszählen der Zellen erfolgte wie oben beschrieben. Die Zellsuspension wurde danach bis auf $4 \cdot 10^5/\text{ml}$ weiterverdünnt.

2.2.2.2 Versuch zum zirkadianen Rhythmus in mHypoA-Zellen

Die Genexpression verschiedener Gene (siehe 3.3.1.2 und 3.3.1.3) wurde zu

2 Material und Methoden

sieben ZP, alle vier Stunden bestimmt. Je Versuch wurden für jeden ZP drei Wells (= 21 Wells pro Platte) genutzt, der Versuch wurde zweimal wiederholt. Von den ermittelten Werten wurde für jeden ZP der Mittelwert aus drei gebildet und die drei Mittelwerte je ZP verwendet. Nach Auszählung und Verdünnung der Zellsuspension auf 2×10^5 Zellen/ml Medium wurden diese in einer 24-Well-Zellkulturplatte ausgesät.

Die Aussaat der Zellen fand zu zwei ZP wie folgt statt:

- 1) 39 Stunden vor Versuchbeginn (= ZP 0h):
Aussaat der Zellen für die ZPs 16h, 20h und 24h
- 2) 23 Stunden vor Versuchsbeginn (= ZP 0h):
Aussaat der Zellen für die ZPs 0h, 4h, 8h und 12h

Die Synchronisierung der Zellen erfolgte durch einen Serum Schock mit 1 ml 50%igem HorseSerum (HorseSerum + mHypoA-Medium (DMEM High Glucose (4,5 g/l) with L-Glutamine Cat E15-810) ohne Pen/Strep 1:2) pro Well und nachfolgender Inkubation für zwei Stunden bei Raumtemperatur (120). Nach zwei Stunden wurde das Serum abgesaugt, jedes Well mit jeweils 200 µl mHypoA-Medium ohne Pen/Strep gewaschen und wieder mit 500 µl desselben Mediums aufgefüllt.

Das Horse Serum wurde zu zwei ZP appliziert:

- 1) 18 Stunden vor Versuchsbeginn (= ZP 0h)
Serum Schock der Zellen für die ZPs 16h, 20h und 24h
- 2) 2 Stunden vor Versuchsbeginn (= ZP 0h)
Serum Schock der Zellen für die ZPs 0h, 4h, 8h und 12h.

Zur jeweiligen Entnahmezeit wurden die entsprechenden Wells abgesaugt und mit 200 µl PBS-Puffer/Well gewaschen. Nach dem Absaugen des Puffers wurde jedes Well mit 500 µl Lyse- + PBS-Puffer (1:2) aufgefüllt, was zur spontanen Ablösung der Zellen vom Wellboden führte. Die Zellsuspension jedes Wells wurde in je ein 0,5 ml Eppendorfgefäß umpipettiert und im -20°C Gefrierschrank eingefroren.

Von jeder hergestellten Probe wurde jeweils die RNA extrahiert, eine cDNA hergestellt und die Genexpression verschiedener Gene mittels PCR gemessen (siehe unten).

2.2.2.3 Versuch zur Transfektion des hOX₂R-Promotors in mHypoA- und NCI-Zellen

Der hOX₂R-Promotor wurde sowohl in mHypoA-, als auch in NCI-Zellen transfiziert. Letztere wurden gewählt, da sie als humane Zelllinie mit dem humanen Promotor arbeiten können. Hierdurch kann in der mHypoA-Zelllinie zwischen einem nicht vorhandenen Rhythmus und einer Inkompatibilität der murinen Zellen und dem humanen Promotor unterschieden werden.

Von den NCI-Zellen wurden drei Wells je ZP in einer Konzentration von 4×10^5

2 Material und Methoden

Zellen/ml Medium ausgesät. Insgesamt wurden sieben ZPs festgelegt (0h, 4h, 8h, 12h, 16h, 20h und 24h). Die Aussaat erfolgte vor der der mHypoA-Zellen, da die NCI-Zellen eine geringere Teilungsrate aufweisen. Von den mHypoA-Zellen wurden pro ZP neun Wells ausgesät, je drei in 100%iger Konzentration (2×10^5 Zellen/ml Medium), drei in 50%iger Konzentration (1×10^5) und drei in 25%iger Konzentration (5×10^4), um die optimale Konfluenz zu finden. Diese zeigte sich zum Zeitpunkt der Transfektion bei einer Konzentration von 50%, so dass nur diese Zellen im Folgenden transfiziert wurden. Insgesamt wurden für sieben ZPs vier Platten benötigt.

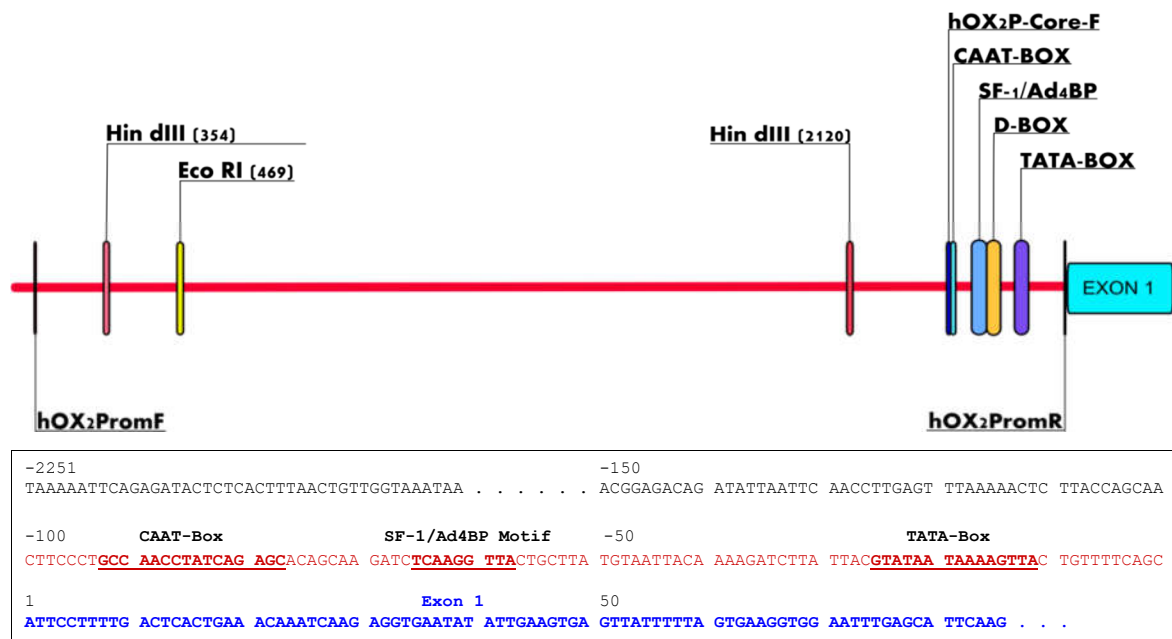


Abbildung 2: Schematische Darstellung (oben) und Sequenz des humanen OX₂R-Promotors (Box unten)

Transfektion

Renilla SV40 Plasmid lag in einer Konzentration von 282,2 µg/ml (1:100) und der hOX₂R-Promotor im pGL4.19-Plasmid in einer Konzentration von 524,0 µg/ml vor. Für die Transfektion wurden pro Probe 2 µl Lipofectamin mit 48 µl OPTI-Mem (HEPES, NaHCO₃⁻, Hypoxanthin, Thymidin, sodium pyruvate, L-Glutamin, trace elements, Wachstumsfaktoren) für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Dieses wurde hiernach einem Gemisch aus 400 ng hOX2-Promoter-Plasmid/Probe + 0,2 ng Renilla SV 40/Probe + OPTIMem* zugesetzt. Die gesamte Mischung aus DNA-Lipofectaminkomplex wurde für 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Aus den Wells wurde das alte Medium abgesaugt und je Well 400 µl frisches Medium + 100 µl DNA-Lipofectaminkomplex zugegeben. Anschließend erfolgte eine Inkubation im Brutschrank bei 37°C für fünf Stunden.

* Die Menge des hOX2/Renilla/OptiMem-Gemisches entsprach der Menge

des Lipofectamin-Gemisches. Die Menge des hier verwendeten OPTIMems berechnet sich somit als Menge Lipofectamin-Gemisch minus Menge hOx2/Renilla-Gemisch.

Zur Verwendung des Horse Serums siehe unter 2.2.2.2.

Zur Entnahmezeit wurden die Zellen mit 200 µl PBS-Puffer/Well gewaschen und nach Absaugung 100 µl 5X-Passivlyse-Puffer (1:5 verdünnt mit DePC-H₂O) pro Well zugesetzt. Die Platten wurden für 15 Minuten bei Raumtemperatur auf dem Rüttler geschüttelt, um die Zellen vom Plattenboden abzulösen. Jede Probe wurde in ein 0,5ml Eppendorfgefäß umpipettiert und bei -20°C für maximal eine Woche gelagert.

Tabelle 1: Zeitlicher Versuchsablauf

ZP vor Versuchsbeginn (= 1. Probenentnahme zum ZP 0h) in Stunden	Durchführung von:
97	Aussaat der NCI-Zellen für die ZPs 16h, 20 und 24h
81	Aussaat der NCI-Zellen für die ZPs 0h, 4h, 8h und 12h
66	Aussaat der mHypoA-Zellen für die ZPs 16h, 20 und 24h
50	Aussaat der mHypoA-Zellen für die ZPs 0h, 4h, 8h und 12h
42	Transfektion aller Zellen für die ZPs 16h, 20 und 24h
37	Mediumwechsel für die ZPs 16h, 20 und 24h
26	Transfektion aller Zellen für die ZPs 0h, 4h, 8h und 12h
21	Mediumwechsel für die ZPs 0h, 4h, 8h und 12h
18	Synchronisierung aller Zellen mit Horse Serum für die ZPs 16h, 20 und 24h
16	Auswaschen des Horse Serums für die ZPs 16h, 20 und 24h
2	Synchronisierung aller Zellen mit Horse Serum für die ZPs 0h, 4h, 8h und 12h
0	Auswaschen des Horse Serums für die ZPs 0h, 4h, 8h und 12h

2.2.2.4 Versuch zum SF1 mutierten hOX₂R-Promotor in NCI-Zellen

Eine Hälfte der NCI-Zellen wurden mit einem hOX₂R-Promotor transfiziert, die andere Hälfte mit einem hOX₂R-Promotor, dessen SF-1-Motiv (Steroidogenic factor 1) mutiert ist. Der Transkriptionsfaktor SF-1 ist essentiell unter anderem für die Entwicklung von Geweben der Steroidgenese (192). Es wurden drei Wells je ZP in einer Konzentration von 4x10⁵ Zellen/ml Medium ausgesät. Insgesamt wurden 13 ZPs festgelegt, alle vier Stunden (0h, 4h, 8h, 12h, 16h, 20h, 24h, 28h, 32h, 36h, 40h, 44h und 48h), auf insgesamt vier Zellkulturplatten.

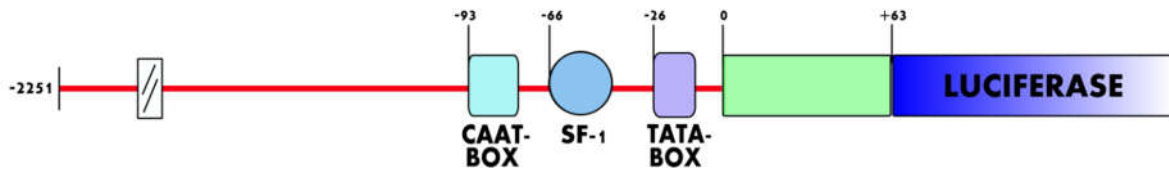


Abbildung 3: hOX₂R-Promotor - Luciferase

Transfektion

Die Transfektion mittels DNA-Lipofectaminkomplex ohne Mutation wurde wie unter 2.2.2.3 durchgeführt.

Der hOX₂R-Promotor mutSF-1 im Plasmid pGL4.19 wurde in einer Konzentration von 527 µg/ml verwendet. Die Herstellung des DNA-Lipofectaminkomplexes erfolgte wie oben beschrieben mit dem hOX₂R-Promotor mutSF1 anstelle vom hOX₂R-Promotor.

Zur Verwendung des HorseSerums und Behandlung der Zellen zum Entnahmezeitpunkt sowie deren Lagerung siehe unter 2.2.2.2.

Tabelle 2: Zeitlicher Versuchsablauf

ZP vor Versuchsbeginn (= 1. Probenentnahme zum ZP 0h) in Stunden	Durchführung von:
117	Aussaat der NCI-Zellen für die ZPs 36h, 40h, 44h, und 48h
97	Aussaat der NCI-Zellen für die ZPs 16h, 20h, 24h, 28h und 32h
81	Aussaat der NCI-Zellen für die ZPs 0h, 4h, 8h und 12h
62	Transfektion der Zellen für die ZPs 36h, 40h, 44h, und 48h
57	Mediumwechsel für die ZPs 36h, 40h, 44h, und 48h
42	Transfektion der Zellen für die ZPs 16h, 20, 24h, 28h und 32h
37	Mediumwechsel für die ZPs 16h, 20, 24h, 28h und 32h
26	Transfektion aller Zellen für die ZPs 0h, 4h, 8h und 12h
21	Mediumwechsel für die ZPs 0h, 4h, 8h und 12h
18	Synchronisierung aller Zellen mit Horse Serum für die ZPs 16h, 20, 24h, 28h und 32h
16	Auswaschen des Horse Serums für die ZPs 16h, 20, 24h, 28h und 32h
2	Synchronisierung aller Zellen mit Horse Serum für die ZPs 0h, 4h, 8h und 12h
0	Auswaschen des Horse Serums für die ZPs 0h, 4h, 8h und 12h

2.2.3 RNA-Extraktion

Die RNA als exakte, komplementäre DNA-Kopie, wird mittels einer RNA-Polymerase transkribiert. Da die RNA im Gegensatz zur DNA den Zellkern verlassen kann, besteht hierüber die Möglichkeit die Informationen der DNA im Zytosol in Proteine zu translatieren. Somit ist es möglich, über die Isolierung der RNA aus einem Gewebe auf die Expression eines bestimmten Genes zu schließen.

Durch Homogenisierung der Proben mittels Lyse-Reagenz kommt es durch das Waschmittel sowie zelluläre Lipide zu einer Ausfällung der RNA in Mizellen, welche die RNA von vorhandener DNA sowie Proteinen separiert (190). In diesem Zustand wird das Lysat in den 96-Well-Tray (bestehend aus einer Fiberglasmembran zum Auffangen der RNA, einem Tropfdetektor sowie einem Kreuzkontaminationsschutz) gegeben und diese in die ABI PRISM® 6100 Nucleic Acid Station verbracht. Der Durchfluss wird durch verschieden starke Vakua ermöglicht bzw. kontrolliert (190).

Zur Isolierung und Reinigung wurden verschiedene Waschlösungen nacheinander auf die spezifische Tray-Membran gegeben und die gereinigte RNA in einer 96-Well PCR-Platte aufgefangen. Alle Wells des Purification Trays wurden mit je 50 µl Wash Solution 1 (Guanidin Hydrochlorid, 2-(4-Morpholino) ethanesulfonic Acid) vorbefeuchtet. Im Anschluss wurde jeweils die gesamte Probe (= 500 µl homogenisiertes Gewebe oder lysierte Zellen) ins Well gegeben. Danach wurde nach Folgendem Schema vorgegangen:

Tabelle 3: RNA-Extraktions-Schema

	RNA-Isolation aus Geweben			RNA-Isolation aus Zellkulturen		
Methode	<i>RNA Tissue-Filter method</i>			<i>RNA Cell method</i>		
	Volumen (µl)	Zeit (sek)	Vakuum (%)	Volumen (µl)	Zeit (sek)	Vakuum (%)
Probenzugabe	500	180	80	500	120	20
Waschlösung 1	500	180	80	500	120	20
Waschlösung 2	300	180	80	300	120	20
Waschlösung 2	200	120	60	300	120	20
Waschlösung 2	200	120	60	200	120	20
Vakuum	-	300	90	-	300	90
Elutionslösung	150	120	40	150	120	20

2 Material und Methoden

Jede Probe wurde anschließend in 0,5 ml Eppendorf- Reaktionsgefäße umpipetiert und bei -80°C gelagert.

2.2.3.1 Messung des RNA-Gehalts

Der Gehalt an RNA wurde pro 1 µl mittels NANO-Drop gemessen. Als Blankprobe wurde die Elutionslösung verwendet.

2.2.4 cDNA

Komplementäre DNA (cDNA) wird mithilfe des Enzyms Reverse Transkriptase, einer DNA-Polymerase, aus mRNA hergestellt. Die cDNA kann dann im Folgenden zur Messung der Genexpression mittels PCR verwendet werden.

Zunächst wurde ein Mix aus 1 Teil dNTP (je 75 µL dATP, dCTP, dGTP, dTTP, je 10 mM) + 0,5 Teile Oligo(dt)-Primer angesetzt. Für jede Probe wurden 1,5 µl des Mixes und 4,5 µl RNA in je ein 0,2 ml Eppendorfgefäß gegeben. Die Proben wurden für 5 Minuten im Cyclyer bei 65 °C inkubiert.

Je 0,5 Teile Dithiothreitol 0,1 M (DTT), DEPC Wasser, RNase Out (Ribonuklease-Inhibitor; 20 mM Tris-HCl (pH 8), 50 mM KCl, 0.5 mM EDTA, 8 mM DTT, 50% (v/v) Glycerol) und Cloned AMV RT (eine Reverse Transkriptase des klonierten ‚Avian Myeloblastosis Virus‘ aus durch einen Baculovirus infizierten Insektenzellen (193)), sowie 2 Teile RT Puffer (250 mM Tris-Acetate (pH 8.4), 375 mM K⁺-Acetate, 40 mM magnesium acetate, stabilizer, 20 µg/ml BSA), wurden nach der Inkubation zupipettiert und wiederum alles in den Cyclyer gegeben.

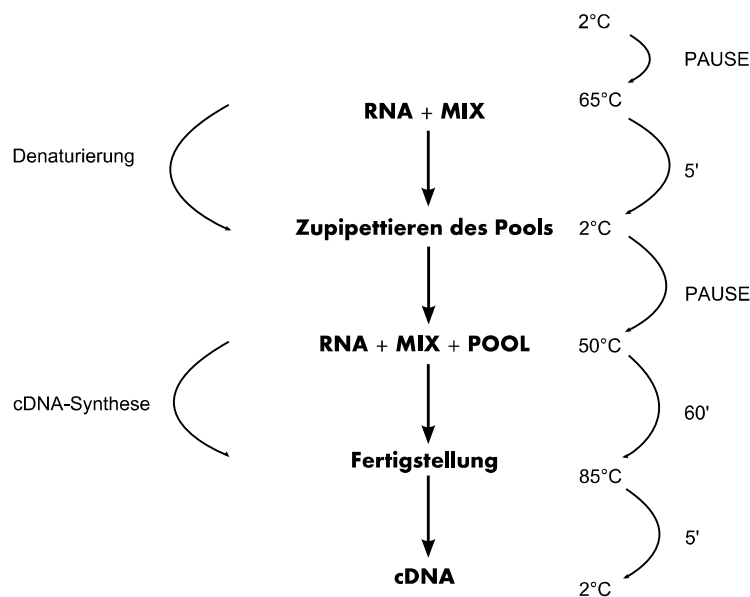


Abbildung 4: cDNA-Synthese-Programm nach Angaben des Herstellers (© Invitrogen™ by Life Technologies)

Alle Proben wurden im Anschluss zunächst auf Eis gesetzt, je Eppendorf-Reaktionsgefäß 10 µl DPC- H₂O zugegeben und die cDNA bei -20°C eingefroren.

2.2.5 PCR (Polymerase Chain Reaction)

1986 veröffentlichte der Amerikaner Kary Mullis eine von ihm entwickelte Methode, die es ermöglicht eine DNA-Zielsequenz exponentiell zu duplizieren und somit in eine detektierbare Konzentration zu überführen – die PCR. Hierzu denaturierte er die zunächst DNA und zerlegte sie somit in Einzelstränge (194). An die DNA-Abschnitte, die die zu amplifizierende Zielsequenz (Template) umgeben, konnten nun sogenannte Primer (korrespondierende Sequenzen) hybridisieren, die mittels einer DNA-Polymerase und Desoxynukleosid-Triphosphaten verlängert werden konnten. Erneutes Erhitzen und Abkühlen wiederholte den Vorgang. Unter anderem mithilfe dieser Methode entwickelte Randall Saiki bereits vor der Veröffentlichung von Mullis Studie einen diagnostischen Pränatal-Test für die Sichelzellanämie (195). Zwei Jahre später nutzte Saiki zum ersten Mal die von Alice Chien (196) entdeckte DNA-Polymerase des thermophilen Bakteriums *Thermus aquaticus* für die PCR (197), anstatt der *Escherichia Coli* Polymerase, die Mullis genutzt hatte (194). *Thermus aquaticus* besitzt ein Temperaturoptimum von 80°C, was den Vorteil hat, dass es im sich wiederholenden DNA-Denaturierungsprozess stabil ist (196). Dadurch werden durch die Taq-Polymerase Sensitivität, Spezifität, Ausbeute und Länge des PCR-Produktes signifikant verbessert (197). In den folgenden Jahren wurde kontinuierlich versucht, die PCR zu verbessern und Fehlerquellen zu eliminieren, so zum Beispiel die Wahl der richtigen Temperatur zum Annealing der Primer an die DNA-Templates (198), was beim Aussuchen der Primer beachtet werden muss (199) und wie speziell konstruierte Primer die Bildung von Primer-Dimeren verhindern können (200). 1993 beschrieb Russell Higuchi in einer Arbeit eine Möglichkeit zum Echtzeit-Monitoring der Amplifikations-Reaktion (201). Bis dahin wurde der Gehalt des PCR-Produkts am Reaktionsende durch Gel-Elektrophorese oder Southern Blotting gemessen (194). Higuchi maß die Kinetik der PCR mittels einer Videokamera, die den Fluoreszenzanstieg von Ethidium Bromid durch dessen Bindung an doppelsträngige DNA ermittelte (201). Je schneller also der Anstieg der Fluoreszenz, desto größer die Anzahl der Zielsequenzen. Die Echtzeit Messung der PC-Reaktion wurde dann einige Jahre später mithilfe der TaqMan Gensonde weiterentwickelt (202). Die Gensonde enthält zwei fluoreszierende Färbungen, wobei bei intakter Sonde die Fluoreszenz der einen von der anderen

absorbiert wird, also keine oder nur eine geringe Emission stattfindet. Wird nun die Polymerase während der sich wiederholenden Extensionszyklen aktiv, dupliziert sie nicht nur die Templates, sondern spaltet auch die Gensonden. In der Folge fällt die Absorption weg und die messbare Emission steigt. Die gemessene Fluoreszenz kann in Einheiten auf der y-Achse gegen die Zeit in Zyklen auf der x-Achse aufgetragen und eine Amplifizierungskurve sigmoider Form ermittelt werden. Die Log-Phase, also der Anstieg der Kurve, beginnt an einer willkürlich gesetzten Schwelle, die meist 10 Standardabweichungen oberhalb der Basislinie liegt. Der Punkt, an dem die Amplifizierungskurve den Schwellenwert kreuzt wird mit C_T bezeichnet und widerspiegelt die Zyklusanzahl an diesem Punkt. Je geringer die Ausgangskonzentration an Templates, desto größer ist der C_T -Wert, da mehr Zyklen benötigt werden um genügend Gensonden zu spalten, so dass die Höhe des C_T -Werts allein schon eine Aussage über die Ausgangskonzentration der zu amplifizierenden Substanz treffen kann.

Schmelzpunktkurven lassen weitere Aussagen über die amplifizierten Produkte treffen, zum Beispiel über das Verhältnis der Basenpaare GC zu AT oder aber die Länge der zu amplifizierenden Templates (203). Je höher der GC-Anteil und je länger das Template, desto höher die Schmelztemperatur des PCR-Produktes. Dies ermöglicht eine wesentliche differenziertere Analyse der Zielsequenzen, da zum Beispiel schon eine unterschiedliche GC-Verteilung in zwei Sequenzen gleicher Länge und GC-Gehalts eine unterschiedliche Schmelzkurve erzeugt. Mithilfe der Schmelzpunktkurve kann ein PCR-Produkt bereits während des Amplifizierungsprozesses identifiziert werden, zudem können in einem Gemisch Produkte differenziert werden, die sich um nicht mehr als 2°C unterscheiden.

Ablauf PCR-Zyklus (204)

Im ersten Schritt 1 findet die Denaturierung statt. Durch Temperaturen $>90^\circ\text{C}$ werden die Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Basenpaaren der doppelsträngigen DNA gelöst. Die stabileren Bindungen zwischen Desoxyribose und Phosphat bleiben intakt. So entstehen zwei Einzelstränge. Die Zielsequenz innerhalb der DNA-Stränge wird im zweiten Schritt, dem Annealing, durch Bindung von Primern (synthetische, 20 – 30 Basen lange Einzelstrang-DNA) markiert. Bei Temperaturen von 40°C bis 65°C (abhängig von Länge und Sequenz der Primer) wird die Zielsequenz von etwa 100 - 35000 Basenpaaren durch die Primer eingegrenzt. Sobald die Primer gebunden haben, wird der Ansatz auf 72°C erhitzt und eine Polymerase beginnt unter Verwendung frei in Lösung vorhandener komplementärer Nukleotide neue Doppelstrang-DNA zwischen den Primer-Paaren zu synthetisie-

ren (Extension). Im letzten Schritt liegen nun zwei identische neue doppelsträngige DNAs vor. Meist sind 30 bis 40 Zyklen nötig, um durch exponentielle Vervielfältigung der Ursprungssequenz bis eine Milliarde Kopien zu erzeugen.

Vorgehen PCR

Zunächst wurden alle Primer außer GAPDH 1:10 mit DEPC- H₂O verdünnt. GAPDH wurde 1:6 mit DEPC- H₂O verdünnt.

Für den Pool wurden SuperMix (SYBR® Green I dye, Tris-HCl, KCl, 6 mM MgCl₂, 400 µM dGTP, 400 µM dATP, 400 µM dCTP, 800 µM dUTP, Uracil DNA Glycosylase (UDG), 1 µM ROX Reference Dye, Stabilisatoren), SensePrimer, AntiSensePrimer und DePC-H₂O gemeinsam in lichtgeschützte 2,0 ml Eppendorfgefäße pipettiert.

Die Verdünnung des Standards erfolgte mittels TE-Puffer (20 µl UltraPure™ 0.5 M EDTA, pH 8.0; 100 µl TrisHCl 1M pH 7,40 +/- 0,05 bei 25°C; 9880 µl DePC-H₂O). Für die Housekeeping Genes (mß-Actin, mGAPDH) wurden folgende Standardverdünnungen angesetzt: 10⁻⁸, 10⁻⁷, 10⁻⁶, 10⁻⁵, 10⁻⁴; für alle anderen Gene: 10⁻⁷, 10⁻⁶, 10⁻⁵, 10⁻⁴, 10⁻³.

Im Anschluß wurden die Wells bestückt. In eine 96-Well-Platte wurden zunächst 23 µl/Well des angesetzten Pools, bestehend aus 12,50 µl SuperMix, jeweils 0,75 µl SensePrimer (10 pmol/µl) und AntiSensePrimer (10 pmol/µl) sowie 9 µl H₂O) vorgelegt. Jedem Well wurden dann 2 µl der gewonnen cDNA zugegeben. Die Platte wurde mit einer durchsichtigen Folie zugeklebt und bei 2000 rpm zentrifugiert.

PCR-Programm

Tabelle 4: PCR-Programm

Stage	1	2	3		4		
Wiederholungen	1	1	40		1		
Temperatur (°C)	50	95	95	60	95	60	95
Dauer (min)	02:00	02:00	00:15	01:00	00:15	00:20	00:15

2.2.6 Primeroptimierung

Zur Optimierung wurde eine PCR für die Primer mit neun verschiedenen Konzentrationen zwischen sense und antisense Primer durchgeführt, um das bestmögliche Verhältnis zu ermitteln.

In einem 25 µl Reaktionsansatz befanden sich 2,0 µl cDNA, 2,5 µl Puffer (10 X), 0,5 µl 10mM dNTP Mix, 1,63 µl 50 mM MgCl₂, 0,125 µl Hot Gol Star Enzyme und

0,75 µl Sybr Green (1/2000). Die 9 Reaktionsansätze enthielten zudem sense und antisense Primer in den Konzentrationsverhältnissen 50/50, 300/50, 900/50, 50/300, 300/300, 900/300, 50/900, 300/900 und 900/900 (jeweils in µM). Die verbliebene Differenz zu 25,0 µl wurde mittels Wasser (13,0 bis 16,0 µl) aufgefüllt.

2.2.7 Agarose-Gel-Elektrophorese

Zum Gießen eines 2%igen Agarose-Gels, wurden zunächst 200 ml TAE-Puffer mit 4 g Agarose versetzt. Das Gemisch wurde in der Mikrowelle bei 900 Watt für etwa 3 Minuten kurz aufgekocht, so dass eine klare Flüssigkeit entstand. Die Flüssigkeit wurde auf Handwärme abgekühlt, bevor die Zugabe von 4 µl Ethidiumbromid erfolgte. Ethidiumbromid interkaliert in DNA (205). Die Anwesenheit von DNA, oder auch RNA führt zu einer Änderung des Absorptionsmaximums (und damit der Farbe) des Ethidiumbromids von einer Wellenlänge von 479 nm zu etwa 517 nm (und damit von Orange zu Pink). In diesem warmen, flüssigen Zustand wurde das Gel in die Form gegossen, gemeinsam mit einem Kamm zur Taschenbildung. Der Kamm wurde entfernt, nachdem das Gel ausgekühlt und erstarrt war. In die Taschen konnte die Eingabe der Proben mit den Ladepuffern erfolgen. Außerdem wurde neben die Proben ein Größenstandard (Marker M) gesetzt. Die Anlage einer konstanten Spannung von 200 V, führte zum "Laufen" der Proben im Gel. Unter UV-Licht konnte die Fluoreszenz des Ethidiumbromids sichtbar gemacht werden, die Intensität der dargestellten Bande entspricht dabei der Größe des PCR-Produkts. Im Vergleich mit dem Größenstandard kann somit die Größe der PCR-Produkte ermittelt werden.

2.2.8 Reporter Gen Assay

Duale Reporter Systeme bestehen aus zwei Enzymen, sogenannten Luziferasen, meist Firefly, über welche das zu interessierende Gen gemessen wird, sowie Renilla, welche als interne Kontrolle dient und konstitutiv exprimiert wird (206).

