

Aus dem Institut für Anatomie II  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf  
Direktorin: Univ.-Prof. Dr. Charlotte von Gall

Untersuchung tageszeitlicher Expressionsprofile purinerger  
Rezeptoren im Nucleus suprachiasmaticus der Maus

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität  
Düsseldorf

vorgelegt von  
Julian Johannes Lommen  
2018

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der  
Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität  
Düsseldorf

gez.:

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachterin: Univ.-Prof. Dr. phil. nat. Charlotte von Gall

Zweitgutachterin: Prof. Dr. rer. nat. Olga A. Sergeeva



Meiner Familie in ewiger Dankbarkeit

**Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:**

**Lommen, J., Stahr, A., Ingenwerth, M., Ali, A.A.H., von Gall, C., (2017) Time-of-day-dependent expression of purinergic receptors in mouse suprachiasmatic nucleus. *Cell Tissue Res*, (369) 579-590.**

## Zusammenfassung

Purinerge P2X- und P2Y-Rezeptoren sind an der zellulären Kommunikation über interzelluläre Signalkaskaden beteiligt. Als Neurotransmitter dienen hierbei Purine wie Adenosintriphosphat (ATP). P2X- und P2Y-Rezeptoren sind an einer Vielzahl bio- und neurochemischer Körperfunktionen beteiligt, darunter Lernen, Gedächtnis und Schlaf. All diese Körperfunktionen sind tageszeitabhängig unterschiedlich stark ausgeprägt. Sie werden über einen zirkadianen Hauptschrittmacher im Bereich des Nucleus suprachiasmaticus (SCN) des Hypothalamus koordiniert. Es gibt Hinweise dafür, dass die purinerge Signalkaskade an der interzellulären Kommunikation innerhalb des SCN beteiligt ist. Dessen ungeachtet existieren derzeit jedoch nur wenige wissenschaftliche Studien, die sich mit dem Expressionsverhalten der purinergen Rezeptoren im SCN befassen.

In unserer Studie untersuchten wir die Expression der sieben P2X- (P2X<sub>1-7</sub>) und acht P2Y- (P2Y<sub>1</sub>, P2Y<sub>2</sub>, P2Y<sub>4</sub>, P2Y<sub>6</sub>, P2Y<sub>11-14</sub>) Rezeptoren im SCN der Maus sowie ihre tageszeitabhängigen Expressionsunterschiede. Methodisch nutzten wir dazu die Immunhistochemie (IHC) sowie die quantitative Real-Time Polymerase-Kettenreaktion (qRT-PCR). Zu Beginn der frühen Lichtphase zeigten die P2X- und P2Y-Rezeptoren eine schwache bis moderate, homogen verteilte Immunreaktion (IR) innerhalb des SCN. P2Y<sub>13</sub> zeigte eine starke IR in Nervenfasern der Kernregion des SCN (vSCN). Von den 15 untersuchten Rezeptoren zeigten sieben eine tageszeitabhängige Variation ihrer Proteinexpression im SCN. Die IR von P2X<sub>1</sub> war zu Beginn der Lichtphase sehr gering und zeigte einen kleinen Anstieg zum Ende der Dunkelphase. Die P2X<sub>4</sub> IR stieg im Verlauf der Dunkelphase auf Zellsomata der vSCN und in Nervenfasern der Schalenregion (dmSCN) stark an. Die IR von P2X<sub>3</sub> stieg während der Dunkelphase moderat an. Die IR von P2Y<sub>2</sub>, P2Y<sub>12</sub> und P2Y<sub>14</sub> stieg zu Beginn der Lichtphase, während die IR von P2Y<sub>6</sub> zur Mitte der Lichtphase anstieg. Wir postulieren daher eine tageszeitabhängige Variation der Purinrezeptoren im SCN der Maus.

Um den Einfluss von Licht auf die tageszeitabhängige Expression der Purinrezeptoren zu untersuchen, führten wir ergänzende Untersuchungen unter Dauerdunkelheit durch. Hier zeigte sich für die Rezeptoren P2X<sub>4</sub> und P2Y<sub>2</sub> ein Verlust der zuvor beobachteten tageszeitabhängigen Rezeptorexpression. Die tageszeitabhängige Variation der Rezeptorexpression scheint demnach Licht getriggert zu sein.

## Summary

Purinergic P2X and P2Y receptors are involved in mediating intercellular signalling via purines such as adenosine triphosphate (ATP). P2X and P2Y receptors have been implicated in numerous body functions including learning, memory and sleep. All of these body functions show time-of-day-dependent variations controlled by the master circadian oscillator located in the suprachiasmatic nucleus (SCN). Evidence exists for a role of purinergic signalling in intercellular coupling within SCN. However, few studies have been performed on the expression of purinergic receptors in SCN. Therefore, we analyze the expression of seven P2X (P2X<sub>1-7</sub>) and eight P2Y (P2Y<sub>1</sub>, P2Y<sub>2</sub>, P2Y<sub>4</sub>, P2Y<sub>6</sub>, P2Y<sub>11-14</sub>) receptors in mouse SCN and address their time-of-day-dependent variation by using immunohistochemistry and real-time polymerase chain reaction. At the early light phase, P2X and P2Y receptors show a low to moderate, homogeneously distributed immunoreaction throughout SCN. P2Y<sub>13</sub> reveals strong immunoreaction in fibers within the core region of SCN. From the fifteen analyzed P2 receptors, seven exhibit a time-of-day-dependent variation in SCN. P2X<sub>1</sub> immunoreaction is very low in the early light phase with a minor increase at the end of the dark phase. P2X<sub>4</sub> immunoreaction strongly increases during the dark phase in soma cells in the core region and in a dense network of fibers in the shell region of SCN. P2X<sub>3</sub> immunoreaction is moderately elevated during the dark phase. Conversely, immunoreaction for P2Y<sub>2</sub>, P2Y<sub>12</sub> and P2Y<sub>14</sub> moderately increases at the early light phase and P2Y<sub>6</sub> immunoreaction displays a moderate increase at the mid-light phase. Thus, this study demonstrates a time-of-day-dependent variation of P2 receptors in mouse SCN.

Additionally, variation in circadian protein expression of P2X<sub>4</sub> and P2Y<sub>2</sub> receptors was examined. Therefore, we analyzed protein expression in a 24 h constant dark phase. We found a loss of time-of-day-dependent variation of P2X<sub>4</sub> and P2Y<sub>2</sub> receptors in constant dark phase. Hence, we suggest that time-of-day-dependent variation of P2 receptors in mouse SCN is triggered by light.

## Abkürzungsverzeichnis

<b>12D:12D</b>	Beleuchtungsperiode mit 24 Stunden Dauerdunkelheit
<b>12L:12D</b>	Beleuchtungsperiode mit 12 Stunden Licht und 12 Stunden Dunkelheit
<b>Abb.</b>	Abbildung
<b>AC</b>	Adenylatzyklase
<b>ACh</b>	Acetylcholin
<b>Ade</b>	Adenin
<b>Ado</b>	Adenosin
<b>ADP</b>	Adenosindiphosphat
<b>AK</b>	Antikörper
<b>AMP</b>	Adenosinmonophosphat
<b>ANOVA</b>	Analysis of Variance (dt. Varianzanalyse)
<b>ATP</b>	Adenosintriphosphat
<b>AVP</b>	Arginin-Vasopressin
<b>BLAST</b>	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
<b>BMAL</b>	<i>Brain and Muscle ARNT-like</i>
<b>bzw.</b>	beziehungsweise
<b>cAMP</b>	Zyklisches Adenosinmonophosphat
<b>cDNA</b>	<i>Complementary DNA</i>
<b>CLOCK</b>	<i>Circadian Locomotor Output Cycles Kaput</i>
<b>CRY</b>	<i>Cryptosome</i>
<b>CT</b>	<i>Circadian Time</i>
<b>DAB</b>	3,3'-Diaminobenzidin Tetrahydrochlorid
<b>d.h.</b>	das heißt
<b>DMH</b>	Dorsomedialer Hypothalamus
<b>dmSCN</b>	Dorsomedialer Anteil des Nucleus suprachiasmaticus
<b>DNS (DNA)</b>	Desoxyribonukleinsäure ( <i>deoxyribonucleic acid</i> )
<b>dt.</b>	deutsch
<b>etc.</b>	et cetera (dt. und die übrigen)
<b>FELASA</b>	<i>Federation of European Laboratory Animal Science Associations</i>
<b>GDP</b>	Guanosindiphosphat
<b>gem.</b>	gemäß
<b>GHT</b>	Tractus geniculohypothalamicus
<b>Glu</b>	Glutamat

<b>GMP</b>	Guanosinmonophosphat
<b>GTP</b>	Guanosintriphosphat
<b>Gua</b>	Guanin
<b>I.E.</b>	Internationale Einheit
<b>IGL</b>	<i>Intergeniculate leaflet</i>
<b>IgG</b>	Immunglobulin der Klasse G
<b>IHC</b>	Immunhistochemie
<b>IP<sub>3</sub></b>	Inositoltriphosphat
<b>LANUV</b>	Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz Nordrhein-Westfalen
<b>lat.</b>	lateinisch
<b>LGN</b>	Corpus geniculatum laterale
<b>MDT</b>	Magen-Darm-Trakt
<b>mRNA</b>	<i>Messenger RNA</i>
<b>MW</b>	Mittelwert
<b>NA</b>	Noradrenalin
<b>NANC</b>	Nicht-adrenerg und nicht-cholinerg
<b>NCBI</b>	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
<b>Ncl.</b>	Nucleus (dt. Kern)
<b>P2XR</b>	Purinrezeptoren der Klasse P2X
<b>P2YR</b>	Purinrezeptoren der Klasse P2Y
<b>PBS</b>	Phosphatpuffer Saline
<b>PBS-T</b>	Phosphatpuffer Saline + Triton X-100
<b>PACAP</b>	<i>Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide</i>
<b>Per</b>	<i>Period</i>
<b>PFA</b>	Paraformaldehyd
<b>PLC</b>	Phospholipase C
<b>PNS</b>	Peripheres Nervensystem
<b>PR</b>	Purinrezeptor
<b>PVN</b>	Nucleus paraventricularis des Hypothalamus
<b>PVT</b>	Paraventriculärer Bereich des Thalamus
<b>qRT-PCR</b>	Quantitative Real-Time Polymerase-Kettenreaktion
<b>RHT</b>	Tractus retinohypothalamicus
<b>Rn18S</b>	Ribosomale RNA 18S

<b>RNS (RNA)</b>	Ribonukleinsäure ( <i>ribonucleic acid</i> )
<b>RT</b>	Raumtemperatur
<b>SCN</b>	Nucleus suprachiasmaticus
<b>SEM</b>	<i>Standard Error of the Mean</i> (dt. Standardfehler)
<b>SON</b>	Nucleus supraopticus
<b>sPVz</b>	Subparaventrikuläre Zone
<b>Tab.</b>	Tabelle
<b>TierSchG</b>	Tierschutzgesetz
<b>TIM</b>	<i>Timeless</i>
<b>u.a.</b>	unter anderem
<b>UDP</b>	Uridindiphosphat
<b>UTP</b>	Uridintriphosphat
<b>v.a.</b>	vor allem
<b>VIP</b>	Vasoaktives intestinales Polypeptid
<b>VLH</b>	Ventrolateraler Hypothalamus
<b>vISCN</b>	Ventrolateraler Anteil des Nucleus suprachiasmaticus
<b>VMH</b>	Ventromedialer Hypothalamus
<b>z.B.</b>	zum Beispiel
<b>ZETT</b>	Zentrale Einrichtung für Tierforschung und Tierschutzaufgaben der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
<b>ZNS</b>	Zentrales Nervensystem
<b>ZT</b>	<i>Zeitgeber Time</i>

**SI-Einheiten**

<b>%</b>	Prozent
<b>°C</b>	Grad Celsius
<b>g</b>	Gramm
<b>mg</b>	Milligramm
<b>min</b>	Minute
<b>ml</b>	Milliliter
<b>μl</b>	Mikroliter
<b>μg</b>	Mikrogramm
<b>μm</b>	Mikrometer
<b>ng</b>	Nanogramm
<b>nmol</b>	Nanomol
<b>sek</b>	Sekunde
<b>xg</b>	relative Zentrifugalkraft



## Inhaltsverzeichnis

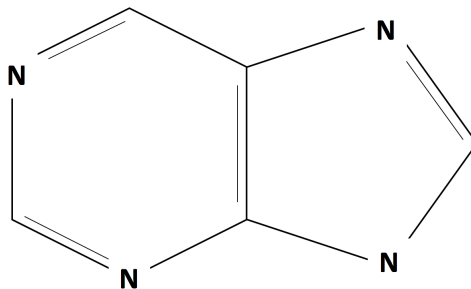
1	Einleitung .....	1
1.1	Chemische Klasse der Purine.....	1
1.2	Purine als Neurotransmitter .....	2
1.3	Purinrezeptoren .....	5
1.3.1	P1-Purinrezeptoren.....	6
1.3.2	P2-Purinrezeptoren.....	7
1.3.2.1	P2X-Rezeptoren im ZNS .....	8
1.3.2.2	P2Y-Rezeptoren im ZNS .....	10
1.4	Das zirkadiane System .....	12
1.5	P2-Rezeptoren im SCN .....	17
1.6	ATP als Neurotransmitter im SCN .....	18
2	Ziele der Arbeit.....	19
3	Material und Methoden .....	20
3.1	Allgemeine Richtlinien.....	20
3.2	Versuchstiere.....	20
3.3	Haltungsbedingungen .....	20
3.4	Versuchsaufbau.....	21
3.4.1	Versuchstierkohorte unter <i>Zeitgeber Time</i> .....	21
3.4.2	Versuchstierkohorte unter <i>Circadian Time</i> .....	21
3.5	Chemikalien und Lösungen .....	22
3.6	Quantitative Real-Time Polymerase-Kettenreaktion (qRT-PCR) .....	26
3.6.1	Native Probenentnahme .....	26
3.6.2	RNA-Isolierung .....	26
3.6.3	cDNA-Synthese .....	27
3.6.4	Ansetzen der Primer.....	27
3.6.5	Durchführung der qRT-PCR .....	28
3.7	Immunhistochemie (IHC) .....	28
3.7.1	Gewebepfusion.....	28
3.7.2	Herstellung von Gewebeschnitten .....	29
3.7.3	Färbeprotokoll.....	29
3.7.4	Mikroskopische Aufnahmen.....	30
3.7.5	Analyse der Immunreaktivität .....	31
3.8	Statistische Auswertung.....	31

4	Ergebnisse .....	33
4.1	Quantitative Real-Time PCR (qRT-PCR).....	33
4.1.1	mRNA-Expression der P2X-Rezeptoren im SCN unter 12L:12D.....	33
4.1.2	mRNA-Expression der P2Y-Rezeptoren im SCN unter 12L:12D.....	38
4.2	Immunhistochemie (IHC) .....	43
4.2.1	Topografie der P2X-Rezeptoren im Hypothalamus .....	44
4.2.2	Immunreaktivität der P2X-Rezeptoren im SCN unter 12L:12D.....	49
4.2.3	Topografie der P2Y-Rezeptoren im Hypothalamus .....	53
4.2.4	Immunreaktivität der P2Y-Rezeptoren im SCN unter 12L:12D.....	59
4.2.5	Immunreaktivität von P2X <sub>4</sub> und P2Y <sub>2</sub> im SCN unter 12D:12D.....	64
5	Diskussion.....	66
5.1	Tageszeitlicher Verlauf der mRNA-Expression im SCN.....	68
5.2	Topografie der P2-Rezeptoren im SCN, PVN und SON .....	70
5.2.1	P2X-Rezeptoren .....	70
5.2.2	P2Y-Rezeptoren .....	71
5.2.3	Funktionelle Bedeutung der P2-Rezeptoren im SCN.....	72
5.3	Tageszeitlicher Verlauf der Proteinexpression im SCN .....	73
5.4	Zirkadianer Verlauf der Proteinexpression im SCN .....	78
5.5	Ausblick .....	78
6	Literaturverzeichnis.....	79
7	Anhang.....	94

# 1 Einleitung

## 1.1 Chemische Klasse der Purine

Purine zählen zu den ältesten Molekülen der zellulären Evolution. In Anlehnung an die systematische Einteilung der Lebewesen (nach Carl R. Woese) wurden Purine in allen drei Domänen – Bakterien, Archaeen und Eukaryoten – des phylogenetischen Baum des Lebens nachgewiesen [1, 2]. Chemisch betrachtet sind Purine organische Verbindungen, die sowohl über die Nahrung aufgenommen, als auch vom menschlichen Körper selbst synthetisiert werden können [3, 4]. Auf molekularer Ebene werden sie vor allem im Rahmen der Nukleinsäurebiosynthese benötigt. Hier sind sie, als Bausteine der Ribonukleinsäure (RNS) und Desoxyribonukleinsäure (DNS), essentiell zum Aufbau und Erhalt der zellulären Erbinformation und damit für jeden Organismus überlebensnotwendig [5-7]. Die im Allgemeinen bekanntesten Vertreter der chemischen Klasse der Purine sind sicherlich die Moleküle Adenin (Ade) und Guanin (Gua). Ihre chemische Grundstruktur setzt sich aus einem stickstoffhaltigen aromatischen Heterozyklus – bestehend aus einem Pyrimidin- und einem Imidazolring – zusammen (Abb. 1) [8]. Insgesamt betrachtet stellen Purine die in der Natur weitverbreitetsten stickstoffhaltigen Heterozyklen dar [8].



**Abb. 1: Chemische Strukturformel der Purine**

Im menschlichen Organismus kommen Purine in der zuvor beschriebenen reinen chemischen Strukturform nicht vor, sondern sind vielfach an weitere Substituenten gekoppelt [8]. Häufig ist hierbei die Kopplung an ein fünfgliedriges Zuckermolekül (Pentose) und eine Phosphatgruppe. Genau wie die Purine, so ist auch Phosphat für jeden Organismus überlebensnotwendig, da es die zelluläre Energieversorgung sichert [9, 10]. Die Verbindung aus einem Purinmolekül, einer Pentose und einer Phosphatgruppe bezeichnet man als Nukleotid. Fehlt hingegen die Phosphatgruppe spricht man von einem Nukleosid. Im menschlichen Organismus liegen Purine

bevorzugt als Nukleotide vor. Nukleotide spielen, zusätzlich zu ihrer bereits beschriebenen Funktion bei der RNS- und DNS-Synthese, eine entscheidende Rolle in der Regulation und Aufrechterhaltung des molekularen Energiestoffwechsels [11]. Als biologische Energieträger sind sie in der Lage – durch Abspaltung ihrer Phosphatgruppe – Energie für molekulare Prozesse bereitzustellen. Ein prominentes Beispiel eines derartigen Nukleotids auf Adeninbasis ist Adenosintriphosphat (ATP), welches gleich drei (-tri) Phosphatgruppen trägt [11]. ATP ist derart reaktiv, dass es nach Wasser an mehr chemischen Reaktionen beteiligt ist als jedes andere terrestrische Molekül [12]. Durch sukzessive Abspaltung seiner drei Phosphatreste, entstehen seine Analoga Adenosindiphosphat (ADP), Adenosinmonophosphat (AMP) und schließlich Adenosin (Ado), welches keine Phosphatgruppe mehr trägt und somit chemisch betrachtet ein Nukleosid ist. Analog kann auch das Nukleosidtriphosphat von Guanin als molekularer Energieträger dienen [13]. Die bedeutendsten im Körper vorkommenden Substanzen sind hier Guanosintriphosphat (GTP), Guanosindiphosphat (GDP) und Guanosinmonophosphat (GMP). Vor allem bei der Funktion membranständiger G-Protein-gekoppelter Rezeptoren sind GTP und GDP wichtige Moleküle [14].

## 1.2 Purine als Neurotransmitter

Wissenschaftliche Studien zur Untersuchung des Einflusses von ATP und seiner Strukturanaloga auf diverse biologische Systeme wurden bereits zu Beginn des vergangenen Jahrhunderts durchgeführt. Im Jahr 1930 konnten M. E. Holman und J. R. Hughes zeigen, dass Purinmoleküle inhibitorische Effekte auf den Magen-Darm-Trakt (MDT) verschiedener Säugetierspezies haben [15, 16]. 1950 erkannte man den Einfluss von ATP, ADP, AMP und Ado auf das kardiovaskuläre System [17]. Zusätzlich konnte der Einfluss von ATP und seiner Derivate auf die vaskuläre Feinregulation durch Vasodilatation und -konstriktion gezeigt werden [18-20]. Auch im Bereich des zentralen Nervensystems (ZNS) wurde ATP als Regulator der elektrokortikalen Aktivität identifiziert [21].

In der Mitte des 20. Jahrhunderts wurde Purinen schließlich eine Bedeutung in der zellulären Kommunikation, genauer in der neuronalen Signalübertragung, zugeschrieben. Ausgangspunkt dieser wissenschaftlichen Überlegung waren Untersuchungen autonomer Nervenstrukturen im MDT von Meerschweinchen durch die Arbeitsgruppe um Burnstock et al. 1970 [22]. Zu dieser Zeit war die

wissenschaftliche Welt der Überzeugung, nur adrenerge und cholinerge Nervenfasern hätten einen modulatorischen Effekt auf die autonom innervierte glatte Muskulatur des MDT. Hierbei wurde den adrenergen Nervenfasern über den Neurotransmitter Noradrenalin (NA) ein inhibitorischer und den cholinergen Nervenfasern über den Neurotransmitter Acetylcholin (ACh) ein stimulierender Einfluss auf die Muskulatur des MDT zugeschrieben [23, 24]. Im Verlauf zahlreicher experimenteller Untersuchungen erkannte man jedoch, dass es noch eine weitere Transmittersubstanz neben NA und ACh geben müsse, die in dieses System regulatorisch eingreift [25-29]. Da der gesuchte Transmitter weder der adrenergen noch der cholinergen Transmittergruppe zugeschrieben werden konnte, betitelte man ihn vorläufig vereinfacht als „nicht-adrenerg und nicht-cholinerg“ (NANC) [30]. In ihren Studien stellten Burnstock et al. zunächst fest, dass die gewöhnlichen Transmittersubstanzen, zum Großteil bestehend aus Aminosäuren, Monoaminen und Neuropeptiden, für die NANC Signalübertragung nicht in Frage kamen [31]. Letztendlich wurden auf Purinen basierende und aus autonomen intestinalen Nervenendigungen freigesetzte Transmittersubstanzen nachgewiesen, die den oben genannten inhibitorischen Effekt auf die glatte Muskulatur des MDT haben [22]. Bei den nachgewiesenen Substanzen handelte es sich um ATP und seine eng verwandten Strukturanaloga ADP und AMP [22]. Damit war jedoch der Nachweis dieser Purinnukleotide als Neurotransmitter noch nicht hinreichend erbracht.

Zum endgültigen Nachweis einer Substanz als biologisch aktiver Neurotransmitter bedarf es nämlich einiger notwendiger Kriterien, die von Sir John Eccles und Sir William Paton 1964 definiert wurden [22, 32]: (1) Die vermeintliche Transmittersubstanz selbst, inklusive die für ihre Synthese benötigten Enzyme, müssen in den freisetzenden Nervenfasern vorhanden sein; (2) die vermeintliche Transmittersubstanz muss nach nervaler Stimulation aus den Nervenfasern freigesetzt werden; (3) nach Hinzugabe der vermeintlichen Transmittersubstanz muss der zuvor beobachtete Effekt eintreten (z.B. Inhibition der glatten Muskulatur des MDT); (4) ein die vermeintliche Transmittersubstanz abbauendes Enzym muss im untersuchten Gewebe vorhanden sein oder die Transmittersubstanz muss durch Wiederaufnahme (*reuptake*) aus dem synaptischen Spalt eliminiert werden; und (5) pharmakologische Substanzen, die bekanntermaßen die Wirkung der vermeintlichen Transmittersubstanz antagonisieren, müssen auch den beobachteten Gewebeeffekt antagonisieren.

Geoffrey Burnstock und David Satchell erkannten, dass die Purinnukleotide ATP, ADP und AMP alle der oben geforderten fünf Kriterien erfüllen und konnten sie somit als Neurotransmitter klassifizieren [22, 32].

Die wissenschaftliche Welt begegnete diesen Erkenntnissen zunächst mit großer Skepsis. Für viele Autoren war es unvorstellbar, dass Purine – als ubiquitär vorhandene Moleküle – an einem so spezifischen und empfindlichen System wie der intra- und extrazellulären Signalübertragung beteiligt sein sollten. Zudem postulierten Burnstock et al. 1976 die Hypothese, dass Purine nicht nur als Neurotransmitter dienen, sondern einige Nervenfasern sogar mehr als eine Transmittersubstanz freisetzen [33]. Diese Behauptung löste zur damaligen Zeit eine kontroverse Debatte aus, ging man doch gemäß „Dale’s Principle“ davon aus, dass jeder Nerv nur einen Transmitter freisetzt [34].

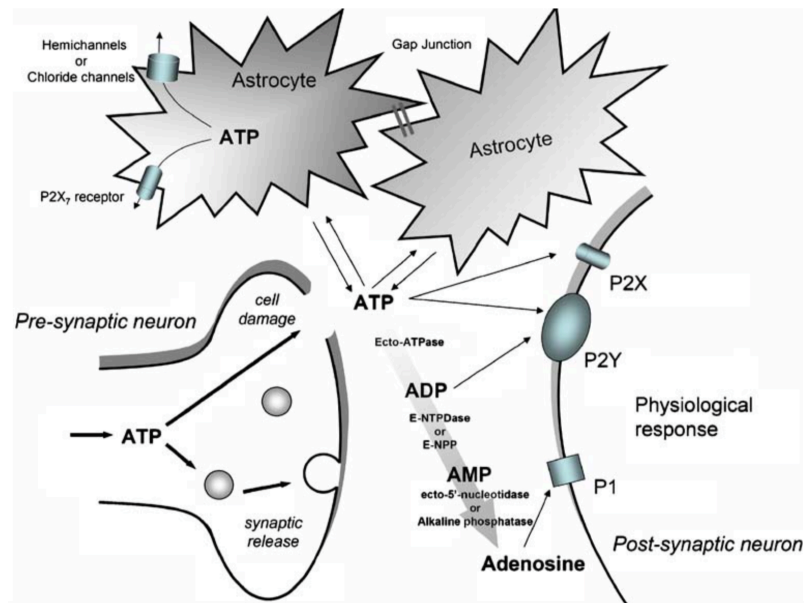
Heute gilt als gesichert, dass ATP nicht nur als Transmitter von autonomen intestinalen Nervenfasern, sondern auch als Kotransmitter von allen Nervenfasern des peripheren (PNS) und zentralen Nervensystems (ZNS) genutzt wird [35, 36]. Diese Erkenntnisse führten seit Beginn der 90er Jahre zu einem starken Interessenzuwachs in der Erforschung der Rolle von ATP und seiner Analoga an der neuronalen Signalübertragung im ZNS. Man erkannte, dass exzitatorische neuronale Prozesse nicht nur durch den Neurotransmitter Glutamat (Glu), sondern auch durch Purinanaloga ausgelöst werden [37-39]. Purine wurden daraufhin immer häufiger als wichtige Faktoren in der neuronalen Signalübertragung in zahlreichen Regionen des ZNS entdeckt [40-42].

Die Freisetzung von ATP in den synaptischen Spalt kann dabei prinzipiell auf verschiedenen Wegen erfolgen. Zu den häufigsten Mechanismen zählen hierbei: (1) Transmembranäre Diffusion mittels ATP-permeablen Kanälen, (2) aktiver Transport und (3) Exozytose [43-45]. *In-vivo* kontrollieren zudem Ektonukleotidasen die Konzentration von in den Extrazellulärraum freigesetzten Nukleotiden, indem sie diese hydrolytisch spalten [46, 47]. Somit schließt sich der Zyklus aus ATP-Freisetzung, ATP-Wirkung und ATP-Abbau.

### 1.3 Purinrezeptoren

Damit Purinnukleotide wie ATP als Neurotransmitter die neuronale Signalübertragung ermöglichen können, bedarf es ihrer Bindung an einen geeigneten Rezeptor. Um die vielfältigen Wirkungen der einzelnen Purinmoleküle in verschiedenen Geweben des Körpers näher erklären zu können, begann man Ende der 70er Jahre mit der Erforschung von Rezeptoren, die Purine als Liganden binden [36]. Diese Rezeptoren bezeichnet man als purinerge Rezeptoren, Purinrezeptoren oder Purinozeptoren [48]. Der Begriff „purinerg“ bedeutet in diesem Zusammenhang: „durch Purine aktiviert“. Aus Ergebnissen zahlreicher elektrophysiologischer Untersuchungen an biologischen Membranen erkannte man, dass die einzelnen Purinmoleküle Ado, AMP, ADP und ATP unterschiedliche Wirkpotenzen in den diversen Körpergeweben aufweisen [17, 49, 50].

1978 klassifizierten Burnstock et al. anhand unterschiedlicher pharmakologischer Eigenschaften eine Reihe von Rezeptoren, deren geeignete Liganden Purine darstellen [51]. Diese Klassifikation unterteilt die Purinrezeptoren in verschiedene Subtypen. Die P1-Purinrezeptoren werden bevorzugt durch Nukleoside – vor allem Ado – aktiviert, wohingegen die P2-Purinrezeptoren bevorzugt durch Nukleotide – vor allem ADP und ATP – aktiviert werden. Abbildung 2 zeigt die Expression von P1- und P2-Rezeptoren am Beispiel postsynaptischer Membranen von Neuronen sowie die Freisetzung und den Abbau von extrazellulärem ATP, ADP, AMP und Ado [52].



**Abb. 2: Die purinerge Signalkaskade am Beispiel postsynaptischer Membranen im ZNS.** Die purinerge Signalkaskade besteht aus der Freisetzung von Purinnukleotiden wie ATP, der Aktivierung von P1- und P2-Rezeptoren sowie der Hydrolyse von Purinmolekülen durch Ektonukleotidasen. Diese Kommunikationsstruktur konnte zwischen Gliazellen untereinander, Neuronen und Gliazellen sowie Neuronen untereinander nachgewiesen werden. Sowohl in der Neurogenese, als auch dem Metabolismus des adulten Gehirns, spielt die purinerge Signalkaskade eine wichtige Rolle [52]. (Mit freundlicher Genehmigung von Majumder et al., 2007)

Eine weitere erst kürzlich entdeckte Klasse von Purinrezeptoren, die P0-Rezeptoren, nutzen als Liganden Ade. Sie sind nur der Vollständigkeit halber erwähnt und werden hier nicht näher erläutert [53].

### 1.3.1 P1-Purinrezeptoren

Bereits im Jahr 1929 erkannte man, dass Ado einen Einfluss auf die physiologische Funktion des Säugetierherzens hat [15]. In ihrer Studie konnten Alan Drury und Albert von Szent-Györgyi – neben weiteren Funktionen – nachweisen, dass Ado die Herzfrequenz senkt sowie die elektrische Überleitung vom Vorhof auf die Kammer verringert. Obwohl in dieser Studie vornehmlich der Einfluss von Ado auf das Säugetierherz untersucht wurde, ging man davon aus, dass auch andere Zellen – neben den Herzmuskelzellen – durch Ado beeinflusst werden können. Hier ist vor allem der inhibitorische Effekt von Ado auf die glatte Muskulatur des MDT hervorzuheben [15, 54]. Auch im Bereich des ZNS wurde Ado mit diversen Funktionen in Verbindung gebracht [55]. Zu diesem Zeitpunkt waren spezifische Rezeptoren für Ado noch nicht bekannt.



Erst Ende der 70er Jahre konnten verschiedene Rezeptoren für Ado nachgewiesen werden [56, 57]. Zunächst wurde angenommen, dass es zwei verschiedene Arten von P1-Rezeptoren gäbe, die beide mit dem membranständigen Enzym Adenylatzyklase (AC) interagieren. Die AC ist für die Generierung von zyklischem Adenosinmonophosphat (cAMP) – einem intrazellulären Signalmolekül – verantwortlich. In Anlehnung an ihre Assoziation mit der AC bezeichnete man diese Rezeptoren als A<sub>1</sub>- und A<sub>2</sub>-Rezeptoren [58]. Durch Bindung von Ado am A<sub>1</sub>-Rezeptor kommt es zur Inhibierung und durch Bindung am A<sub>2</sub>-Rezeptor zur Aktivierung der AC [57]. Durch weiterführende Studien im Verlauf der Jahre erkannte man, dass die zuvor gewählte Klassifikation dem Detailreichtum der Adenosinwirkungen in den verschiedenen Körpergeweben nicht ausreichend gerecht wurde. Es kam zu einer verfeinerten Subklassifizierung der P1-Rezeptoren in A<sub>1A</sub>-, A<sub>1B</sub>-, A<sub>2A</sub>- und A<sub>2B</sub>-Rezeptoren, die durch verschiedene pharmakologische Antagonisten unterschiedlich stark beeinflusst werden können [59, 60]. Eine weitere Klasse der P1-Rezeptoren sind die A<sub>3</sub>-Rezeptoren, von denen man annimmt, dass sie mit Kalzium-Ionenkanälen interagieren [61].