Luziferasen erzeugen Licht über die Katalyse der Oxidation des Substrates Luziferin mit ATP und Sauerstoff (207). Firefly, ein Enzym des Leuchtkäfers *Photinus pyralis*, ist der am häufigsten genutzte biolumineszente Reporter (206). Durch die Katalyse der Oxidation von Luciferin zu Oxyluciferin erzeugt die Firefly Licht einer Wellenlänge zwischen 550 und 570 nm (also im visuellen grünen bis gelben Bereich), wobei mit Beginn der Reaktion ein plötzlicher Anstieg der Lumineszenz erfolgt, der über etwa 15 Minuten auf ein niedrig persistierendes Niveau abfällt. Renilla, genauer *Renilla reniformis*, eine Korallenart, reagiert auf taktile Stimulation mit der Emission grünen Lichts des visuellen Bereiches. Anders

als die Firefly katalysiert es nicht die Oxidation von Luziferin, sondern die von Coelenterazin zu Coelenteramid und erzeugt dabei Licht von 480 nm Wellenlänge (also im visuellen blauen Bereich). Bei beiden Reportergenen (luc2CP sowie Rluc) handelt es sich um cDNA, was posttranslationale Modifikationen erspart. Die Firefly wird mittels des Vektors pGL4.19[luc2CP/Neo] transfiziert und liegt auf diesem – wie die meisten Luziferasen, also auch die Renilla - downstream vom interessierenden Gen (206) (208). Dieser Vektor weist daneben noch einige Besonderheiten auf (208). Zum einen enthält er mehrere klonierbare Regionen. Außerdem sind ihm drei weitere Sequenzen zu eigen und zwar die aus Algen isolierte hCL1-Sequenz und eine hPEST-Sequenz, welche beide zu einer erhöhten Proteolyse führen, sowie eine Sequenz, die für eine Neomycin-Resistenz kodiert. Bei der PEST-Sequenz handelt es sich um Regionen mit hohem Vorkommen an Prolin, Glutamat, Serin, Threonin und in geringerem Umfang Aspartat (209). Die Sequenz führt – wie schon erwähnt - zu einem schnelleren Abbau des dazugehörigen Proteins. Insgesamt kommt es also zu einem schnellen Abbau der Firefly, was vor allem in Studien über den zirkadianen Rhythmus gewünscht ist, da der Reporter ansonsten über die Zeit stark akkumuliert (210). Zudem korreliert die Geschwindigkeit mit der ein Reporter auf Änderungen der Transkriptionsrate reagiert negativ mit seiner Stabilität (206). Instabile Reporter weisen also eine schnellere Änderung in Reaktion auf geänderte Transkriptionsraten auf. Für die Renilla steht der pRLSV40 Vektor zur Verfügung, in dem die Renilla durch einen viralen Promotor kontrolliert wird und konstitutiv aktiv ist. Es besteht auch die Möglichkeit, Renilla an ein ebenfalls konstitutiv exprimiertes Housekeeping Gene zu koppeln (206). SV40 ist das Simian Virus, welches zwei mRNAs exprimiert: Eine frühe und eine späte, jeweils mit einer unterschiedlichen Polyadenylierung (211). Dieser Vektor ist darauf ausgerichtet, eine möglichst hohe Rate an mRNA zu produzieren und zu stabilisieren. Daher enthält er neben dem frühen SV40-Promotor auch noch den Enhancer und erzeugt somit große Mengen an Luziferase-mRNA. Weiterhin besitzt er am 3' Ende des Rluc Gens das späte poly(A) Signal. Bei der späten Polyadenylierung wird, im Vergleich mit der frühen, viel mehr RNA produziert. Außerdem wird die Stabilität der RNA durch eine Polyadenylierung erhöht (212) (213) (214) (215) (216).

Während der experimentelle Reporter, hier also die Firefly, den zu untersuchenden Effekt – also die Aktivität des OX₂R-Promotors – widerspiegelt, stellt die Renilla als Kotransfektor die interne Kontrolle da und erzeugt durch ihre konstitutive Expression eine Baseline, deren Werte als Referenz auf die über die Firefly ermittelten Werte gemittelt werden können. Dies hat mehrere Vorteile: Zum einen

werden die Messungen unabhängiger von Messfehlern, die experimentell, zellulär oder transfektionell bedingt sein können. Zum anderen sinkt auch die Anfälligkeit für Schwankungen der Effizienz der Zellyse und Schwankungen der Pipettenvolumina. Da Firefly und Renilla unterschiedliche Enzymstrukturen und Substratansprüche haben, kann ihre Biolumineszenz im selben Gefäß gemessen werden (206).

Für die Messung wurde zunächst das gefriergetrocknete Luciferase Assay Substrat in Luciferase Assay Puffer II resuspendiert. Von dem 50X Stop & Glo Reagenz wurden 2,1 ml zu 105 ml Stop & Glo Puffer gegeben und 10 Sekunden gevortext. Am Gerät NanoDrop wurde eine 1-2 sekündige Verzögerung, sowie eine 5-10 sekündige Lesezeit eingestellt. Je Well wurden auf einer 96-Well Platte zunächst 20 µl des hergestellten Passivlysepuffer-Zell-Lysates vorgelegt, es wurden wieder wie bereits im Versuch pro Zeitpunkt drei Wells genutzt. Im Anschluß wurde die Platte im Gerät platziert. Hier erfolgte nun automatisch durch das Gerät nacheinander die Zugabe von jeweils 100 µl Luciferase Assay Reagenz, um die Firefly-Enzym-Reaktion zu starten und die Lumineszenz messen zu können. Zum Stoppen der Firefly- und Starten der Renilla-Aktivität erfolgte die Zugabe von jeweils 100 µl Stop & Glo Reagenz pro Well. Wiederum wurde die Lumineszenz gemessen. Die ermittelten Werte wurden dann jeweils einzeln auf den zeitgleich während der Messung ermittelten Einzelwert der Renilla bezogen.

2.3 Statistik

Alle erhobenen Daten wurden mittels GraphPad Prism 5 ausgewertet. Für jede Gruppe aller Versuche wurde je Zeitpunkt zunächst über die Varianzanalyse One Way ANOVA die Varianz der Werte innerhalb der Gruppe ermittelt. Für die Vergleiche der einzelnen Zeitpunkte untereinander wurden in allen Versuchen jeweils die Mittelwerte über Dunnett's Multiple Comparison Test verglichen. Hierbei wurden Werte innerhalb des 95%-Konfidenz-Intervalls ($P\text{-Wert} \leq 0.05$) als signifikant erachtet. Zusätzlich sind die Werte innerhalb des Konfidenz-Intervalls weiter abgestuft. Dies ist durch Sterne gekennzeichnet. Ein $P\text{-Wert} \leq 0.001$ ist wie folgt gekennzeichnet: „***“. Ein $P\text{-Wert} \leq 0.01$ ist wie folgt gekennzeichnet: „**“. Ein $P\text{-Wert} \leq 0.05$ ist wie folgt gekennzeichnet: „*“.

Für die Korrelationsanalysen gelten dieselben Kriterien.

Das Existenz eines circadianen Rhythmus wurde mit der Software CircWave v1.4 analysiert. Die CircWave Analysen wurden von Prof. Dr. rer. nat. Henrik Oster durchgeführt (217).

2.4 Bezugsparameter

In allen Versuchen wurde für jedes Gewebe die Expression der RNA, sowie der Housekeeping Genes GAPDH und β -Actin als mögliche Bezugsparameter mit untersucht.

β -Actin gehört zu den Housekeeping Genes, die als eben solche normalerweise keiner Regulation unterliegen. Ihre im allgemeinen konstitutive Expression ohne signifikante Schwankungen der Konzentrationen im Tagesverlauf stellt eine wichtige Baseline zur Verfügung. Hierüber besteht die Möglichkeit, Mess- und Pipettierfehler zu mindern sowie experimentell bedingte Schwankungen herauszurechnen. Inzwischen ist aber bekannt, dass zumindest GAPDH nicht frei von Regulationen ist (218). Für β -Actin wurde eine zirkadiane Regulation im Cortex, nicht jedoch im Hypothalamus nachgewiesen (219), was sich auch in den vorliegenden Werten bestätigt. Der Bezug sämtlicher ermittelter Werte auf ein reguliertes Housekeeping Gene oder regulierte RNA ändert die Aussage insgesamt jedoch nicht. Es kommt allenfalls zu geringfügigen Abweichungen zu einzelnen Zeitpunkten, die im Allgemeinen nicht signifikant sind. In Einzelfällen kam es zu signifikanten Abweichungen in der Größenordnung eines P-Wertes ≤ 0.05 , jedoch > 0.01 . Alle Ergebnisse im Folgenden wurden auf GAPDH bezogen.

3 Ergebnisse

3.1 Etablierung der PCR für die Primer mBmal-1, mG6PC, mGCK, mPer2, mNFIL-3 und mDBP

Zur Etablierung und Optimierung der Primer mBmal1, mG6PC und mGCK wurden Gele mit je einer Tasche für jede in der PCR eingesetzte Primerkonzentration (s. 2.2.6) hergestellt. Es zeigte sich in allen Fällen, dass die PCR mit dem in der Regel verwendeten Primer-Konzentrationsverhältnis 300:300 (5. Bande) eine deutliche Bande mit den erwarteten Größen von 101 bp (mBmal1), 120 bp (G6PC) und 121 bp (mGCK) der amplifizierten DNA ergab (Abbildung 5). Somit wurden für mBmal1, mG6PC und mGCK die Primer mit diesem Konzentrationsverhältnis für die nachfolgenden PCRs verwendet.

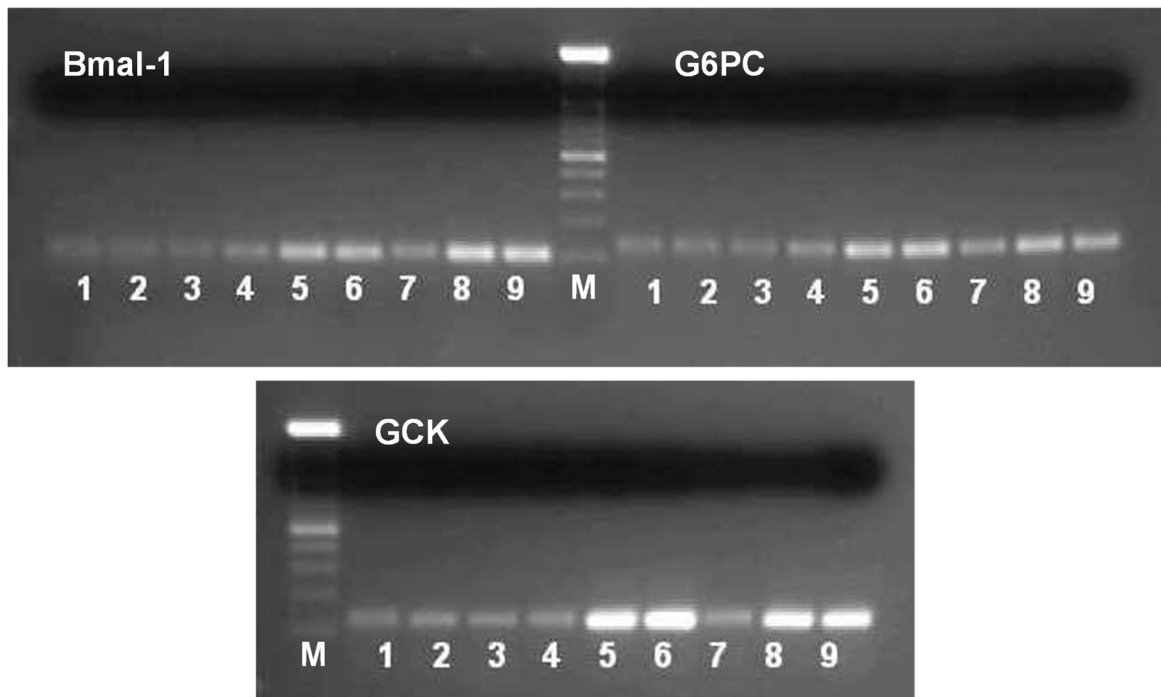


Abbildung 5: Agarose-Gelelektrophorese für die Primer mBmal1, mG6PC und mGCK. Die Nummerierung 1-9 der Banden entspricht den unter 2.2.6 angegebenen Kombinationen der jeweiligen Primerkonzentration. M = Marker

Für die Primer mPer2, mNFIL-3 und mDBP wurden Gele mit jeweils nur einer Tasche pro Primer gegossen und ausschließlich die Konzentration 300:300 gemessen. Die Intensitäten der jeweiligen Banden entsprachen für alle drei Primerpaare der erwarteten Größe von 113 bp (mPer2), 110 bp (mNFIL-3) und 119 bp (mDBP) (Abbildung 6). Somit wurden diese Primer in den nachfolgenden Analysen ebenfalls in dieser Konzentration verwendet.

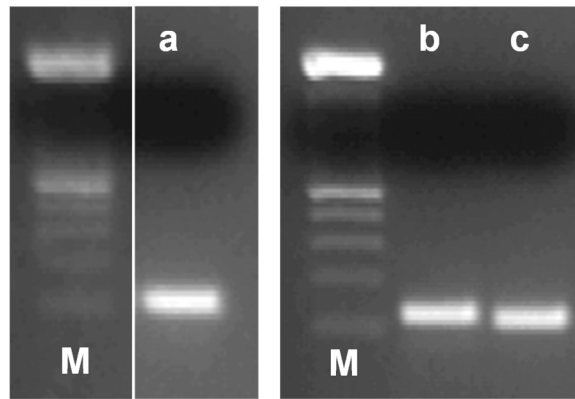


Abbildung 6: Agarose-Gelelektrophorese für den Primer Per2 (a) mNFIL-3 (b) und mDBP (c). M = Marker

3.2 Tageszeitabhängige Expression des Präpro-Orexins, der Orexin-Rezeptorsubtypen sowie der Uhrengene

Die Genexpression des Präpro-Orexins, der Orexin-Rezeptorsubtypen OX₁R und OX₂R sowie der Uhrengene bzw. Enzyme (Leber) wurden in Cortex, Hypothalamus, Leber und Nebenniere männlicher Mäuse zu unterschiedlichen Tageszeitpunkten während der Hell- und Dunkelfase untersucht. Zudem wurde die Genexpression während einer 24-stündigen Dunkelfase sowie anschließend 1 Stunde nach dem automatischen Lichteinschalten analysiert.

3.2.1 Hell-Dunkel-Expression (L/D)

Zur Analyse einer möglichen zirkadianen Rhythmik wurde die mRNA-Expression folgender Gene alle 4 Stunden mit der qPCR über 24 Stunden untersucht: OX₁R, OX₂R, PPO, Bmal1, Per2, NIFL-3 und DBP. Mit der Varianzanalyse wurde untersucht, ob signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Zeitpunkten bestehen. Zudem wurde getestet, ob sich die während der Hell-Phase erhobenen Daten signifikant von den während der Dunkel-Phase erhobenen Daten unterscheiden. Mit einer anschließenden CircWave-Analyse wurde untersucht, inwieweit für die Expression der jeweiligen Gene ein signifikanter 24-Rhythmus vorliegt. Obwohl sich die 0h und 24h Zeitpunkte im Zeitverlauf entsprechen, wurde teilweise eine Diskrepanz zwischen den Werten beobachtet. Daher wurden für die Varianz- und CircWave-Analysen die jeweiligen 24h-Wert nicht berücksichtigt.

3.2.1.1 Cortex

Im murinen Cortex wurden die mRNA-Spiegel der Gene OX_1R , OX_2R , $Bmal1$, $Per2$, $NIFL-3$ und DBP mit der qPCR untersucht (Abbildung 7). Für jedes Gen wurde die Höhe der Expression während der Hell- mit der Höhe der Expression während der Dunkelphase ermittelt (Abbildung 8).

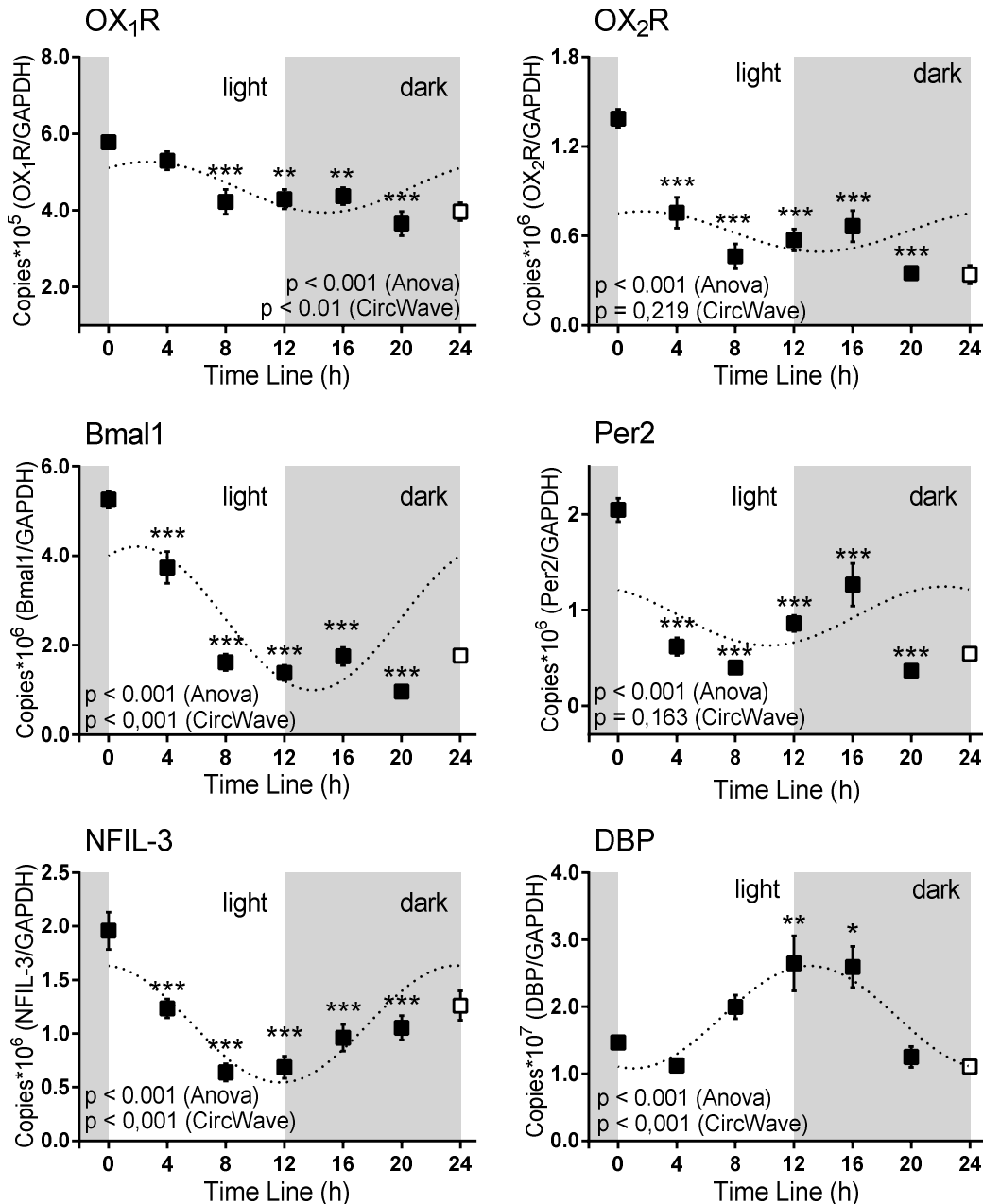


Abbildung 7: OX_1R , OX_2R , $Bmal1$, $Per2$, $NIFL-3$ und DBP mRNA-Expression im Maus-Cortex im Verlauf der 24h Hell-Dunkel-Phase. Dargestellt ist der Mittelwert $\pm$ SEM, * - $p < 0,05$; ** - $p < 0,01$; *** - $p < 0,001$ im Vergleich zum 0h Wert; 5 – 6 Tiere pro Gruppe. Sowohl bei der Varianzanalyse als auch der CircWave-Analyse wurde der 24h-Wert aufgrund der jeweils beobachteten Diskrepanz zum 0h-Wert nicht berücksichtigt.

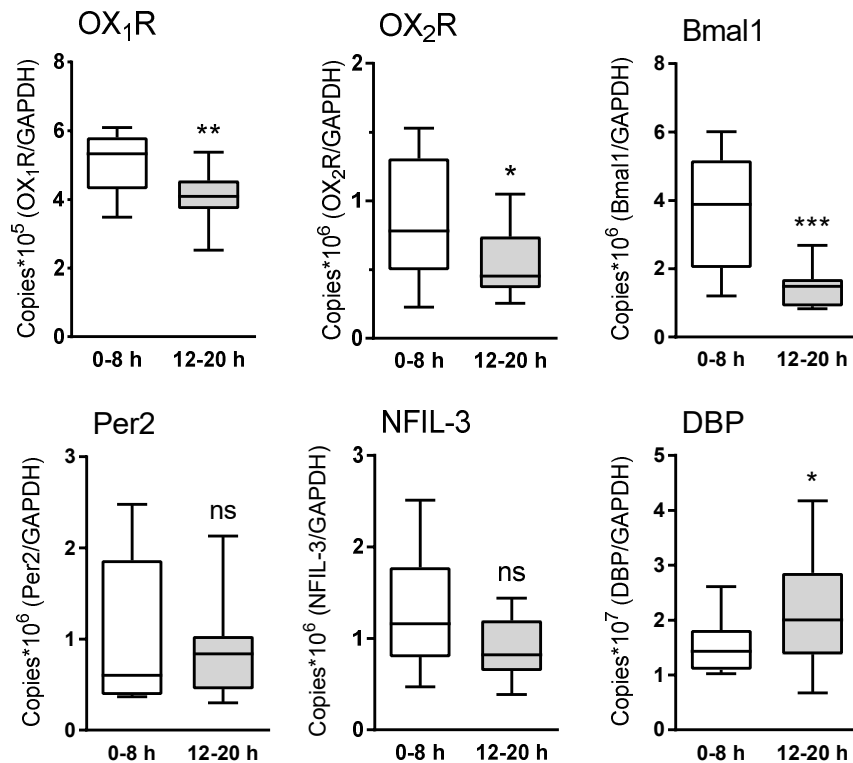


Abbildung 8: OX₁R, OX₂R, Bmal1, Per2, NFIL-3 und DBP mRNA-Expression im Maus-Cortex im Verlauf der 24h Hell-Dunkel-Phase. Dargestellt sind das Minimum, das 25. Perzentil, der Median, das 75. Perzentil und das Maximum, * - $p < 0,05$; ** - $p < 0,01$; *** - $p < 0,001$ im Vergleich zum 0h Wert; 5 – 6 Tiere pro Gruppe mit jeweils 3 Zeitpunkten (0h-4h-8h und 12h-16-24h).

Die Varianzanalyse zeigt eine signifikante Regulation des **OX₁R** (Abbildung 7), wobei diese insgesamt über den gesamten Zeitraum von 24 Stunden abfällt. Die CircWave-Analyse ergab eine signifikante zirkadiane Regulation der Expression im 24 Stunden-Rhythmus. Während der zweiten Tageshälfte (Dunkelphase) waren die OX₁R mRNA-Level signifikant reduziert (Abbildung 8).

Der **OX₂R** zeigt einen ähnlichen Kurvenverlauf wie der OX₁R mit einer signifikanten Regulation der Genexpression (Abbildung 7) und reduzierten mRNA-Levels in der Dunkelphase (Abbildung 8). Allerdings zeigte die CircWave-Analyse keinen signifikanten 24h-Rhythmus für die OX₂R Expression (Abbildung 7). **Bmal1** wird am höchsten zu Beginn der Lichtphase exprimiert (Abbildung 7). Am Übergang in die Dunkelphase ist die Expression erheblich niedriger, dies hält über die gesamte Dunkelphase an. Die Varianzanalyse und die CircWave-Analyse zeigen jeweils eine signifikante Regulation. Während der Dunkelphase waren die mRNA-Level von Bmal1 signifikant reduziert (Abbildung 8). Die Expression des Uhrengens **Per2** fällt zu Beginn der Lichtphase stark ab (Abbildung 7). Ein zweites Peak zeigt sich bei 16h, hier wird allerdings auch eine hohe

3 Ergebnisse

Varianz verzeichnet. Während des Überganges in die Dunkelphase zeigt sich ein konstanter Anstieg der Expression. Die Varianzanalyse zeigt keine signifikante Regulation an, während die CircWave-Analyse hier signifikante Werte verzeichnet. Die mRNA-Level zeigen in der Dunkelphase keinen signifikanten Abfall gegenüber der Lichtphase (Abbildung 8). **NFIL-3** zeigt einen ähnlichen Expressionsverlauf wie **Bmal1** (Abbildung 7). Der nächtliche Anstieg ist allerdings größer. Insgesamt ist hier die Regulation sowohl in der Varianzanalyse als auch der CircWave-Analyse signifikant. Der Vergleich der mRNA-Level der beiden Phasen zeigt jedoch keinen signifikanten nächtlichen Abfall (Abbildung 8). Invers zu den vorgenannten Kurvenverläufen zeigt sich der sowohl in der Varianz- als auch der CircWave-Analyse signifikante Kurvenverlauf von **DBP** (Abbildung 7). Zu Beginn der Lichtphase findet sich eine niedrige Expression mit konsekutiv folgendem Anstieg im 24h-Verlauf. Zum Ende der Nacht fällt die Expression wieder ab. Aufgrund dieses Verlaufes findet sich im direkten Vergleich der mRNA-Level nur bei diesem Gen ein signifikanter Anstieg in der Dunkelphase (Abbildung 8).

3.2.1.2 Hypothalamus

Im murinen Hypothalamus wurden die mRNA-Spiegel der Gene OX_1R , OX_2R , $Bmal1$, $Per2$, $NIFL-3$ und DBP (Abbildung 9) sowie PPO (Abbildung 11) mit der qPCR untersucht. Für jedes Gen wurde die Höhe der Expression während der Hell- mit der Höhe der Expression während der Dunkelfase ermittelt (Abbildung 10).

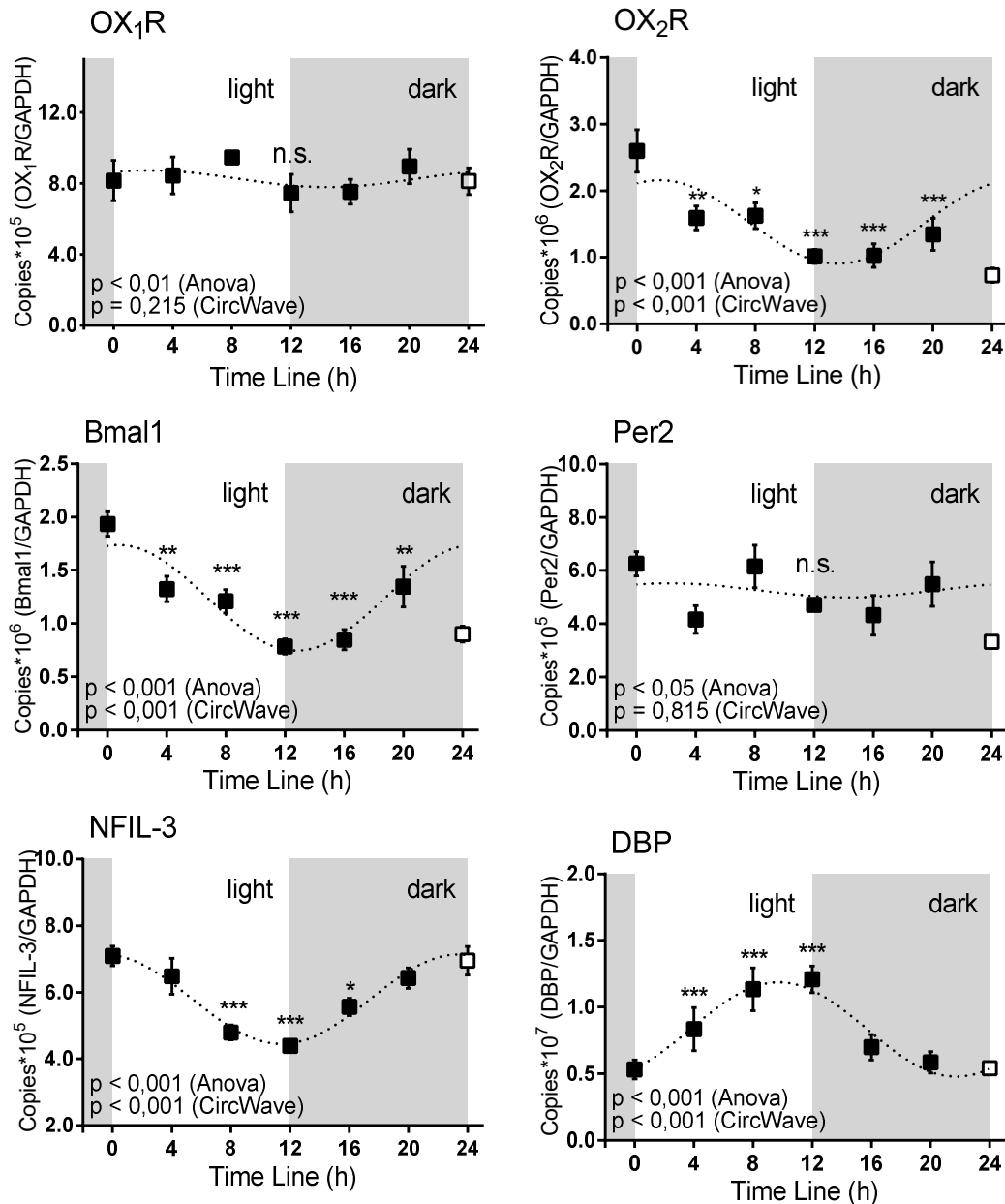


Abbildung 9: OX_1R , OX_2R , $Bmal1$, $Per2$, $NIFL-3$ und DBP mRNA-Expression im Maus-Hypothalamus im Verlauf der 24 h Hell-Dunkel-Phase. Dargestellt ist der Mittelwert $\pm$ SEM, * - $p < 0,05$; ** - $p < 0,01$; *** - $p < 0,001$ im Vergleich zum 0h Wert; 5 – 6 Tiere pro Gruppe. Sowohl bei der Varianzanalyse als auch der CircWave-Analyse wurde der 24h-Wert aufgrund der jeweils beobachteten Diskrepanz zum 0h-Wert nicht berücksichtigt.