### 1.3.2 P2-Purinrezeptoren

Rezeptoren, die bevorzugt Purinnukleotide wie ADP und ATP binden, werden als P2-Purinrezeptoren bezeichnet. 1985 erfolgte durch G. Burnstock und C. Kennedy eine Klassifizierung der P2-Purinrezeptoren in P2X- und P2Y-Subtypen [62]. Hintergrund dieser Klassifizierung waren die unterschiedlichen pharmakologischen Eigenschaften einiger Rezeptoren sowie die unterschiedlichen Zeitpunkte ihrer artifiziellen Klonierung. Aufgrund der enormen Vielfalt dieser Rezeptorklasse zeigen die verschiedenen Rezeptorsubtypen auch eine unterschiedliche Sensitivität gegenüber unterschiedlichen Nukleotidmolekülen. Beispielsweise werden P2Y<sub>2</sub>, P2Y<sub>4</sub> und P2Y<sub>11</sub> bevorzugt durch ATP aktiviert, wohingegen P2Y<sub>1</sub>, P2Y<sub>12</sub> und P2Y<sub>13</sub> besonders durch ADP aktiviert werden [63]. Neben Purinnukleotiden besteht ebenfalls eine Sensitivität gegenüber Pyrimidinnukleotiden wie Uridintriphosphat (UTP) und Uridindiphosphat (UDP). P2Y<sub>2</sub> und P2Y<sub>4</sub> sind dabei besonders sensitiv für den Liganden UTP, wobei P2Y<sub>6</sub> und P2Y<sub>14</sub> UDP favorisieren [63]. Des Weiteren erfolgt eine Aktivierung von P2Y<sub>14</sub> durch die Nukleotidzucker UDP-Glukose und UDP-Galaktose [63].

### 1.3.2.1 P2X-Rezeptoren im ZNS

P2X-Rezeptoren zählen zur Rezeptorklasse ligandengesteuerter Ionenkanäle, welche auch als ionotrope Rezeptoren bezeichnet werden. Sie bestehen aus zwei transmembranären Domänen, wobei sowohl das N-terminale (Stickstoff) als auch das C-terminale (Kohlenstoff) Ende intrazellulär liegt [64, 65]. Die Kanalpore der P2X-Rezeptoren wird durch drei Untereinheiten (Trimere) gebildet, die als Homomultimere oder Heteromultimere vorliegen [66]. Eine extrazelluläre Schleife („loop“) dient als ATP-Bindungsstelle [67]. Je nach P2X-Rezeptor variiert die Anzahl der bildenden Aminosäuren zwischen 379 und 595 [68]. Die Studien von Kawate et al. trugen maßgeblich zur Erkenntnis der molekularen Architektur der P2X-Rezeptoren bei [69]. Nach Bindung von Purinnukleotiden (z.B. ADP und ATP) öffnet sich ihre Kanalpore und sie sind permeabel für die Kationen Natrium ( $\text{Na}^+$ ), Kalium ( $\text{K}^+$ ) und Kalzium ( $\text{Ca}^{2+}$ ). P2X-Rezeptoren werden in die sieben verschiedenen Subtypen P2X<sub>1</sub>, P2X<sub>2</sub>, P2X<sub>3</sub>, P2X<sub>4</sub>, P2X<sub>5</sub>, P2X<sub>6</sub> und P2X<sub>7</sub> unterteilt. Diese Unterteilung begann im Jahr 1994 mit der Klonierung der ersten Rezeptoren P2X<sub>1</sub> und P2X<sub>2</sub> [70, 71].

Mit dem Aufkommen immunhistochemischer Untersuchungen erkannte man, dass P2X-Rezeptoren in fast allen nicht-neuronalen Zellen – u.a. in glatten Muskelzellen, Herzmuskelzellen, Fibroblasten und Immunzellen – in großer Zahl exprimiert werden [72]. Auch neuronale Zellen exprimieren alle Subtypen der P2X-Rezeptoren, wobei ihre topographische Verteilung in den einzelnen Regionen des ZNS sehr heterogen ist.

1992 wurde die neuronale synaptische Signalübertragung mittels P2X-Rezeptoren in Ganglien und im Gehirn beschrieben [38, 39]. Seither ist die molekulare Physiologie der P2X-Rezeptoren im ZNS von großem wissenschaftlichen Interesse, wobei vor allem die Lokalisation und Funktion im Vordergrund stehen. Durch Stimulation von P2X-Rezeptoren kommt es zur Aktivierung zytosolischer  $\text{Ca}^{2+}$ -vermittelter Signalkaskaden in vielen Neuronen des ZNS [73]. Dazu zählt auch die durch präsynaptische P2X-Rezeptoren vermittelte Freisetzung von ATP und anderen Neurotransmittern [74].

Die einzelnen Regionen des ZNS weisen unterschiedliche Subtypen an P2X-Rezeptoren auf (Tab. 1). Im Hippocampus sind alle Subtypen der P2X-Rezeptoren in großer Anzahl vorkommend. In den diversen Kerngebieten des

Hypothalamus ist die Expression eher heterogen. Der Ncl. paraventricularis (PVN) weist vor allem die Subtypen P2X<sub>1-6</sub> auf, wohingegen der Ncl. supraopticus (SON) vor allem die Subtypen P2X<sub>2</sub> und P2X<sub>5</sub> exprimiert [75]. Der Rezeptortyp P2X<sub>4</sub> wurde bereits im Ncl. suprachiasmaticus (SCN) nachgewiesen [75]. Im Bereich des Isokortex finden sich vor allem die Rezeptortypen P2X<sub>2</sub>, P2X<sub>4</sub> und P2X<sub>5</sub> [76].

**Tabelle 1: Lokalisation der P2X-Rezeptoren in verschiedenen Regionen des ZNS**

P2X-Rezeptor	Lokalisation im ZNS
P2X <sub>1</sub> [75, 77]	Hypothalamus (PVN), Hippocampus, Cerebellum
P2X <sub>2</sub> [75, 77-79]	Hypothalamus (SON, PVN), Hippocampus, Isokortex
P2X <sub>3</sub> [75, 77]	Hypothalamus (PVN), Hippocampus
P2X <sub>4</sub> [75, 76, 80]	Hypothalamus (SCN, PVN), Hippocampus, Isokortex
P2X <sub>5</sub> [75, 81]	Hypothalamus (SON, PVN), Hippocampus, Isokortex
P2X <sub>6</sub> [75]	Hypothalamus (PVN), Hippocampus
P2X <sub>7</sub> [82]	Hippocampus

Die Funktionen der P2X-Rezeptoren im ZNS wurden in diversen Studien untersucht (Tab. 2). P2X<sub>1</sub> konnte verstärkt in geschädigtem Hirngewebe nachgewiesen werden und dient somit vermutlich der zellulären Regeneration [83]. P2X<sub>2</sub> ist in physiologische Prozesse wie Schlaf und Aufmerksamkeit, Nahrungsaufnahme, lokomotorische Aktivität sowie in die zelluläre Regeneration involviert [83-86]. Die vor allem im Hippocampus vorkommenden Rezeptoren P2X<sub>3</sub> und P2X<sub>4</sub> sind an Lern- und Gedächtnisprozessen beteiligt [87, 88]. P2X<sub>4</sub> ist darüber hinaus auch in Gefühlsprozesse wie Stimmung und Motivation involviert [89]. An der lokomotorischen Aktivität ist P2X<sub>5</sub> beteiligt [90]. P2X<sub>6</sub> wurde in der Schmerzregulation beschrieben [91]. P2X<sub>7</sub> erfüllt seine Rolle maßgeblich in Lern- und Gedächtnisprozessen, Schlaf und Aufmerksamkeit sowie Stimmung und Motivation [89, 92-94].

**Tabelle 2: Physiologische Funktionen der P2X-Rezeptoren im ZNS**

P2X-Rezeptor	Funktion
P2X <sub>1</sub> [83]	Zelluläre Regeneration
P2X <sub>2</sub> [83-86]	Schlaf und Aufmerksamkeit, Nahrungsaufnahme, Lokomotorische Aktivität, zelluläre Regeneration
P2X <sub>3</sub> [87]	Lernen und Gedächtnis
P2X <sub>4</sub> [88, 89]	Lernen und Gedächtnis, Stimmung und Motivation
P2X <sub>5</sub> [90]	Lokomotorische Aktivität
P2X <sub>6</sub> [91]	Schmerzregulation
P2X <sub>7</sub> [89, 92-94]	Lernen und Gedächtnis, Schlaf und Aufmerksamkeit, Stimmung und Motivation

### 1.3.2.2 P2Y-Rezeptoren im ZNS

P2Y-Rezeptoren zählen zur Klasse G-Protein-gekoppelter Rezeptoren, auch metabotrope Rezeptoren genannt [95]. Auf molekularer Ebene besitzen sie die für alle G-Protein-gekoppelten Rezeptoren typischen septahelikalen, hydrophoben Transmembrandomänen [96]. Insgesamt werden die acht Subtypen P2Y<sub>1</sub>, P2Y<sub>2</sub>, P2Y<sub>4</sub>, P2Y<sub>6</sub>, P2Y<sub>11</sub>, P2Y<sub>12</sub>, P2Y<sub>13</sub> und P2Y<sub>14</sub> unterschieden [97]. Analog der verschiedenen Arten G-Protein-gekoppelter Rezeptoren verwenden P2Y<sub>1</sub>, P2Y<sub>2</sub>, P2Y<sub>4</sub>, P2Y<sub>6</sub> und P2Y<sub>11</sub> die G<sub>q</sub>-gekoppelte Signalkaskade zur Aktivierung der durch Phospholipase C (PLC) und Inositoltriphosphat (IP<sub>3</sub>) initiierten Freisetzung von Ca<sup>2+</sup>-Ionen aus dem endoplasmatischen Retikulum der Zelle [98]. Die Rezeptoren P2Y<sub>12</sub>, P2Y<sub>13</sub> und P2Y<sub>14</sub> verwenden hingegen fast ausschließlich den G<sub>i/o</sub>-gekoppelten Signalweg, wodurch die AC inhibiert und die Aktivität diverser Ionenkanäle moduliert wird [99].

P2Y-Rezeptoren können als Homodimere und Heterodimere mit anderen P2Y-Rezeptoren vorkommen, bilden vereinzelt aber auch Dimere mit P1-Rezeptoren [100, 101].

Tabelle 3 zeigt eine Auswahl der Lokalisationen der P2Y-Rezeptoren im ZNS. P2Y<sub>1-2</sub>, P2Y<sub>4</sub>, P2Y<sub>6</sub>, P2Y<sub>11-12</sub> werden im Hippocampus exprimiert [97, 102]. P2Y<sub>1</sub> findet sich darüber hinaus im Hypothalamus, Putamen, Ncl. caudatus und Striatum [102]. P2Y<sub>2</sub> zeigt neben dem Hippocampus eine Expression im Putamen, Striatum, Isokortex und Cerebellum [102]. Im Hypothalamus und Cerebellum wurde P2Y<sub>4</sub> nachgewiesen [102]. Neben dem Hippocampus konnte P2Y<sub>6</sub> auch in der Amygdala, Putamen und Ncl.

accumbens entdeckt werden [102]. P2Y<sub>11</sub> findet sich im Putamen, Ncl. accumbens und Striatum [97]. P2Y<sub>12</sub> wurde neben dem Hippocampus im Ncl. accumbens nachgewiesen [103]. P2Y<sub>13</sub> wird im Isokortex und im Striatum exprimiert [104]. Die Lokalisation von P2Y<sub>14</sub> ist bis heute ungeklärt. P2Y<sub>14</sub> wurde bisher in Mikrogliazellen diverser Hirnregionen beschrieben [105]. Eine P2Y<sub>14</sub>-Expression in spezifischen neuronalen Zellpopulationen fand sich dabei jedoch bisher nicht.

**Tabelle 3: Lokalisation der P2Y-Rezeptoren in verschiedenen Regionen des ZNS**

P2Y-Rezeptor	Lokalisation im ZNS
P2Y <sub>1</sub> [97, 102]	Hippocampus, Hypothalamus (Ncl. dorsomedialis, Ncl. ventromedialis, Ncl. lateralis, Ncl. arcuatus), Putamen, Ncl. caudatus, Striatum
P2Y <sub>2</sub> [97, 102]	Hippocampus, Putamen, Striatum, Isokortex, Cerebellum
P2Y <sub>4</sub> [97, 102]	Hippocampus, Hypothalamus, Cerebellum
P2Y <sub>6</sub> [97, 102]	Hippocampus, Amygdala, Putamen, Ncl. accumbens
P2Y <sub>11</sub> [97]	Hippocampus, Putamen, Ncl. accumbens, Striatum
P2Y <sub>12</sub> [102, 103]	Hippocampus, Ncl. accumbens
P2Y <sub>13</sub> [104]	Isokortex, Striatum
P2Y <sub>14</sub> [105]	Mikroglia, keine spezifische Region beschrieben

Die funktionalen Eigenschaften der P2Y-Rezeptoren sind sehr unterschiedlich (Tab. 4). P2Y<sub>1</sub> ist an Prozessen wie Lernen und Gedächtnis, Schlaf und Aufmerksamkeit, Nahrungsaufnahme sowie Stimmung und Motivation beteiligt [101, 106-108]. Die lokomotorische Aktivität wird maßgeblich durch P2Y<sub>2</sub> beeinflusst [90]. Der Rezeptor P2Y<sub>4</sub> beeinflusst und steuert physiologische Prozesse wie Schlaf und Aufmerksamkeit sowie die lokomotorische Aktivität [90, 107]. Es konnte gezeigt werden, dass P2Y<sub>6</sub> an der Aktivierung von Mikroglia beteiligt ist [109]. Durch eine Steigerung der Phagozytose durch Mikroglia, könnte P2Y<sub>6</sub> einen wichtigen Beitrag zu immunologischen Abwehrprozessen im ZNS liefern. Die Rolle von P2Y<sub>11</sub> wird derzeit in der Aktivierung des Immunsystems gesehen [110]. Wie aus diversen Studien bekannt, spielt P2Y<sub>12</sub> eine entscheidende Rolle in der Thrombozytenaggregation und dient hier pharmakologisch als wichtige Struktur für die medikamentöse Thrombozytenaggregationshemmung [111]. Die Schlaganfallprävention spielt hierbei eine wichtige Rolle. In neueren Studien wurde ebenfalls eine Aktivierung von Mikroglia durch P2Y<sub>12</sub> beschrieben [112].

Die Rezeptoren P2Y<sub>13</sub> und P2Y<sub>14</sub> werden im Rahmen physiologischer Prozesse zur Neuroprotektion geschädigter Hirnareale diskutiert [105, 113].

**Tabelle 4: Bekannte physiologische Funktionen der P2Y-Rezeptoren im ZNS**

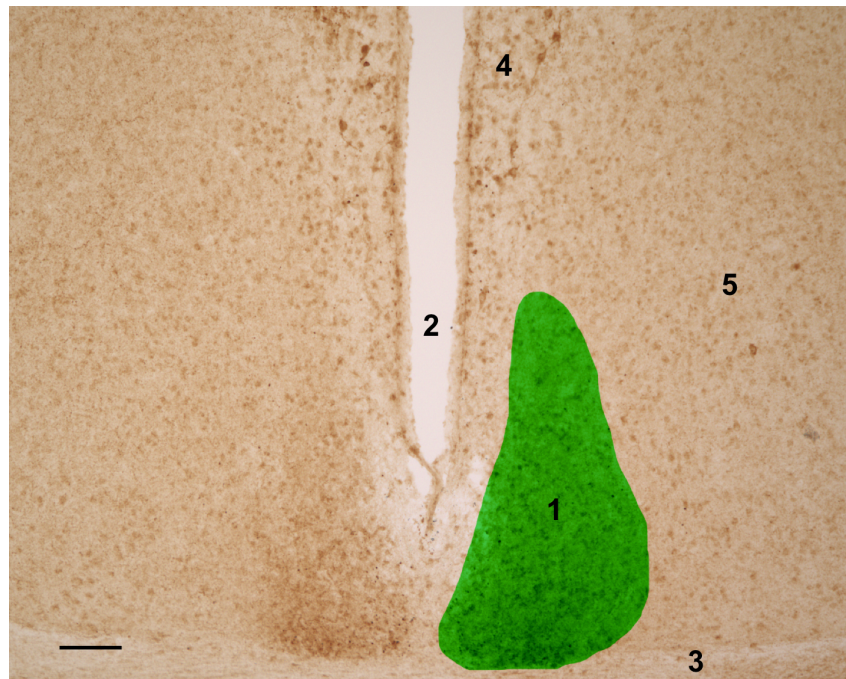
P2Y-Rezeptor	Funktion
P2Y <sub>1</sub> [101, 106-108]	Lernen und Gedächtnis, Schlaf und Aufmerksamkeit, Nahrungsaufnahme, Stimmung und Motivation
P2Y <sub>2</sub> [90]	Lokomotorische Aktivität
P2Y <sub>4</sub> [90, 107]	Schlaf und Aufmerksamkeit, Lokomotorische Aktivität
P2Y <sub>6</sub> [109]	Aktivierung von Mikroglia
P2Y <sub>11</sub> [110]	Aktivierung des Immunsystems
P2Y <sub>12</sub> [111, 112]	Aktivierung von Mikroglia, Thrombozytenaggregation
P2Y <sub>13</sub> [113]	Neuroprotektion
P2Y <sub>14</sub> [105]	Neuroprotektion

#### 1.4 Das zirkadiane System

Als zirkadian (dt. „um den Tag herum“) bezeichnet man in der Chronobiologie rhythmisch ablaufende Funktionen eines Organismus, die einer Periodenlänge von etwa 24 Stunden folgen. Definitionsgemäß ist die zirkadiane Rhythmik unabhängig von äußeren Faktoren wie Licht, Dunkelheit oder Umgebungstemperatur, daher wird sie umgangssprachlich auch als „innere Uhr“ bezeichnet. Der in terrestrischen Lebewesen – vor allem bei Säugetieren – bedeutendste zirkadiane Rhythmus ist der Schlaf-Wach-Rhythmus. Aber auch zahlreiche andere Körperfunktionen wie Atem- und Herzfrequenz, Körpertemperatur, Blutdruck, Hormonausschüttung sowie verschiedene metabolische Prozesse und Funktionen folgen zirkadianen Rhythmen [114, 115].

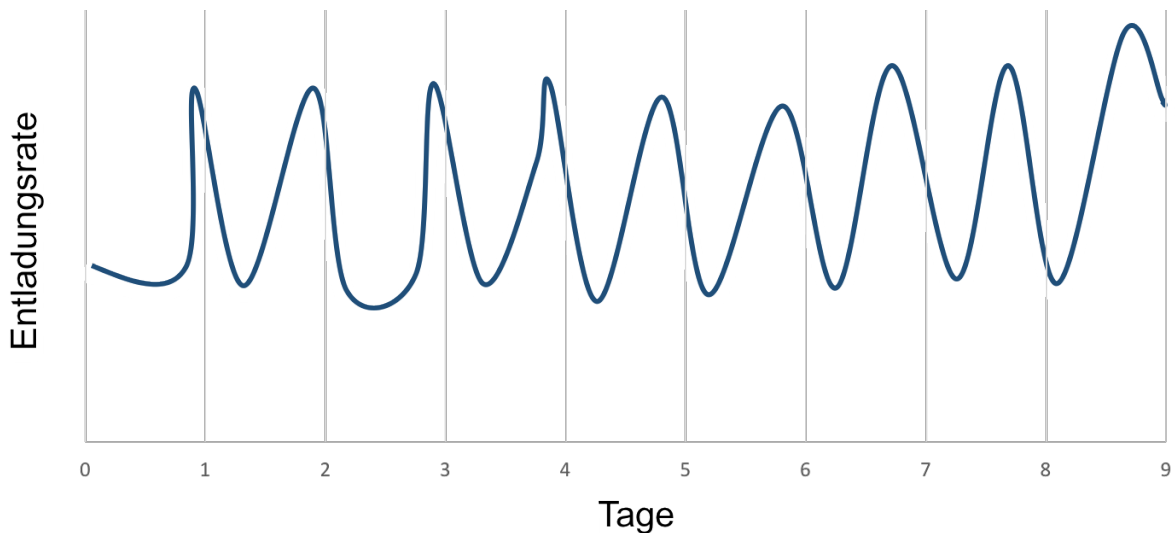
Bei Säugern werden zirkadiane Rhythmen von einem zirkadianen System gesteuert. Dieses besteht aus einem zentralen zirkadianen Schrittmacher sowie aus Strukturen, die Afferenzen und Efferenzen vermitteln. Der Schrittmacher des zirkadianen Systems befindet sich in den Nuclei suprachiasmatici (SCN) des anterioren Hypothalamus [116, 117]. Wie aus Abbildung 3 erkennbar, verdankt dieses Kerngebiet seinen Namen (lat. supra = über, chiasma = Kreuzung) der bilateralen Lage neben dem 3. Hirnventrikel,

unmittelbar oberhalb der Sehnervenkreuzung (Chiasma opticum). Der SCN wurde 1930 durch Grünthal et al. erstmals beschrieben [118].



**Abb. 3: Koronarschnitt (30 µm) durch den SCN einer Maus des Wildtyp-Stamms C57Bl/6 nach immunohistochemischer DAB-Färbung von P2X<sub>4</sub>.** Skala = 100 µm. Die SCN (1; linkshemisphärisch grün markiert) beider Hemisphären grenzen medial an den 3. Hirnventrikel (2), kaudal an Fasern der Sehbahn (3), kranial an den PVN (4) und lateral an das Neuropil des lateralen Hypothalamus (5).

Die etwa 20.000 Neurone des bilateralen SCN zeigen eine spontane elektrische Aktivität ähnlich den Schrittmacherzellen des Herzens [119, 120]. Diese elektrische Entladungsrate der SCN-Zellen zeigt eine anhaltende zirkadiane Rhythmik *in-vivo*. Auch bei SCN-Neuronen in der Zellkultur bleibt diese Entladungsrate für über 9 Tage erhalten [121] (Abb. 4).



**Abb. 4: Schematische Darstellung der neuntägigen zirkadianen elektrischen Entladungsrates von SCN-Neuronen in der Zellkultur.** (Modifiziert nach Liu et al., 2000)

Um eine einheitliche Synchronisation aller Schrittmacherzellen des SCN zu erreichen, wird eine Signalübertragung über Synapsen, Gap-Junctions sowie neurohumorale Signale angenommen [122, 123]. Auf zellulärer Ebene befindet sich in jedem SCN Neuron ein molekulares Uhrwerk, das aus transkriptionellen/translationalen Rückkopplungsschleifen so genannter Uhrengene besteht. Dieses molekulare Uhrwerk im SCN ist, ähnlich wie die elektrische Aktivität, selbsterhaltend. Die Uhrengene kodieren für transkriptionelle Regulatoren und kontrollieren so die rhythmische Zellfunktion. In SCN-Neuronen steuern die Uhrengene unter anderem die rhythmische elektrische Aktivität aber auch die Freisetzung von Transmittern. Durch diese rhythmische Freisetzung von Transmittern wird der zirkadiane Rhythmus an nachgeschaltete Kerngebiete im Hypothalamus übertragen und somit vegetative rhythmische Körperfunktionen gesteuert. Interessanterweise besitzen auch Zellen in anderen zentralen (z.B. Hippocampus) und peripheren Geweben (z.B. Leber, Niere) ein molekulares Uhrwerk [124]. Diese werden als untergeordnete zirkadiane Oszillatoren bezeichnet [125]. Somit werden auf zellulärer Ebene zirkadiane Rhythmen der Organfunktionen gesteuert. Die untergeordneten zirkadianen Oszillatoren können ihre zirkadiane Rhythmik ohne Informationen aus dem SCN jedoch nur wenige Tage aufrechterhalten und sind auf den SCN als Taktgeber angewiesen [120, 125]. Der SCN koordiniert somit an der Spitze einer Hierarchie aus zirkadianen Oszillatoren die tageszyklischen Zell- und Organfunktionen.



Die Periodenlänge und Phasenlage der inneren Uhr können durch interne und externe Faktoren verstellt werden. Zu den externen Faktoren zählen v.a. Licht und Umgebungstemperatur [126, 127]. Bereits 1963 konnten Sweeney et al. am Dinoflagellaten *Gonyaulax polyedra* zeigen, dass die Beeinflussung des zirkadianen Rhythmus durch Licht mit einer zeitlichen Phasenverschiebung einhergeht, d.h. die 24-Stunden-Rhythmik verfrüht oder verspätet abläuft [128]. Im Nagetierversuch unter Dauerdunkelheit untersuchten DeCoursey et al. die Beeinflussung des zirkadianen Systems durch Lichteinfall [129]. Hierbei trat eine Phasenverspätung auf, sobald Licht in der frühen Nacht einfiel, wohingegen es durch Lichteinfall in der späten Nacht zu einer Phasenverfrühung kam. Lichteinfall in der Tagphase führte nicht zu einer Phasenverschiebung.

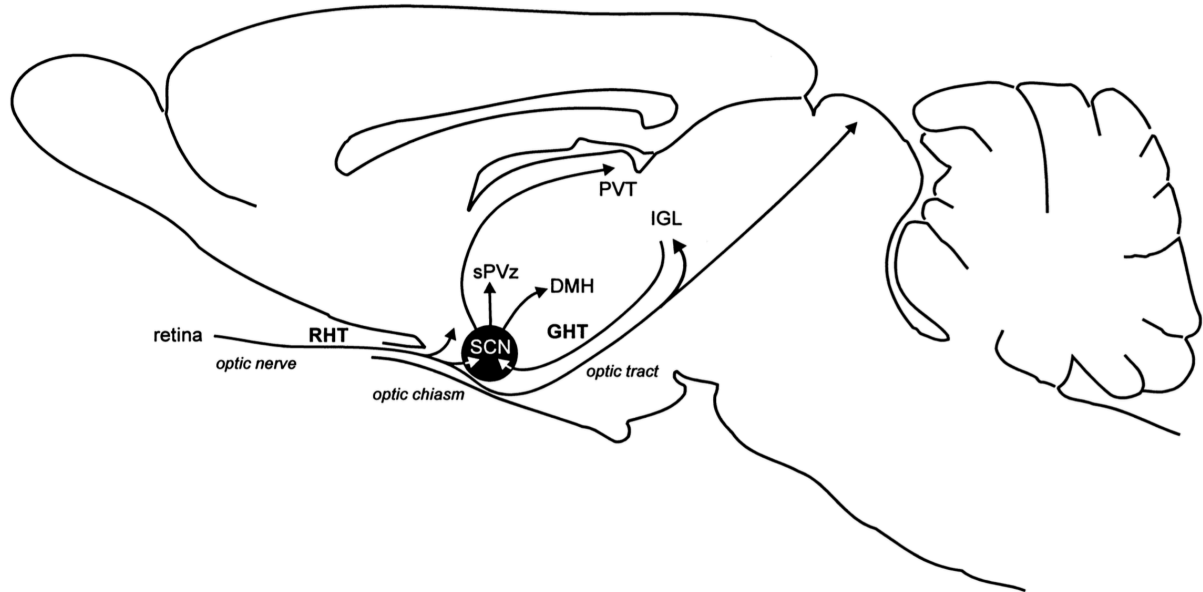
Alle exogenen Faktoren, die den zirkadianen Rhythmus beeinflussen, bezeichnet man als Zeitgeber. Licht stellt dabei den die zirkadiane Rhythmik am stärksten beeinflussenden Zeitgeber dar. Licht stimmt den autonomen zirkadianen Rhythmus auf den Tag-Nacht-Zyklus und damit auf Änderungen in der Umwelt des Individuums ab. In der wissenschaftlichen Literatur wird bei einem Experiment in sich rhythmisch abwechselnden Licht- und Dunkelphasen die Zeitachse als *Zeitgeber Time* (ZT) angegeben [130]. Wird in Studien der endogene zirkadiane Rhythmus ohne den Einfluss von Licht oder anderen Zeitgebern untersucht, so bezeichnet man die Zeitachse mit *Circadian Time* (CT) [131].

Um den funktionellen Einfluss von Licht auf die zirkadiane Rhythmik zu verstehen, wurden die Zellpopulationen des SCN genauer untersucht [132]. Hierbei ergab sich die topografische Differenzierung zwischen einer inneren ventrolateralen (vlSCN) und äußeren dorsomedialen (dmSCN) Zellpopulation innerhalb des SCN [133]. Der vlSCN wird dabei auch als Kern und der dmSCN als Schale bezeichnet. Diese beiden Regionen stehen durch Afferenzen und Efferenzen untereinander in Verbindung, um eine einheitliche Synchronisation der zellulären elektrischen Aktivität zu erreichen [122]. Über den Tractus retinohypothalamicus (RHT) erhält die ventrolaterale Zellpopulation direkte monosynaptische glutamaterge Afferenzen von Melanopsin-positiven retinalen Ganglienzellen und damit Informationen über die äußeren Lichtverhältnisse [134]. Melanopsin wird dabei als zirkadianer Photorezeptor angesehen [135]. Weitere indirekte Afferenzen erhält der vlSCN vom *intergeniculate*

*leaflet* (IGL) des Corpus geniculatum laterale (LGN) über den Tractus geniculohypothalamicus (GHT) [136].

Die Verarbeitung der Lichtimpulse aus den retinalen Ganglienzellen erfolgt auf molekularer Ebene innerhalb der SCN-Neurone durch Aktivierung und Inhibierung der Uhrengene *Per* (*period*), *CRY* (*cryptosome*), *CLOCK* (*Circadian Locomotor Output Cycles Kaput*), *BMAL* (*Brain and Muscle ARNT-like*) sowie *TIM* (*timeless*), die sich in ihrer Transkription und Translation gegenseitig beeinflussen [137, 138]. Durch den Einfall von Licht während der Nacht kommt es nach einigen Stunden zu einem Anstieg der Transkription von *Per1* und *CRY1* [139]. Über einen negativen Feedback-Mechanismus inhibieren *Per1* und *CRY1* wiederum ihre eigene Synthese durch Inaktivierung von *CLOCK* und *BMAL1*. Nach Verarbeitung der afferenten retinalen Signale projiziert der SCN seine Efferenzen in andere Hirnareale. Die prominentesten Efferenzen verlaufen zur subparaventriculären Zone (sPVz) direkt unterhalb der paraventriculären Zone des Hypothalamus [122]. Dabei projiziert der vSCN vorwiegend über den Neurotransmitter VIP (vasoaktives intestinales Polypeptid) in den lateralen Anteil der sPVz, wohingegen der dmSCN seine Efferenzen überwiegend mittels des Neurotransmitters AVP (Arginin-Vasopressin) in den medialen Anteil der sPVz schickt [133, 140, 141]. Weitere Efferenzen ziehen zum Nucleus paraventricularis des Thalamus (PVT) sowie zu Kerngebieten im dorsomedialen (DMH) und ventromedialen (VMH) Anteil des Hypothalamus [122]. Nachfolgend werden auch die peripheren Oszillationszentren mit Afferenzen aus dem SCN versorgt. Somit synchronisiert der SCN die peripheren Oszillatoren anhand der Informationen zu äußeren Lichtverhältnissen, die er durch den RHT erhält.

Abbildung 5 zeigt eine graphische Zusammenfassung der wichtigsten Afferenzen und Efferenzen des SCN sowie deren Kerngebiete.



**Abb. 5: Longitudinalschnitt durch das Gehirn der Ratte mit Darstellung der wichtigsten Afferenzen und Efferenzen des Nucleus suprachiasmaticus (SCN).** Über den Tractus retinohypothalamicus (RHT) erhält der SCN (vorwiegend der Ncl. ventrolateralis) Informationen von der Retina. Der Tractus geniculohypothalamicus (GHT) liefert Afferenzen vom *intergeniculate leaflet* (IGL) des Corpus geniculatum laterale (LGN). Die wichtigsten Efferenzen des SCN verlaufen zur subparaventriculären Zone (sPVz) des Hypothalamus, dem Nucleus paraventricularis des Thalamus (PVT) sowie den dorsomedialen (DMH) und ventromedialen (VMH) Anteilen des Hypothalamus [122]. (Mit freundlicher Genehmigung von van Esseveldt et al., 2000)

## 1.5 P2-Rezeptoren im SCN

Die Bedeutung der P2-Rezeptoren im SCN ist bislang unzureichend untersucht. Auch über die Lokalisation der P2-Rezeptoren im SCN der Maus ist nur wenig bekannt. Im SCN der Ratte konnten die mRNAs von  $P2X_2$ ,  $P2X_4$  sowie  $P2X_6$  nachgewiesen werden [142]. Auf Proteinebene wurde das Vorkommen von  $P2X_5$  im SCN der Ratte bestätigt [143]. Bhattacharya et al. konnten 2013 zeigen, dass in der quantitativen Real-Time PCR (qRT-PCR) von SCN-Proben der Ratte die mRNAs von  $P2X_{1-7}$  exprimiert werden [144]. Dabei wurde die Quantität der Expression mit  $P2X_2 > P2X_7 > P2X_4 > P2X_5 > P2X_1 = P2X_3 > P2X_6$  ermittelt. In der gleichen Studie wurde ebenfalls die mRNA-Expression der P2Y-Rezeptoren  $P2Y_1$ ,  $P2Y_2$  und  $P2Y_{12}$  im SCN der Ratte untersucht. Hierbei ergaben sich quantitative Werte von  $P2Y_2 > P2Y_1 > P2Y_{12}$ . In der gleichen Studie wurde die Proteinexpression von  $P2X_2$  immunhistochemisch analysiert. Aus Untersuchungen von Vulchanova et al. wusste man bereits, dass das Protein  $P2X_2$  im SON der Ratte – einer dem SCN benachbarten Region – stark exprimiert ist [145]. Im SCN der Ratte fand sich hingegen kein  $P2X_2$  Protein auf den SCN-Zellsomata, sondern nur auf den Nervenendigungen nach Koloalisation mit Synapsin I. Dies

deutet auf eine präsynaptische Lokalisation hin. Umfassende Untersuchungen an der Maus wurden bisher nicht durchgeführt und sollen durch diese Arbeit ergänzt werden.