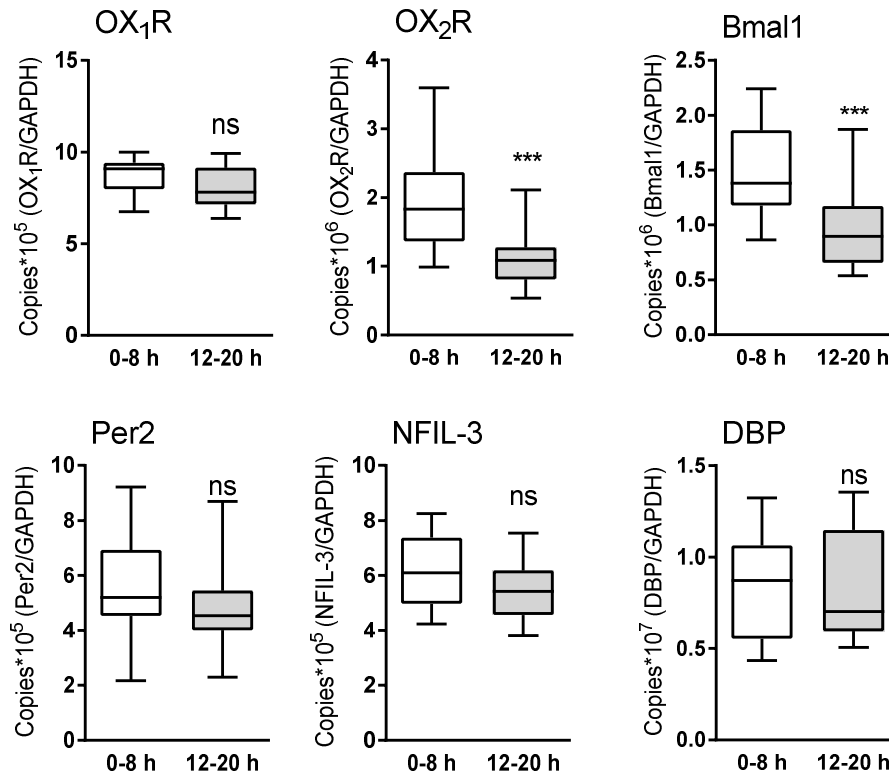


Abbildung 10: OX₁R, OX₂R, Bmal1, Per2, NFIL-3 und DBP mRNA-Expression im Maus-Hypothalamus im Verlauf der 24h Hell-Dunkel-Phase. Dargestellt sind das Minimum, das 25. Perzentil, der Median, das 75. Perzentil und das Maximum, * - p < 0,05; ** - p < 0,01; *** - p < 0,001 im Vergleich zum 0h Wert; 5 – 6 Tiere pro Gruppe mit jeweils 3 Zeitpunkten (0h-4h-8h und 12h-16-24h).

OX₁R zeigt in der Varianzanalyse keine signifikante Regulation (Abbildung 9). Auch in der CircWave-Analyse konnte keine Signifikanz gefunden werden. Erwartungsgemäß zeigte auch der Vergleich der mRNA-Level keine signifikanten Unterschiede (Abbildung 10). Hingegen zeigt sich in der Varianz- und CircWave-Analyse des **OX₂R** jeweils eine signifikante Regulation (Abbildung 9). Die Kurve verläuft ähnlich der von Bmal1, über 24 Stunden fällt die Genexpression zunächst ab, um zum Ende der Dunkelphase wieder anzusteigen. Auch im Vergleich der mRNA-Level zwischen Hell- und Dunkelphase verzeichnet sich ein signifikanter Abfall der nächtlichen Expression (Abbildung 10). **Bmal1** zeigt eine signifikante Regulation über 24 Stunden in der Varianzanalyse (Abbildung 9). Die höchste Expression tritt zu Beginn der Lichtphase auf, ein zweiter Peak findet sich gegen Ende der Dunkelphase. Der Verlauf der Expression ist ähnlich dem des OX₂R und entgegengesetzt zu PPO (siehe unten). Während der Dunkelphase ist die Expression der mRNA-Level gegenüber der Lichtphase signifikant vermindert (Abbildung 10). Die Genexpression von **Per2** zeigt zu fast allen Zeitpunkten starke Standardabweichungen. Weder in der Varianz- noch in der CircWave-Analyse konnte eine signifikante Regulation

3 Ergebnisse

festgestellt werden. Folglich lässt sich im direkten Vergleich der mRNA-Level ebenso keine signifikante Regulation feststellen (Abbildung 10). Der Kurvenverlauf von **NFIL-3** weist zwei Peaks auf, was nach 24 Stunden zu einer ähnlich hohen Gen-Expression wie zu Beginn (0h) führt (Abbildung 9). Die Regulation zeigt sich signifikant, in beiden Analysen. Der direkte mRNA-Vergleich zeigt allerdings keine signifikante Änderung der Expression (Abbildung 10). Sowohl die Varianz- als auch die CircWave-Analyse zeigen eine signifikante Regulation von **DBP** (Abbildung 9). Der Verlauf der Expression über 24 Stunden zeigt sich entgegengesetzt zu dem von NFIL-3 (Abbildung 10).

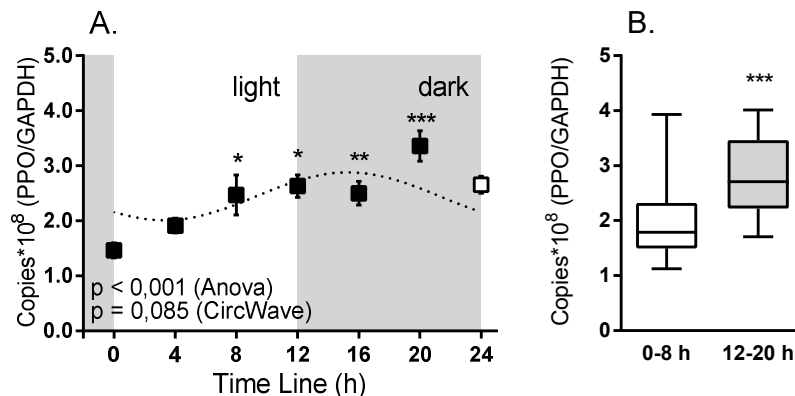


Abbildung 11: A: PPO mRNA-Expression im Maus-Hypothalamus im Verlauf der 24 h Hell-Dunkel-Phase. Dargestellt ist der Mittelwert $\pm$ SEM, * - $p < 0,05$; ** - $p < 0,01$; *** - $p < 0,001$ im Vergleich zum 0h Wert; 5 – 6 Tiere pro Gruppe. Sowohl bei der Varianzanalyse als auch der CircWave-Analyse wurde der 24h-Wert aufgrund der jeweils beobachteten Diskrepanz zum 0h-Wert nicht berücksichtigt. **B:** PPO mRNA-Expression im Maus-Hypothalamus im Verlauf der 24h Hell-Dunkel-Phase. Dargestellt sind das Minimum, das 25. Perzentil, der Median, das 75. Perzentil und das Maximum, * - $p < 0,05$; ** - $p < 0,01$; *** - $p < 0,001$ im Vergleich zum 0h Wert; 5 – 6 Tiere pro Gruppe mit jeweils 3 Zeitpunkten (0h-4h-8h und 12h-16-24h).

PPO wird im Hypothalamus grob entgegengesetzt zum **OX₂R** exprimiert (Abbildung 11). Während die Varianzanalyse eine signifikante Regulation aufzeigt, kann dies mittels CircWave-Analyse nicht bestätigt werden. Im direkten Vergleich der mRNA-Expression zeigt sich ein signifikanter Anstieg der Expression von PPO während der Dunkelphase.

3.2.1.3 Leber

In der murinen Leber wurden die mRNA-Spiegel der Gene G6PC, GCK, Bmal1, Per2, NIFL-3 und DBP mit der qPCR untersucht (Abbildung 12). Für jedes Gen wurde die Höhe der Expression während der Hell- mit der Höhe der Expression während der Dunkelphase ermittelt (Abbildung 13).

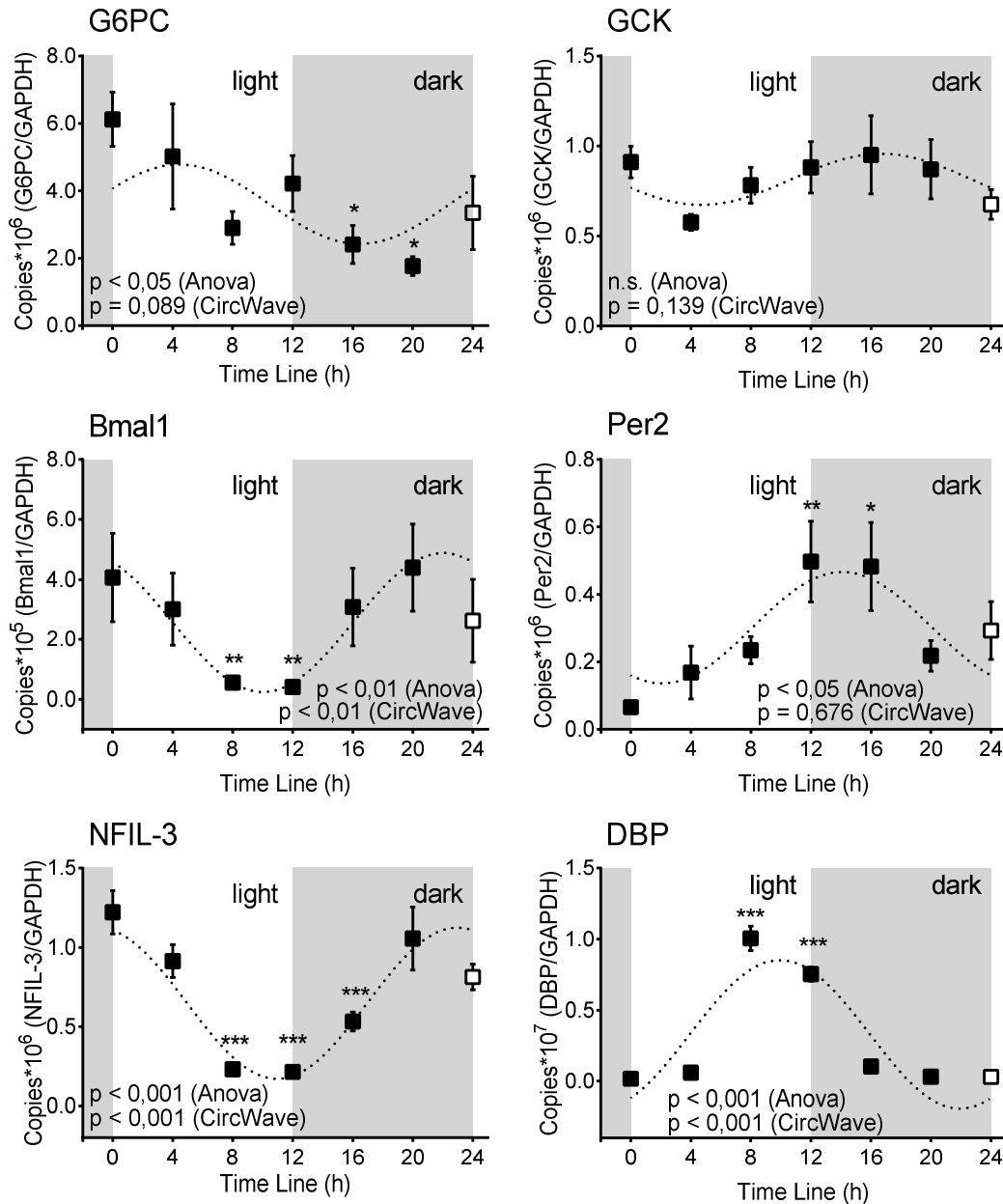


Abbildung 12: G6PC, GCK, Bmal1, Per2, NIFL-3 und DBP mRNA-Expression in der Maus-Leber im Verlauf der 24 h Hell-Dunkel-Phase. Dargestellt ist der Mittelwert $\pm$ SEM, * - $p < 0,05$; ** - $p < 0,01$; *** - $p < 0,001$ im Vergleich zum 0h Wert; 5 – 6 Tiere pro Gruppe. Sowohl bei der Varianzanalyse als auch der CircWave-Analyse wurde der 24h-Wert aufgrund der jeweils beobachteten Diskrepanz zum 0h-Wert nicht berücksichtigt.

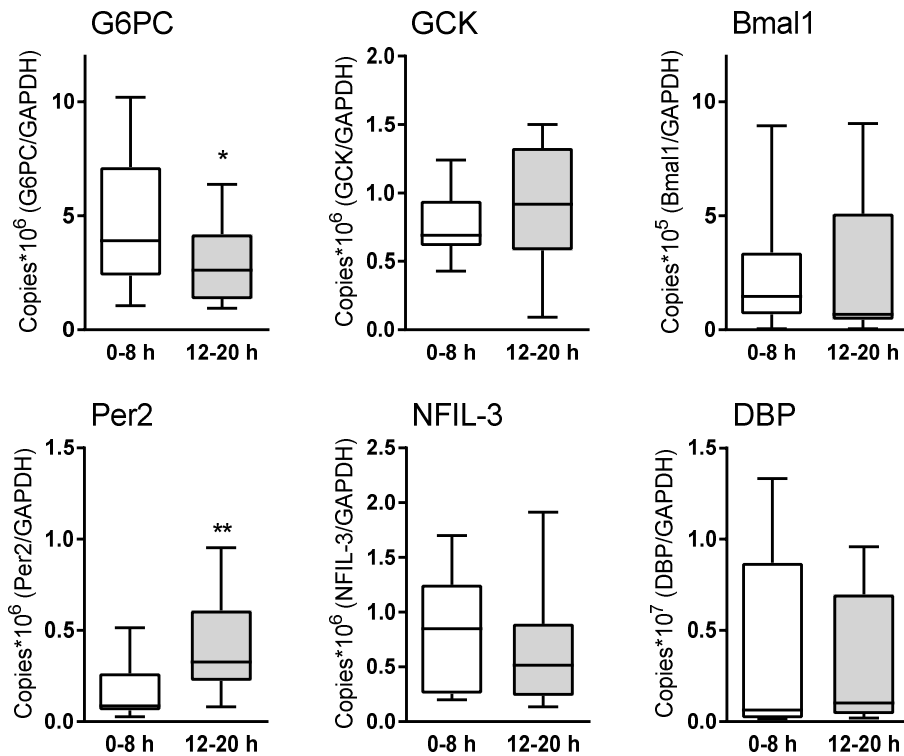


Abbildung 13: G6P, GCK, Bmal1, Per2, NIFL-3 und DBP mRNA-Expression im Maus-Cortex im Verlauf der 24h Hell-Dunkel-Phase. Dargestellt sind das Minimum, das 25. Perzentil, der Median, das 75. Perzentil und das Maximum, * - $p < 0,05$; ** - $p < 0,01$; *** - $p < 0,001$ im Vergleich zum 0h Wert; 5 – 6 Tiere pro Gruppe mit jeweils 3 Zeitpunkten (0h-4h-8h und 12h-16-24h).

G6PC zeigt nur eine geringfügige Regulation in der Varianzanalyse (Abbildung 12). Mittels CircWave-Analyse kann eine Regulation nicht bestätigt werden. Es sind starke Standardabweichung zu drei Zeitpunkten (0h, 4h, 24h) zu beobachten. Im direkten Vergleich findet sich zwar eine signifikante Verminderung der mRNA-Expression während der Dunkelphase, diese ist jedoch gering (Abbildung 13). Demgegenüber ist **GCK** in der Leber überhaupt nicht reguliert (Abbildung 12). Auch der direkte Vergleich ist nicht signifikant (Abbildung 13). **Bmal1** weist eine hohe Standardabweichung zu den Zeitpunkten 0h, 4h und 24h auf (Abbildung 12). Es besteht ein signifikanter Abfall der Expression zum Ende der Lichtphase. Auch die CircWave-Analyse zeigt eine signifikante Regulation auf. Im direkten Licht-/Dunkelvergleich kann kein signifikanter Unterschied gefunden werden (Abbildung 13). Wie die anderen gemessenen Gene in der Leber zeigt auch **Per2** starke Standardabweichungen zu einzelnen Zeitpunkten (12h und 16h) (Abbildung 12). Nach einem signifikanten Anstieg der Genexpression über den Übergang zur Dunkelphase hinweg folgt bei 16h ein Abfall der Expression. Die Expression stellt sich grob entgegengesetzt zu der von Bmal1 dar. Mittels CircWave-Analyse kann keine signifikante Regulation nachgewiesen werden. Im direkten Vergleich kann aber ein

3 Ergebnisse

signifikanter Anstieg der mRNA-Expression in der Dunkelphase dargestellt werden. **NFIL-3** zeigt einen signifikanten Abfall der Expression von 0h auf 12h, mit nachfolgendem Wiederanstieg (Abbildung 12). Auch hier treten erhöhte Standardabweichung (0h, 4h, 20h und 24h) auf. Der Gesamtverlauf der Gen-Expression ähnelt dem von *Bmal1*. Die CircWave-Analyse zeigt eine signifikante Regulation auf. Ein signifikanter nächtlicher Anstieg oder Abfall der Expression fehlt jedoch (Abbildung 13). Einen zu NFIL-3 inversen Kurvenverlauf mit signifikanter Regulation weist **DBP** auf (Abbildung 12). Zu Beginn des 24h-Zyklus findet sich annähernd ein 4-stündiges Plateau auf, worauf ein starker, signifikanter Anstieg zwischen 4h und 8h folgt. Im Übergang zur Dunkelphase fällt die Expression stark ab und erreicht bei 20h beinahe seine Ausgangskonzentration. Anders als bei *Per2*, liegt das Peak von DBP in der Hell-, nicht in der Dunkelphase. Allerdings findet sich auch hier keine signifikante Abweichung der mRNA im direkten Vergleich (Abbildung 13).

3.2.1.4 Nebenniere

In der murinen Nebenniere wurden die mRNA-Spiegel der Gene OX_1R , OX_2R , $Bmal1$, $Per2$, $NIFL-3$ und DBP mit der qPCR untersucht (Abbildung 14). Für jedes Gen wurde die Höhe der Expression während der Hell- mit der Höhe der Expression während der Dunkelphase ermittelt (Abbildung 15).

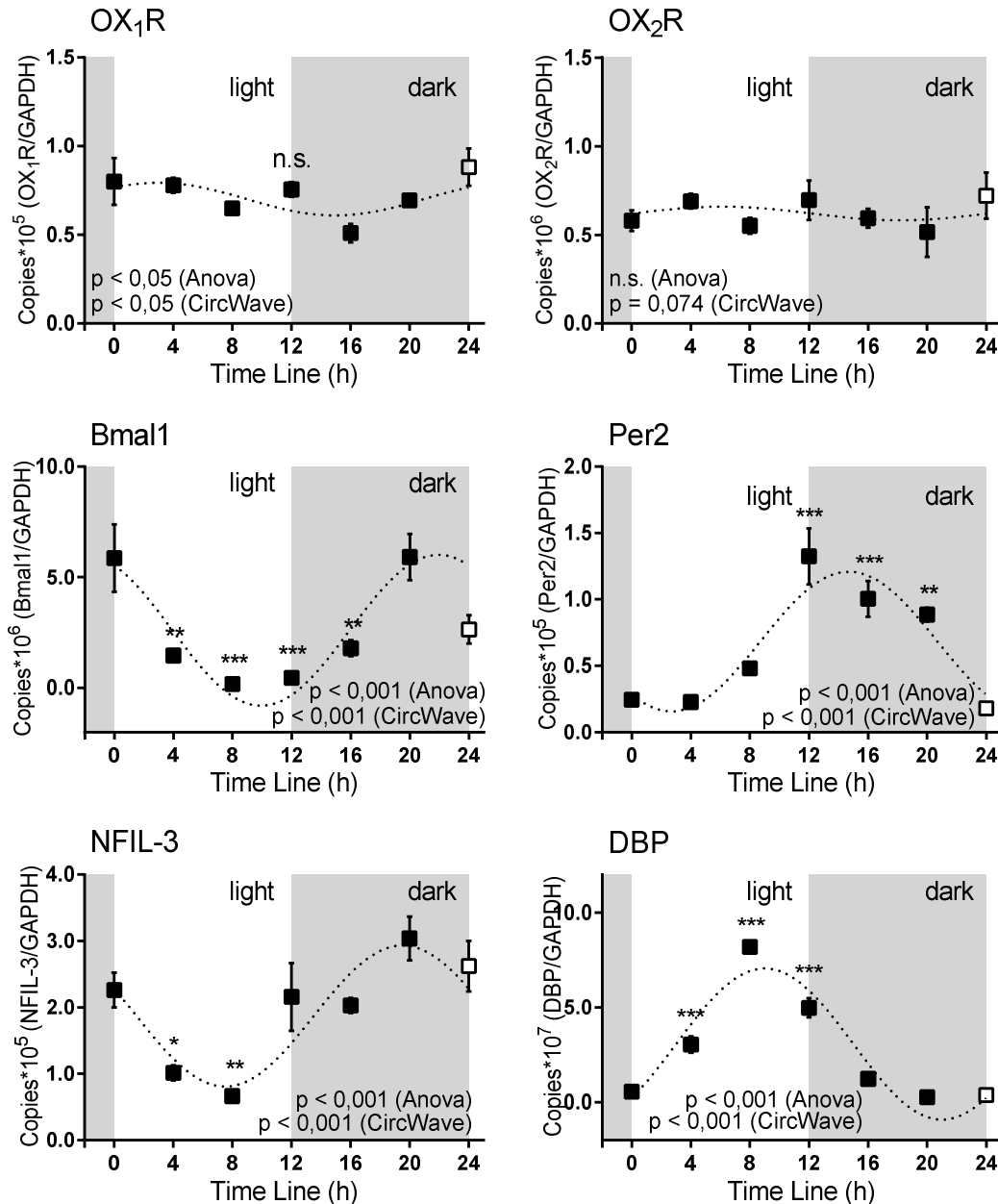


Abbildung 14: OX_1R , OX_2R , $Bmal1$, $Per2$, $NIFL-3$ und DBP mRNA-Expression in der Nebenniere der Maus im Verlauf der 24 h Hell-Dunkel-Phase. Dargestellt ist der Mittelwert $\pm$ SEM, * - $p < 0,05$; ** - $p < 0,01$; *** - $p < 0,001$ im Vergleich zum 0h Wert; 5 – 6 Tiere pro Gruppe. Sowohl bei der Varianzanalyse als auch der CircWave-Analyse wurde der 24h-Wert aufgrund der jeweils beobachteten Diskrepanz zum 0h-Wert nicht berücksichtigt.

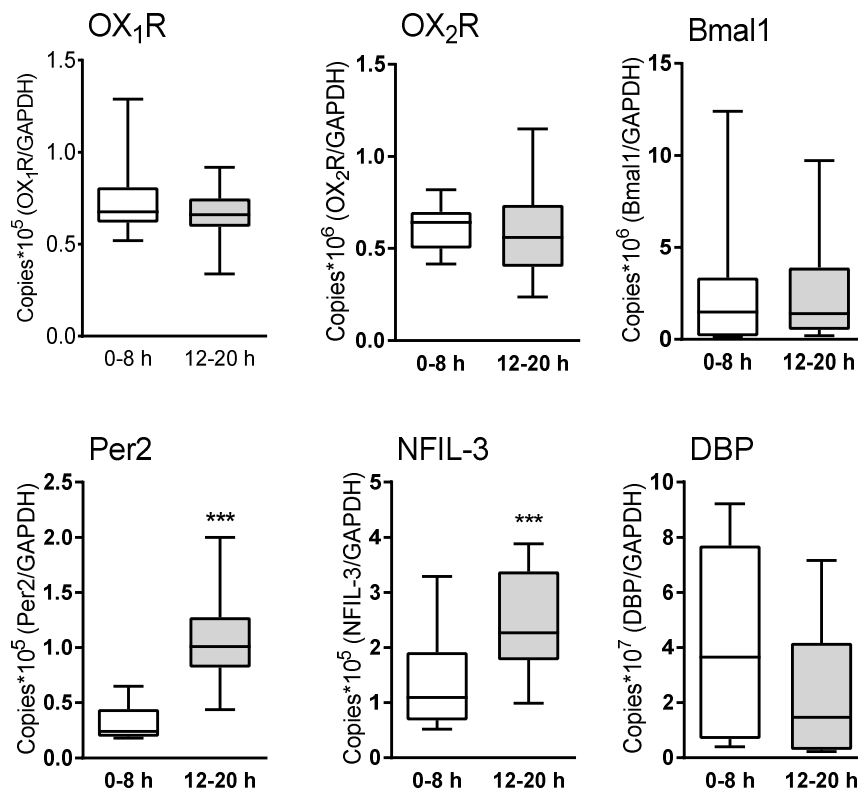


Abbildung 15: OX₁R, OX₂R, PPO, Bmal1, Per2, NFIL-3 und DBP mRNA-Expression in der Nebenniere der Maus im Verlauf der 24h Hell-Dunkel-Phase. Dargestellt sind das Minimum, das 25. Perzentil, der Median, das 75. Perzentil und das Maximum, * - p < 0,05; ** - p < 0,01; *** - p < 0,001 im Vergleich zum 0h Wert; 5 – 6 Tiere pro Gruppe mit jeweils 3 Zeitpunkten (0h-4h-8h und 12h-16-24h).

OX₁R und **OX₂R** zeigen in der Nebenniere keine Regulation (Abbildung 14). Auch im direkten Vergleich der Hell-/Dunkelphase zeigt sich keine signifikante Abweichung der mRNA-Expression (Abbildung 15). **Bmal1** verzeichnet einen starken, signifikanten Abfall der Expression von 0h auf 8h (Abbildung 14). Am Übergang zur Dunkelphase erfolgt ein starker Wiederanstieg bis 20h. Die CircWave-Analyse zeigt eine signifikante Regulation des Gens, im direkten Hell-/Dunkelvergleich lässt sich kein signifikanter Unterschied finden (Abbildung 15). **Per2** zeigt eine zu Bmal1 phasenverschobene Kurve mit einem starken Anstieg der Gen-Expression bereits ab Mitte der Lichtphase (Abbildung 14). Varianz- und CircWave-Analyse weisen eine signifikante Regulation nach, im Hell-/Dunkel-Vergleich findet sich ein signifikanter Anstieg der Expression während der Dunkelphase (Abbildung 15). In seinem signifikant regulierten Kurvenverlauf ähnelt **NFIL-3** Bmal1, die Kopienzahl ist allerdings wesentlich geringer (Abbildung 14). Während der Dunkelphase kommt es zu einem signifikanten Anstieg der Genexpression (Abbildung 15). Die Kurve von **DBP** stellt sich einerseits phasenverschoben zu der von Per2 dar, andererseits zeigt sie einen inversen Verlauf zu Bmal1 und NFIL-3 (also eine komplette

Phasenverschiebung) (Abbildung 14). Das Gen ist ausgeprägt reguliert. Ein signifikanter Unterschied zwischen Hell- und Dunkelphase ist nicht nachweisbar (Abbildung 15).

3.2.2 Dunkel-Dunkel-Expression

Zur Analyse einer möglichen lichtunabhängigen Rhythmik wurde die mRNA-Expression folgender Gene alle 4h mit der qPCR über 24h untersucht: *OX₁R*, *OX₂R*, *PPO*, *Bmal1*, *Per2*, *NIFL-3* und *DBP*. Mit der Varianzanalyse wurde untersucht, ob signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Zeitpunkten bestehen. Obwohl die 0h und 24h Zeitpunkte sich im Zeitverlauf entsprechen, wurde teilweise eine Diskrepanz zwischen den Werten beobachtet. Daher wurden für die Varianz-Analysen die jeweiligen 24h-Werte nicht berücksichtigt.

3.2.2.1 Cortex

Im murinen Cortex wurden wie bei der vorangegangenen L/D-Expression die mRNA-Spiegel der Gene *OX₁R*, *OX₂R*, *Bmal1*, *Per2*, *NIFL-3* und *DBP* mit der qPCR untersucht (Abbildung 16). Die Genexpressionen sind im Vergleich zur L/D-Expression insgesamt weniger ausgeprägt, zum Teil fehlt eine Regulation gänzlich.

Der ***OX₁R*** und der ***OX₂R*** sind nicht reguliert, es zeigen sich keinerlei signifikante Abweichungen. Die D/D-Expression ist insgesamt geringer als die L/D-Expression. Sogar das Uhrengen ***Bmal1*** zeigt nur eine geringfügige Regulation obwohl es normalerweise reguliert ist. ***Per2*** ist im Cortex, obwohl ein Uhrengen, gar nicht reguliert. Die Expression von ***NFIL-3*** zeigt einen konstanten und signifikanten Abfall zwischen 0h und 12h. Die Expression steigt bis 24h wieder an. ***DBP*** verzeichnet ein Plateau zwischen 0h und 4h, danach erfolgt ein signifikanter Anstieg auf ein weiteres Plateau zwischen 8h und 12h. Der Verlauf der Expression ist ähnlich wie bei der L/D-Expression, wobei dort kein Plateau zu beobachten ist.