## **1.6 ATP als Neurotransmitter im SCN**

Studien über P1-Rezeptoren konnten bereits zeigen, dass Schlafmangel die Konzentration von extrazellulärem Ado sowie A<sub>1</sub>R-mRNA in cholinergen Anteilen des basalen Vorderhirns – einer Region, die an der Schlaf-Wach-Homöostase beteiligt ist – ansteigen lässt [146]. Die P1-Rezeptoren A<sub>1</sub> und A<sub>2</sub> konnten in elektrophysiologischen Untersuchungen im SCN nachgewiesen werden [147]. Zudem zeigte die Arbeitsgruppe um von Gall et al., dass Ado die rhythmische Genexpression in der Hypophyse von Mäusen beeinflusst [148]. Die glutamaterge retinohypothalamische Neurotransmission mit ihren Afferenzen zum SCN konnte durch Ado im SCN von Hamster und Maus inhibiert werden [149, 150]. Da das Gehirn von allen Geweben die größte Dichte an P2-Rezeptoren aufweist, wird derzeit auch der Einfluss von ATP auf neuronale Prozesse akribisch untersucht. Im Hinblick auf den SCN stellt ATP womöglich einen entscheidenden Neurotransmitter dar, um die Schrittmacherfrequenzen des SCN und anderen Hirnregionen über P2-Rezeptoren zu koordinieren [151]. Dabei ist bereits bekannt, dass die Expression von an der ATP-Regulation beteiligter Gene im SCN oszilliert [152]. Auch die Freisetzung von ATP im SCN folgt einem zirkadianen Rhythmus [153]. Sie zeigt eine negative Korrelation mit der elektrischen Zellaktivität der SCN-Neurone [151]. Astrozyten setzen ATP u.a. über die große Kanalpore von P2X<sub>7</sub> frei [154]. Auch im SCN könnte dieser Mechanismus eine Rolle spielen.

## 2 Ziele der Arbeit

Purinrezeptoren sind im ZNS, aber auch in anderen Regionen des Körpers, weit verbreitet. Sie spielen eine fundamentale Rolle in der neuronalen synaptischen Signalübertragung. Diese Aufgabe erfüllen sie u.a. durch Bindung des ubiquitär vorkommenden Neurotransmitters ATP. Auch im SCN – dem Hauptschrittmacher des zirkadianen Systems – wird ATP als Neurotransmitter freigesetzt. Die Wirkungen von ATP im SCN sind hingegen nur unzureichend untersucht. Ebenso ist über das Vorkommen und das Verteilungsmuster von Purinrezeptoren im SCN bisher wenig bekannt.

In dieser Arbeit soll daher zunächst die Expression der Purinrezeptoren P2X<sub>1</sub>, P2X<sub>2</sub>, P2X<sub>3</sub>, P2X<sub>4</sub>, P2X<sub>5</sub>, P2X<sub>6</sub> und P2X<sub>7</sub> sowie P2Y<sub>1</sub>, P2Y<sub>2</sub>, P2Y<sub>4</sub>, P2Y<sub>6</sub>, P2Y<sub>11</sub>, P2Y<sub>12</sub>, P2Y<sub>13</sub> und P2Y<sub>14</sub> im SCN der Maus untersucht werden. Durch Erkenntnisse über das Vorkommen der einzelnen Rezeptoren im SCN lassen sich zukünftig womöglich Rückschlüsse über die Beteiligung dieser Rezeptoren an der Modulation des zirkadianen Systems ziehen.

Darüber hinaus sollen ebenfalls die tageszeitlichen sowie zirkadianen Unterschiede im Expressionsverlauf der Purinrezeptoren im SCN der Maus untersucht werden. Es ist bereits bekannt, dass ATP einen zirkadianen Rhythmus im SCN aufweist. Ein Ligand kann jedoch nur wirksam sein, wenn auf der Zielzelle ein entsprechender Rezeptor exprimiert wird. Daher ist es von großer Bedeutung, nicht nur das räumliche, sondern auch das zeitliche Verteilungsmuster der Purinrezeptoren im SCN zu untersuchen.

Die Analyse von räumlichem und zeitlichem Verteilungsmuster der Purinrezeptoren im SCN der Maus soll dazu dienen, die Wirkungsweise der Purine auf das zirkadiane System besser zu verstehen und somit Perspektiven für neue Therapiemöglichkeiten von Chronodisruption zu eröffnen.

### **3 Material und Methoden**

#### **3.1 Allgemeine Richtlinien**

Alle Versuche im Rahmen dieses experimentellen Projektes wurden gemäß den aktuellen Richtlinien für Tierversuche des Landesamts für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz (LANUV) Nordrhein-Westfalen sowie des geltenden deutschen Tierschutzgesetzes (TierSchG) durchgeführt. Für die experimentellen Durchführungen lag eine Tierversuchsgenehmigung mit dem Aktenzeichen 84-02.04.2013.A358 vor. Die Organentnahmen fanden in der Zentralen Einrichtung für Tierforschung und Tierschutzaufgaben (ZETT) der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf statt; die Projektnummer lautet G 358/13. Der im Rahmen des deutschen Tierschutzgesetzes geforderte Nachweis über die Fachkunde im Umgang mit Versuchstieren wurde durch die Teilnahme am „Versuchstierkundlichen Übungsschein mit Fachkundenachweis gem. §9 des geltenden Tierschutzgesetzes“ der *Federation of European Laboratory Animal Science Associations (FELASA)* erbracht.

Die präexperimentelle Planung des Tierversuches erfolgte unter Berücksichtigung aktuell empfohlener Leitlinien zur Durchführung von Tierversuchen [155].

#### **3.2 Versuchstiere**

Ausschließlich männliche Mäuse des Wildtyp-Stamms C57Bl/6 im Alter von 8-12 Wochen wurden in die Studie eingeschlossen. Die Bereitstellung der Tiere erfolgte durch die Firma Janvier Labs (Le Genest-Saint-Isle, Frankreich). Aufgrund manifester genetischer Homologie zum menschlichen Genom [156], der gut etablierten genetischen Manipulation sowie aus praktikabler haltungstechnischer Sicht, stellte die Spezies Maus (*Mus musculus*) das geeignetste Tiermodell für das hiesige Versuchsvorhaben dar.

#### **3.3 Haltungsbedingungen**

Die Mäuse wurden in der Zentralen Einrichtung für Tierforschung und Tierschutzaufgaben (ZETT) der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf in einem klimatisierten (konstante Temperatur 20°C) Käfigkabinett mit streng kontrollierten Beleuchtungsverhältnissen sowie Futter und Wasser ad libitum gehalten. Die Tiere wurden in 3er Gruppen gehalten. Diese Gruppenhaltung ist gut etabliert und stellt für

die Tiere keine Belastung dar, die den Versuchsablauf negativ beeinflussen könnte [157]. Aufgrund der Sensitivität des zirkadianen Systems gegenüber Faktoren, die die Lokomotion oder die Lichtexposition verändern könnten, enthielten die Käfige kein zusätzliches *Enrichment* (z.B. Häuschen, Laufrad etc.) [158].

### **3.4 Versuchsaufbau**

Zur Analyse der tageszeitlichen Rhythmik der Purinrezeptoren wurde eine Versuchstierkohorte in einer Photoperiode von 12 h Licht/12 h Dunkelheit gehalten. Dieser Versuchsaufbau wird in der Literatur als *Zeitgeber Time* (ZT) bezeichnet. Eine weitere Versuchstierkohorte war einer Photoperiode in Dauerdunkelheit ausgesetzt, um die zirkadiane Rhythmik zu untersuchen. Ein solcher Versuchsaufbau wird in der Literatur als *Circadian Time* (CT) bezeichnet.

#### **3.4.1 Versuchstierkohorte unter *Zeitgeber Time***

Die Mäuse wurden unter dem Einfluss von 12 Stunden Licht (von 06:00 Uhr – 18:00 Uhr) und 12 Stunden Dunkelheit (von 18:00 Uhr – 06:00 Uhr) gehalten. Dieses Versuchsdesign wurde als 12L:12D bezeichnet. Der Beginn der Lichtphase um 6:00 Uhr ist definitionsgemäß ZT0, das Ende mit Beginn der Dunkelphase um 18:00 Uhr ZT12. Die Dunkelphase endet um 6:00 Uhr am Folgetag erneut bei ZT0. Die Mäuse wurden in vierstündigen Abständen zu den Zeitpunkten 08:00 Uhr (ZT02), 12:00 Uhr (ZT06), 16:00 Uhr (ZT10), 20:00 Uhr (ZT14), 24:00 Uhr (ZT18) und 04:00 Uhr (ZT22) getötet. Daraus ergaben sich jeweils drei Probenentnahmen bei Licht (ZT02, ZT06, ZT10) sowie drei bei Dunkelheit (ZT14, ZT18, ZT22). Für die Immunhistochemie wurden jeweils drei Tiere pro Zeitpunkt (n=3) narkotisiert, getötet, transkardial perfundiert und die Gehirne in-toto entnommen. Für die qRT-PCR wurden jeweils 3 Tiere pro Zeitpunkt (n=3) narkotisiert, getötet, die Gehirne entnommen und der SCN ausgestanzt.

#### **3.4.2 Versuchstierkohorte unter *Circadian Time***

Die Mäuse wurden unter 24 Stunden Dauerdunkelheit gehalten. Wir bezeichneten diesen Versuchsaufbau als 12D:12D. Das Einsetzen der Dunkelphase um 6:00 Uhr wird mit CT0 bezeichnet. Zu den Zeitpunkten 8:00 Uhr (CT02) und 04:00 Uhr (CT22) wurden jeweils 3 Mäuse getötet und perfundiert. Auch hier wurden die Gehirne in-toto entnommen. Aus Gründen des Tierschutzes zur Minimierung der Versuchstierzahl

wurden hier nur an zwei Zeitpunkten Probenentnahmen durchgeführt. Im 12D:12D-Versuch wurden die Zeitpunkte CT02 und CT22 untersucht.

### 3.5 Chemikalien und Lösungen

Alle Materialien zur technischen Durchführung der quantitativen Real-Time Polymerase-Kettenreaktion (qRT-PCR) (engl.: *real-time* = Echtzeit) sowie Immunhistochemie (IHC) sind nachfolgend aufgeführt. Ansätze zur Herstellung der verwendeten Lösungen finden sich in tabellarischer Form im Anhang dieser Arbeit (Tab. 13). Verbrauchsmaterialien (z.B. Pipetten, Flacons etc.) und Kleingeräte (z.B. Orbitalschüttler, Magnetrührer etc.) – sofern nicht tabellarisch gelistet – entsprechen gängiger Laborausstattung.

**Tabelle 5: Verwendete Chemikalien und Kits**

Chemikalie	Artikelnummer	Firma
Chrom(III)-Kaliumsulfat-Dodecahydrat ( $\text{CrK}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$ )	101036	Merck KGaA
3,3'-Diaminobenzidin Tetrahydrochlorid	D5637	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
di-Natriumhydrogen- phosphat-Dihydrat ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ )	106580	Merck KGaA
di-Natriumhydrogenphosphat wasserfrei ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ )	06586	Merck KGaA
Entellan®	107961	Merck KGaA
Ethylenglykol	324558	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Gelatine	104070	Merck KGaA
Heparin-Natrium-5000	PZN-03029820	Ratiopharm
Isofluran (Forene®)	B506	AbbVie GmbH
Isopentan ( $\text{C}_5\text{H}_{12}$ )	M32631	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Kaliumdihydrogen- phosphat wasserfrei ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )	105108	Merck KGaA
Kaliumchlorid (KCl)	104938	Merck KGaA
Ketamin-Actavis 50mg/ml (Ketaminhydrochlorid)	14999.00.00	Actavis Deutschland GmbH
MinElute PCR Purification Kit	28004	Qiagen
Natriumdihydrogenphosphat- Monohydrat ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ )	06346	Merck KGaA
Natriumchlorid (NaCl)	27810.295	VWR Chemicals
Natriumhydroxid (NaOH)	106453	Merck KGaA



Chemikalie	Artikelnummer	Firma
Paraformaldehyd (PFA)	104005	Merck KGaA
Polyvinyl Pyrolidon	PVP40	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
QuantiTect Reverse Transcription Kit	205311	Qiagen
RNeasy Micro Kit	74004	Qiagen
Rompun TS 50mg/ml (Xylazinhydrochlorid)	80712871	Bayer
Saccharose	S9378	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
SYBR Green	330520	Promega
Triton X-100	T9284	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Vectastain Elite ABC Universal Kit	PK-6100	Vector Laboratories, INC.
Millipore-Wasser (H <sub>2</sub> O)	MilliQ Reference A	Fisher Scientific
Wasserstoffperoxid (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	108597	Merck KGaA

**Tabelle 6: Liste verwendeter Primärantikörper**

Primärantikörper	Konzentration	Spezies	Bestellnummer	Firma
P2X1	1:75	Polyklonaler <i>Rabbit</i> AK	Sc-25692	Santa Cruz Biotechnology
P2X2	1:500	Polyklonaler <i>Rabbit</i> AK	GTX10266	Gene Tex
P2X3	1:50	Polyklonaler <i>Rabbit</i> AK	Sc-25694	Santa Cruz Biotechnology
P2X4	1:50	Polyklonaler <i>Goat</i> AK	Sc-15187	Santa Cruz Biotechnology
P2X5	1:25	Polyklonaler <i>Goat</i> AK	Sc-15191	Santa Cruz Biotechnology
P2X6	1:100	Polyklonaler <i>Rabbit</i> AK	LS-C94426	LifeSpan BioScience
P2X7	1:50	Polyklonaler <i>Goat</i> AK	Sc-15200	Santa Cruz Biotechnology
P2Y1	1:50	Polyklonaler <i>Rabbit</i> AK	Sc-20123	Santa Cruz Biotechnology
P2Y2	1:100	Polyklonaler <i>Rabbit</i> AK	NB110-39032	Novus Biologicals
P2Y4	1:750	Polyklonaler <i>Rabbit</i> AK	GTX87199	Gene Tex
P2Y6	1:100	Polyklonaler <i>Rabbit</i> AK	APR-011	Alomone Labs
P2Y11	1:300	Polyklonaler <i>Rabbit</i> AK	GTX108241	Gene Tex

Primärantikörper	Konzentration	Spezies	Bestellnummer	Firma
P2Y12	1:50	Polyklonaler <i>Goat</i> AK	Sc-27152	Santa Cruz Biotechnology
P2Y13	1:250	Polyklonaler <i>Rabbit</i> AK	LS-C145104	LifeSpan BioScience
P2Y14	1:250	Polyklonaler <i>Rabbit</i> AK	LS-C120603	LifeSpan BioScience

**Tabelle 7: Liste verwendeter Sekundärantikörper**

Sekundär-antikörper	Konzentration	Spezies	Bestellnummer	Firma
Anti- <i>Rabbit</i> IgG (biotinyliert)	1:500	<i>Goat</i>	BA-1000	Vector Laboratories
Anti- <i>Goat</i> IgG (biotinyliert)	1:500	<i>Rabbit</i>	BA-5000	Vector Laboratories

**Tabelle 8: Liste verwendeter Primer**

Primer	Sequenz
Rn18S forward	CGCCGCTAGAGGTGAAATTC
Rn18S reverse	TTGGCAAATGCTTTGCTC
P2X1 forward	CATGGGGACAGCTCCTTTGT
P2X1 reverse	GAGTGCAGCCACTGTCATCT
P2X2 forward	CCAAGGCACCCCTCAAGTAG
P2X2 reverse	CTCTGCCCCTTCTCCCAAAG
P2X3 forward	TGCTTCAACCAACCCAGTGT
P2X3 reverse	TAAGAGCCCCTCTTCTCCCC
P2X4 forward	CCTGGCTTACGTCATTGGGT
P2X4 reverse	AAGTGTGGTGCACAGCCACA
P2X5 forward	TCTACTGCCCATCTTCCGA
P2X5 reverse	ATAGTGTGGTTGCAGTGGG
P2X6 forward	GCTGCACCATGGACCTACTT
P2X6 reverse	GCTTCAGGTGAGCTGTTCCCT
P2X7 forward	GCACGAATTATGGCACCGTC
P2X7 reverse	CCCCACCCTCTGTGACATTC
P2Y1 forward	TTATGTCAGCGTGCTGGTGT
P2Y1 reverse	ACGTGGTGCATAGCAGGTG
P2Y2 forward	TCAAACCGGCTTATGGGACC

<b>Primer</b>	<b>Sequenz</b>
P2Y2 reverse	GGCAGCTGAGGTCAAGTGAT
P2Y4 forward	GCTCTATCTGTTACGGGGG
P2Y4 reverse	AGGGAGGAAGCAGTTGTTTCG
P2Y6 forward	GGGTAGTGTGTGGAGTCGTG
P2Y6 reverse	AGCGAGTAGACAGGATGGGT
P2Y12 forward	TGCTGTACACCGTCCTGTTC
P2Y12 reverse	CGGCTCCCAGTTTAGCATCA
P2Y13 forward	GCATCAGGTGGTCAGTCACA
P2Y13 reverse	GTGGGGCAAAGCAGACAAAG
P2Y14 forward	CCACATTGCCAGAATCCCCT
P2Y14 reverse	AGCCGAGAGTAGCAGAGTGA

Alle verwendeten Primer wurden ausschließlich von den Firmen Sigma-Aldrich Chemie GmbH sowie Eurofins Genomics bezogen.