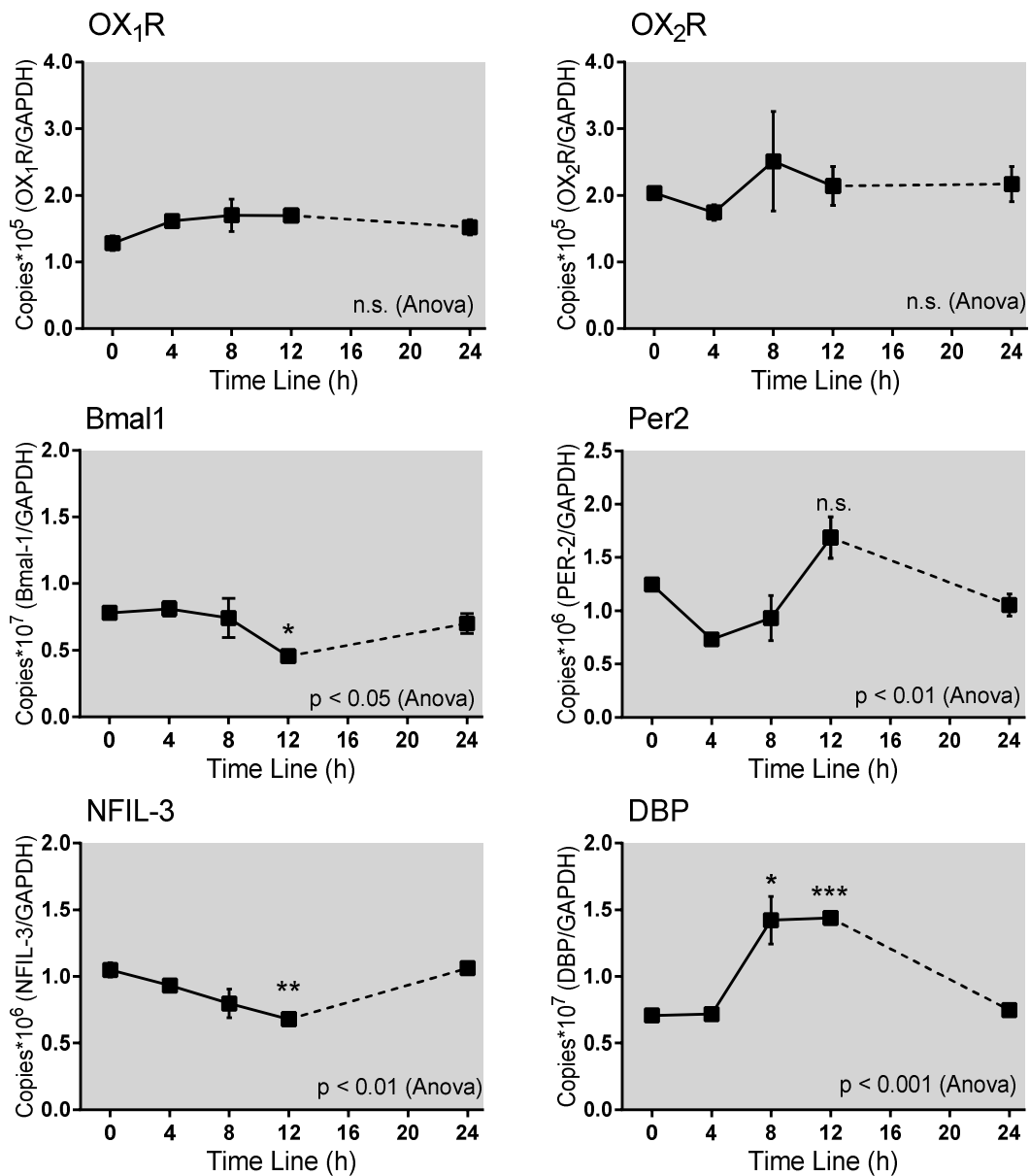


Abbildung 16: OX₁R, OX₂R, Bmal1, Per2, NFIL-3 und DBP mRNA-Expression im Maus-Cortex im Verlauf der 24h Dunkel-Dunkel-Phase. Dargestellt ist der Mittelwert $\pm$ SEM, * - p < 0,05; ** - p < 0,01; *** - p < 0,001 im Vergleich zum 0h Wert; 5 – 6 Tiere pro Gruppe.

3.2.2.2 Hypothalamus

Im murinen Hypothalamus wurden wie bei der vorangegangenen L/D-Expression die mRNA-Spiegel der Gene OX_1R , OX_2R , $Bmal1$, $Per2$, $NIFL-3$ und DBP (Abbildung 17) sowie PPO (Abbildung 18) mit der qPCR untersucht. Wie schon im Cortex sind im Vergleich zur L/D-Expression die Gene insgesamt weniger ausgeprägt reguliert, zum Teil fehlt eine Regulation gänzlich.

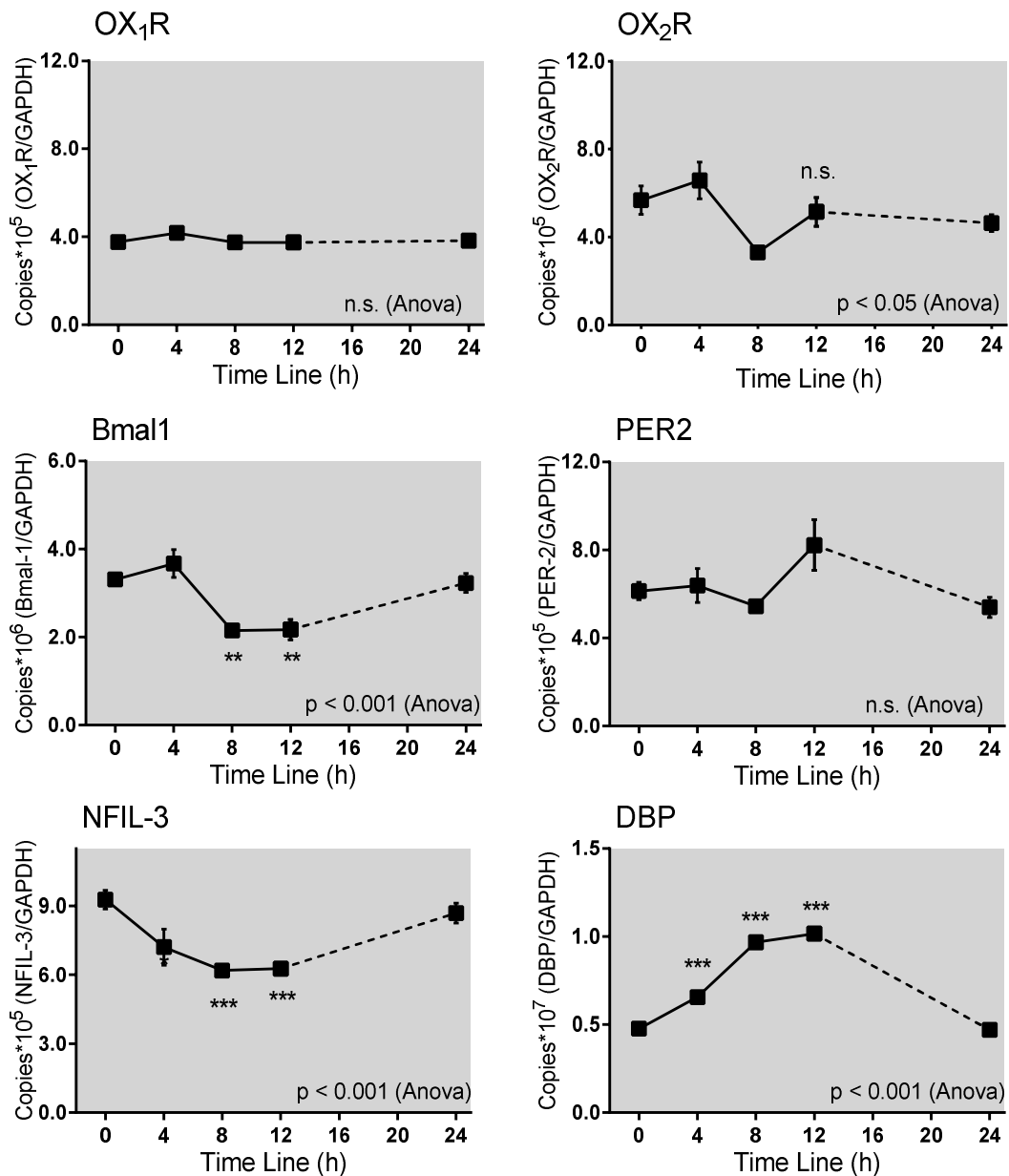


Abbildung 17: OX_1R , OX_2R , $Bmal1$, $Per2$, $NIFL-3$ und DBP mRNA-Expression im Maus-Hypothalamus im Verlauf der 24h Dunkel-Dunkel-Phase. Dargestellt ist der Mittelwert $\pm$ SEM, * - p < 0,05; ** - p < 0,01; *** - p < 0,001 im Vergleich zum 0h Wert; 5 – 6 Tiere pro Gruppe.

Wie bereits im Cortex festgestellt, zeigt auch im Hypothalamus weder der **OX_1R** noch der

3 Ergebnisse

OX₂R eine messbare Regulation. Weiterhin ist für beide Gene auch die Höhe der Expression insgesamt geringer bei der L/D-Expression. **Bmal1** hingegen ist reguliert. Der Kurvenverlauf ähnelt dem des OX₂R. Die Anzahl der Genkopien ist ähnlich hoch bei der L/D-Expression. Das zweite gemessene Uhrgen, **Per2**, ist im Hypothalamus jedoch nicht reguliert. **NFIL-3** verzeichnet einen konstanten und signifikanten Abfall der Expression zwischen 0h und 8h, danach folgt ein Wiederanstieg. Es ist somit auch in Dunkelheit reguliert. Der Verlauf ähnelt dem der L/D-Expression, genauso wie die Anzahl der Genkopien. Gegenüber D/D DBP verläuft die Gen-Expression entgegengesetzt. Der gegenüber NFIL-3 inverse Kurvenverlauf von **DBP** ist ebenfalls signifikant, somit ist DBP ebenfalls reguliert. Verlauf und Anzahl der Gen-Kopien ähneln, wie bei NFIL-3, der L/D-Expression.

PPO zeigt eine schwache Regulation (Abbildung 18). Es findet sich eine signifikant höhere Expression zum Zeitpunkt 12h. Diese Erhöhung zeigt sich auch bei der L/D-Expression, in dem die Kopienzahl ebenfalls im Bereich 10^8 liegt.

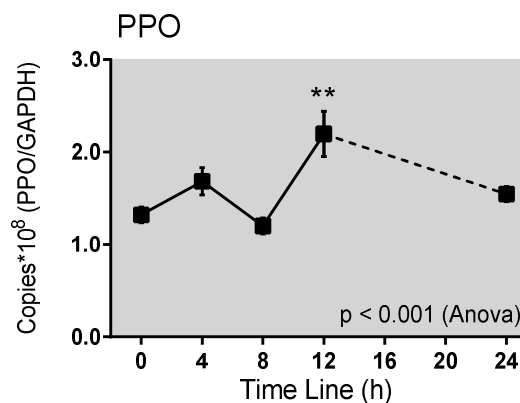


Abbildung 18: PPO mRNA-Expression im Maus-Hypothalamus im Verlauf der 24h Dunkel-Dunkel-Phase. Dargestellt ist der Mittelwert $\pm$ SEM, * - $p < 0,05$; ** - $p < 0,01$; *** - $p < 0,001$ im Vergleich zum 0h Wert; 5 – 6 Tiere pro Gruppe

3.2.2.3 Leber

Auch in der murinen Leber wurden wie bei der vorangegangenen L/D-Expression die mRNA-Spiegel der Gene G6PC, GCK, Bmal1, Per2, NIFL-3 und DBP mit der qPCR untersucht (Abbildung 19). Insgesamt zeigt sich eine geringere Regulation als bei der L/D-Expression. Wiederum sind einige Gene wie in den vorhergehenden Organen der D/D-Expression – und anders als bei der L/D-Expression – gar nicht reguliert.

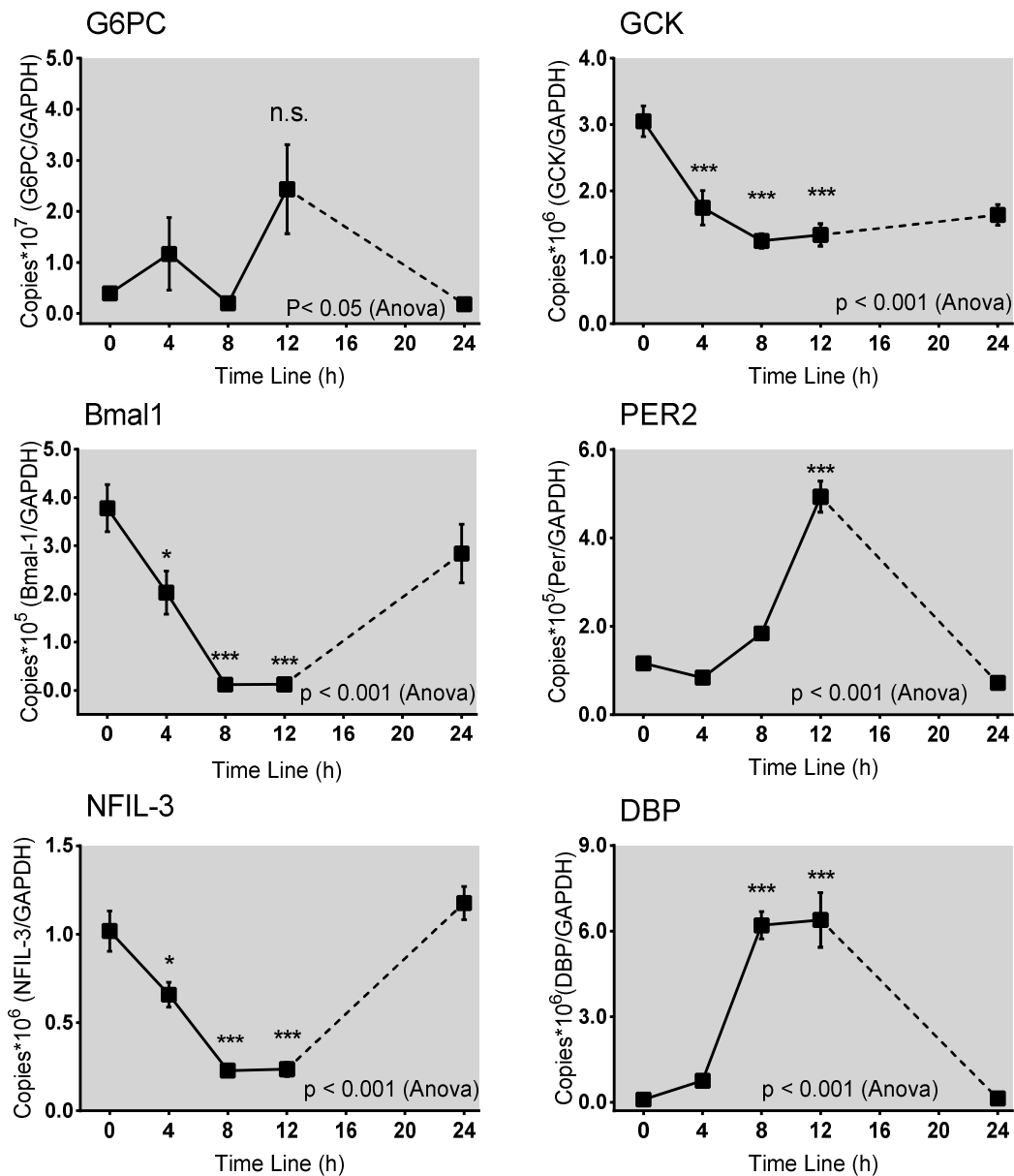


Abbildung 19: G6PC, GCK, Bmal1, Per2, NIFL-3 und DBP mRNA-Expression in der Maus-Leber im Verlauf der 24h Dunkel-Dunkel-Phase. Dargestellt ist der Mittelwert $\pm$ SEM, * - $p < 0,05$; ** - $p < 0,01$; *** - $p < 0,001$ im Vergleich zum 0h Wert; 5 – 6 Tiere pro Gruppe.

Für **G6PC** zeigt sich keine signifikante Abweichung, somit findet sich keine messbare Regulation für das Gen. Hingegen zeigt **GCK**, in der L/D-Expression gar nicht reguliert,

3 Ergebnisse

hier einen signifikanten Abfall der Expression auf 12h mit nachfolgend leichtem, nicht signifikanten Wiederanstieg auf 24h, wobei der Ausgangswert aber nicht erreicht wird. Der Verlauf der Expression zeigt kaum Ähnlichkeit mit dem der L/D-Expression. Die Expression über 24h ähnelt der von **Bmal1** und **NFIL-3** bei der D/D-Expression. Das Uhrengen **Bmal1** verzeichnet einen stark signifikanten Expressions-Verlauf, welcher dem der L/D-Expression ähnelt. Allerdings sind die Signifikanzen dort geringer ausgeprägt. Insgesamt ähnelt der Verlauf der Expression dem von GCK und ist beinahe identisch mit demjenigen von **NFIL-3**. **Per2** zeigt über die ersten acht Stunden einen nahezu plateauartigen Verlauf, bevor es innerhalb der folgenden vier Stunden zu einem signifikanten Anstieg auf 12h kommt. Nach Varianz-Analyse ebenfalls reguliert weist **NFIL-3** einen ähnlichen Expressionsverlauf wie GCK (welches mehr Kopien aufweist) und **Bmal1** (mit weniger Kopien) auf. Der Verlauf über die ersten zwölf Stunden passt zu dem Verlauf bei der L/D-Expression, allerdings liegt dort der 24h-Wert etwa eine Zehnerpotenz niedriger als der Ausgangswert von 0h, während er hier eine höhere Kopienzahl aufweist. **DBP** zeigt einen signifikanten Peak bei 8h, das fast als Plateau nach 12h zieht. Zu Beginn und Ende der Messung verläuft die Gen-Expression etwa eineinhalb Zehnerpotenzen niedriger im Vergleich zum Peak. Dieser Verlauf ist auch bei der L/D-Expression zu beobachten und stellt sich somit wie dort auch umgekehrt zu **NFIL-3** dar.

3.2.2.4 Nebenniere

In der murinen Nebenniere wurden wie bei der vorangegangenen L/D-Expression die mRNA-Spiegel der Gene *OX₁R*, *OX₂R*, *Bmal1*, *Per2*, *NIFL-3* und *DBP* mittels qPCR untersucht (Abbildung 20). Auch hier zeigen die Gene, wie bei der gesamten D/D-Expression eine geringere Regulation als bei der L/D-Expression bei meist gleich hoher Gen-Kopienzahl.

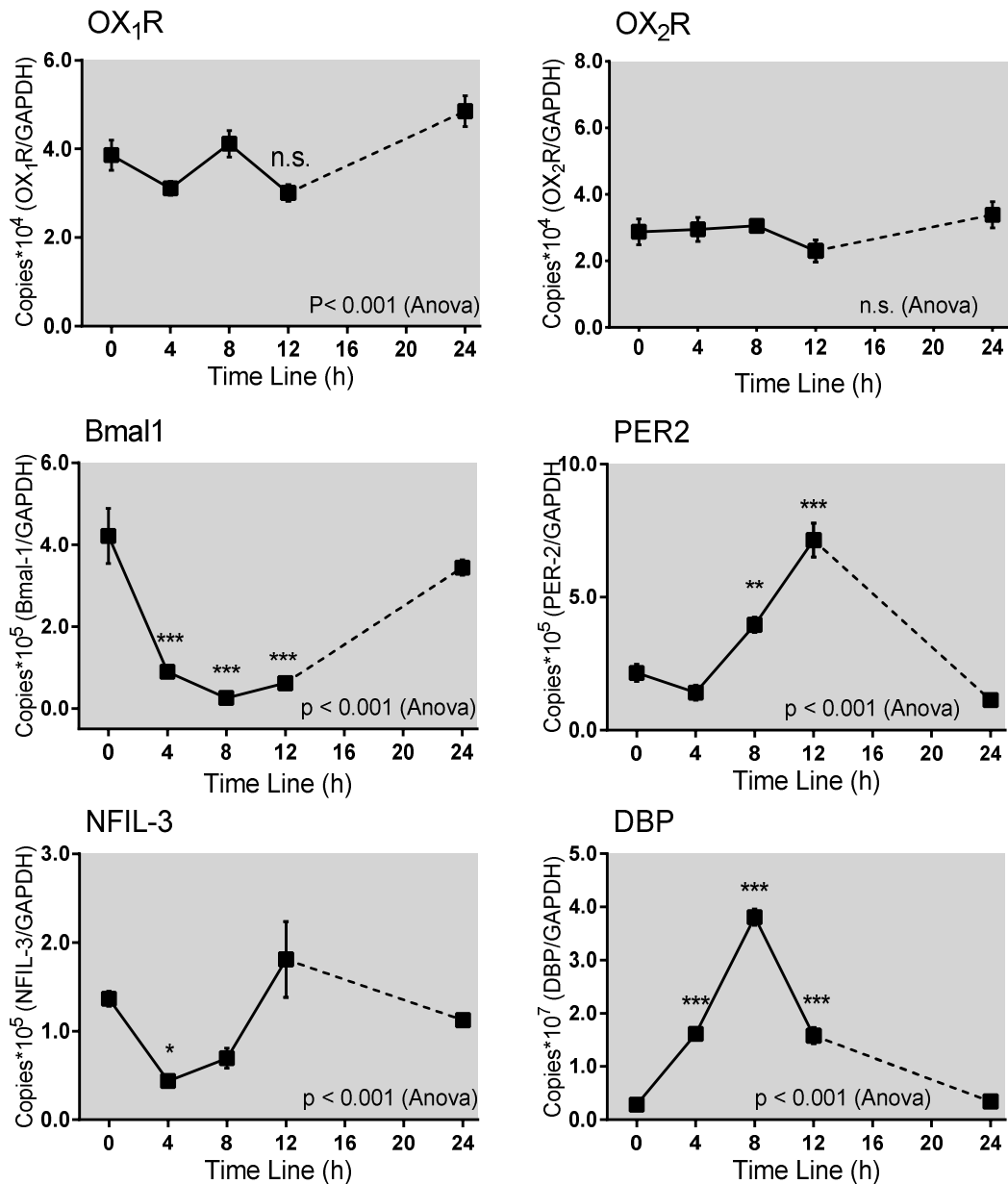


Abbildung 20: *OX₁R*, *OX₂R*, *Bmal1*, *Per2*, *NIFL-3* und *DBP* mRNA-Expression in der Nebenniere der Maus im Verlauf der 24h Dunkel-Dunkel-Phase. Dargestellt ist der Mittelwert $\pm$ SEM, * - $p < 0,05$; ** - $p < 0,01$; *** - $p < 0,001$ im Vergleich zum 0h Wert; 5 – 6 Tiere pro Gruppe.

Weder für den **OX₁R** noch den **OX₂R** findet sich in der Nebenniere eine Regulation. Dies entspricht für den **OX₂R** der L/D-Expression. Beide Gene weisen eine geringere Anzahl Genkopien als bei der L/D-Expression auf. Demgegenüber ist **Bmal1** stark reguliert. Nach einem starken Abfall der Gen-Expression entspricht der Kurvenverlauf bis 12h dem der L/D-Expression bei ähnlich hoher Anzahl der Gen-Kopien. Während hier die Expression bei 24h wieder stark angestiegen ist, ist dies bei der L/D-Expression jedoch nicht der Fall. Die Expression verläuft entgegengesetzt zu der von **Per2**, dies ist teilweise auch schon bei der L/D-Expression beobachtbar. Der inverse Kurvenverlauf von **Per2** zeigt ab 4h einen stark signifikanten Anstieg der Expression bis 12h, mit nachfolgend starkem Abfall bis 24h. Der Verlauf über die ersten 12 Stunden ähnelt dem der L/D-Expression bei insgesamt geringerer Kopienzahl. **NFIL-3** steigt nach beginnendem gering signifikantem Abfall auf 12h an. Die Expression ist ähnlich der der L/D-Expression bei annähernd gleich hoher Kopienzahl und ähnlich dem Kurvenverlauf von **Bmal1**. **DBP** weist nach einem stark signifikanten Anstieg der Expression bis zum Peak bei 8h einen starken Abfall bei 12h auf, entspricht damit im Verlauf der L/D-Expression und ist phasenverschoben gegenüber **Bmal1** und **NFIL-3**.

3.2.3 Licht-Effekt auf die Expression

Zur Analyse einer möglichen Lichtinduktion der Genexpression wurden die mRNA-Spiegel folgender Gene nach 25 Stunden Dunkelheit mit und ohne Lichtpuls mit der qPCR untersucht: **OX₁R**, **OX₂R**, **PPO**, **Bmal1**, **Per2**, **NFIL-3** und **DBP** (Abbildung 21, Abbildung 22, Abbildung 23, Abbildung 24). Mit der Varianzanalyse wurde untersucht, ob signifikante Unterschiede zwischen den jeweiligen Genexpressionen bestehen.

3.2.3.1 Cortex

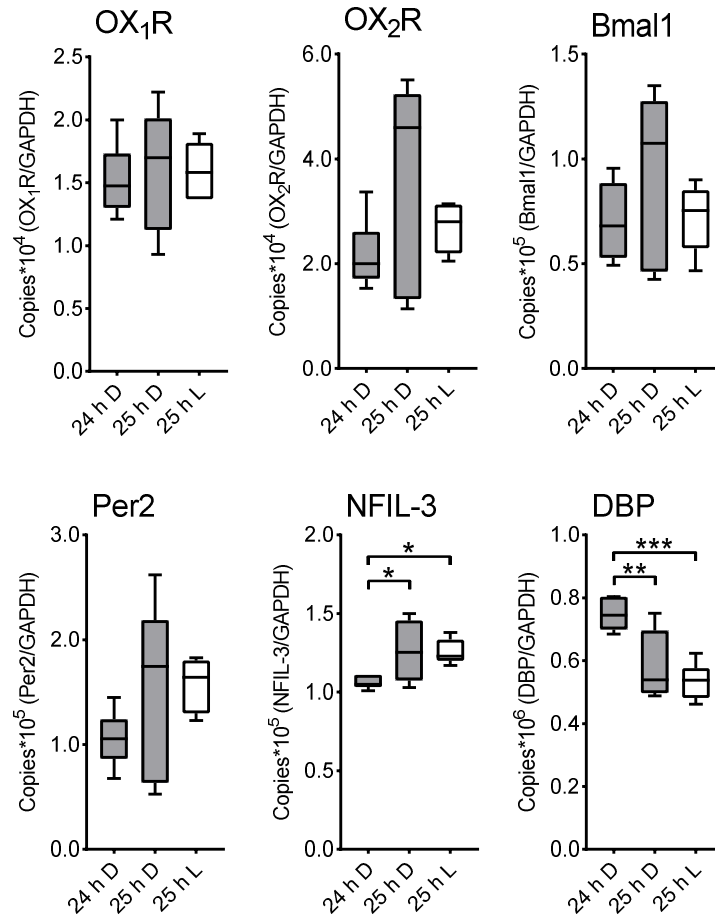


Abbildung 21: OX₁R, OX₂R, Bmal1, Per2, NFIL-3 und DBP mRNA-Expression im Maus-Cortex zu den Zeitpunkten 24h D (Wert aus der D/D-Expression) und 25h in Dunkelheit (25h D) sowie 25h in Dunkelheit mit nachfolgendem Lichtpuls (25h L). Dargestellt sind das Minimum, das 25. Perzentil, der Median, das 75. Perzentil und das Maximum, * - $p < 0,05$; ** - $p < 0,01$; *** - $p < 0,001$; 5 – 6 Tiere pro Gruppe.

Für sämtliche Gene findet sich bei den 25h-Werten keine signifikante Veränderung der Expression (Abbildung 21). Auffallend ist die breite Streuung der 25h-D-Werte für die Gene OX₁R, OX₂R, Bmal1 und Per2. Im Vergleich zu den 24h-D-Werten finden sich signifikante Änderungen der Expression zu beiden 25h-Werten für die Gene NFIL-3 und DBP. Hier ist auch die Streuung der 25h-D-Werte weniger ausgeprägt.

3.2.3.2 Hypothalamus

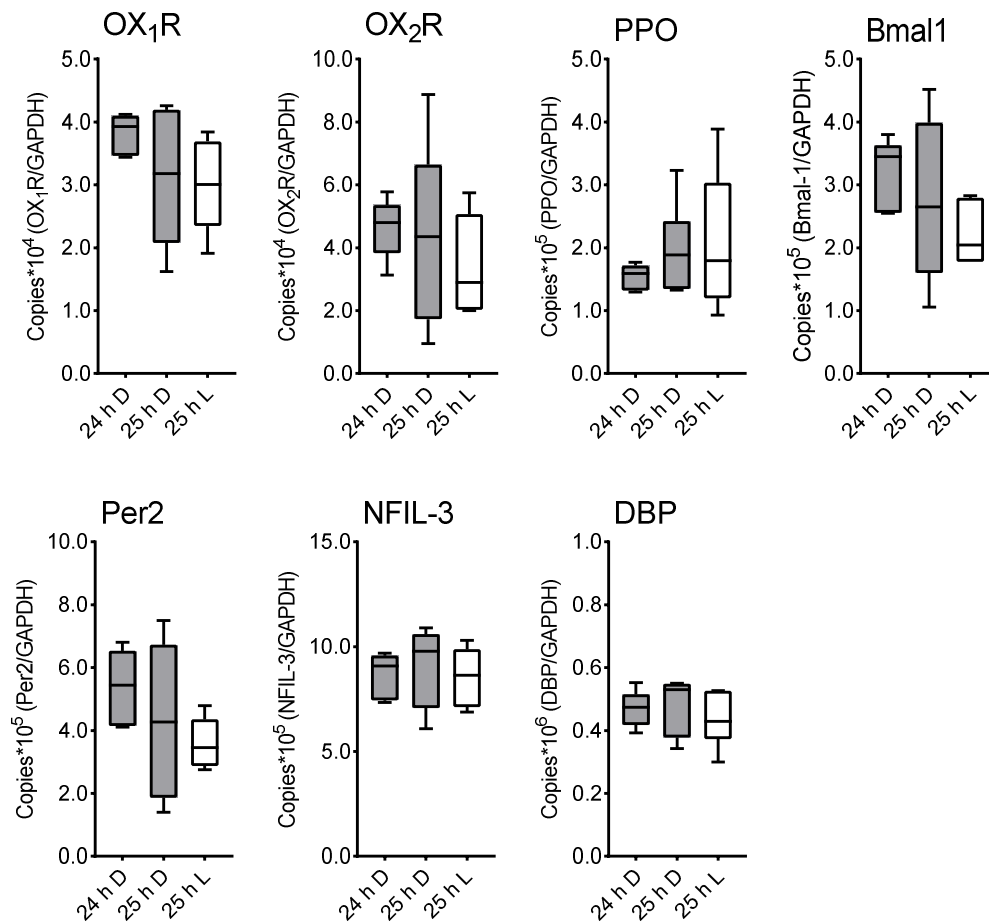


Abbildung 22: OX₁R, OX₂R, PPO, Bmal1, Per2, NFIL-3 und DBP mRNA-Expression im Maus-Hypothalamus zu den Zeitpunkten 24h D (Wert aus der D/D-Expression) und 25h in Dunkelheit (25h D) sowie 25h in Dunkelheit mit nachfolgendem Lichtpuls (25h L). Dargestellt sind das Minimum, das 25. Perzentil, der Median, das 75. Perzentil und das Maximum, * - $p < 0,05$; ** - $p < 0,01$; *** - $p < 0,001$; 5 – 6 Tiere pro Gruppe.

Im Hypothalamus zeigen sich in keinem der gemessenen Gene signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen (Abbildung 22). Alle Gene zeigen jedoch tendenziell eine geringere Expression in der Lichtgruppe. Hier findet sich ebenfalls eine breite Streuung in der 25h-D-Gruppe für die Gene OX₁R, OX₂R, Bmal1 und Per2.

3.2.3.3 Leber

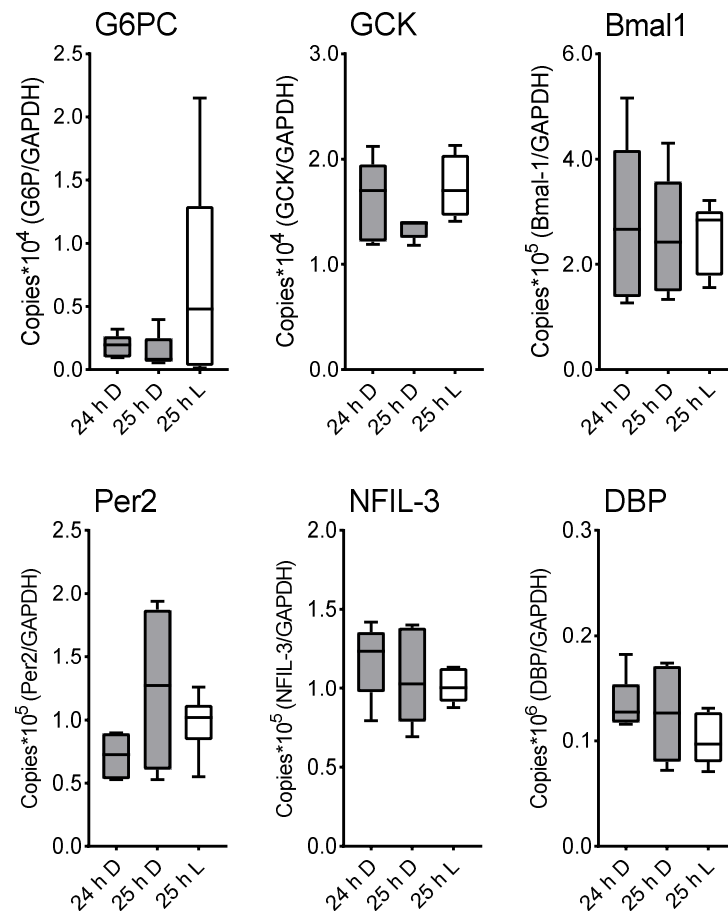


Abbildung 23: OX₁R, OX₂R, PPO, Bmal1, Per2, NFIL-3 und DBP mRNA-Expression in der Maus-Leber zu den Zeitpunkten 24h D (Wert aus der D/D-Expression) und 25h in Dunkelheit (25h D) sowie 25h in Dunkelheit mit nachfolgendem Lichtpuls (25h L). Dargestellt sind das Minimum, das 25. Perzentil, der Median, das 75. Perzentil und das Maximum, * - p < 0,05; ** - p < 0,01; *** - p < 0,001; 5 – 6 Tiere pro Gruppe.

Auch in der Leber lassen sich keine signifikanten Änderungen messen (Abbildung 23). Die Streuung der 25h-D-Werte für die Gene G6PC und GCK ist im Vergleich zu den anderen beiden gemessenen Werten gering. Ein Verhältnis, das sich bei den übrigen vier Genen nicht darstellen lässt.

3.2.3.4 Nebenniere

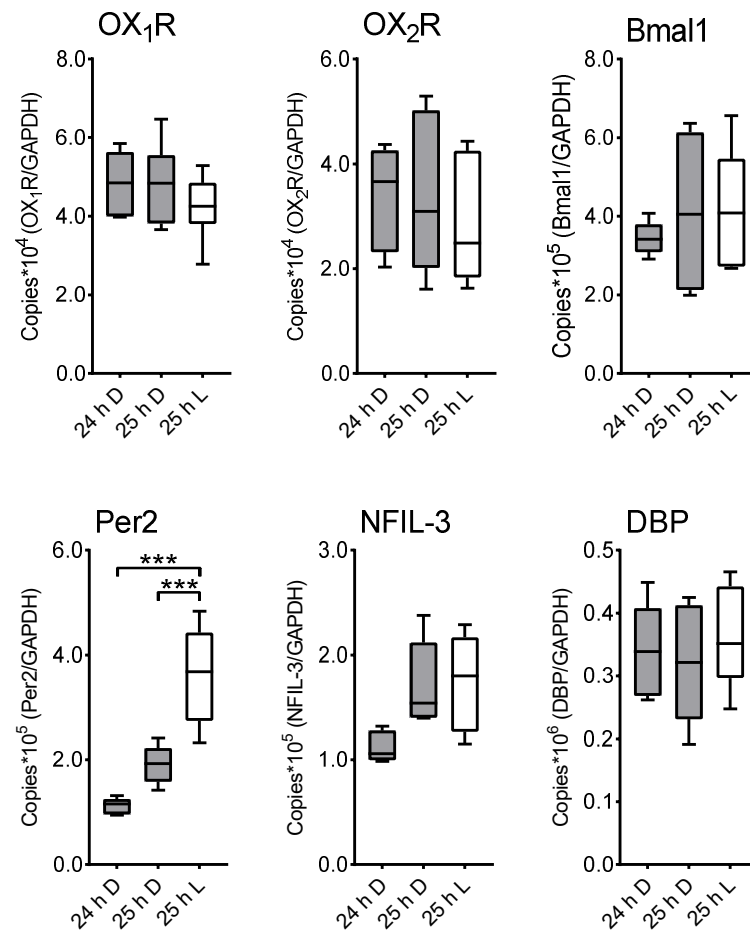


Abbildung 24: OX₁R, OX₂R, PPO, Bmal1, Per2, NIFL-3 und DBP mRNA-Expression in der Nebenniere der Maus zu den Zeitpunkten 24h D (Wert aus D/D-Expression) und 25h in Dunkelheit (25h D) sowie 25h in Dunkelheit mit nachfolgendem Lichtpuls (25h L). Dargestellt sind das Minimum, das 25. Perzentil, der Median, das 75. Perzentil und das Maximum, * - p < 0,05; ** - p < 0,01; *** - p < 0,001; 5 – 6 Tiere pro Gruppe.

In der Nebenniere zeigen sich ebenfalls keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen, mit Ausnahme von Per2 (Abbildung 24). Hier ist auch der einzige signifikante Unterschied zwischen den 25h-Gruppen zu verzeichnen.

3.3 Zellversuche

In mHypoA-Zellen wurde die Expression der Gene OX_1R , OX_2R , PPO, Bmal1, Per2, NFIL-3 und DBP analog der L/D- und D/D-Expressionen auf das Vorkommen eines zirkadianen Rhythmus im Verlauf von 24 Stunden mittels der qPCR untersucht (3.3.1.1). Anschließend wurde durch Reporter Gene Assays der humane OX_2R -Promotor sowohl in mHypoA- als auch in NCI-Zellen auf das Vorkommen eines zirkadianen Rhythmus über 24 Stunden untersucht (3.3.2.1). Die humanen NCI-Zellen wurden neben den murinen mHypoA-Zellen verwendet, um eine eventuell fehlende Expression des Promotors in mHypoA-Zellen von einer Inkompatibilität des humanen Promotors mit den murinen Zellen unterscheiden zu können. Die Expression des h OX_2R -Promotors wurde anschließend über einen Zeitraum von 48 Stunden untersucht, um einen zirkadianen Rhythmus genauer analysieren und verifizieren zu können (3.3.2.2). Seine SF-1-mutierte Form in NCI-Zellen wurde ebenfalls zwecks Verifizierung der initialen Messergebnisse vorgenommen (3.3.2.3).

3.3.1 24h-Zellversuch mit mHypoA-Zellen

3.3.1.1 Gen-Expression mHypoA-Zellen

In den mHypoA-Zellen wurden wie in den Tierversuchen die mRNA-Spiegel der Gene OX_1R , OX_2R , Bmal1, Per2, NIFL-3 und DBP (Abbildung 25) sowie PPO (Abbildung 26) mittels qPCR untersucht.

OX_1R zeigt in der Varianzanalyse keine signifikanten Änderungen der Genexpression im Verlauf von 24h (Abbildung 25). Dies ist ebenso im Hypothalamus bei der L/D-Expression zu beobachten gewesen. Die CircWave-Analyse zeigt allerdings eine geringfügige Regulation auf. Ebenso findet sich für den **OX_2R** keine signifikante Regulation. Damit weicht das Ergebnis von der L/D-Expression ab. Auch hier sind, wie beim zellulären OX_1R , die Standardabweichungen innerhalb der einzelnen Zeitpunkte zum Teil nicht unerheblich. **Bmal1** weist einen entgegengesetzten Verlauf zu Bmal1 in Cortex, Hypothalamus, Leber und Nebenniere auf. Während die Expression in Cortex und Hypothalamus im zeitlichen Verlauf abfällt und in Leber und Nebenniere dagegen fallend mit Wiederanstieg verläuft, zeigt sich hier ein Anstieg bis 12h mit nachfolgendem Abfall und Wiederanstieg der Expression. Über Varianz- und CircWave-Analyse ist das Gen nachweislich reguliert. Mittels Varianz- und CircWave-Analyse findet sich für **Per2** eine Regulation des Gens. Zu Beginn zeigt es einen ähnlichen Verlauf wie Per2 bei der L/D-Expression Cortex (0h bis 8h), verläuft danach allerdings anders und tendenziell entgegengesetzt zum Verlauf der Expression von Per2 in Leber und Nebenniere. Der Verlauf der Expression dieses Gens im Hypothalamus stellt sich gänzlich anders dar.

3 Ergebnisse

Vielmehr ist der Verlauf phasenverschoben ähnlich dem von NFIL-3 im Hypothalamus. Anders als bei der L/D-Expression zum Teil beobachtet, ist der Verlauf nicht entgegengesetzt zum Verlauf von Bmal1. **NFIL-3** weist am ehesten eine geringfügige Ähnlichkeit mit der NFIL-3-Expression bei der L/D-Expression im Cortex auf, korreliert aber nicht mit dem Verlauf in Hypothalamus, Leber und Nebenniere. Auch dieses Gen ist reguliert (nachweislich der Varianz- und CircWave-Analyse), ebenso wie **DBP**. Letzteres verzeichnet einen Verlauf der Gen-Expression, der sich am ehesten entgegengesetzt zum Verlauf der Expression dieses Gens in Cortex, Hypothalamus, Leber und Nebenniere bei der L/D-Expression darstellt.

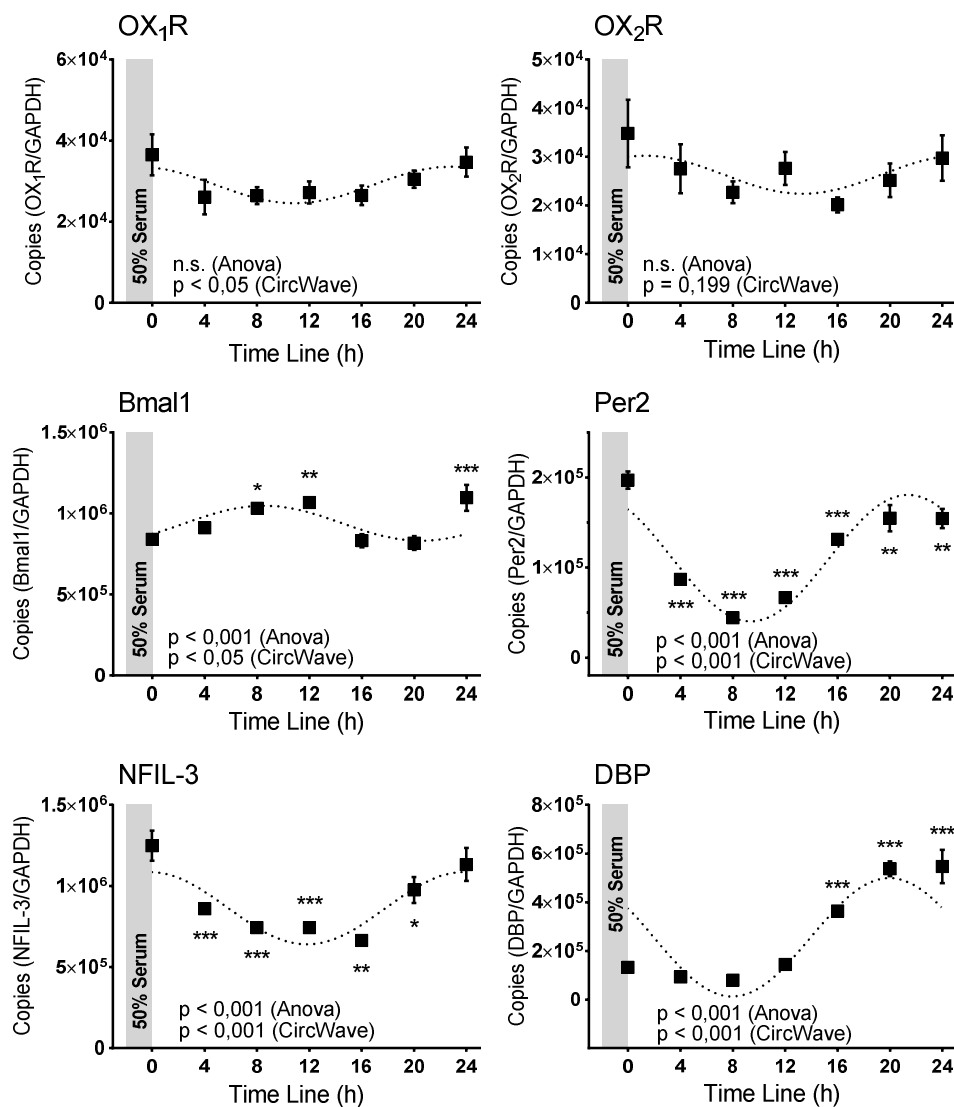


Abbildung 25: OX₁R, OX₂R, Bmal1, Per2, NFIL-3 und DBP mRNA-Expression in mHypoA-Zellen. Die Zellen wurden durch Gabe von 50% Serum für 2h synchronisiert. Dargestellt sind der Mittelwert ± SEM, * - p < 0,05; ** - p < 0,01; *** - p < 0,001 im Vergleich zum 0h Wert; Jeweils Mittelwert der Mittelwerte aus drei Messversuchen, Auswertung mittels Varianz- sowie CircWave-Analyse.

3.3.1.2 PPO-Expression mHypoA-Zellen

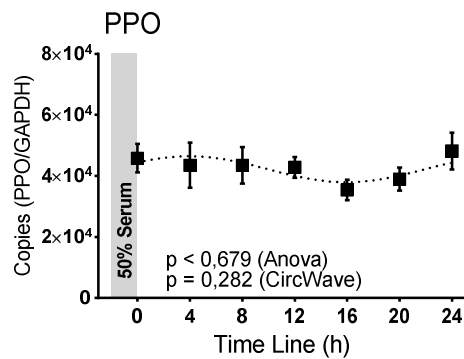


Abbildung 26: PPO mRNA-Expression in mHypoA-Zellen. Die Zellen wurden durch Gabe von 50% Serum für 2h synchronisiert. Dargestellt sind der Mittelwert $\pm$ SEM, * - $p < 0,05$; ** - $p < 0,01$; *** - $p < 0,001$ im Vergleich zum 0h Wert; Jeweils Mittelwert der Mittelwerte aus drei Messversuchen, Auswertung mittels Varianz- sowie CircWave-Analyse.

Die Expression von PPO in den mHypoA-Zellen ist in Bezug auf die RNA nicht reguliert. Dieses Ergebnis geht konform mit den Messungen im Cortex bei der L/D-Expression. Hier wurde, anders als im Hypothalamus bei der L/D-Expression, ebenfalls keine Regulation gesehen.

3.3.2 Reporter Gen Assays

In sämtlichen Reporter Gen Assay Versuchen wurde ausschließlich die Expression des Promotors des OX₂R gemessen. An diesen wurde downstream eine Firefly-Luciferase gekoppelt, über deren Messung die Expression des hOX₂R-Promotors erfolgte. Die Werte wurden in Bezug gesetzt zur Expression der Renilla-Luciferase, die konstitutiv über eine Kopplung an den Simian Virus 40 Promotor aktiv ist. Letztere stellt damit das Housekeeping Gene beziehungsweise die GAPDH bei den L/D- und D/D-Expressionen dar und dient als Baseline-Referenz.

3.3.2.1 Aktivität des hOX₂R-Promotors in NCI- sowie mHypoA-Zellen

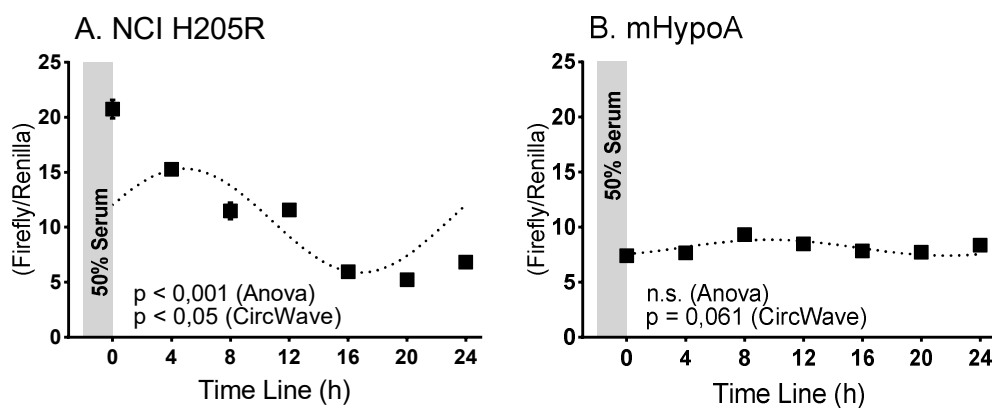


Abbildung 27: Aktivität des hOX₂R-Promotors in NCI-Zellen und in mHypoA-Zellen im Verlauf von 24h mittels RGA. Die Zellen wurden durch Gabe von 50% Serum für 2h synchronisiert. Dargestellt sind der Mittelwert $\pm$ SEM, * - p < 0,05; ** - p < 0,01; *** - p < 0,001 im Vergleich zum 0h Wert; Auswertung mittels Varianz- sowie CircWave-Analyse.

NCI-Zellen

Die Zellen zeigen sowohl in der Varianz- als auch in der CircWave-Analyse signifikante Unterschiede in der Höhe der Expression des hOX₂R-Promotors über 24 Stunden (Abbildung 27). Insgesamt finden sich im Verlauf ein Abfall der Expression mit Ausnahme des 12h-Wertes.

mHypoA-Zellen

Für die mit dem humanen OX₂R-Promotor transfizierten murinen mHypoA-Zellen finden sich in Varianz- und CircWave-Analyse keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Expressionshöhe (Abbildung 27). Des Weiteren korreliert der Verlauf nicht mit der Expression des OX₂R-Promotors in den humanen NCI-Zellen. Der Anfangswert bei 0h ist völlig entgegengesetzt zu dem der NCI-Zellen der niedrigste gemessene Wert im gesamten Zyklus.

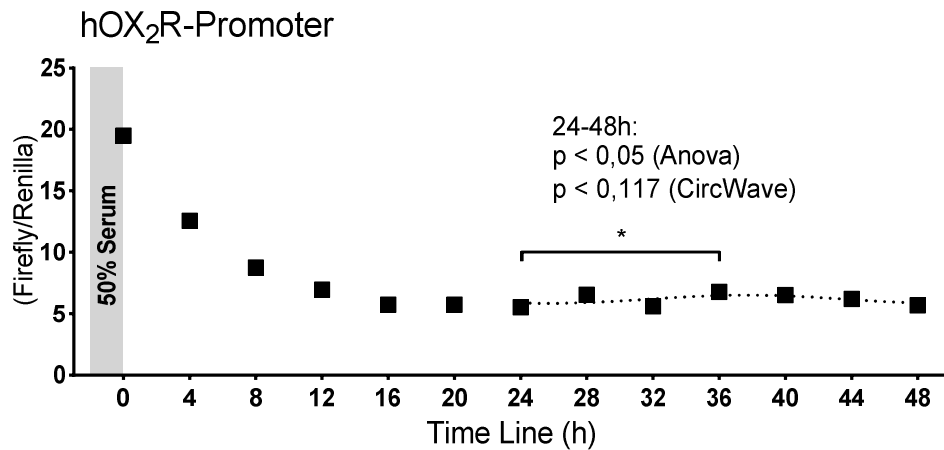
3.3.2.2 48h-Aktivität des hOX₂R-Promotors in NCI-Zellen

Abbildung 28: Aktivität des hOX₂R-Promotors in NCI-Zellen im Verlauf von 48h mittels RGA. Die Zellen wurden durch Gabe von 50% Serum für 2h synchronisiert. Dargestellt sind der Mittelwert $\pm$ SEM, * - $p < 0,05$; ** - $p < 0,01$; *** - $p < 0,001$ im Vergleich zum 0h Wert; Auswertung mittels Varianz- sowie CircWave-Analyse.

Die nativen NCI-Zellen zeigen bis 20h den gleichen Verlauf wie die NCI-Zellen im vorangegangenen Versuch (Abbildung 28). Der Wiederanstieg bei 24h, so beobachtet im vorherigen Versuch, ist hier nicht mehr zu ermitteln, vielmehr entspricht die Expression zum Zeitpunkt 24h annähernd den Werten von 18h und 20h. In den folgenden 24h (24h bis 48h) finden sich zwar signifikante Unterschiede in der Varianzanalyse, allerdings lässt sich über die CircWave-Analyse kein unterliegender zirkadianer Rhythmus für den Zeitraum ermitteln. Insgesamt zeigt sich ein scheinbarer, nicht signifikanter, Wiederanstieg der Expression mit dezentem Abfall als Ausdruck eines zweiten „Tages“, wobei der Anstieg der Expression zu Beginn des zweiten „Tages“ viel geringer ist und später einsetzt (32h). Die Expression zum Ende des zweiten „Tages“ ist jedoch ähnlich hoch wie zu Ende des ersten „Tages“.

3.3.2.3 48h-Expression des hOX₂R-Promotor_mut SF1 in NCI-Zellen

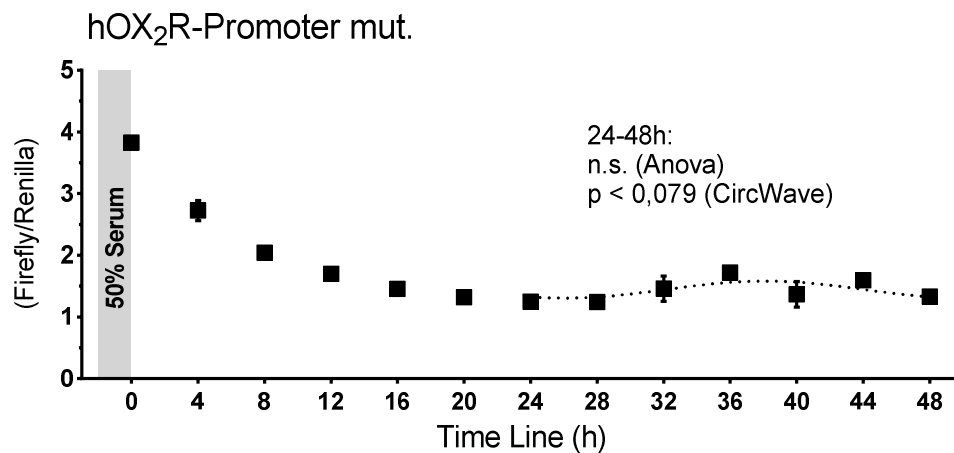


Abbildung 29: Aktivität des SF1-mutierten hOX₂R-Promotors in NCI-Zellen im Verlauf von 48h mittels RGA. Die Zellen wurden durch Gabe von 50% Serum für 2h synchronisiert. Dargestellt sind der Mittelwert $\pm$ SEM, * - p < 0,05; ** - p < 0,01; *** - p < 0,001 im Vergleich zum 0h Wert; Auswertung mittels Varianz- sowie CircWave-Analyse.

Die Expression des mutierten Promotors zeigt interessanterweise denselben Verlauf über 48h wie der nicht mutierte Promotor, weist aber eine Besonderheit auf: Die Expression ist insgesamt geringer, sie liegt bei annähernd einem Viertel der Expression des nicht mutierten Promotors (Abbildung 29). Für den Zeitraum 24 – 48 Stunden finden sich auch hier in den Analysen keine signifikanten Ergebnisse.

4 Diskussion

Obwohl in mehreren Arbeiten eine zirkadiane Rhythmik des Neuropeptides Orexin A dargestellt wurde, unter anderem bei Mäusen (176), Ratten (180) (181), Totenkopffäffchen (35), sowie im menschlichen Liquor (184) (185) ist die zirkadiane Regulation der Expression des PPO und der Orexin-Rezeptorsubtypen OX₁R und OX₂R kaum erforscht. Daher wurde in der vorliegenden Arbeit selbige in Mäusen allgemein, sowie bezogen auf den Expressionsort und im Vergleich zu Uhrengenen untersucht. Weiterhin wurde ein Zellversuch angeschlossen, in welchem ebenfalls die Expression der Gene untersucht wurde. Im Zellversuch wurde auch der hOX₂R-Promotor in murinen und humanen Zellen auf das Vorliegen eines zirkadianen Rhythmus untersucht.

4.1 Zirkadiane Regulation von PPO

Die PPO-mRNA, Vorstufe der beiden Hormone Orexin A und B steigt in der Dunkelfase, also während des subjektiven Tages der Mäuse, an. Der hier aufgetretene verzögerte Anstieg geht konform mit den Beobachtungen von Zeitzer et al., der bei Affen niedrigere Orexin A-Konzentrationen in den ersten ein bis drei Stunden des Tages fand im Vergleich zum späteren Drittel des Tages (35). Eine erhöhte PPO-Expression, bzw. erhöhte Orexin-Konzentrationen, sind während der aktiven subjektiven Tagesphase zu erwarten, da Orexine aktivierend wirken und eine reduzierte Orexin-Wirkung zum Schlaf führt.

Taheri et al. stellten bei Ratten einen zirkadianen Rhythmus der PPO-Expression im Hypothalamus fest, allerdings fand sich die geringste Expression hier zu Beginn des subjektiven Tages, also der Dunkelfase bei nachtaktiven Nagern, und nicht in der ersten Phase der subjektiven Nacht wie in der vorliegenden Arbeit (181). Ebenfalls verzeichneten Taheri et al. jedoch ein Peak gegen Ende des subjektiven Tages. Die vorliegenden PPO-Werte stimmen wiederum auch nicht überein mit den Beobachtungen der Orexin A Konzentration im lateralen Hypothalamus von Marston et al. (175) sowie von Martinez et al. (177). Diese fanden während der subjektiven Nacht von Mäusen erhöhte Konzentrationen des Hormons, welches zum Ende der Nacht absank und eine Stunde nach Tagesanfang seine geringste Konzentration zeigte, um im Tagesverlauf wieder anzusteigen. Die Abweichungen sind ohne weitere Untersuchungen nicht zufrieden stellend zu erklären. Es muss jedoch bedacht werden, dass es möglicherweise interspezifische Unterschiede gibt. So untersuchte Taheri, dessen gemessener Verlauf der PPO-mRNA zu dem Expressions-Verlauf von Martinez hypothalamisch ermittelter Orexin A-Konzentration passt, ebenso wie Martinez Ratten, nicht Mäuse. Marston verwendete zwar Mäuse, stellte jedoch nur zwei Zeitpunkte (Tag / Nacht) in seiner Arbeit dar. Des Weiteren ist im Rattenversuch bereits dargestellt worden, dass auf jeden Fall die Höhe

der PPO-mRNA schon innerhalb derselben Art geschlechtsspezifisch unterschiedlich ist, da weibliche Ratten hier eine höhere Expression zeigten (5). Ebenso ist der Ort der Messung nicht unerheblich. Desarnaud et al. fanden durch Messung der hypothalamischen PPO-mRNA keine altersabhängigen Unterschiede in der Expressions-Höhe (76), während Porkka-Heiskanen in seiner Arbeit aber eben jenes darstellen konnte (77). Desarnaud führte seine Untersuchungen mit Proben des posterioren Hypothalamus durch, während Porkka-Heiskanen hierzu den lateralen Hypothalamus verwendete. Taheri konnte darstellen, dass die Konzentration von Orexin A im präoptischen/anterioren Hypothalamus in der Zeit von 9 – 21 Uhr um 50% sank, während es in der Brücke zwischen 9 und 1 Uhr über 30% anstieg (181). Insgesamt stimmen die hier gemessenen Werte mit der Beobachtung überein, dass Orexine Hormone sind, die Wachheit und Aufmerksamkeit vermitteln und wichtig sind, um ein Einschlafen während des Tages zu vermeiden (181) (35) (37) (38) (40) (177) (188).

Der Verlauf der PPO-mRNA-Expression bei der D/D-Expression zeigt sich über die ersten 12 Stunden, also der ehemals subjektiven Nacht der Mäuse, ähnlich dem der L/D-Expression. In der Annahme, dass sich während der zweiten zwölf Stunden ein – hier nicht ermittelter – Peak wie bei der L/D-Expression zeigt, bestätigen die Ergebnisse, dass die Expression der PPO-mRNA zum Teil von äußeren Einflüssen, also Licht, abhängig ist. Das Licht bestimmt hier vermutlich die Höhe der Expression, während die zirkadiane Rhythmik jedoch intern reguliert wird. Interessant wäre in diesem Zusammenhang inwiefern ein Lichtpuls zu einer bestimmten Zeit bei der D/D-Expression keine Änderung, nur einen Phasenshift - ähnlich wie im Versuch von Marston et al. (175), der je nach Zeitpunkt des Dunkelpulses Phasenverschiebungen von 0 bis gut sechs Stunden beobachten konnte - oder aber eine vollkommene Störung des internen Rhythmus verursachen würde. Weiterhin ist fraglich, ob nach einem bestimmten Zeitraum in völliger Dunkelheit der interne Rhythmus verloren geht wie bei *mPer1* und *mPer2* unter konstanter Lichtexposition (174) (169). Die molekulare Regulation ist ebenfalls unbekannt, es finden sich keine Übereinstimmungen mit den Expressionsmustern der Uhrgene im Hypothalamus. Einzig auffallend ist, dass die Expression grob entgegengesetzt zu der des *OX₁R* verläuft.

4.2 Zirkadiane Regulation der Orexin Rezeptoren

Die beiden Orexin-Rezeptoren unterliegen im Gehirn einer zirkadianen Regulation, der *OX₁R* nur in kortikalen Bereichen, der *OX₂R* auch hypothalamisch. Die mRNA-Konzentration ist für den *OX₂R* immer höher, sowohl im Hypothalamus als auch im Kortex, dies bei der L/D- wie auch bei der D/D-Expression in Übereinstimmung mit früheren Studien (14). Dies überrascht zunächst, da in der Literatur Orexin A, welches eine höhere Affinität für den *OX₁R* aufweist, das wichtigere und wirksame Hormon zu sein scheint und

Orexin B, welches spezifisch an den OX₂R bindet, eine geringere Bedeutung zu haben scheint (1) (9) (81) (82) (92) (96) (97). Tatsächlich ist Orexin B gegenüber Orexin A jedoch instabiler (220), was sowohl dem freien N-Terminus sowie dem Fehlen von Disulfidbrücken geschuldet ist (221).