**Tabelle 9: Liste verwendeter Geräte**

<b>Gerät</b>	<b>Firma</b>
Fluoreszenz- Mikroskop BZ-9000 BIOREVO	Keyence
Frigomobil Schlittenmikrotom	Reichert-Jung
Gene Power Supply GPS 200/400	Pharmacia
Mastercycler pro	Eppendorf
Nanodrop 2000	ThermoScientific
Objektträger (E1001-G)	Knittel Glasbearbeitungs GmbH
Pipettierroboter CAS-1200	LTF Labortechnik
Schliff C Mikrotommesser	Techno-Med
StepOnePlus™ Real-Time PCR System	Applied Biosystems
Zentrifuge 5810 R	Eppendorf
Zentrifuge Heraeus Fresco 21	Thermo Scientific

### 3.6 Quantitative Real-Time Polymerase-Kettenreaktion (qRT-PCR)

Zur Analyse der tageszeitlichen Variation der Genexpression von *P2X<sub>1-7</sub>*, *P2Y<sub>1-2</sub>*, *P2Y<sub>4</sub>*, *P2Y<sub>6</sub>* und *P2Y<sub>12-14</sub>* fand die quantitative Real-Time PCR mit absoluter Quantifizierung Anwendung. Als *housekeeping*-Gen wurde *Rn18S* verwendet.

#### 3.6.1 Native Probenentnahme

Zur Tötung der Mäuse erfolgte eine Aufsättigung von Isofluran auf 5% der Umgebungsluft nach der Drop-Methode, was bei dem von uns verwendeten Exsikkator einer Isofluranmenge von ca. 1 ml entsprach. Im Anschluss wurden die Mäuse dekapitiert, die Sutura coronalis und sagittalis gespalten und die Gehirne nach Entfernung der Kalotte *in-toto* entnommen. Zur Analyse der Genexpression erfolgte die Ausstanzung des SCN aus dem nativen Ganzhirngewebe. Zur Auffindung der SCN-Region wurde eine spezielle Matrix (Fa. Zivic Instruments, Pittsburgh, USA) zur Herstellung koronaler Ebenen adulter Mäusegehirne verwendet. Die Lage des SCN wurde gemäß dem anatomischen Atlas des Mäusehirns (*The Mouse Brain in stereotaxic coordinates; Keith B.J. Franklin & George Paxinos; 3rd Edition*) bestimmt. Gemessen vom Bregma fand sich der SCN dabei zwischen der Ebene -0,22 mm und -0,82 mm. Die SCN-Stanze wurde mit einer Punktionsnadel (1 mm Innendurchmesser) aus Edelstahl im Bereich des SCN durchgeführt. Unmittelbar nach der Entnahme wurden alle SCN-Proben in 2 ml *Tubes* (Eppendorf®, Hamburg) überführt und in Flüssigstickstoff schockgefroren. Die Lagerung erfolgte bei -80 °C.

#### 3.6.2 RNA-Isolierung

Das Gewicht jeder präparierten nativen SCN-Probe betrug weniger als 5 mg. Bei derart geringem Anteil an Ausgangsmaterial, ist besonderer Wert auf eine schonende Lyse des lipomatösen Hirngewebes mit Inhibierung von RNasen zu legen. Aus diesem Grund erfolgte die RNA-Isolierung aus den Proben mit einer Kombination des RNeasy® Micro Kit und RNeasy® Lipid Tissue Mini Kit (Fa. Qiagen, Hilden, Deutschland). Zunächst wurde dabei das Gewebe jeder Probe in 250 µl Qiazol-Reagenz für 2-3 min homogenisiert. Danach wurden 50 µl Chloroform hinzugeben und das Gemisch für 2-3 min bei RT inkubiert. Es folgte eine Zentrifugation für 15 min (4 °C und 12000 xg). Im Anschluss wurden 125 µl der wässrigen RNA-haltigen Phase in ein neues 2 ml *Tube* pipettiert, mit 125 µl 70% Ethanol durchmischt

und auf die RNeasy® Spinsäule in einem neuen 2 ml *Tube* aufgetragen. Folgend wurde für 30 sek zentrifugiert (RT und 8000 xg) und der Überstand verworfen. Danach wurden 700 µl Waschpuffer (RW1) auf die RNeasy® Spinsäule auftragen, erneut für 30 sek zentrifugiert (RT und 8000 xg) und der Überstand verworfen. Nachfolgend wurden 500 µl Puffer (RPE) auf die RNeasy® Spinsäule auftragen und eine Zentrifugation für 15 sek (RT und 8000 xg) angeschlossen. Auch hier wurde der Überstand verworfen. Hiernach wurden 500 µl 80% Ethanol auf die RNeasy® Spinsäule aufgetragen und für 2 min zentrifugiert (RT und 8000 xg). Anschließend wurde die RNeasy® Spinsäule auf ein neues 2 ml *Tube* gesetzt und für 1 min zentrifugiert (RT und 21000 xg). Abschließend wurde die RNeasy® Spinsäule auf ein neues 1,5 ml *Tube* platziert, 14 µl RNase-freies Wasser direkt auf die Membran pipettiert, für 1 min inkubiert und für 1 min zentrifugiert (RT und 21000 xg). Der letzte Schritt wurde mit 10 µl des entstandenen Eluates wiederholt. Das RNA-haltige Eluat wurde bei 4 °C gelagert.

Die Konzentration der gewonnenen RNA wurde photometrisch am Nanodrop 2000 bestimmt. Als Negativkontrolle wurde dasselbe RNase-freie Wasser verwendet, das auch bei der RNA-Isolierung Anwendung fand. Im Vorfeld der cDNA-Synthese wurden alle Proben einheitlich mit Wasser (Gibco®, ThermoFisher Scientific) auf 50 ng/µl verdünnt.

### **3.6.3 cDNA-Synthese**

Die cDNA-Synthese wurde mit dem QuantiTec® Reverse Transcription Kit (Fa. Qiagen, Hilden, Deutschland) – gemäß den Herstellerangaben – durchgeführt. Für die cDNA-Synthese wurde für jede Probe eine Finalkonzentration von 250 ng RNA pro Ansatz eingesetzt. Die cDNA wurde anschließend mit Wasser (Gibco®, ThermoFisher Scientific) auf 1,25 ng/µl verdünnt.

### **3.6.4 Ansetzen der Primer**

Primer für die spezifischen PR-Gensequenzen wurden mittels der *NCBI Primer-BLAST* Software (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) generiert. Für die Spezies Maus konnten wir für *P2Y<sub>11</sub>* keinen funktionierenden Primer generieren, daher wurde in dieser Arbeit keine Genanalyse an *P2Y<sub>11</sub>* durchgeführt. Die Lösung der Primer erfolgte gemäß den Herstellerangaben. Zur Erzeugung eines

Primermixes wurden *forward*- und *reverse*-Primer mit Wasser (Gibco®, ThermoFisher Scientific) auf eine Stoffmenge von 125 nmol verdünnt.

### 3.6.5 Durchführung der qRT-PCR

Zur Analyse der tageszeitlichen Variation der Genexpression von *P2X<sub>1-7</sub>*, *P2Y<sub>1-2</sub>*, *P2Y<sub>4</sub>*, *P2Y<sub>6</sub>* und *P2Y<sub>12-14</sub>* fand die quantitative Real-Time PCR mit absoluter Quantifizierung Anwendung. Verwendet wurde der Real-Time-Cycler StepOne Plus (Fa. Applied Biosystems). Als Detektionsreagenz wurde SYBR-Green (KAPA® VWR Life Science Competence Center, Erlangen, Deutschland) verwendet. Je Reaktion wurden 10 µl SYBR-Green (2fach-Mix), 5 µl Primermix (125 nmol/Primer) und 5 µl cDNA (6,25 ng/ 20 µl Ansatz) eingesetzt. Zur Sicherstellung maximaler Präzision erfolgte die Beladung der Platte mittels eines Pipettierroboters. Die absolute Quantifizierung erfolgte durch ein im Vorfeld erzeugtes PCR-Produkt der entsprechenden Primer. Dieses wurde mit dem MiniElute PCR Purification Kit (Fa. Qiagen, Hilden) aufgereinigt und das PCR-Produkt am NanoDrop 2000 gemessen. Daraufhin wurde das PCR-Produkt auf eine Konzentration von 0,01 ng/µl verdünnt. Entsprechend der bekannten Produktgröße und Konzentration konnte die Anzahl der Transkripte nach Pfaffl et al. berechnet werden [159]. Zeitgleich wurde mit diesem PCR-Produkt eine Standardkurve erzeugt, anhand derer die Transkriptmengen der Proben quantifiziert werden konnten. Zur Adjustierung der Proben wurde das *housekeeping*-Gen *Rn18S* in gleicher Weise verwendet. *Rn18S* zeigte im Vorfeld unter den bestehenden Bedingungen eine stabile, gleichmäßige Expression.

## 3.7 Immunhistochemie (IHC)

Die Purinrezeptoren *P2X<sub>1-7</sub>*, *P2Y<sub>1-2</sub>*, *P2Y<sub>4</sub>*, *P2Y<sub>6</sub>*, *P2Y<sub>11-14</sub>* wurden immunhistochemisch auf ihre Expression im SCN der Maus untersucht.

### 3.7.1 Gewebepfusion

Die Narkose und Schmerzkontrolle der Mäuse erfolgte mit Ketamin:Xylazin (100 mg: 10 mg/kg Körpergewicht). Anschließend erfolgte die Eröffnung des Brustraumes. Zur Blutverdünnung wurden 0,1 ml Heparin (5000 I.E.) in die linke Herzkammer injiziert. Über denselben Zugang erfolgte die Perfusion des Gefäßsystems mittels zweiminütiger isotonomischer Natriumchlorid- (0,9% NaCl) sowie dreiminütiger vierprozentiger Paraformaldehyd-Lösung (Tab. 13 Anhang). Im

Anschluss wurden die Mäuse dekapitiert und die Gehirne, wie im Abschnitt 2.6.1 beschrieben, *in-toto* entnommen. Die Nachfixierung der Gehirne erfolgte mit 4% PFA für 24 Stunden bei einer Temperatur von 4 °C. Zur Kryoprotektion wurden die Gehirne für weitere 24 Stunden in 20% Saccharose (Tab. 13 Anhang) gelagert. Anschließend wurden die Gehirne in -30 °C Methylbutan eingefroren und bis zur immunhistochemischen Aufbereitung bei -80 °C gelagert.

### **3.7.2 Herstellung von Gewebeschnitten**

Zur Vorbereitung auf die immunhistochemische Färbung wurden die perfundierten Gehirne an einem Schlittenmikrotom in koronaler Orientierung in vier parallele Serien geschnitten. Die Schnittdicke betrug 30 µm. Die Lagerung erfolgte bei -20 °C in Cryoprotectant Solution (Tab. 13 Anhang).

### **3.7.3 Färbeprotokoll**

Jeder vierte Hirnschnitt wurde immunhistochemisch gegen jeweils einen Rezeptor gefärbt. Um die *Cryoprotectant Solution* zu entfernen, wurden am Vortag der IHC alle Hirnschnitte in 12-Well Platten überführt und über Nacht bei 4 °C in 1 x PBS Lösung (Tab. 13 Anhang) gewaschen.

Der erste Schritt des Färbeprotokolls erfolgte für 6x15 min in 1 x PBS-T 0,2% (Tab. 13 Anhang) Waschpuffer. Das verwendete Triton X-100 ist ein Detergens, welches der Permeabilisierung des Gewebes und der Zellmembranen dient und dadurch die zellulären Zielstrukturen der Antikörperbindung leichter zugänglich macht. Zur Inaktivierung endogener Peroxidase erfolgte eine 30 min Inkubation in 0,24% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Tab. 13 Anhang). Peroxidasen dienen Zellen normalerweise zur Eliminierung schädlicher toxischer Peroxide (z.B. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Da das Chromogen 3,3'-Diaminobenzidin Tetrahydrochlorid (DAB) durch Peroxidase aktiviert wird, muss zunächst die endogene Peroxidase gehemmt werden.

Drei anschließende 15-minütige Waschschrte in 1 x PBS-T 0,2% dienen der Entfernung von Peroxidresten. Zur Unterdrückung kreuzreaktiver Antikörperbindungen erfolgte die Inkubation in vorabsorbierendem Kaninchen- bzw. Ziegen Serum. Über Nacht erfolgte bei 4 °C die Inkubation in Primärantikörpern in einer zuvor etablierten Konzentration (Tab. 6).

Am Folgetag wurden ungebundene Primärantikörperreste durch 3x15 min Reinigung mit 1 x PBS-T 0,2% entfernt, gefolgt von einer 15 min Inkubation in blockierendem Serum (Tab. 13 Anhang). Danach wurden die Schnitte mit biotinyliertem Sekundärantikörper (Tab. 7) für 120 min inkubiert. Erneut folgte eine 3x15 min Reinigung mit 1 x PBS-T 0,2%. Danach wurden die Schnitte mit Meerrettichperoxidase-gekoppeltem Avidin-Biotin-Complex (Tab. 13 Anhang) inkubiert. Avidin ist ein Molekül mit hoher Affinität zum Biotin der Sekundärantikörper, der Komplex dient der Signalverstärkung. Die DAB-Färbung erfolgte durch 10 min Inkubation in 1ml DAB-Lösung und Hinzugabe von 1 ml H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Lösung (Tab. 13 Anhang). Abschließend wurden alle Hirnschnitte für 6x10 min in 1 x PBS-T 0,2% von Färberückständen gereinigt. Ein zusammenfassendes Färbeprotokoll ist nachstehend genannt (Tab. 10). Im Anschluss wurden die Hirnschnitte mittels Gelatine (Tab. 13 Anhang) auf Objektträger aufgezogen. Nach Trocknung über Nacht erfolgte die Abdeckung mit Entellan®.

**Tabelle 10: Färbeprotokoll Tag 1 und 2**

<b><u>Tag 1:</u></b>	Dauer	Lösung
Schritt 1	6x15 min (RT)	1 x PBS-T 0,2%
Schritt 2	30 min (RT)	0,24% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
Schritt 3	3x15 min (RT)	1 x PBS-T 0,2%
Schritt 4	60 min (RT)	PBS-T Serum
Schritt 5	über Nacht (4 °C)	PBS-T Serum + Primärantikörper

<b><u>Tag 2:</u></b>	Dauer	Lösung
Schritt 1	3x15 min (RT)	1 x PBS-T 0,2%
Schritt 2	15 min (RT)	PBS-T Serum
Schritt 3	120 min (RT)	PBS-T Serum + Sekundärantikörper
Schritt 4	3x10 min (RT)	1 x PBS-T 0,2%
Schritt 5	60 min (RT)	ABC Reagenz
Schritt 6	3x15 min (RT)	1 x PBS-T 0,2%
Schritt 7	10 min (RT)	DAB-Entwicklung
Schritt 8	6x10 min (RT)	2 ml 1 x PBS-T 0,2%

### 3.7.4 Mikroskopische Aufnahmen

Verwendet wurde das Durchlicht-Mikroskop BZ-9000 BIOREVO der Firma Keyence. Die Betrachtungssoftware war der *BZ-II-Viewer* (Fa. Keyence). Aufgenommen wurde



ausschließlich der SCN beider Hemisphären. Übersichtsaufnahmen wurden in 10x- und Zoomaufnahmen in 40x-Vergrößerung aufgenommen.

Die Einstellungen *Shadow* (Wert: 61), *Highlight* (Wert: 213) und *Gamma* (Wert: 1.0) wurden für alle Aufnahmen einheitlich verwendet. Je nach Signalstärke wurde die Belichtungszeit (*exposure time*) unterschiedlich eingestellt, jedoch innerhalb eines spezifischen Rezeptors für alle Aufnahmen beibehalten. Die Werte sind nachfolgend tabellarisch gelistet (Tab. 11).