Die Tatsache, dass eine höhere Konzentration sowie eine zirkadiane Steuerung des OX₂R im Hypothalamus vorliegt lässt vermuten, dass der OX₂R in diesem Gebiet eine wichtige – jedoch noch unbekannte – Rolle spielt, während der OX₁R eher Effekte außerhalb des Hypothalamus vermittelt. Die zirkadiane Expression des OX₂R ähnelt in ihrem Verlauf über 24 Stunden derjenigen von Bmal1, auch bei der D/D-Expression. Dieser Sachverhalt wirft die Frage auf, ob auf molekularer Ebene eine zirkadiane Regulation der Expression durch Bmal1 gesteuert, beziehungsweise kontrolliert wird. Zur Zeit nicht zu erklären ist der Abfall der Expression des OX₂R in der Nacht und der höchsten Expression am Morgen, da bekannt ist, dass die Konzentration der Orexine morgens am niedrigsten ist und im Tagesverlauf ansteigt (35) (181) (188), um erst gegen Morgen wieder zu sinken. Hier stellt sich die Frage, ob Orexine tatsächlich die einzigen Liganden für den OX₂R sind. Von beiden Rezeptoren ist bekannt, dass sie in der Nebenniere exprimiert werden, über den OX₂R wird vermutlich die Glukokortikoid sezernierende Wirkung vermittelt, eventuell liegt auch eine Beteiligung an der Genese vor (105) (103) (106) (107) (108). Bemerkenswerter Weise wird diesbezüglich keine Regulation der Orexin-Rezeptoren in der Nebenniere gesehen, obwohl bekannt ist, dass in den frühen Morgenstunden physiologischer Weise eine erhöhte Sezernierung von Glukokortikoiden stattfindet (222) (223) (224). Eine Erklärung hierfür wäre die Beteiligung des Orexin-Hormonsystems an der Fight-or-Flight-Reaktion (48). Die Orexine wären demnach in der Nebenniere nicht für die Aufrechterhaltung einer zirkadianen Sezernierung der Steroidhormone zuständig, sondern würden nur die stress-bedingte erhöhte Sekretion und eventuell in diesem Fall auch die erhöhte Steroidgenese vermitteln (105) (103) (106) (107) (108). Im Vergleich der – soweit vorhanden – zirkadianen Expression der beiden Rezeptoren mit PPO findet sich bei der L/D-Expression im Kortex ein sehr ähnlicher Kurvenverlauf aller drei Gene mit einer insgesamt abfallenden Expression über 24 Stunden. Im Hypothalamus selbst ist der OX₁R wie oben beschrieben nicht reguliert, wohl aber der OX₂R sowie PPO. Allerdings verlaufen die Expressionen hier weder phasisch noch anti-phasisch sondern komplett entgegengesetzt. Während OX₂R im 24-Stunden-Zyklus sinkt, steigt PPO an. Dies lässt vermuten, dass die zirkadiane Expression des PPO überhaupt nicht ursächlich für die hypothalamische Stimulation stattfindet, sondern vielmehr auf eine periphere Wirkung abzielt, während die hypothalamischen zirkadianen Rhythmen durch den OX₂R reguliert werden.

4.3 Uhrengene

Die Clock Genes Bmal1 und Per2 zeigen bei der L/D-Expression im Gehirn wie erwartet eine ausgeprägte zirkadiane Regulation, wobei sie miteinander zumindest annähernd phasisch zu sein scheinen. Eine zirkadiane Regulation der beiden Gene ist bereits von Honma et al. (welche unterschiedliche Oszillationen von Bmal1 im SCN und kortikal sahen) (136) und Shearman et al. (welche im SCN einen ähnlichen Per2-Verlauf beobachtet haben wie hier im Cortex zu sehen) beschrieben worden (161). Yamajuku et al. sahen in Versuchen mit kultivierten Rattenfibroblasten einen annähernd gegensätzlichen Verlauf von Bmal1 und Per2 (157). Im vorliegenden Versuch ist dies auch sichtbar, bei der L/D-Expression nur in der Peripherie, bei der D/D-Expression jedoch auch zentral. Ansatzweise kann dies ebenfalls im Zellversuch verdeutlicht werden. Bei der D/D-Expression beginnen beide Gene zu desynchronisieren, dies ist zumindest für Per2 in Versuchen mit konstanter Lichtexposition bekannt (169). Der Kurvenverlauf der beiden Gene zeigt sich nun eher anti-phasisch. Bemerkenswert ist, dass die Konzentration von Bmal1 bei der D/D-Expression sowohl im Cortex als auch im Hypothalamus ansteigt, während diejenige von Per2 annähernd konstant bleibt. Interessanterweise ist auch in der Leber ein Anstieg des Bmal1 bei der D/D-Expression erkennbar, lediglich in der Nebenniere tritt dieses Phänomen nicht auf. Peripher zeigen die Gene den schon erwähnten anti-phasischen Verlauf bei der L/D- sowie D/D-Expression in der Leber und der Nebenniere, welcher sich peripher um acht Stunden phasenverschoben darstellt und zwar zugunsten von Per2, welches sowohl kortikal als auch hypothalamisch zuerst ein Peak zeigt. Da beide Gene im Gehirn also anscheinend phasisch verlaufen besteht die Möglichkeit, dass eines von beiden durch das andere reguliert wird, was bereits 1998 von Oishi et al. vermutet wurde (135). Für Per1 ist bekannt, dass es von einem Komplex, der unter anderem Bmal1 enthält über das Promotor-Motiv E-Box reguliert wird (137). Eventuell gilt Gleiches zentral auch für Per2, da Amplituden und Expressionslevel der mRNAs von Bmal1 und Per2 dort ähnlich sind. In der Peripherie zeigt sich allerdings ein anti-phasischer Verlauf mit einer Phasenverschiebung von etwa acht Stunden. Auch ist in der Nebenniere kein phasischer Verlauf von Bmal1 und OX₂R sichtbar, so dass hier nicht von einer modulierenden Wirkung des Bmal1 ausgegangen werden kann.

Für NFIL-3 und DBP sind wie unter 1.2.2.2 vorbeschrieben auch hier die anti-phasischen Verläufe ersichtlich (147), mit zwei so bisher nicht beschriebenen Ausnahmen: Sowohl im Kortex bei der L/D-Expression, also auch im mHypoA-Zellversuch zeigen beide Gene einen eher synchronen als asynchronen Verlauf, wobei der Effekt im Kortex auffälliger ist. Weshalb nur hier, vor allem ausschließlich im Kortex und nur unter normaler Tagesrhythmik (denn dieser Effekt ist bei der D/D-Expression nicht mehr vorhanden)

plötzlich ein phasischer Verlauf der beiden Gene vorliegt, ist nicht zu erklären und bedarf gegebenenfalls weiterer Untersuchungen. Der OX₂R besitzt ein D-Box-Motiv [das D-Box-Motiv wurde durch Sequenzanalyse – die Ergebnisse sind nicht publiziert worden], allerdings ist bisher nicht bekannt, ob dieses nur putativ vorhanden ist oder tatsächlich eine aktive Funktion aufweist. Zunächst wurde angenommen, dass beide Gene einen regulierenden Einfluss auf den OX₂R haben. Die zentralen Expressions-Verläufe des OX₂R gehen aber nicht konform mit der Enhancer- bzw. Silencerfunktion von NFIL-3 und DBP. So ist die Expression des OX₂R im Gehirn trotz erhöhten NFIL-3-Leveln ebenfalls erhöht, während es unter erhöhten DBP-mRNA-Leveln zu einer Abnahme der OX₂R-mRNA kommt. Somit kann die Hypothese aufgestellt werden, dass das vorhandene D-Box-Motiv im Promotor des OX₂R nicht aktiv ist.

4.4 Lichteffect auf die Expression

Beim Lichteffect auf die Expression sehen wir nicht die erwartete Änderung der Expression. Wir gingen davon aus, dass ein Lichtpuls die Orexin- und Clock Gene-Transkription von extern aktiviert und eine signifikant erhöhte mRNA-Konzentration messbar sein würde. Ursächlich hierfür können mehrere Faktoren sein: Der Lichtpuls könnte zu kurz gewesen sein. Die Mäuse waren lediglich eine Stunde im Licht, Marston et al. setzten Mäuse sechs Stunden lang einem Dunkelpuls aus (175). Als Lichtpuls verwendeten wir das normale Raumlicht im Tierstall (etwa 500 Lux; zum Vergleich: Ein heller Sommertag hat etwa 100.000 Lux, ein bedeckter Wintertag etwa 4000 Lux), eventuell war die Lichtintensität nicht stark genug. Kim et al fanden heraus, dass abweichende Orexinkonzentrationen im 24-Stunden-Rhythmus trotz suffizienter Lichteinstrahlung zu Phasenverschiebungen im zirkadianen Rhythmus führen (225). Diese konnten in ihrem Model durch Lichtbehandlung stabilisiert werden. Es gibt unzählige Studien zur Auswirkung der Lichtintensität auf diverse metabolische Prozesse im menschlichen Körper. Je nach Gen wird für die Aktivierung oder Repression der Transkription eine andere Lux-Stärke benötigt. So sind beispielsweise für die Suppression pinealen Melatonins bereits 0.0021 bis 0.00026 Lux ausreichend (226), während für eine Verzögerung des Anstiegs pinealen N-Acetylserotonins schon 2000 Lux benötigt werden (227). Rosenthal zeigte, dass Licht eine bestimmte Helligkeit benötigt, um einen Effekt auf das sogenannte Seasonal Affective Disorder (SAD, umgangssprachlich Winterdepression) zu haben (228) (229). Die Verwendung von Licht als Stimulus stellt somit eine erhebliche Fehlerquelle dar, da das Ergebnis im Vergleich zum Dunkelpuls, der einfach in absoluter Dunkelheit stattfindet, stark von der Intensität des Lichts abhängig zu sein scheint. Weitere Fehlerquellen sind unter anderem die Möglichkeit, dass die erhöhte mRNA-Expression direkt nach Beginn des Lichtpulses einsetzt und zu unserem Messzeitpunkt bereits wieder abgefallen war oder aber, dass die Expression erst viel später einsetzt und

zu unserem Messpunkt noch gar keine erhöhte Transkription der Gene induziert wurde. Letztendlich muss auch in Erwägung gezogen werden, dass tatsächlich überhaupt kein Effekt messbar ist.

4.5 Zirkadiane Regulation des humanen OX₂R-Promoters

Da bereits im Vorfeld vermutet wurde, dass der zu transfizierende humane Promotor des OX₂R nicht oder nicht vollständig kompatibel ist mit den murinen mHypoA-Zellen, wurde eine humane Zelllinie als Kontrolle ko-transfiziert (NCI-Zellen). Während in den NCI-Zellen ein eindeutiger Rhythmus sichtbar ist, konnte dieser für die mHypoA-Zellen nicht ermittelt werden. Folglich bestätigte sich die oben genannte Vermutung. Aus diesem Grund wurden für den Folge-Versuch ausschließlich die NCI-Zellen weiterverwendet. Der Versuch wurde mit einer Dauer von 48 Stunden wiederholt, um auszuschließen, dass der Abfall der Expression lediglich auf einem Wirkverlust des Serums beruht. Tatsächlich zeigt sich im zweiten 24-Stunden-Zyklus mit aktivem SF1-Motiv eine leicht signifikante Zunahme der Expression. Über die CircWave Analyse kann kein zugrundeliegender zirkadianer Rhythmus gefunden werden. Die insgesamt geringere Höhe der Expression in der zweiten Versuchshälfte ist möglicherweise auf eine Desynchronisation der Zellen zurück zu führen. Es ist nicht bekannt, wie lange die Wirkung des Serums in mHypoA-Zellen tatsächlich anhält; die Wirkung ist durch die L/D- und D/D-Expressionen kontrollierbar und für andere Zellarten bestätigt (120). Im anschließenden Versuch mit einem mutierten SF1-Motiv, welches Teil des humanen OX₂R-Promoters ist, zeigt sich keine signifikante Regulation in der zweiten Versuchshälfte. Der Kurvenverlauf entspricht dem des aktiven SF1-Motivs, die Expressionshöhe allerdings beläuft sich auf nur 25 – 50 % des aktiven SF1-Motivs. Wir gehen deshalb davon aus, dass das SF1-Motiv eine stimulierende Funktion auf die Expression hat.

Bei der D/D-Expression zeigt sich bei einigen der untersuchten Gene der Verlust des unter Vorhandensein einer Tagesrhythmik beobachteten zirkadianen Rhythmus. Bei diesen Genen muss also davon ausgegangen werden, dass sie ihren Rhythmus durch externe Zeitgeber erhalten, sie also durch Umwelteinflüsse und nicht durch einen internen Taktgeber gesteuert werden, bzw. das regulierend beeinflussende Gen von äußeren Einflüssen abhängig ist. Dies schließt jedoch eine modulierende Wirkung durch interne Taktgeber, vornehmlich dem Nucleus suprachiasmaticus, bzw. durch diesem unterliegende Gene, nicht aus. Ein Haupt-Kriterium des zirkadianen Rhythmus ist es, dass dieser auch unter wechselnden Umweltbedingungen konstant bleibt. Dieses Phänomen wird in der Literatur als „free running“ bezeichnet (230). Der kortikal regulierte OX₁R verliert seine zirkadiane Rhythmik, so dass davon ausgegangen werden kann, dass er keiner zirkadianen Regulation durch den SCN unterliegt. Hypothalamisch war bereits unter L/D-Bedingungen keine Rhythmik erkennbar, so dass hier bei der D/D-Expression

ein Auftreten rhythmischer Kontrolle sowieso nicht zu erwarten war. Gleiches trifft für den OX₁R in der Niere zu. Hier war zunächst keine Regulation sichtbar, umso überraschender war das Auftreten einer Regulation unter D/D-Konditionen. Diese Beobachtung ist durch den vorliegenden Versuch nicht zufriedenstellend erklärbar. Denkbar wäre, dass der OX₁R in der Peripherie durch Faktoren beeinflusst wird, deren Einfluss bei Wegfall einer Tagesrhythmik unterdrückt wird, so dass sich nun erst der interne Rhythmus zeigt. Allerdings würde dies nicht erklären, weshalb dasselbe Phänomen nicht auch im Hypothalamus sichtbar wäre. Der OX₂R verliert sowohl im Cortex als auch im Hypothalamus seine zirkadiane Expression. Hier besteht die Vermutung, dass die Rhythmik durch Bmal1 reguliert wird, da der Kurvenverlauf in beiden Hirngebieten ähnlich ist und Bmal1 in seiner Periodik ebenfalls stark sinkt, wenngleich ein geringer Rhythmus erhalten bleibt. Die regulierende Wirkung von Bmal1 ist naheliegend, da bereits bekannt ist, dass es scheinbar eben jenen Einfluss auf die Gene von mPer1 und mPer2 hat (135) (137) (s.o.). In der Nebenniere lag von Anfang an keine Regulation vor, so dass hier – anders als beim OX₁R – wie erwartet unter D/D-Konditionen keine Regulation auftrat. Da beide Rezeptoren im Gehirn zumindest teilweise Regulationen zeigen, im Gegensatz zur Peripherie, Bmal1 jedoch auch hier exprimiert und reguliert wird, ist davon auszugehen, dass die Expression zentral und peripher anders gesteuert wird, beziehungsweise, dass die Wertigkeit der zirkadianen Expression unterschiedlich ausgeprägt ist. Dies führt in der Folge zu der Annahme, dass die Aufgaben der Rezeptoren in Abhängigkeit vom Expressions-Ort unterschiedlich sind. In jedem Fall ist bewiesen, dass weder der eine, noch der andere Rezeptor ein clock gene ist. Wie bereits beschrieben, verliert Bmal1 einen Großteil seiner zirkadianen Rhythmik in Hypothalamus und Cortex durch Wegfall eines externen Zeitgebers. Nichtsdestotrotz weist es einen zirkadianen Rhythmus auf und gehört somit zu den Clock Genes. Peripher bleibt der zirkadiane Rhythmus in Leber und Nebenniere ebenfalls weiterhin erhalten. Auffällig ist, dass sowohl im Hypothalamus als auch in der Leber die Expressionshöhe nicht wie bei den anderen Genen unter D/D-Konditionen sinkt, sondern steigt. Wahrscheinlich ist diese Phasenverschiebung ebenfalls unter D/D-Konditionen erhalten, allerdings sind diese Zeitpunkte im vorliegenden Versuch nicht gemessen worden, daher kann hierzu leider keine zufriedenstellende Aussage gemacht werden. NFIL-3 und DBP zeigen zentral einen anti-phasischen Verlauf, welcher auch unter D/D-Konditionen weiterhin stabil vorliegt. Beide Gene zeigen bei der D/D-Expression eine starke zirkadiane Regulation, so dass sie ebenfalls mit ziemlicher Sicherheit intern über den SCN oder aber über ein abhängiges Period Gene reguliert werden. Peripher findet sich dasselbe Phänomen wie zentral. G6PC und GCK zeigen einige Besonderheiten. Zum einen ist GCK bei der L/D-Expression gar nicht und G6PC nur so schwach reguliert, dass dies auch aufgrund einer Messungenauigkeit entstanden sein kann und in Wahrheit überhaupt keine Regulation vorliegt. Vorbeschrieben ist der

Versuch von Cailotto et al. (231). Sie zeigten in einer Studie unter anderem auch die zirkadiane Expression von G6PC und GCK an scheinoperierten Mäusen. In ihrer Auswertung verglichen sie jeweils die mRNA-Expression des Peaks mit den anderen Zeitpunkten. Für G6PC fanden sie keine Regulation. In der vorliegenden Arbeit fanden wir in der Varianzanalyse eine geringfügige Regulation für das Gen, in der CircWave Analyse jedoch nicht. Cailotto et al. konnten für die GCK eine Regulation nachweisen, wohingegen in unseren Ergebnissen keinerlei Regulation vorlag. Die Kurvenverläufe stellen sich jedoch überwiegend identisch dar. Für G6PC liegt bei Cailotto et al. das Peak bei 6h (hier bei 4h) und für GCK bei 18h (hier 16h). Den Ergebnissen bei der L/D-Expression folgend zeigt G6PC wenig überraschend bei der D/D-Expression auch keine Regulation. GCK allerdings weist unter diesen Bedingungen plötzlich eine ausgeprägte zirkadiane Regulation auf, deren Ursache und Wertigkeit gänzlich unbekannt sind.

Insgesamt bleibt unklar, weshalb bei den L/D- und D/D-Expressionen die 24h-Werte zum Teil nicht den 0h-Werten entsprechen, was eigentlich erwartet wurde. Während dies bei der D/D-Expression zwar meistens der Fall ist und es nur wenige Abweichungen gibt (wie zum Beispiel GCK in der Leber), zeigen sich bei der L/D-Expression vor allem zentral starke Schwankungen. Hier gibt es sowohl im Kortex (beispielsweise Bmal1 und Per2) als auch im Hypothalamus (unter anderem PPO, Bmal1 und Per2) Gene, deren Expression am Ende des 24-Stunden-Zyklus deutlich geringer ist als zu Beginn. Einzige Ausnahme stellt PPO im Hypothalamus dar, welches zum Zeitpunkt 24h eine höhere Expression aufweist. Die Schwankungen fallen peripher in Leber und Nebenniere deutlich geringer aus, hier weicht jeweils nur ein Gen ab. Noch geringer sind die Schwankungen bei der gesamten D/D-Expression, zum Teil sind gar keine vorhanden. Auch finden sich innerhalb eines Genes in den verschiedenen Organen teilweise die beschriebenen Abweichungen, teilweise jedoch auch nicht, so dass insgesamt kein Muster auszumachen ist. Da die Varianzen der betroffenen Gene zu den Zeitpunkten 0h und 24h nicht aus dem Rahmen fallen, ist ein Messfehler aus Gründen der Desynchronisation der Mäuse auszuschließen. Eine Ausweitung der Messungen auf einen Zeitraum über 28 Stunden würde eventuell die Ursache aufdecken können. Mittels mHypoA sollte die zirkadiane Rhythmik auf zellulärer Ebene nachgestellt werden. Während die Uhrengene sowie NFIL-3 und DBP eine ausgeprägte Rhythmizität aufweisen, ist dies weder für die Orexin-Rezeptoren, noch für PPO darstellbar. Da über die clock genes bewiesen ist, dass die Synchronisation der Zellen mittels Horse Serum erfolgreich war, ist vermutlich die fehlende Spezifität der mHypoA-Zellen für das Orexin-Hormon-System ursächlich für das Ergebnis.

4.5 Ausblick

Über die zirkadiane Rhythmik des Orexin-Hormonsystems, insbesondere seiner beiden

Rezeptoren, ist bisher nur wenig bekannt. Die vorliegenden Versuche haben im Verlauf viele neue Fragen aufgeworfen. Es ist zu prüfen, ob PPO tatsächlich die vermuteten Unterschiede zwischen verschiedenen Spezies zeigt und inwieweit die Regulation der Expression organabhängig oder in verschiedenen Gehirnregionen unterschiedlich ist. Des Weiteren müsste bei der D/D-Expression ein engmaschigeres Monitoring der Expressionshöhe während der zweiten Hälfte des 24-Stunden-Zyklus durchgeführt werden. Es sollten auch hier vierstündige Messintervalle über den gesamten Zyklus erfolgen. Einige Gene zeigten in diesem Zeitraum bereits bei der L/D-Expression einen signifikanten Peak. Der fast identische Kurvenverlauf beider Versuche über die ersten zwölf Stunden lässt vermuten, dass dieses Peak bei der D/D-Expression ebenfalls auftritt, so zum Beispiel bei *mPer2* in der Leber sowie *mBmal1* in der Nebenniere. Auch für andere Gene scheint sich der bei der L/D-Expression ermittelte Verlauf bei der D/D-Expression fortzusetzen, zu beobachten bei *NFIL-3* und *DBP* in Cortex, Hypothalamus, Leber und Nebenniere. Dies würde weitere Evidenz geben für das Vorliegen zirkadianer Rhythmen der betroffenen Gene, beziehungsweise mit Sicherheit das Vorliegen einer zirkadianen Rhythmik ausschließen. Denn auch für die scheinbar nicht regulierten Gene kann bei der D/D-Expression nur eine eingeschränkte Aussage zum Verlust beziehungsweise nicht Vorliegen von Rhythmizität gemacht werden. Durch Messungen im Verlauf der vorbereitenden Woche auf den D/D-Versuch, ließe sich der Zeitpunkt der Desynchronisation der Orexinrezeptoren, sowie von *Bmal1* und *Per2* bestimmen. Eine Verlängerung des Zeitraums würde eine eventuell vorhandene Desynchronisation von *NFIL-3* und *DBP* aufdecken. Da beide Orexin-Rezeptoren einem gewissen Maß an Regulation zu unterliegen scheinen, wir dies jedoch nur zentral nachweisen konnten, sollte es an weiteren peripheren Organen untersucht werden. Ebenfalls hinsichtlich der ermittelten zirkadianen Rhythmik der Rezeptoren sollten auf molekularer Ebene weitere Untersuchungen durchgeführt werden, vor allem um die Abhängigkeit der Steuerung durch clock genes zu ermitteln. Vielleicht ergibt sich allein dadurch schon ein Aufschluss über die Hintergründe des heterogenen Vorliegens der Regulation in Abhängigkeit vom Ort. Ein erster Versuch könnte hier die Mutation des D-Box-Motivs im Promotor des *OX₂R* sein, um den Einfluss von *NFIL-3* und *DBP* zu prüfen. Sollte das D-Box-Motiv nur putativ vorliegen, ist eine Regulation über ein E-Box-Motiv denkbar, da der *OX₂R* in seinem Expressionsverlauf demjenigen von *Bmal1* ähnelt und letzteres wiederum zum Beispiel den Promotor von *mPer1* über das E-Box-Motiv mit reguliert (137). Sollte sich dieses Szenario als zutreffend erweisen, wäre in der Folge die Suche nach einem E-Box-Motiv im *OX₂R*-Promotor wegweisend. Um den phasischen Verlauf von *NFIL-3* und *DBP* im Kortex unter L/D-Bedingungen besser verstehen zu können, wären eine Analyse der beiden Gene in verschiedenen kortikalen Hirnregionen, sowie eine differenzierte Messung in einzelnen hypothalamischen Gebieten in Abhängigkeit von zirkadianen Aspekten

denkbare Ansatzpunkte.

Die Untersuchung eines Lichteffekts auf die Expression hat rückblickend mit den hier untersuchten Parametern eine unerwartet geringe Aussagekraft. Um eine verifizierbare Aussage zu erhalten, müsste ein neues Versuchsdesign entworfen werden. So könnte zum einen die Intensität des Lichtpulses variiert werden, zum anderen aber auch seine Dauer. Es sollten zu mehreren Zeitpunkten während und nach Applikation des Lichtpulses Messungen erfolgen, wahrscheinlich sogar bis einige Tage nach Gabe des Lichtpulses. Außerdem könnte zum Vergleich ein Versuch mit einem Dunkelpuls wie von Marston et al. (175) beschrieben vorgenommen werden. Zuletzt sollte eine Verifizierung der murinen Versuche durch einen Zellversuch mit NCI-Zellen anstatt mHypoA-Zellen erfolgen, da sie ein größeres Potential zu haben scheinen, die rhythmische Aktivität der Orexin-Rezeptoren auch tatsächlich messen zu können.

Insgesamt wäre es interessant zu verifizieren, ob es eine Altersabhängigkeit hinsichtlich der zirkadianen Regulation des Orexin-Systems gibt. Letzteres ist nicht unerheblich, da eine veränderte Konzentration an Orexin-Hormonen wie schon beschrieben für einige physiologische Alterungsprozesse ursächlich sein könnte (67).

5 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit stellten wir die Frage nach einer zirkadianen Kontrolle der Expression des Präpro-Orexins sowie beider Orexin-Rezeptoren in Abhängigkeit vom Expressionsort (zentral/peripher) sowie im Vergleich zu bekannten Uhrengenen. Des Weiteren sollte differenziert werden, ob der mutmaßliche Rhythmus vollständig extern oder intern oder sowohl intern als auch extern kombiniert kontrolliert wird.

Hierzu wurde die Genexpression der Orexin-Rezeptorsubtypen OX_1R und OX_2R sowie der Uhrengene *Bmal1* und *Per2* und der Transkriptionsfaktoren *NFIL3* und *DBP* in Gehirn, Hypothalamus, Leber und Nebenniere von Mäusen über 24 Stunden unter Hell/Dunkel- sowie Dunkel/Dunkel-Konditionen mittels qPCR untersucht. Anschließend wurde die Expression der Gene in einer murinen hypothalamischen Zelllinie untersucht. Außerdem wurde die Aktivität des humanen OX_2R -Promotors auf das Vorliegen eines zirkadianen Rhythmus untersucht.

Unter Hell/Dunkel-Konditionen unterlagen die zentralen Orexin-Rezeptoren einer zirkadianen Regulation. Der OX_2R zeigte kortikal und hypothalamisch eine Regulation, der OX_1R nur kortikal. In der Nebenniere fand sich keine Regulation. Die Gen-Expression von Präpro-Orexin war im Hypothalamus reguliert, jedoch entgegengesetzt zum OX_2R . Der Verlauf der Expressionskurve des OX_2R ähnelte stark demjenigen von *Bmal1*. Unter Dunkel/Dunkel-Konditionen verloren einige der regulierten Gene ihre zirkadiane Rhythmik. OX_1R und OX_2R zeigten zentral keinen zirkadianen Rhythmus, für OX_1R fand sich jedoch eine Regulation in der Nebenniere. *Bmal1* desynchronisierte, wenngleich ein gering ausgeprägter Rhythmus erhalten blieb. Im Zellversuch zeigten die Uhrengene einen ausgeprägten Rhythmus über 24 h. Für die Orexin-Rezeptoren sowie Präpro-Orexin war kein Rhythmus darstellbar. Hierfür ist möglicherweise eine fehlende Spezifität der verwendeten Zelllinie für das Orexin-System verantwortlich. Der humane OX_2R -Promotor zeigte mit aktivem SF1-Motiv im ersten Versuch eine zirkadiane Regulation, im zweiten Versuch nur im zweiten 24-Stunden-Zyklus eine leicht signifikante Zunahme der Expression. Diese war nach Mutation des SF1-Motivs nicht mehr nachweisbar, allerdings sank die Expressionshöhe auf 25 - 50 % derjenigen des aktiven Motivs, so dass eine stimulierende Wirkung von SF1 auf den Promoter angenommen werden kann.

Unsere Ergebnisse zeigen, dass die Orexin-Rezeptorsubtypen zentral zirkadian reguliert sind (OX_1R nur kortikal, OX_2R auch hypothalamisch) und dass der Verlauf der Expressionskurve des OX_2R demjenigen von *Bmal1* ähnelt. Da *Bmal1* unter Dunkel/Dunkel-Konditionen desynchronisierte und OX_2R keine Regulation mehr aufwies, kann ein regulierender Einfluss von *Bmal1* angenommen werden. Unter Dunkel/Dunkel-Konditionen verloren weitere der regulierten Gene ihre zirkadiane Rhythmik, was für die Regulation durch einen externen Zeitgeber, eventuell mit interner Modulation spricht.

6 Literaturverzeichnis

1. **Sakurai, T, et al.** *Orexins and Orexin Receptors: A Family of Hypothalamic Neuropeptides and G Protein-Coupled Receptors that Regulate Feeding Behavior.* Cell; Vol. 92, 573–585 (1998).
2. **de Lecea L, Kilduff T, Peyron C, Gao X, Foye P, Danielson P, Fukuhara C, Battenberg E, Gautvik V, Bartlett F, Frankel W, van den Pol A, Bloom F, Gautvik K, Sutcliffe J.** *The hypocretins Hypothalamus-specific peptides with neuroexcitatory activity.* Proceedings of the National Academy of Science of the USA; Vol. 6, 322-327 (1998).
3. **Karteris E, Machado R, Chen J, Zervou S, Hillhouse E, Randeva H.** *Food deprivation differentially modulates orexin receptor expression and signaling in rat hypothalamus and adrenal cortex.* American Journal of Physiology; Vol. 288, 1089-1100 (2004).
4. **Ammoun S, Lindholm D, Wootz H, Akerman K, Kukkonen J.** *G-protein-coupled OX1 orexin/hcrt-1 hypocretin receptors induce caspase-dependent and -independent cell death through p38 mitogen-/stress-activated protein kinase.* The Journal of Biological Chemistry; Vol. 281, 834-842 (2005).
5. **Jöhren O, Neidert S, Kummer M, Dendorfer A, Dominiak P.** *Prepro-Orexin and Orexin Receptor mRNAs Are Differentially Expressed in Peripheral Tissues of Male and Female Rats.* Endocrinology; Vol. 142, 3324-3331 (2001).
6. **Sakurai, T., Moriguchi, T., Furuya, K., Kajiwar, N., Nakamura, T., Yanagisawai, M., Goto, K.** *Structure and Function of Human Prepro-orexin Gene.* The Journal of Biological Chemistry; Vol. 274, 17771–17776 (1999).
7. **Gautvik K, de Lecea L, Gautvik V, Danielson P, Tranque P, Dopazo A, Bloom F, Sutcliffe J.** *Overview of the most prevalent hypothalamus-specific mRNAs, as identified by directional tag PCR subtraction.* Proceedings of the National Academy of Science of the USA; Vol. 93, 8733-8738 (1996).
8. **Date Y1, Ueta Y, Yamashita H, Yamaguchi H, Matsukura S, Kangawa K, Sakurai T, Yanagisawa M, Nakazato M.** *Orexins, orexigenic hypothalamic peptides, interact with autonomic, neuroendocrine and neuroregulatory systems.* Proceedings of the National Academy of Science of the USA; Vol. 96, 748-753 (1999).
9. **Cutler D, Morris R, Sheridhar V, Wattam T, Holmes S, Patel S, Arch J, Wilson S, Buckingham R, Evans M, Leslie R, Williams G.** *Differential distribution of orexin-A and orexin-B immunoreactivity in the rat brain and spinal cord.* Peptides; Vol. 20, 1455-1470 (1999).
10. **Mintz E, van den Pol A, Casano A, Albers H.** *Distribution of hypocretin-(orexin) immunoreactivity in the central nervous system of Syrian hamsters (Mesocricetus auratus).* Journal of Chemical Neuroanatomy; Vol. 21, 225-38 (2001).

11. **Novak C, Albers H.** *Localization of hypocretin-like immunoreactivity in the brain of the diurnal rodent, Arvicanthis niloticus.* Journal of Chemical Neuroanatomy; Vol. 23, 49-58 (2002).
12. **McGranaghan P, Piggins H.** *Orexin A-like immunoreactivity in the hypothalamus and thalamus of the Syrian hamster (Mesocricetus auratus) and Siberian hamster (Phodopus sungorus), with special reference to circadian structures.* Brain Research; Vol. 904, 234-244 (2001).
13. **van den Pol, A.** *Hypothalamic hypocretin (orexin): robust innervation off the spinal cord.* The Journal of Neuroscience; Vol.19, 3171-3182 (1999).
14. **Marcus J, Aschkenasi C, Lee C, Chemelli R, Saper C, Yanagisawa M, Elmquist J.** *Differential Expression of Orexin Receptors 1 and 2 in the Rat Brain.* The Journal of Comparative Neurology; Vol. 435, 6-25 (2001).
15. **Ikeno T, Yan L.** *A comparison of the orexin receptor distribution in the brain between diurnal Nile grass rats (Arvicanthis niloticus) and nocturnal mice (Mus musculus).* Brain Research; Vol. 1690, 89-95 (2018).
16. **Eriksson K, Sergeeva O, Brown R, Haas H.** *Orexin/hypocretin excites the histaminergic neurons of the tuberomammillary nucleus.* The Journal of Neuroscience; Vol. 21, 9273-9279 (2001).
17. **Huang Z, Qu W, Li W, Mochizuki T, Eguchi N, Watanabe T, Urade Y, Hayaishi O.** *Arousal effect of orexin A depends on activation of the histaminergic system.* Proceedings of the National Academy of Science of the USA; Vol. 98, 9965-9970 (2001).
18. **Lin L, Wisor J, Shiba T, Taheri S, Yanai K, Wurts S, Lin X, Vitaterna M, Takahashi J, Lovenberg T, Koehl M, Uhl G, Nishino S, Mignot E.** *Measurement of hypocretin/orexin content in the mouse brain using an enzyme immunoassay: the effect of circadian time, age and genetic background.* Peptides; Vol. 23, 2203-2211 (2002).
19. **Bayer L, Eggermann E, Serafin M, Saint-Mieux B, Machard D, Jones B, Mühlethaler M.** *Orexins (hypocretins) directly excite tuberomammillary neurons.* The European Journal of Neuroscience; Vol. 14, 1571-1575 (2001).
20. **Ishizuka T, Yamamoto Y, Yamatodani A.** *The effect of orexin-A and -B on the histamine release in the anterior hypothalamus in rats.* Neuroscience Letters; Vol. 26, 93-96 (2002).
21. **Yamanaka, A., Tsujino, N., Funahashi, H., Honda, K., Guan, J., Wang, Q., Tominaga, M., Goto, K., Shioda, S., Sakurai, T.** *Orexins Activate Histaminergic Neurons via the Orexin 2 Receptor.* Biochemical and Biophysical Research Communications; Vol. 290, 1237-1245 (2002).
22. **Adie, W. J.** *A Case of true Narcolepsy: Onset at the Age of 12 Years.* Proceedings of the Royal Society of Medicine; Vol. 19, 2 (1926).
23. **Peyron, C., Faraco, J., Rogers, W., Ripley, B., Overeem, S., Charnay, Y.,**

- Nevsimalova, S., Aldrich, M., Reynolds, D., Albin, R., Li, R., Hungs, M., Pedrazzoli, M., Padigaru, M., Kucherlapati, M., Fan, J., Maki, R., Boura, C., Nishino, S., Mignot, E.** *A mutation in a case of early onset narcolepsy and a generalized absence of hypocretin peptides in human narcoleptic brains.* Nature Medicine; Vol. 6, 991-997 (2000).
24. **Nishino S, Ripley B, Overeem S, Lammers G, Mignot E.** *Hypocretin (orexin) deficiency in human narcolepsy.* Lancet; Vol. 355, 39-40 (2000).
25. **Gencik M, Dahmen N, Wiczorek S, Kasten M, Bierbrauer J, Anghelescu I, Szegedi A, Menezes Saecker A, Epplen J.** *A prepro-orexin gene polymorphism is associated with narcolepsy.* Neurology; Vol. 56, 115-117 (2001).
26. **Chemelli, R., Willie, J., Sinton, C., Elmquist, J., Scammell, T., Lee, C., Richardson, J., Williams, S., Xiong, Y., Kisanuki, Y., Fitch, T., Nakazato, M., Hammer, R., Saper, C., Yanagisawa, M.** *Narcolepsy in orexin Knockout Mice: Molecular Genetics of Sleep.* Cell; Vol. 98, 437–451 (1999).
27. **Hara J, Beuckmann C, Nambu T, Willie J, Chemelli R, Sinton C, Sugiyama F, Yagami K, Goto K, Yanagisawa M, Sakurai T.** *Genetic Ablation of Orexin Neurons in Mice Results in Narcolepsy, Hypophagia and Obesity.* Neuron; Vol. 30, 345-354 (2001).
28. **Lin L, Faraco J, Li R, Kadotani H, Rogers W, Lin X, Qiu X, de Jong P, Nishino S, Mignot E.** *The Sleep Disorder Canine Narcolepsy Is Caused by a Mutation in the Hypocretin (Orexin) Receptor2 Gene.* Cell; Vol. 98, 365-376 (1999).
29. **Thannickal T, Moore R, Nienhuis R, Ramanathan L, Gulyani S, Aldrich M, Cornford M, Siegel J.** *Reduced Number of Hypocretin Neurons in Human Narcolepsy.* Neuron; Vol. 27, 469-474 (2000).
30. **Thannickal, T., Nienhuis, R., Siegel, J.** *Localized Loss of Hypocretin (Orexin) Cells in Narcolepsy Without Cataplexy.* Sleep; Vol. 32, 993-998 (2009).
31. **Tsukamoto H, Ishikawa T, Fujii Y, Fukumizu M, Sugai K, Kanbayashi T.** *Undetectable levels of CSF hypocretin-1 (orexin-A) in two prepubertal boys with narcolepsy.* Neuropediatrics; Vol. 33, 51-52 (2002).
32. **Higuchi S, Usui A, Murasaki M, Matsushita S, Nishioka N, Yoshino A, Matsui T, Muraoka H, Ishizuka Y, Kanba S, Sakurai T.** *Plasma orexin-A is lower in patients with narcolepsy.* Neuroscience Letters; Vol. 318, 61-64 (2002).
33. **Mishima K, Fujiki N, Yoshida Y, Sakurai T, Honda M, Mignot E, Nishino S.** *Hypocretin receptor expression in canine and murine narcolepsy models and in hypocretin-ligand deficient human narcolepsy.* Sleep; Vol. 31, 1119–1126 (2008).
34. **Tang J, Chen J, Ramanjaneya M, Punnett A, Conner A, Rande H.** *The signalling profile of recombinant human orexin-2-receptor.* Cellular Signalling; Vol. 20, 1651-1661 (2008).
35. **Zeitler J, Buckmaster C, Parker K, Hauck C, Lyons D, Mignot E.** *Circadian and Homeostatic Regulation of Hypocretin in a Primate Model: Implications for the*

Consolidation of Wakefulness. The Journal of Neuroscience; Vol. 23, 3555-3560 (2003).

36. **Helmus T, Rosenthal L, Bishop C, Roehrs T, Syron M, Roth T.** *The alerting effects of short and long naps in narcoleptic, sleep deprived, and alert individuals*. Sleep; Vol. 20, 251-257 (1997).

37. **John J, Wu M, Siegel J.** *Systemic administration of hypocretin-1 reduces cataplexy and normalizes sleep and waking durations in narcoleptic dogs*. Sleep Research Online; Vol. 3, 23-28 (2000).

38. **Kantor S, Mochizuki T, Lops S, Ko B, Clain E, Clark E, Yamamoto M, Scammell T.** *Orexin gene therapy restores the timing and maintenance of wakefulness in narcoleptic mice*. Sleep; Vol. 36, 1129-1138 (2013).

39. **Baier P, Hallschmid M, Seeck-Hirschner M, Weinhold S, Burkert S, Diessner N, Göder R, Aldenhoff J, Hinze-Selch D.** *Effects of intranasal hypocretin-1 (orexin A) on sleep in narcolepsy with cataplexy*. Sleep Medicine; Vol. 12, 941-946 (2011).

40. **Weinhold S, Seeck-Hirschner M, Nowak A, Hallschmid M, Göder R, Baier P.** *The effect of intranasal orexin-A (hypocretin-1) on sleep, wakefulness and attention in narcolepsy with cataplexy*. Behavioural Brain Research; Vol. 262, 8-13 (2014).

41. **Irukayama-Tomobe Y, Ogawa Y, Tominaga H, Ishikawa Y, Hosokawa N, Ambai S, Kawabe Y, Uchida S, Nakajima R, Saitoh T, Kanda T, Vogt K, Sakurai T, Nagase H, Yanagisawa M.** *Nonpeptide orexin type-2 receptor agonist ameliorates narcolepsy-cataplexy symptoms in mouse models*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA; Vol. 114, 5731-5736 (2017).

42. **Prober D, Rihel J, Onah A, Sung R, Schier A.** *Hypocretin/orexin overexpression induces an insomnia-like phenotype in zebrafish*. The Journal of Neuroscience; Vol. 26, 13400-13410 (2006).

43. **Alakuijala A, Sarkanen T, Partinen M.** *Hypocretin-1 Levels Associate with Fragmented Sleep in Patients with Narcolepsy Type 1*. Sleep; Vol. 39, 1047–1050 (2016).

44. **Rayner, H.** *Orexin as a possible cause of insomnia in dialysis patients*. American Journal of Kidney Diseases; Vol. 41, 1335-1336 (2003).

45. **Neubauer, D.** *Almorexant, a dual orexin receptor antagonist for the treatment of insomnia*. Current Opinion in Investigational Drugs; Vol. 11, 101-110 (2010).

46. **Herring W, Snyder E, Budd K, Hutzelmann J, Snively D, Liu K, Lines C, Roth T, Michelson D.** *Orexin receptor antagonism for treatment of insomnia: a randomized clinical trial of suvorexant*. Neurology; Vol. 79, 2265-2274 (2012).

47. **Ida T, Nakahara K, Murakami T, Hanada R, Nakazato M, Murakami N.** *Possible Involvement of Orexin in the Stress Reaction in Rats*. Biochemical and Biophysical Research Communications; Vol. 270, 318-23 (2000).

48. **Geerling J, Mettenleiter T, Loewy A.** *Orexin Neurons Project to Diverse Sympathetic Outflow Systems*. Neuroscience; Vol. 122, 541-550 (2003).

49. **Kayaba Y1, Nakamura A, Kasuya Y, Ohuchi T, Yanagisawa M, Komuro I, Fukuda Y, Kuwaki T.** *Attenuated defense response and low basal blood pressure in orexin knockout mice.* American Journal of Physiology; Vol. 285, 581-593 (2003).
50. **van den Top M, Nolan M, Lee K, Richardson P, Buijs R, Davies C, Spanswick D.** *Orexins induce increased excitability and synchronization of rat sympathetic preganglionic neurons.* The Journal of Physiology; Vol. 549, 809-821 (2003).
51. **España R, Plahn S, Berridge C.** *Circadian-dependent and circadian-independent behavioral actions of hypocretin/orexin.* Brain Research; Vol. 943, 224-236 (2002).
52. **Nambu T, Sakurai T, Mizukami K, Hosoya Y, Yanagisawa M, Goto K.** *Distribution of orexin neurons in the adult rat brain.* Brain Research; Vol. 827, 243-260 (1999).
53. **Anand B, Brobeck J.** *Hypothalamic control of food intake in rats and cats.* The Yale Journal of Biology and Medicine, Vol. 24, 123-140 (1951).
54. **Yamanaka A, Beuckmann C, Willie J, Hara J, Tsujino N, Mieda M, Tominaga M, Yagami Ki, Sugiyama F, Goto K, Yanagisawa M, Sakurai T.** *Hypothalamic Orexin Neurons Regulate Arousal According to Energy Balance in Mice.* Neuron; Vol. 38, 701-713 (2003).
55. **Mendoza J, Lopez-Lopez C, Revel FG, Jeanneau K, Delerue F, Prinssen E, Challet E, Moreau JL, Grundschober C.** *Dimorphic effects of leptin on the circadian and hypocretinergic systems of mice.* Journal of neuroendocrinology; Vol. 23, 28-38 (2011).
56. **Mistlberger R, Antle M, Kilduff T, Jones M.** *Food- and light-entrained circadian rhythms in rats with hypocretin-2-saporin ablations of the lateral hypothalamus.* Brain Research; Vol. 980, 161-168 (2003).
57. **Fujiki N, Yoshida Y, Ripley B, Honda K, Mignot E, Nishino S.** *Changes in CSF hypocretin-1 (orexin A) levels in rats across 24 hours and in response to food deprivation.* Neuroreport; Vol. 12, 993-997 (2001).
58. **Almeneessier AS, Alzoghaibi M, BaHammam AA, Ibrahim MG, Olaish AH, Nashwan SZ, BaHammam AS.** *The effects of diurnal intermittent fasting on the wake-promoting neurotransmitter orexin-A.* Annals of thoracic medicine; Vol. 13, 48-54 (2018).
59. **Linehan V, Fang LZ, Hirasawa M.** *Short-term high-fat diet primes excitatory synapses for long-term depression in orexin neurons.* The Journal of physiology; Vol. 596, 305-316 (2018).
60. **Ramirez-Plascencia OD, Saderi N, Escobar C, Salgado-Delgado RC.** *Feeding during the rest phase promotes circadian conflict in nuclei that control energy homeostasis and sleep-wake cycle in rats.* The European journal of neuroscience; Vol. 45, 1325-1332 (2017).
61. **Kok S, Overeem S, Visscher T, Lammers G, Seidell J, Pijl H, Meinders A.** *Hypocretin Deficiency in Narcoleptic Humans Is Associated with Abdominal Obesity.* Obesity Research; Vol. 11, 1147-54 (2003).

62. **Kok S, Meinders A, Overeem S, Lammers G, Roelfsema F, Frölich M, Pijl H.** *Reduction of plasma leptin levels and loss of its circadian rhythmicity in hypocretin (orexin)-deficient narcoleptic humans.* The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism; Vol. 87, 805-809 (2002).
63. **Clément K, Vaisse C, Lahlou N, Cabrol S, Pelloux V, Cassuto D, Gormelen M, Dina C, Chambaz J, Lacorte J, Basdevant A, Bougnères P, Lebouc Y, Froguel P, Guy-Grand B.** *A mutation in the human leptin receptor gene causes obesity and pituitary dysfunction.* Nature; Vol. 392, 398-401 (1998).
64. **López M, Seoane L, García M, Lago F, Casanueva F, Sejaris R, Diéguez C.** *Leptin regulation of prepro-orexin and orexin receptor mRNA levels in the hypothalamus.* Biochemical and Biophysical Research Communication; Vol. 269, 41-45 (2000).
65. **Tsuneki H, Murata S, Anzawa Y, Soeda Y, Tokai E, Wada T, Kimura I, Yanagisawa M, Sakurai T, Sasaoka T.** *Age-related insulin resistance in hypothalamus and peripheral tissues of orexin knockout mice.* Diabetologia; Vol. 51, 657-667 (2008).
66. **Shiuchi T, Haque M, Okamoto S, Inoue T, Kageyama H, Lee S, Toda C, Suzuki A, Bachman E, Kim Y, Sakurai T, Yanagisawa M, Shioda S, Imoto K, Minokoshi Y.** *Hypothalamic Orexin Stimulates Feeding-Associated Glucose Utilization in Skeletal Muscle via Sympathetic Nervous System.* Cell and Metabolism; Vol. 10, 466-480 (2009).
67. **Kessler B, Stanley E, Frederick-Duus D, Fadel J.** *Age-related loss of orexin/hypocretin neurons.* Neuroscience; Vol. 178, 82-88 (2011).
68. **Kaczmarek P, Skrzypski M, Pruszyńska-Oszmerek E, Sassek M, Kolodziejewski PA, Billert M, Szczepankiewicz D, Wojciechowski T, Maechler P, Nowak KW, Strowski MZ.** *Chronic orexin-A (hypocretin-1) treatment of type 2 diabetic rats improves glucose control and beta-cell functions.* Journal of physiology and pharmacology: an official journal of the Polish Physiological Society; Vol. 68, 669-681 (2017).
69. **Maejima Y, Takahashi S, Takasu K, Takenoshita S, Ueta Y, Shimomura K.** *Orexin action on oxytocin neurons in the paraventricular nucleus of the hypothalamus.* Neuroreport; Vol. 28, 360-366 (2017).
70. **Buijs R, Chun S, Nijima A, Romijn H, Nagai K.** *Parasympathetic and Sympathetic Control of the Pancreas – A Role for the Suprachiasmatic Nucleus and Other Hypothalamic Centers That Are Involved in the Regulation of Food Intake.* The Journal of Comparative Neurology; Vol. 431, 405-423 (2001).
71. **Kiwaki K, Kotz C, Wang C, Lanningsham-Foster L, Levine J.** *Orexin A (hypocretin1) injected into hypothalamic paraventricular nucleus and spontaneous physical activity in rats.* American Journal of Physiology; Vol. 286, 551-559 (2003).
72. **Nixon J, Smale L.** *Individual differences in wheel-running rhythms are related to temporal and spatial patterns of activation of orexin A and B cells in a diurnal rodent (Arvicanthis niloticus).* Neuroscience; Vol. 127, 25-34 (2004).

73. **Zhang J, Sampogna S, Morales F, Chase M.** *Age-related changes in hypocretin (orexin) immunoreactivity in the cat brainstem.* Brain Research; Vol. 930, 206-211 (2002).
74. **Kanbayashi T, Yano T, Ishiguro H, Kawanishi K, Chiba S, Aizawa R, Sawaishi Y, Hirota K, Nishino S, Shimizu T.** *Hypocretin-1 (orexin-A) levels in human lumbar CSF in different age groups: infants to elderly persons.* Sleep; Vol. 25, 337-339 (2002).
75. **Matsumura T, Nakayama M, Nomura A, Naito A, Kamahara K, Kadono K, Inoue M, Homma T, Sekizawa K.** *Age-related changes in plasma orexin-A concentrations.* Experimental Gerontology; Vol. 37, 1127-1130 (2002).
76. **Desarnaud F, Murillo-Rodriguez E, Lin L, Xu M, Gerashchenko D, Shiromani S, Nishino S, Mignot E, Shiromani P.** *The diurnal rhythm of hypocretin in young and old F344 rats.* Sleep; Vol. 27, 851-856 (2004).
77. **Porkka-Heiskanen T, Alanko L, Kalinchuk A, Heiskanen S, Stenberg D.** *The effect of age on prepro-orexin gene expression and contents of orexin A and B in the rat brain.* Neurobiology of Aging; Vol. 25, 231-238 (2004).
78. **Fronczek R, van Geest S, Frölich M, Overeem S, Roelandse F, Lammers G, Swaab D.** *Hypocretin (orexin) loss in Alzheimer's disease.* Neurobiology of Aging; Vol. 33, 1642-1650 (2011).
79. **Guan J, Wang Q, Shioda S.** *Immunoelectron microscopic examination of orexin-like immunoreactive fibers in the dorsal horn of the rat spinal cord.* Brain Research; Vol. 987, 86-92 (2003).
80. **Yamamoto T, Nozaki-Taguchi N, Chiba T.** *Analgesic effect of intrathecally administered orexin-A in the rat formalin test and in the rat hot plate test.* British Journal of Pharmacology; Vol.137, 170-176 (2002).
81. **Cheng J, Chou R, Hwang L, Chiou L.** *Antiallodynic effects of intrathecal orexins in a rat model of postoperative pain.* The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics; Vol. 307, 1065-1071 (2003).
82. **Suyama H, Kawamoto M, Shiraishi S, Gaus S, Kajiyama S, Yuge O.** *Analgesic effect of intrathecal administration of orexin on neuropathic pain in rats.* In Vivo; Vol. 18, 119-123 (2004).
83. **Yamamoto T, Saito O, Shono K, Aoe T, Chiba T.** *Anti-mechanical allodynic effect of intrathecal and intracerebroventricular injection of orexin-A in the rat neuropathic pain model.* Neuroscience Letters; Vol. 347, 183-86 (2003).
84. **Grudt T, van den Pol A, Perl E.** *Hypocretin 2 (orexin-B) modulation of superficial dorsal horn activity in rat.* The Journal of Physiology; Vol. 538, 517-525 (2002).
85. **Bingham S, Davey P, Babbs A, Irving E, Sammons M, Wyles M, Jeffrey P, Cutler L, Riba I, Johns A, Porter R, Upton N, Hunter A, Parsons A.** *Orexin-A, an hypothalamic peptide with analgesic properties.* Pain, Vol. 92, 81-90 (2001).
86. **Harris G, Wimmer M, Aston-Jones G.** *A role for lateral hypothalamic orexin neurons*

in reward seeking. Nature; Vol. 437, 556-559 (2005).

87. **Dayas C, McGranahan T, Martin-Fardon R, Weiss F.** *Stimuli linked to ethanol availability activate hypothalamic CART and orexin neurons in a reinstatement model of relapse*. Biol Psychiatry; Vol. 63, 152-157 (2008).

88. **Ranjbar-Slamloo Y, Azizi H, Fathollahi Y, Semnanian S.** *Orexin receptor type-1 antagonist SB-334867 inhibits the development of morphine analgesic tolerance in rats*. Peptides; Vol. 35, 56-59 (2012).

89. **Georgescu D, Zachariou V, Barrot M, Mieda M, Willie J, Eisch A, Yanagisawa M, Nestler E, DiLeone R.** *Involvement of the lateral hypothalamic peptide orexin in morphine dependence and withdrawal*. The Journal of Neuroscience; Vol. 23, 3106-31011 (2003).

90. **Narita M, Nagumo Y, Hashimoto S, Narita M, Khotib J, Miyatake M, Sakurai T, Yanagisawa M, Nakamachi T, Shioda S, Suzuki T.** *Direct involvement of orexinergic systems in the activation of the mesolimbic dopamine pathway and related behaviors induced by morphine*. The Journal of Neuroscience; Vol. 26, 398-405 (2006).

91. **Boutrel B, Kenny P, Specio S, Martin-Fardon R, Markou A, Koob G, de Lecea L.** *Role for hypocretin in mediating stress-induced reinstatement of cocaine-seeking behavior*. Proceedings of the National Academy of Science of the USA; Vol. 102, 19168-19173 (2005).

92. **Lawrence A, Cowen M, Yang H, Chen F, Oldfield B.** *The orexin system regulates alcohol-seeking in rats*. British Journal of Pharmacology; Vol. 148, 752-759 (2006).

93. **Sahafzadeh M, Karimi-Haghighi S, Mousavi Z, Haghparast A.** *Role of the orexin receptors within the nucleus accumbens in the drug priming-induced reinstatement of morphine seeking in the food deprived rats*. Brain Research Bulletin; Vol. 137, 217-224 (2018).

94. **Richards J, Simms J, Steensland P, Taha S, Borgland SL, Bonci A, Bartlett SE.** *Inhibition of orexin-1/hypocretin-1 receptors inhibits yohimbine-induced reinstatement of ethanol and sucrose seeking in Long-Evans rats*. Psychopharmacology; Vol. 199, 109-117 (2008).

95. **Thannickal T, Lai Y, Siegel J.** *Hypocretin (orexin) cell loss in Parkinson's disease*. Brain; Vol. 130, 1586-1595 (2007).

96. **Holland P, Akerman S, Goadsby P.** *Orexin 1 receptor activation attenuates neurogenic dural vasodilation in an animal model of trigeminovascular nociception*. The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics; Vol. 315, 1380-1385 (2005).

97. **Holland P, Akerman S, Goadsby P.** *Modulation of nociceptive dural input to the trigeminal nucleus caudalis via activation of the orexin 1 receptor in the rat*. The European Journal of Neuroscience; Vol. 24, 2825-2833 (2006).

98. **Erken H, Erken G, Genç O, Kortunay S, Sahiner M, Turgut G, Turgut S.** *Orexins cause epileptic activity*. Peptides; Vol. 37, 161-164 (2012).

99. **Hayatdavoudi P, Sadeghnia HR, Mohamadian-Roshan N, Hadjzadeh MA.** *Beneficial Effects of Selective Orexin-A Receptor Antagonist in 4-aminopyridine-induced Seizures in Male Rats.* Advanced biomedical research; Vol. 6, 162 (2017).
100. **Ma Z, Jiang W, Zhang EE.** *Orexin signaling regulates both the hippocampal clock and the circadian oscillation of Alzheimer's disease-risk genes.* Scientific Reports; Vol. 6:36035, 1-14 (2016).
101. **Boddum K, Hansen MH, Jennum PJ, Kornum BR.** *Cerebrospinal Fluid Hypocretin-1 (Orexin-A) Level Fluctuates with Season and Correlates with Day Length.* Public Library of Science (PLOS ONE); Vol. 11, 1-13 (2016).
102. **Yan L, Lonstein JS, Nunez AA.** *Light as a modulator of emotion and cognition: Lessons learned from studying a diurnal rodent.* Hormones and behaviour; doi: 10.1016/j.yhbeh.2018.09.003. [Epub ahead of print] (2018).
103. **Malendowicz L, Hochol A, Ziolkowska A, Nowak M, Gottardo L, Nussdorfer G.** *Prolonged orexin administration stimulates steroid-hormone secretion, acting directly on the rat adrenal gland.* Internal Journal of Molecular Medicine; Vol. 7, 401-404 (2001).
104. **Randeva HS, Karteris E, Grammatopoulos D, Hillhouse EW.** *Expression of orexin-A and functional orexin type 2 receptors in the human adult adrenals: implications for adrenal function and energy homeostasis.* Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism; Vol. 86, 4808-4813 (2001).
105. **Malendowicz L, Tortorella C, Nussdorfer G.** *Orexins stimulate corticosterone secretion of rat adrenocortical cells, through the activation of the adenylate cyclase-dependent signaling cascade.* The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology; Vol. 70, 185-188 (1999).
106. **Mazzocchi G, Malendowicz L, Gottardo L, Aragona F, Nussdorfer G.** *Orexin A stimulates cortisol secretion from human adrenocortical cells through activation of the adenylate cyclase-dependent signaling cascade.* The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism; Vol. 86, 778-782 (2001).
107. **Ziolkowska A, Spinazzi R, Albertin G, Nowak M, Malendowicz L, Tortorella C, Nussdorfer G.** *Orexins stimulate glucocorticoid secretion from cultured rat and human adrenocortical cells, exclusively acting via the OX1 receptor.* Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology; Vol. 96, 423-429 (2005).
108. **Wenzel J, Grabinski N, Knopp C, Dendorfer A, Ramanjaneya M, Randeva H, Ehrhart-Bornstein M, Dominiak P, Jöhren O.** *Hypocretin/orexin increases the expression of steroidogenic enzymes in human adrenocortical NCI H295R Cells.* American Journal of Physiology; Vol. 297, 1601-1609 (2009).
109. **Perin M, Longordo F, Massonnet C, Welker E, Lüthi A.** *Diurnal inhibition of NMDA-EPSCs at rat hippocampal mossy fibre synapses through orexin-2 receptors.* Journal of Physiology; Vol. 592, 4277-4295 (2014).