**Tabelle 11: Verwendete Belichtungszeit je Rezeptor**

Purinrezeptor	Belichtungszeit (sek)
P2X <sub>1</sub>	1/800
P2X <sub>2</sub>	1/800
P2X <sub>3</sub>	1/2500
P2X <sub>4</sub>	1/3000
P2X <sub>5</sub>	1/600
P2X <sub>6</sub>	1/2500
P2X <sub>7</sub>	1/600
P2Y <sub>1</sub>	1/600
P2Y <sub>2</sub>	1/3000
P2Y <sub>4</sub>	1/700
P2Y <sub>6</sub>	1/450
P2Y <sub>11</sub>	1/500
P2Y <sub>12</sub>	1/3000
P2Y <sub>13</sub>	1/600
P2Y <sub>14</sub>	1/700

### 3.7.5 Analyse der Immunreaktivität

Mittels der Software *ImageJ* wurde die relative Immunreaktivität der Purinrezeptoren im SCN ermittelt. Das komplette SCN-Areal wurde dabei durch Kalibrierung einer maximalen Signalstärke (100%) in Verhältnis zum umliegenden Neuropil gesetzt (% Fläche SCN normiert auf Neuropil) und quantifiziert.

### 3.8 Statistische Auswertung

Für die statistische Auswertung wurde das Programm GraphPad Prism 7.0 für Mac OSX (Graphpad Software, San Diego, Kalifornien, USA) benutzt. Sowohl für die qRT-PCR, als auch für die IHC lag die Fallzahl pro Versuchszeitpunkt bei jeweils drei Tieren

(n = 3). Pro Zeitpunkt wurde ein Mittelwert mit Standardfehler ermittelt. Unterschiede zwischen den Zeitpunkten wurden mittels One-Way ANOVA mit Post-hoc Test Tukey ermittelt. Unterschiede mit  $p < 0,05$  wurden als signifikant eingestuft.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Quantitative Real-Time PCR (qRT-PCR)

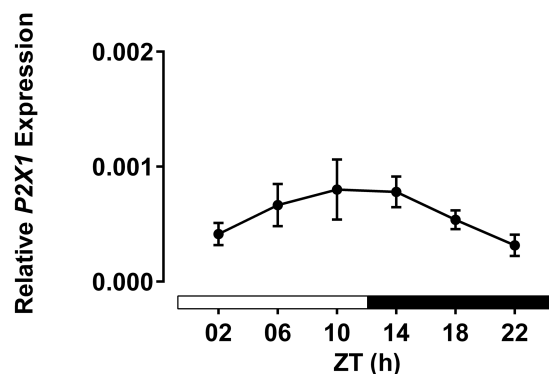
Mittels qRT-PCR wurde der tageszeitliche Verlauf der mRNA-Expression der Purinrezeptor-Subtypen *P2X* (*P2X<sub>1-7</sub>*) und *P2Y* (*P2Y<sub>1-2</sub>*, *P2Y<sub>4</sub>*, *P2Y<sub>6</sub>*, *P2Y<sub>12-14</sub>*) im SCN der Maus untersucht. Die Ergebnisse sind nachstehend aufgeführt. Aus Gründen der Übersicht werden zunächst die Expressionsanalysen der *P2X*- und anschließend die der *P2Y*-Rezeptoren dargestellt.

#### 4.1.1 mRNA-Expression der *P2X*-Rezeptoren im SCN unter 12L:12D

Im SCN wurde die tageszeitliche mRNA-Expression von *P2X<sub>1-7</sub>* im Verhältnis zum *housekeeping*-Gen *Rn18S* unter 12L:12D-Bedingungen untersucht. Im Folgenden sind die Ergebnisse der mRNA-Expressionsanalysen – nach Subtypen sortiert – gelistet.

##### *P2X<sub>1</sub>*:

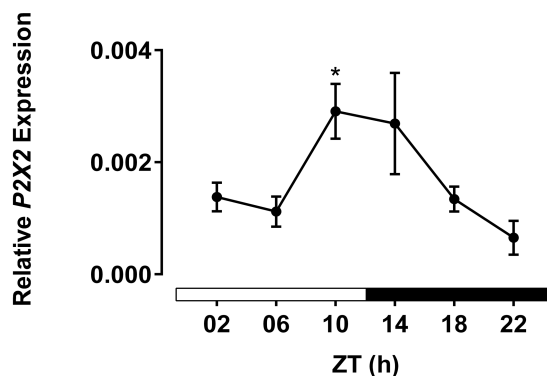
Während der Lichtphase steigt die Expression von *P2X<sub>1</sub>* zwischen ZT02 und ZT10 an. Am Übergang zwischen der Licht- und Dunkelfase erreicht die Expression ein Plateau zwischen ZT10 und ZT14. In der Dunkelfase fallen die Werte von ZT14 über ZT18 und ZT22 kontinuierlich ab. Diese Unterschiede zeigen jedoch zu keinem Zeitpunkt eine statistische Signifikanz. Abbildung 6 zeigt den tageszeitlichen Expressionsverlauf von *P2X<sub>1</sub>* unter 12L:12D.



**Abb. 6:** Analyse der tageszeitlichen mRNA-Expression von *P2X<sub>1</sub>* im SCN der Maus zwischen den Zeitpunkten ZT02-ZT22 relativ zum *housekeeping*-Gen *Rn18S*. MW ± SEM, einfaktorielle ANOVA vs. ZT22. *P2X<sub>1</sub>* zeigt keine statistisch signifikanten Unterschiede im tageszeitlichen Expressionsverlauf.

***P2X<sub>2</sub>***

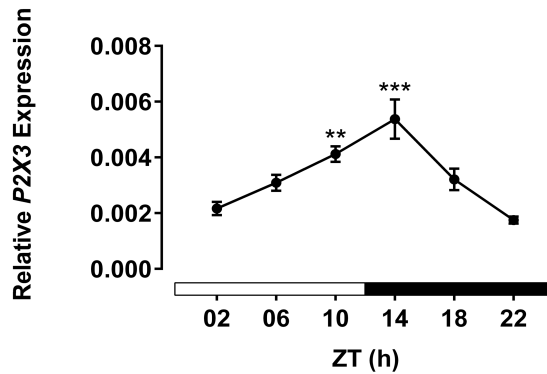
Zwischen ZT02 und ZT06 zeigt sich ein geringer Abfall der Expression von *P2X<sub>2</sub>*, die von einem starken Anstieg zwischen ZT06 zu ZT10 gefolgt wird. Zu den Zeitpunkten ZT10 und ZT14 ist die Expression auf annähernd konstant hohem Niveau. Im weiteren Verlauf der Dunkelphase sinkt die Expression bis zum Zeitpunkt ZT22 stark ab. Ein signifikanter Expressionsunterschied findet sich zwischen den Zeitpunkten ZT10 und ZT22 ( $p = 0,0479$ ). Abbildung 7 zeigt den tageszeitlichen Expressionsverlauf von *P2X<sub>2</sub>* unter 12L:12D.



**Abb. 7: Analyse der tageszeitlichen mRNA-Expression von *P2X<sub>2</sub>* im SCN der Maus zwischen den Zeitpunkten ZT02-ZT22 relativ zum *housekeeping*-Gen *Rn18S*. MW  $\pm$  SEM, einfaktorielle ANOVA vs. ZT22; \*  $p \leq 0,05$ . *P2X<sub>2</sub>*-Expression mit signifikantem Unterschied zwischen ZT10 und ZT22.**

***P2X<sub>3</sub>***

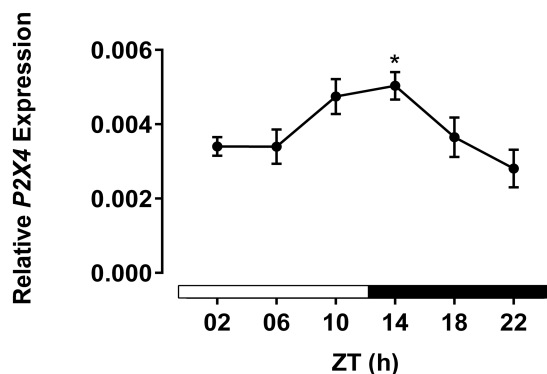
In der Lichtphase steigt die Expression von *P2X<sub>3</sub>* kontinuierlich an. Zu Beginn der Dunkelphase wird bei ZT14 der Maximalwert erreicht. Im weiteren Verlauf der Dunkelphase fällt die Expression von *P2X<sub>3</sub>* zwischen ZT14 und ZT22 stark ab. Signifikante Expressionsunterschiede finden sich zwischen den Zeitpunkten ZT02 und ZT10 ( $p = 0,0320$ ), ZT02 und ZT14 ( $p = 0,0007$ ), ZT06 und ZT14 ( $p = 0,0113$ ), ZT10 und ZT22 ( $p = 0,0087$ ), ZT14 und ZT18 ( $p = 0,0166$ ) sowie ZT14 und ZT22 ( $p = 0,0002$ ). Abbildung 8 zeigt den tageszeitlichen Expressionsverlauf von *P2X<sub>3</sub>* unter 12L:12D. Aus Gründen der Übersicht sind nur Signifikanzen zum Zeitpunkt ZT22 dargestellt.



**Abb. 8: Analyse der tageszeitlichen mRNA-Expression von  $P2X_3$  im SCN der Maus zwischen den Zeitpunkten ZT02-ZT22 relativ zum *housekeeping*-Gen  $Rn18S$ .** MW  $\pm$  SEM, einfaktorielle ANOVA vs. ZT22; \*\*  $p \leq 0,01$ , \*\*\*  $p \leq 0,001$ . Signifikante Unterschiede der Expression von  $P2X_3$  zwischen ZT10 und ZT22 sowie ZT14 und ZT22.

### $P2X_4$ :

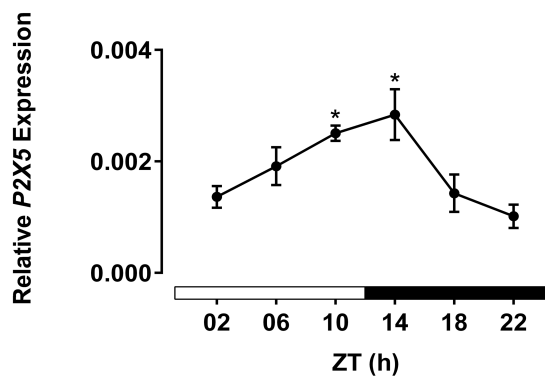
Zu den Zeitpunkten ZT02 und ZT06 zeigen sich nahezu konstante Expressionswerte. Im Verlauf zwischen ZT06 und ZT10 steigt die Expression an und erreicht unter weiterem minimalen Anstieg den Maximalwert bei ZT14. Im Bereich der Dunkelphase fallen die Werte stetig zwischen ZT14 und ZT22 ab. Ein signifikanter Unterschied ist in der  $P2X_4$ -Expression nur zwischen den Zeitpunkten ZT14 und ZT22 ( $p = 0,0347$ ) zu finden. Abbildung 9 zeigt den tageszeitlichen Expressionsverlauf von  $P2X_4$  unter 12L:12D.



**Abb. 9: Analyse der tageszeitlichen mRNA-Expression von  $P2X_4$  im SCN der Maus zwischen den Zeitpunkten ZT02-ZT22 relativ zum *housekeeping*-Gen  $Rn18S$ .** MW  $\pm$  SEM, einfaktorielle ANOVA vs. ZT22; \*  $p \leq 0,05$ . Expression von  $P2X_4$  mit signifikantem Unterschied zwischen ZT14 und ZT22.

**P2X<sub>5</sub>:**

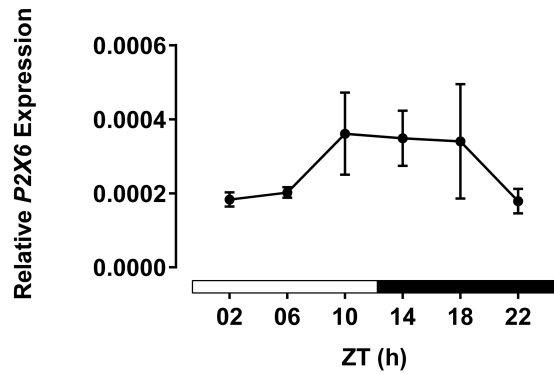
Die Expression von *P2X<sub>5</sub>* verläuft ansteigend zwischen den Zeitpunkten ZT02 und ZT14, wobei der steilste Anstieg innerhalb der Lichtphase zwischen ZT02 und ZT10 zu verzeichnen ist. Der Maximalwert der Expression bei ZT14 wird im Verlauf zwischen ZT18 und ZT22 stark absteigend verlassen. In der Dunkelphase weist die Expression insgesamt einen abfallenden Verlauf auf. Zwischen den Zeitpunkten ZT02 und ZT14 ( $p = 0,0402$ ), ZT10 und ZT22 ( $p = 0,0381$ ) sowie ZT14 und ZT22 ( $p = 0,0100$ ) finden sich signifikante Expressionsunterschiede. Abbildung 10 zeigt den tageszeitlichen Expressionsverlauf von *P2X<sub>5</sub>* unter 12L:12D. Aus Gründen der Übersicht sind nur Signifikanzen zum Zeitpunkt ZT22 dargestellt.



**Abb. 10: Analyse der tageszeitlichen mRNA-Expression von *P2X<sub>5</sub>* im SCN der Maus zwischen den Zeitpunkten ZT02-ZT22 relativ zum *housekeeping*-Gen *Rn18S*. MW  $\pm$  SEM, einfaktorische ANOVA vs. ZT22; \*  $p \leq 0,05$ . *P2X<sub>5</sub>*-Expression mit signifikantem Unterschied zwischen ZT10 und ZT22 sowie ZT14 und ZT22.**

**P2X<sub>6</sub>:**

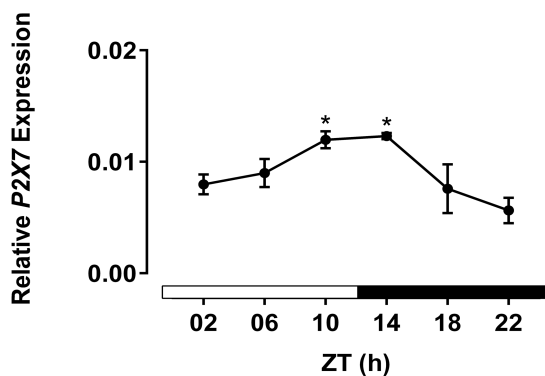
Die Expressionswerte für *P2X<sub>6</sub>* sind durch einen minimalen Anstieg zu Beginn der Lichtphase zwischen ZT02 und ZT06 gekennzeichnet. In der Mitte der Lichtphase zwischen ZT06 und ZT10 steigt die Expression stärker an als zu Beginn der Lichtphase. Zwischen ZT10 und ZT18 findet sich nur eine geringe Variation im Expressionsverlauf. Diese Phase verläuft plateauartig. Zum Ende der Dunkelphase fallen die Werte zwischen ZT18 und ZT22 ab. Die Werte sind nicht signifikant unterschiedlich. Abbildung 11 zeigt den tageszeitlichen Expressionsverlauf von *P2X<sub>6</sub>* unter 12L:12D.



**Abb. 11: Analyse der tageszeitlichen mRNA-Expression von  $P2X_6$  im SCN der Maus zwischen den Zeitpunkten ZT02-ZT22 relativ zum *housekeeping*-Gen *Rn18S*.** MW  $\pm$  SEM, einfaktorische ANOVA vs. ZT22.  $P2X_6$  zeigt keine statistisch signifikanten Unterschiede im tageszeitlichen Expressionsverlauf.

### **$P2X_7$ :**

Die Expression von  $P2X_7$  steigt während der Lichtphase zwischen ZT02 und ZT10 stetig an und erreicht ihren Maximalwert zu Beginn der Dunkelphase bei ZT14. Danach fällt die Expression in der Mitte und zum Ende der Dunkelphase zwischen ZT14 und ZT22 kontinuierlich ab. Der Zeitpunkt mit der geringsten Expression findet sich am Ende der Dunkelphase bei ZT22. Signifikante Unterschiede im Expressionsverlauf finden sich zwischen den Zeitpunkten ZT10 und ZT22 ( $p = 0,0306$ ) sowie ZT14 und ZT22 ( $p = 0,0222$ ). Abbildung 12 zeigt den tageszeitlichen Expressionsverlauf von  $P2X_7$  unter 12L:12D.



**Abb. 12: Analyse der tageszeitlichen mRNA-Expression von  $P2X_7$  im SCN der Maus zwischen den Zeitpunkten ZT02-ZT22 relativ zum *housekeeping*-Gen *Rn18S*.** MW  $\pm$  SEM, einfaktorische ANOVA vs. ZT22; \*  $p \leq 0,05$ . Expression von  $P2X_7$  mit signifikanten Unterschieden zwischen ZT10 und ZT22 sowie ZT14 und ZT22.