110. **Sikder D, Kodadek T.** *The neurohormone orexin stimulates hypoxia-inducible factor-1 activity.* Genes & Development; Vol. 21, 2995-3005 (2007).
111. **Feng Y, Liu T, Li X, Liu Y, Zhu X, Jankovic J, Pan T, Wu Y.** *Neuroprotection by Orexin-A via HIF-1 α induction in a cellular model of Parkinson's disease.* Neuroscience Letters; Vol. 579, 35-40 (2014).
112. **Semenza G, Wang G.** *A nuclear factor induced by hypoxia via de novo protein synthesis binds to the human erythropoietin gene enhancer at a site required for transcriptional activation.* Molecular and Cellular Biology; Vol. 12, 5447–5454 (1992).
113. **Wang G, Semenza G.** *Characterization of hypoxia-inducible factor 1 and regulation of DNA binding activity by hypoxia.* The Journal of Biological Chemistry; Vol. 268, 21513-21518 (1993).
114. **Semenza G, Roth P, Fang H, Wang G.** *Transcriptional regulation of genes encoding glycolytic enzymes by hypoxia-inducible factor 1.* The Journal of Biological Chemistry; Vol. 269, 23757-23763 (1994).
115. **Maxwell P, Wiesener M, Chang G, Clifford S, Vaux E, Cockman M, Wykoff C, Pugh C, Maher E, Ratcliffe P.** *The tumour suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis.* Nature; Vol. 399, 271-275 (1999).
116. **Yuan L, Dong H, Zhang H, Zhao R, Gong G, Chen X, Zhang L, Xiong L.** *Neuroprotective effect of orexin-A is mediated by an increase of hypoxia-inducible factor-1 activity in rat.* Anesthesiology; Vol. 114, 340-354 (2011).
117. **Moore R, Eichler V.** *Loss of a circadian adrenal corticosterone rhythm following suprachiasmatic lesions in the rat.* Brain Research; Vol. 42, 201-206 (1972).
118. **Moore R, Lenn N.** *A retinohypothalamic projection in the rat.* The Journal of Comparative Neurology; Vol. 146, 1-14 (1972).
119. **Ibuka N, Kawamura H.** *Loss of circadian rhythm in sleep-wakefulness cycle in the rat by suprachiasmatic nucleus lesions.* Brain Research; Vol. 96, 76-81 (1975).
120. **Balsalobre A, Damiola F, Schibler U.** *A Serum Shock Induces Circadian Gene Expression in Mammalian Tissue Culture Cells.* Cell; Vol. 93, 929–937 (1998).
121. **Yoo S, Yamazaki S, Lowrey P, Shimomura K, Ko C, Buhr E, Slepka S, Hong H, Oh W, Yoo O, Menaker M, Takahashi J.** *PERIOD2 LUCIFERASE real-time reporting of circadian dynamics reveals persistent circadian oscillations in mouse peripheral tissues.* Proceedings of the National Academy of Science of the USA; Vol. 101, 5339-5346 (2003).
122. **Le Minh N, Damiola F, Tronche F, Schütz G, Schibler U.** *Glucocorticoid hormones inhibit food-induced phase-shifting of peripheral circadian oscillators.* The EMBO Journal; Vol. 20, 7128-7136 (2001).
123. **Ralph M, Foster R, Davis F, Menaker M.** *Transplanted Suprachiasmatic Nucleus Determines Circadian Period.* Science; Vol. 247, 975-978 (1990).
124. **Moore R, Klein D.** *Visual pathways and the central neural control of a circadian*

- rhythm in pineal Serotonin N-Acetyltransferase activity*. Brain Research; Vol. 71, 17-33 (1974).
125. **Boivin D, Duffy J, Kronauer R, Czeisler C.** *Dose-response relationships for resetting of human circadian clock by light*. Nature, Vol. 379, 540-542 (1996).
126. **Silver R, LeSauter J, Tresco P, Lehman M.** *A diffusible coupling signal from the transplanted suprachiasmatic nucleus controlling circadian locomotor rhythms*. Nature; Vol. 382, 810-813 (1996).
127. **Balsalobre A, Marcacci L, Schibler U.** *Multiple signaling pathways elicit circadian gene expression in cultured Rat-1 fibroblasts*. Current Biology; Vol. 10, 1291-1294 (2000).
128. **Oishi K, Amagai N, Shirai H, Kadota K, Ohkura N, Ishida N.** *Genome-wide Expression Analysis Reveals 100 Adrenal Gland-dependent Circadian Genes in the Mouse Liver*. DNA Research; Vol. 12, 191-202 (2005).
129. **Storch K, Lipan O, Leykin I, Viswanathan N, Davis F, Wong W, Weitz C.** *Extensive and divergent circadian gene expression in liver and heart*. Nature; Vol. 417, 78-83 (2002).
130. **Belle MD, Piggins HD.** *Circadian regulation of mouse suprachiasmatic nuclei neuronal states shapes responses to orexin*. The European Journal of Neuroscience; Vol. 45, 723-732 (2017).
131. **Hu Y, Shmygelska A, Tran D1, Eriksson N, Tung JY, Hinds DA.** *GWAS of 89,283 individuals identifies genetic variants associated with self-reporting of being a morning person*. Nature Communications; Vol. 7, 10448 (2016).
132. **Jones SE, Tyrrell J, Wood AR, Beaumont RN, Ruth KS, Tuke MA, Yaghootkar H, Hu Y, Teder-Laving M, Hayward C, Roenneberg T, Wilson JF, Del Greco F, Hicks AA, Shin C, Yun CH, Lee SK, Metspalu A, Byrne EM, Gehrman PR, Tiemeier H.** *Genome-Wide Association Analyses in 128,266 Individuals Identifies New Morningness and Sleep Duration Loci*. PLoS Genetics; Vol. 12(8), e1006125 (2016).
133. **Lane JM, Vlasac I, Anderson SG, Kyle SD, Dixon WG, Bechtold DA, Gill S, Little MA, Luik A, Loudon A, Emsley R, Scheer FA, Lawlor DA, Redline S, Ray DW, Rutter MK, Saxena R.** *Genome-wide association analysis identifies novel loci for chronotype in 100,420 individuals from the UK Biobank*. Nature Communications; Vol. 7, 10889 (2016).
134. **Ikeda M, Nomura M.** *cDNA Cloning and Tissue-Specific Expression of a Novel Basic Helix–Loop–Helix/PAS Protein (BMAL1) and Identification of Alternatively Spliced Variants with Alternative Translation Initiation Site Usage*. Biochemical and Biophysical Research and Communications; Vol. 233, 258-264 (1997).
135. **Oishi K, Sakamoto K, Okada T, Nagase T, Ishida N.** *Antiphase circadian expression between BMAL1 and period homologue mRNA in the suprachiasmatic nucleus and peripheral tissues of rats*. Biochemical and Biophysical Research and Communications; Vol. 253, 199-203 (1998).

136. **Honma S, Ikeda M, Abe H, Tanahashi Y, Namihira M, Honma K, Nomura M.** *Circadian Oscillation of BMAL1, a Partner of a Mammalian Clock Gene Clock, in Rat Suprachiasmatic Nucleus.* Biochemical and Biophysical Research and Communications; Vol. 250, 83-87 (1998).
137. **Gekakis N, Staknis D, Nguyen H, Davis F, Wilsbacher L, King D, Takahashi J, Weitz C.** *Role of the CLOCK Protein in the Mammalian Circadian Mechanism.* Science; Vol. 280, 1564-1569 (1998).
138. **Bunger M, Wilsbacher L, Moran S, Clendenin C, Radcliffe L, Hogenesch J, Simon M, Takahashi J, Bradfield C.** *Mop3 Is an Essential Component of the Master Circadian Pacemaker in Mammals.* Cell; Vol. 103, 1009-1017 (2000).
139. **McDearmon E, Patel K, Ko C, Walisser J, Schook A, Chong J, Wilsbacher L, Song E, Hong H, Bradfield C, Takahashi J.** *Dissecting the Functions of the Mammalian Clock Protein BMAL1 by Tissue-Specific Rescue in Mice.* Science; Vol. 314, 1304-1308 (2006).
140. **Kondratov R, Kondratova A, Gorbacheva V, Vykhovanets O, Antoch M.** *Early aging and age-related pathologies in mice deficient in BMAL1, the core component of the circadian clock.* Genes and Development; Vol. 20, 1868-73 (2006).
141. **Bunger M, Walisser J, Sullivan R, Manley P, Moran S, Kalscheur V, Colman R, Bradfield C.** *Progressive Arthropathy in Mice With a Targeted Disruption of the Mop3/Bmal-1 Locus.* Genesis, Vol. 41, 122-132 (2004).
142. **Laposky A, Easton A, Dugovic C, Walisser J, Bradfield C, Turek F.** *Deletion of the Mammalian Circadian Clock Gene BMAL1/Mop3 Alters Baseline Sleep Architecture and the Response to Sleep Deprivation.* Sleep; Vol. 28, 395-409 (2005).
143. **Shimba S, Ishii N, Ohta Y, Ohno T, Watabe Y, Hayashi M, Wada T, Aoyagi T, Tezuka M.** *Brain and muscle Arnt-like protein-1 (BMAL1), a component of the molecular clock, regulates adipogenesis.* Proceedings of the National Academy of Sciences; Vol. 102, 12071-12076 (2005).
144. **Cowell I, Skinner A, Hurst H.** *Transcriptional repression by a novel member of the bZIP family of transcription factors.* Molecular and Cellular Biology; Vol. 12, 3070-3077 (1992).
145. **Landschulz W, Johnson P, McKnight S.** *The leucine zipper: a hypothetical structure common to a new class of DNA binding proteins.* Science; Vol. 240, 1759-1764 (1988).
146. **Chen W, Lewis K, Chandra G, Cogswell J, Stinnett S, Kadwell S, Gray J.** *Characterization of human E4BP4, a phosphorylated bZIP factor.* Biochimica et Biophysica Acta; Vol. 1264, 388-396 (1995).
147. **Mitsui S, Yamaguchi S, Matsuo T, Ishida Y, Okamura H.** *Antagonistic role of E4BP4 and PAR proteins in the circadian oscillatory mechanism.* Genes & Development;

Vol. 15, 995-1006 (2001).

148. **Cowell I, Hurst H.** *Transcriptional repression by the human bZIP factor E4BP4: definition of a minimal repression domain.* Nucleic Acids Research; Vol. 22, 59-65 (1994).
149. **Ueda H, Hayashi S, Chen W, Sano M, Machida M, Shigeyoshi Y, Iino M, Hashimoto S.** *System-level identification of transcriptional circuits underlying mammalian circadian clocks.* Nature Genetics; Vol. 37, 187-192 (2005).
150. **Doi M, Okano T, Yujnovsky I, Sassone-Corsi P, Fukada Y.** *Negative control of circadian clock regulator E4BP4 by casein kinase Iε-mediated phosphorylation.* Current Biology; Vol. 14, 975-980 (2004).
151. **Wallace A, Wheeler T, Young D.** *Inducibility of E4BP4 Suggests a Novel Mechanism of Negative Gene Regulation by Glucocorticoids.* Biochemical and Biophysical Research Communications; Vol. 232, 403-406 (1997).
152. **Mueller C, Maire P, Schibler U.** *DBP, a liver-enriched transcriptional activator, is expressed late in ontogeny and its tissue specificity is determined post transcriptionally.* Cell; Vol. 61, 279-291 (1990).
153. **Lopez-Molina L, Conquet F, Dubois-Dauphin M, Schibler U.** *The DBP gene is expressed according to a circadian rhythm in the suprachiasmatic nucleus and influences circadian behavior.* The EMBO Journal; Vol. 16, 6762-6771 (1997).
154. **Yan L, Miyake S, Okamura H.** *Distribution and Circadian Expression of dbp in SCN and Extra-SCN Areas in the Mouse Brain.* Journal of Neuroscience Research; Vol. 59, 291-295 (2000).
155. **Wuarin J, Schibler U.** *Expression of the liver-enriched transcriptional activator protein DBP follows a stringent circadian rhythm.* Cell; Vol. 63, 1257-1266 (1990).
156. **Yamaguchi S, Mitsui S, Yan L, Yagita K, Miyake S, Okamura H.** *Role of DBP in the Circadian Oscillatory Mechanism.* Molecular and Cellular Biology; Vol. 20, 4773-4781 (2000).
157. **Yamajuku D, Shibata Y, Kitazawa M, Katakura T, Urata H, Kojima T, Takayasu S, Nakata O, Hashimoto S.** *Cellular DBP and E4BP4 proteins are critical for determining the period length of the circadian oscillator.* FEBS Letters; Vol. 585, 2217-2222 (2011).
158. **Franken P, Lopez-Molina L, Marcacci L, Schibler U, Tafti M.** *The Transcription Factor DBP Affects Circadian Sleep Consolidation and Rhythmic EEG Activity.* The Journal of Neuroscience; Vol. 20, 617-625 (2000).
159. **Sun Z, Albrecht U, Zhuchenko O, Bailey J, Eichele G, Lee C.** *RIGUI, a putative mammalian ortholog of the Drosophila period gene.* Cell; Vol. 90, 1003-1011 (1997).
160. **Tei H, Okamura H, Shigeyoshi Y, Fukuhara C, Ozawa R, Hirose M, Sakaki Y.** *Circadian oscillation of a mammalian homologue of the Drosophila period gene.* Nature; Vol. 389, 512-516 (1997).
161. **Shearman L, Zylka M, Weaver D, Kolakowski L, Reppert S.** *Two period*

Homologs: Circadian Expression and Photic Regulation in the Suprachiasmatic Nuclei. Neuron; Vol. 19, 1261-1269 (1997).

162. **Zheng B, Larkin D, Albrecht U, Sun Z, Sage M, Eichele G, Lee C, Bradley A.** *The mPer2 gene encodes a functional component of the mammalian circadian clock.* Nature; Vol. 400, 169-173 (1999).

163. **Kopp C, Albrecht U, Zheng B, Tobler I.** *Homeostatic sleep regulation is preserved in mPer1 and mPer2 mutant mice.* The European Journal of Neuroscience; Vol. 16, 1099-1106 (2002).

164. **Toh K, Jones C, He Y, Eide E, Hinz W, Virshup D, Ptáček L, Fu Y.** *An hPer2 Phosphorylation Site Mutation in Familial Advanced Sleep Phase Syndrome.* Science; Vol. 291, 1040-1043 (2001).

165. **Carpen J, Archer S, Skene D, Smits M, von Schantz M.** *A single-nucleotide polymorphism in the 5'-untranslated region of the hPER2 gene is associated with diurnal preference.* Journal of Sleep Research; Vol. 14, 293-297 (2005).

166. **Arjona A, Sarkar D.** *The Circadian Gene mPer2 Regulates the Daily Rhythm of IFN-gamma.* Journal of Interferon and Cytokine Research; Vol. 26, 645-649 (2006).

167. **Spanagel R, Pendyala G, Abarca C, Zghoul T, Sanchis-Segura C, Magnone M, Lascorz J, Depner M, Holzberg D, Soyka M, Schreiber S, Matsuda F, Lathrop M, Schumann G, Albrecht U.** *The clock gene Per2 influences the glutamatergic system and modulates alcohol consumption.* Nature Medicine; Vol. 11, 35-42 (2004).

168. **Zylka M, Shearman L, Weaver D, Reppert S.** *Three period homologs in mammals differential light responses in the suprachiasmatic circadian clock and oscillating transcripts outside of brain.* Neuron; Vol. 20, 1103-1110 (1998).

169. **Sudo M, Sasahara K, Moriya T, Akiyama M, Hamada T, Shibata S.** *Constant light housing attenuates circadian rhythms of mPer2 mRNA and mPER2 protein expression in the suprachiasmatic nucleus of mice.* Neuroscience; Vol. 121, 493-499 (2003).

170. **Bae K, Jin X, Maywood E, Hastings M, Reppert S, Weaver D.** *Differential Functions of mPer1, mPer2, and mPer3 in the SCN Circadian Clock.* Neuron; Vol. 30, 525-536 (2001).

171. **Albrecht U, Sun Z, Eichele G, Lee C.** *A differential response of two putative mammalian circadian regulators, mper1 and mper2, to light.* Cell; Vol. 91, 1055-64 (1997).

172. **Takumi T, Matsubara C, Shigeyoshi Y, Taguchi K, Yagita K, Maebayashi Y, Sakakida Y, Okumura K, Takashima N, Okamura H.** *A new mammalian period gene predominantly expressed in the suprachiasmatic nucleus.* Genes to Cells; Vol. 3, 167-176 (1998).

173. **Wakamatsu H, Yoshinobu Y, Aida R, Moriya T, Akiyama M, Shibata S.** *Restricted-feeding-induced anticipatory activity rhythm is associated with a phase-shift of the expression of mPer1 and mPer2 mRNA in the cerebral cortex and hippocampus but not in*

- the suprachiasmatic nucleus of mice*. The European Journal of Neuroscience; Vol. 13, 1190-1196 (2001).
174. **Steinlechner S, Jacobmeier B, Scherbarth F, Dernbach H, Kruse F, Albrecht U.** *Robust circadian rhythmicity of Per1 and Per2 mutant mice in constant light, and dynamics of Per1 and Per2 gene expression under long and short photoperiods*. Journal of Biological Rhythms; Vol. 17, 202-209 (2002).
175. **Marston O, Williams R, Canal M, Samuels R, Upton N, Piggins H.** *Circadian and dark-pulse activation of orexin/hypocretin neurons*. Molecular Brain; Vol. 1:19 (2008).
176. **Justinussen JL, Holm A, Kornum BR.** *An optimized method for measuring hypocretin-1 peptide in the mouse brain reveals differential circadian regulation of hypocretin-1 levels rostral and caudal to the hypothalamus*. Neuroscience; Vol. 310, 354-361 (2015).
177. **Martínez, G., Smale, L., Nunez, A.** *Diurnal and nocturnal rodents show rhythms in orexinergic neurons*. Brain Research; Vol. 955, 1-7 (2002).
178. **Kodama T, Usui S, Honda Y, Kimura M.** *High Fos expression during the active phase in orexin neurons of a diurnal rodent, Tamias sibiricus barberi*. Peptides; Vol. 26, 631-638 (2005).
179. **Savaskan E, Müller-Spahn F, Meier F, Wirz-Justice A, Meyer P.** *Orexins and their receptors in the human retina*. Pathobiology; Vol. 71, 211-216 (2004).
180. **Zhang S, Zeitzer J, Yoshida Y, Wisor J, Nishino S, Edgar D, Mignot E.** *Lesions of the suprachiasmatic nucleus eliminate the daily rhythm of hypocretin-1 release*. Sleep; Vol. 27, 619-627 (2004).
181. **Taheri S, Sunter D, Dakin C, Moyes S, Seal L, Gardiner J, Rossi M, Ghatel M, Bloom S.** *Diurnal variation in orexin A immunoreactivity and prepro-orexin mRNA in the rat central nervous system*. Neuroscience Letters; Vol. 279, 109-112 (2000).
182. **Peyron C, Tighe D, van den Pol A, de Lecea L, Heller H, Sutcliffe J, Kilduff T.** *Neurons containing hypocretin (orexin) project to multiple neuronal systems*. The Journal of Neuroscience; Vol. 18, 9996-10015 (1998).
183. **Hagan J, Leslie R, Patel S, Evans M, Wattam T, Holmes S, Benham C, Taylor S, Routledge C, Hemmati P, Munton R, Ashmeade T, Shah A, Hatcher J, Hatcher P, Jones D, Smith M, Piper D, Hunter A, Porter R, Upton N.** *Orexin A activates locus coeruleus cell firing and increases arousal in the rat*. Proceedings of the National Academy of Science of the USA; Vol. 96, 10911-10916 (1999).
184. **Grady S, Nishino S, Czeisler C, Hepner D, Scammell T.** *Diurnal variation in CSF orexin-A in healthy male subjects*. Sleep; Vol. 29, 295-297 (2006).
185. **Salomon R, Ripley B, Kennedy J, Johnson B, Schmidt D, Zeitzer J, Nishino S, Mignot E.** *Diurnal variation of cerebrospinal fluid hypocretin-1 (Orexin-A) levels in control and depressed subjects*. Biological Psychiatry; Vol. 54, 96-104 (2003).

186. **Scammell T, Winrow C.** *Orexin Receptors: Pharmacology and Therapeutic Opportunities*. Annual Review of Pharmacology and Toxicology; Vol. 51, 243-266 (2011).
187. **Henny P, Jones B.** *Innervation of Orexin/Hypocretin Neurons by GABAergic, Glutamatergic or Cholinergic Basal Forebrain Terminals Evidenced by Immunostaining for Presynaptic Vesicular Transporter and Postsynaptic Scaffolding Proteins*. The Journal of Comparative Neurology; Vol. 499, 645-61 (2006).
188. **Yoshida Y, Fujiki N, Nakajima T, Ripley B, Matsumura H, Yoneda H, Mignot E, Nishino S.** *Fluctuation of extracellular hypocretin-1 (orexin A) levels in the rat in relation to the light-dark cycle and sleep-wake activities*. The European Journal of Neuroscience; Vol. 14, 1075-1081 (2001).
189. **Deboer T, Overeem S, Visser N, Duindam H, Frölich M, Lammers G, Meijer J.** *Convergence of circadian and sleep regulatory mechanisms on hypocretin-1*. Neuroscience; Vol. 129, 727-732 (2004).
190. **Applied, Biosystems.** *Tissue RNA Isolation: Isolation of Total RNA from Plant and Animal*. Applied Biosystems; Protocol, 1-2 - 1-3 (2004).
191. **Stevens, J.** *Promega Usage Information: Proteinase K*. Promega (2013).
192. **Luo X, Ikeda Y, Parker K.** *A cell-specific nuclear receptor is essential for adrenal and gonadal development and sexual differentiation*. Cell; Vol. 77, 481-490 (1994).
193. **Invitrogen.** *Cloned AMV First-Strand cDNA Synthesis Kit*. Invitrogen by Life Technologies, 1-4 (2012).
194. **Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H.** *Specific Enzymatic Amplification of DNA In Vitro The Polymerase Chain Reaction*. Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology; Vol. 51, 263-73 (1986).
195. **Saiki R, Scharf S, Faloona F, Mullis K, Horn G, Erlich H, Arnheim N.** *Enzymatic Amplification of beta-Globin Genomic Sequences and Restriction Site Analysis for Diagnosis of Sickle Cell Anemia*. Science; Vol. 230, 1350-1354 (1985).
196. **Chien A, Edgar D, Trela J.** *Deoxyribonucleic Acid Polymerase from the Extreme Thermophile Thermus aquaticus*. Journal of Bacteriology; Vol. 127, 1550-1557 (1976).
197. **Saiki R, Gelfand D, Stoffel S, Scharf S, Higuchi R, Horn G, Mullis K, Erlich H.** *Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase*. Science; Vol. 239, 487-491 (1988).
198. **Rychlik W, Spencer W, Rhoads R.** *Optimization of the annealing temperature for DNA amplification in vitro*. Nucleic Acids Research; Vol. 18, 6409-6412 (1990).
199. **Rychlik, W.** *Selection of primers for polymerase chain reaction*. Molecular Biotechnology; Vol. 3, 129-134 (1995).
200. **Brownie J, Shawcross S, Theaker J, Whitcombe D, Ferrie R, Newton C, Little S.** *The elimination of primer-dimer accumulation in PCR*. Nucleic Acids Research, Vol. 25, 3235-3241 (1997).

201. **Higuchi R, Fockler C, Dollinger G, Watson R.** *Kinetic PCR Analysis: Real-time Monitoring of DNA Amplification Reactions.* Bio/technology (Nature Publishing Company); Vol. 11, 1026-1030 (1993).
202. **Heid C, Stevens J, Livak K, Williams P.** *Real Time Quantitative PCR.* Genome Research; Vol. 6, 986-994 (1996).
203. **Ririe K, Rasmussen R, Wittwer C.** *Product differentiation by analysis of DNA melting curves during the polymerase chain reaction.* Analytical Biochemistry; Vol. 245, 154-160 (1997).
204. **Degen H-J, Deufel A, Eisel D, Grünewald-Janho S, Keesey J.** *Roche: PCR Applications Manual 3rd Edition.* Roche Diagnostics GmbH, Mannheim (2006).
205. **Waring, M.** *Complex formation between ethidium bromide and nucleic acids.* Journal of Molecular Biology; Vol. 13, 269-282 (1965).
206. **Allard, S.** *Bioluminescent Reporter Genes.* Promega Corporation, 1-8 (2008).
207. **Wood, K.** *The Chemical Mechanism and Evolutionary Development of Beetle Bioluminescence.* Photochemistry and Photobiology; Vol. 62, 662-673 (1995).
208. **Promega.** *Deciphering the pGL4 Vector Code.* Promega Notes; Vol. 96, 6-7 (2007).
209. **Rogers S, Wells R, Rechsteiner M.** *Amino acid sequences common to rapidly degraded proteins: the PEST hypothesis.* Science; Vol. 234, 364-368 (1986).
210. **Li X, Zhao X, Fang Y, Jiang X, Duong T, Fan C, Huang C, Kain S.** *Generation of destabilized green fluorescent protein as a transcription reporter.* The Journal of Biological Chemistry; Vol. 273, 34970-34975 (1998).
211. **Carswell S, Alwine J.** *Efficiency of utilization of the simian virus 40 late polyadenylation site: effects of upstream sequences.* Molecular and Cellular Biology; Vol. 9, 4248-4258 (1989).
212. **Bernstein P, Ross J.** *Poly(A), poly(A) binding protein and the regulation of mRNA stability.* Trends in Biochemical Sciences; Vol. 14, 373-377 (1989).
213. **Nudel U, Soreq H, Littauer Z, Marbaix G, Huez G, Leclercq M, Hubert E, Chantrenne H.** *Globin mRNA species containing poly(A) segments of different lengths - Their functional stability in Xenopus oocytes.* European Journal of Biochemistry / FEBS; Vol. 64, 115-121 (1976).
214. **Huez G, Marbaix G, Hubert E, Cleuter Y, Gallwitz D, Weinberg E, Devos R.** *Functional stabilisation of HeLa cell histone messenger RNAs injected into Xenopus oocytes by 3'-OH polyadenylation.* Nature; Vol. 271, 572 - 573 (1978).
215. **Peltz S, Brewer G, Kobs G, Ross J.** *Substrate specificity of the exonuclease activity that degrades H4 histone mRNA.* The Journal of Biological Chemistry; Vol. 262, 9382-9388 (1987).
216. **Promega.** *pRL Renilla Luciferase Reporter Vectors.* Promega Technical Bulletin 550; 1-8 (2008).

217. **Oster H, Damerow S, Hut RA, Eichele G.** *Transcriptional profiling in the adrenal gland reveals circadian regulation of hormone biosynthesis genes and nucleosome assembly genes.* Journal of biological rhythms; Vol. 21, 350-361 (2006).
218. **Shinohara M, Loros J, Dunlap J.** *Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase is regulated on a daily basis by the circadian clock.* The Journal of Biological Chemistry; Vol. 273, 446-452 (1998).
219. **Taishi P, Bredow S, Guha-Thakurta N, Obál F Jr, Krueger J.** *Diurnal variations of interleukin-1 beta mRNA and beta-actin mRNA in rat brain.* Journal of Neuroimmunology; Vol. 75, 69-74 (1997).
220. **Kastin AJ1, Akerstrom V.** *Orexin A but not orexin B rapidly enters brain from blood by simple diffusion.* The Journal of pharmacology and experimental therapeutics; Vol. 289, 219-23 (1999).
221. **Shahid IZ, Rahman AA, Pilowsky PM.** *Orexin and central regulation of cardiorespiratory system.* Vitamins & Hormones; Vol. 89, 159-84 (2012).
222. **Migeon C, Tyler F, Mahoney J, Florentin A, Castle H, Bliss E, Samuels L.** *The diurnal variation of plasma levels and urinary excretion on 17-hydroxycorticosteroids in normal subjects, night workers and blind subjects.* The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism; Vol. 16, 622-633 (1956).
223. **Vagnucci A, Hesser M, Kozak G, Pauk G, Lauler D, Thorn G.** *Circadian cycle of urinary cortisol in healthy subjects and in Cushing's syndrome.* The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism; Vol. 25, 1331-1339 (1965).
224. **Liddle, G.** *Analysis of circadian rhythms in human adrenocortical secretory activity.* Archives of Internal Medicine; Vol. 117, 739-743 (1966).
225. **Kim SH, Goh S, Han K, Kim JW, Choi M.** *Numerical study of entrainment of the human circadian system and recovery by light treatment.* Theoretical biology & medical modelling; Vol. 15, 5 (2018).
226. **Goto M, Ebihara S.** *The influence of different light intensities on pineal melatonin content in the retinal degenerate C3H mouse and the normal CBA mouse.* Neuroscience Letters; Vol. 108, 267-272 (1990).
227. **Azuma H, Yamatodani A, Yagi A, Nishimura T, Wada H.** *Influence of intensity of illumination during the light period on diurnal variations of pineal indoles in rats and mice.* Neuroscience Letters; Vol. 119, 15-18 (1990).
228. **Rosenthal N, Sack D, James S, Parry B, Mendelson W, Tamarkin L, Wehr T.** *Seasonal affective disorder and phototherapy.* Annals of the New York Academy of Sciences; Vol. 453, 260-269 (1985).
229. **Rosenthal NE, Sack DA, Carpenter CJ, Parry BL, Mendelson WB, Wehr TA.** *Antidepressant effects of light in seasonal affective disorder.* American Journal of Psychiatry; Vol 142, 163-170 (1985).

230. **Vitaterna M, Takahashi J, Turek F.** *Overview of circadian rhythms.* Alcohol Research & Health; Vol. 25, 85-93 (2001).
231. **Cailotto C, van Heijningen C, van der Vliet J, van der Plasse G, Habold C, Kalsbeek A, Pévet P, Buijs RM.** *Daily rhythms in metabolic liver enzymes and plasma glucose require a balance in the autonomic output to the liver.* Endocrinology; Vol. 149, 1914-1925 (2008).

7 Danksagung

Ich bedanke mich bei Herrn Prof. Dr. rer. nat. Olaf Jöhren für die Bereitstellung des Themas der vorliegenden Arbeit und somit die Möglichkeit, einen Einblick in die molekularbiologische Grundlagenforschung sowie die Laborarbeit erhalten zu können. Die jederzeit möglichen vielen thematischen Diskussionen, Anregungen und Unterstützungen habe ich stets zu schätzen gewusst und als sehr bereichernd empfunden.

Mein Dank geht weiterhin an Herrn Prof. Dr. med. Markus Schwaninger für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes sowie die Möglichkeit der Nutzung der Labore und Geräte im Institut.

Weiterhin bedanke ich mich bei Frau Prof. Dr. med. Carla Nau aus der Klinik für Anästhesiologie und Intensivmedizin für ihre zeitliche und organisatorische Unterstützung sowie die Unterstützung meiner Forschungsambitionen.

Herrn Prof. Dr. rer. nat. Henrik Oster danke ich für die die CircWave-Analysen sowie die inhaltliche Beratung bezüglich zirkadianen Rhythmen.

Frau Christine Eichholz und Frau Gudrun Viercke sowie Ines Stölting danke ich für ihre Hilfe, ihren Rat und ihre Unterstützung bezüglich laborexperimentellen Arbeitens. Sie hatten stets ein offenes Ohr und ihre Tür stand mir jederzeit offen.

Den Mitarbeitern des Instituts für experimentelle und klinische Pharmakologie und Toxikologie danke ich für die herzliche Aufnahme, ich habe mich jederzeit willkommen und als Mitglied des Instituts gefühlt.

8 Lebenslauf

Der Lebenslauf ist in der gedruckten Version enthalten.