Zusammenfassend zeigen sich somit für die P2X-Rezeptoren  $P2X_{2-5}$  sowie für  $P2X_7$  statistisch signifikante Unterschiede der mRNA-Expression im SCN der Maus unter 12L:12D. Die tageszeitlichen Expressionsunterschiede der mRNA der Rezeptoren  $P2X_1$  und  $P2X_6$  sind statistisch nicht signifikant. Insgesamt betrachtet folgt die Stärke der relativen mRNA-Expression der P2X-Rezeptoren im SCN der Maus dabei der Reihenfolge:  $P2X_7 > P2X_3 > P2X_4 > P2X_2 > P2X_5 > P2X_1 > P2X_6$ . Alle Rezeptoren wiesen dabei die höchste mRNA-Expression zu Beginn der Dunkelphase und die geringste mRNA-Expression am Ende der Dunkelphase auf.

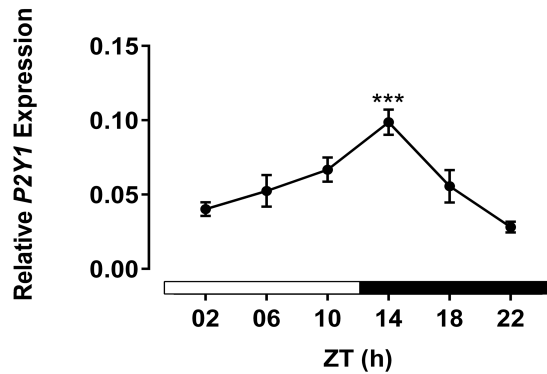
#### 4.1.2 mRNA-Expression der P2Y-Rezeptoren im SCN unter 12L:12D

Die Untersuchung der tageszeitlichen mRNA-Expression von  $P2Y_{1-2}$ ,  $P2Y_4$ ,  $P2Y_6$  und  $P2Y_{12-14}$  im SCN der Maus erfolgte unter 12L:12D-Bedingungen. Auch in diesem Versuch wurde *Rn18S* als *housekeeping*-Gen verwendet. Im Folgenden sind die Ergebnisse der mRNA-Expressionsanalyse – nach Subtypen sortiert – gelistet.

##### ***P2Y<sub>1</sub>*:**

Die Expression von  $P2Y_1$  zeigt einen kontinuierlich ansteigenden Verlauf während der Lichtphase. Zu Beginn der Dunkelphase zeigt die mRNA-Expression einen steilen Anstieg und erreicht bei ZT14 ihren Maximalwert. Nach ZT14 fällt die Expression stark ab. Zum Zeitpunkt ZT22 ist der Minimalwert der Expression von  $P2Y_1$  erreicht. Signifikante Werte ergeben sich zwischen den Zeitpunkten ZT02 und ZT14 ( $p = 0,0030$ ), ZT06 und ZT14 ( $p = 0,0173$ ), ZT14 und ZT18 ( $p = 0,0272$ ) sowie ZT14 und ZT22 ( $p = 0,0006$ ). Abbildung 13 zeigt den tageszeitlichen mRNA-Expressionsverlauf von  $P2Y_1$  unter 12L:12D. Aus Gründen der Übersicht sind nur Signifikanzen zum Zeitpunkt ZT22 dargestellt.

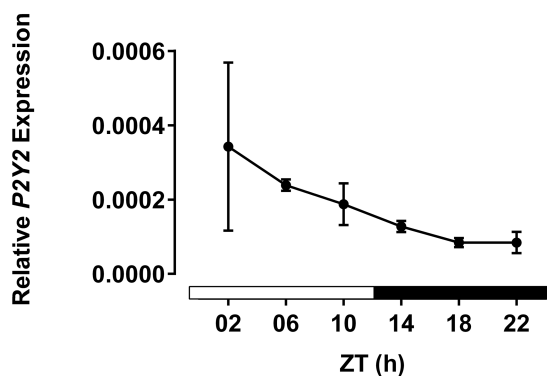




**Abb. 13:** Analyse der tageszeitlichen mRNA-Expression von  $P2Y_1$  im SCN zwischen den Zeitpunkten ZT02-ZT22 relativ zu *Rn18S*. MW  $\pm$  SEM, einfaktorische ANOVA vs. ZT22; \*\*\*  $p \leq 0,001$ .  $P2Y_1$  mit signifikantem Expressionsunterschied zwischen ZT14 und ZT22.

### $P2Y_2$ :

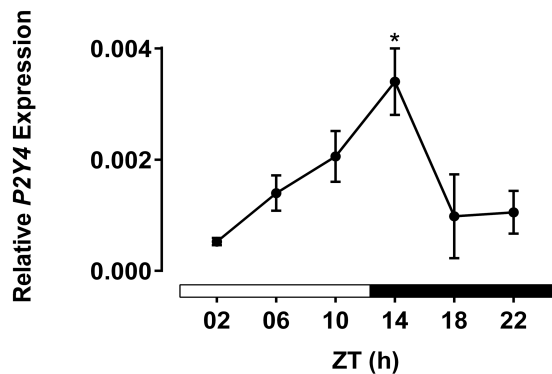
Die mRNA-Expression von  $P2Y_2$  zeigt einen kontinuierlichen Abfall zwischen ZT02 und ZT22. Der Maximalwert der mRNA-Expression von  $P2Y_2$  liegt zu Beginn der Lichtphase bei ZT02, wobei hier ein großer Standardfehler zu beobachten ist. Die geringste relative mRNA-Expression findet sich zum Ende der Dunkelphase zwischen den Zeitpunkten ZT18 und ZT22. Zwischen diesen Zeitpunkten liegt eine annähernd konstante  $P2Y_2$ -Expressionsrate vor. Die Expression von  $P2Y_2$  ist somit in der Lichtphase stärker als in der Dunkelphase, jedoch zeigt sich keiner der Expressionsunterschiede als statistisch signifikant. Abbildung 14 zeigt den tageszeitlichen mRNA-Expressionsverlauf von  $P2Y_2$  unter 12L:12D.



**Abb. 14:** Analyse der tageszeitlichen mRNA-Expression von  $P2Y_2$  im SCN zwischen den Zeitpunkten ZT02-ZT22 relativ zu *Rn18S*. MW  $\pm$  SEM, einfaktorische ANOVA vs. ZT22.  $P2Y_2$ -Expression ohne statistisch signifikante Unterschiede im tageszeitlichen Expressionsverlauf.

**P2Y<sub>4</sub>:**

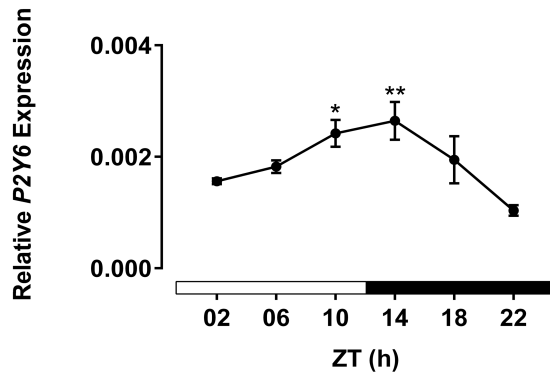
Im Verlauf der Lichtphase ist die *P2Y<sub>4</sub>*-Expression ansteigend. Zum Zeitpunkt ZT14 stellt sich die maximale mRNA-Expression dar. Ab dem Zeitpunkt ZT14 sinken die Expressionswerte stark ab. Sie verlaufen zwischen den Zeitpunkten ZT14 und ZT22 absteigend und erreichen zwischen ZT18 und ZT22 ein ähnlich niedriges Niveau. Signifikante Expressionsunterschiede finden sich zwischen den Zeitpunkten ZT02 und ZT14 ( $p = 0,0115$ ), ZT14 und ZT18 ( $p = 0,0355$ ) sowie ZT14 und ZT22 ( $p = 0,0425$ ). Abbildung 15 zeigt den tageszeitlichen mRNA-Expressionsverlauf von *P2Y<sub>4</sub>* unter 12L:12D. Aus Gründen der Übersicht sind nur Signifikanzen zum Zeitpunkt ZT22 dargestellt.



**Abb. 15:** Analyse der tageszeitlichen mRNA-Expression von *P2Y<sub>4</sub>* im SCN zwischen den Zeitpunkten ZT02-ZT22 relativ zu *Rn18S*. MW  $\pm$  SEM, einfaktorielle ANOVA vs. ZT22; \*  $p \leq 0,05$ . Signifikante Unterschiede der Expression von *P2Y<sub>4</sub>* zwischen ZT14 und ZT22.

**P2Y<sub>6</sub>:**

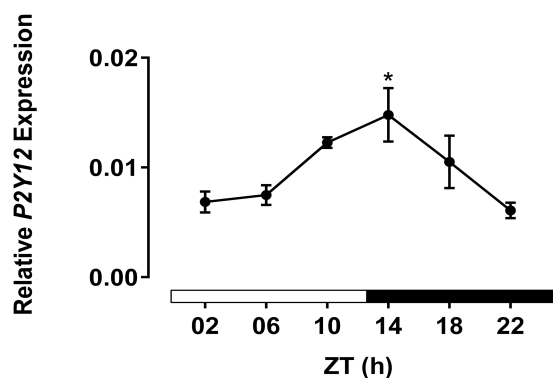
Die Expressionswerte der mRNA-Expression von *P2Y<sub>6</sub>* verlaufen zwischen den Zeitpunkten ZT02 und ZT14 ansteigend und erreichen ihren Maximalwert bei ZT14. Ab ZT14 sinkt die Expression wieder ab. Die Zeitpunkte ZT18 und ZT22 zur Mitte und zum Ende der Dunkelphase sind durch niedrigere Expressionswerte charakterisiert. ZT18 weist dabei höhere Werte auf als ZT22. Zwischen den Zeitpunkten ZT10 und ZT22 ( $p = 0,0198$ ) sowie ZT14 und ZT22 ( $p = 0,0068$ ) werden signifikante Unterschiede der mRNA-Expression verzeichnet. Abbildung 16 zeigt den tageszeitlichen Expressionsverlauf von *P2Y<sub>6</sub>* unter 12L:12D.



**Abb. 16:** Analyse der tageszeitlichen mRNA-Expression von *P2Y<sub>6</sub>* im SCN zwischen den Zeitpunkten ZT02-ZT22 relativ zu *Rn18S*. MW  $\pm$  SEM, einfaktorische ANOVA vs. ZT22; \*  $p \leq 0,05$ , \*\*  $p \leq 0,01$ . *P2Y<sub>6</sub>* mit signifikanten Expressionsunterschieden zwischen ZT10 und ZT22 sowie ZT14 und ZT22.

### *P2Y<sub>12</sub>*:

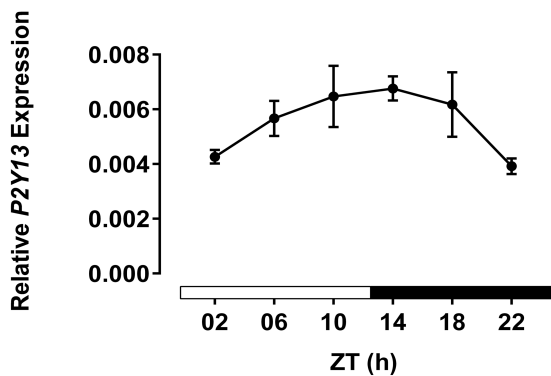
Die *P2Y<sub>12</sub>*-Expressionswerte verlaufen in der Lichtphase ansteigend und sinken in der Dunkelphase kontinuierlich ab. Zwischen den Zeitpunkten ZT02 und ZT14 nimmt der Expressionsverlauf einen steilen Verlauf und erreicht bei ZT14 seinen Maximalwert. Während der Dunkelphase, zwischen ZT14 und ZT22, nimmt die Expression ab. Der Minimalwert ist zum Ende der Dunkelphase bei ZT22 erreicht. Zwischen den Zeitpunkten ZT02 und ZT14 ( $p = 0,0298$ ), ZT06 und ZT14 ( $p = 0,0485$ ) sowie ZT14 und ZT22 ( $p = 0,0163$ ) sind die Expressionswerte signifikant unterschiedlich. Abbildung 17 zeigt den tageszeitlichen Expressionsverlauf von *P2Y<sub>12</sub>* unter 12L:12D. Aus Gründen der Übersicht sind nur Signifikanzen zum Zeitpunkt ZT22 dargestellt.



**Abb. 17:** Analyse der tageszeitlichen mRNA-Expression von *P2Y<sub>12</sub>* im SCN zwischen den Zeitpunkten ZT02-ZT22 relativ zu *Rn18S*. MW  $\pm$  SEM, einfaktorische ANOVA vs. ZT22; \*  $p \leq 0,05$ . *P2Y<sub>12</sub>*-Expression mit signifikantem Unterschied der Expression zwischen ZT14 und ZT22.

***P2Y<sub>13</sub>***

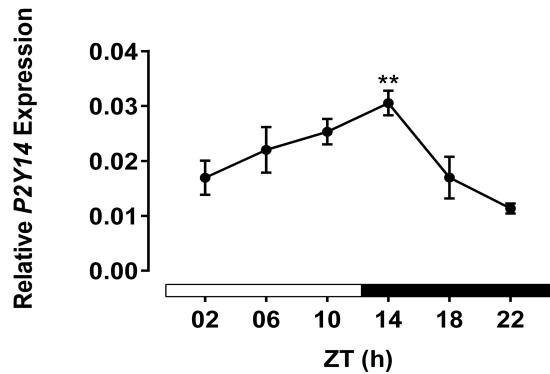
*P2Y<sub>13</sub>* zeigt einen bogenförmigen Expressionsverlauf seiner mRNA, welcher ansteigend von ZT02 über ZT06 und ZT10 verläuft. Zwischen ZT10 und ZT14 liegt der Wendepunkt von aufsteigendem zu absteigendem Expressionsverlauf. Von ZT14 über ZT18 und ZT22 fallen die Expressionswerte wieder ab und erreichen zum Ende der Dunkelphase bei ZT22 ihr niedrigstes Niveau. Zwischen den verschiedenen *P2Y<sub>13</sub>*-Expressionswerten zu den unterschiedlichen Zeitpunkten bestehen keine signifikanten Unterschiede. Abbildung 18 zeigt den tageszeitlichen Expressionsverlauf von *P2Y<sub>13</sub>* unter 12L:12D.



**Abb. 18:** Analyse der tageszeitlichen mRNA-Expression von *P2Y<sub>13</sub>* im SCN zwischen den Zeitpunkten ZT02-ZT22 relativ zu *Rn18S*. MW  $\pm$  SEM, einfaktorische ANOVA vs. ZT22. Die *P2Y<sub>13</sub>*-Expression zeigt keine statistisch signifikanten Unterschiede im tageszeitlichen Expressionsverlauf.

***P2Y<sub>14</sub>***

Die Expression von *P2Y<sub>14</sub>* zeigt zwischen den Zeitpunkten ZT02 und ZT14 einen ansteigenden Verlauf. Die Werte erreichen zu Beginn der Dunkelphase bei ZT14 ihr Maximum. Ab ZT14 fallen die Expressionswerte über ZT18 und ZT22 stark ab. Die Zeitpunkte ZT14 und ZT22 ( $p = 0,0062$ ) weisen einen signifikanten Unterschied zwischen ihren Werten der mRNA-Expression auf. Abbildung 19 zeigt den tageszeitlichen Expressionsverlauf von *P2Y<sub>14</sub>* unter 12L:12D.



**Abb. 19: Analyse der tageszeitlichen mRNA-Expression von  $P2Y_{14}$  im SCN zwischen den Zeitpunkten ZT02-ZT22 relativ zu  $Rn18S$ .** MW  $\pm$  SEM, einfaktorielle ANOVA vs. ZT22; \*\*  $p \leq 0,01$ . Expression von  $P2Y_{14}$  mit signifikantem Unterschied zwischen ZT14 und ZT22.

Zusammenfassend weisen die P2Y-Rezeptoren  $P2Y_1$ ,  $P2Y_4$ ,  $P2Y_6$ ,  $P2Y_{12}$  und  $P2Y_{14}$  statistisch signifikante Unterschiede im tageszeitlichen mRNA-Expressionsverlauf im SCN der Maus auf. Die Unterschiede im tageszeitlichen Expressionsverlauf der Rezeptoren  $P2Y_2$  sowie  $P2Y_{13}$  sind statistisch nicht signifikant. Insgesamt betrachtet, folgt die Stärke der relativen mRNA-Expression der P2Y-Rezeptoren im SCN der Maus dabei der Reihenfolge:  $P2Y_1 > P2Y_{14} > P2Y_{12} > P2Y_{13} > P2Y_4 > P2Y_6 > P2Y_2$ . Alle Rezeptoren weisen die höchste mRNA-Expression zu Beginn der Dunkelphase und die geringste mRNA-Expression am Ende der Dunkelphase auf.

#### 4.2 Immunhistochemie (IHC)

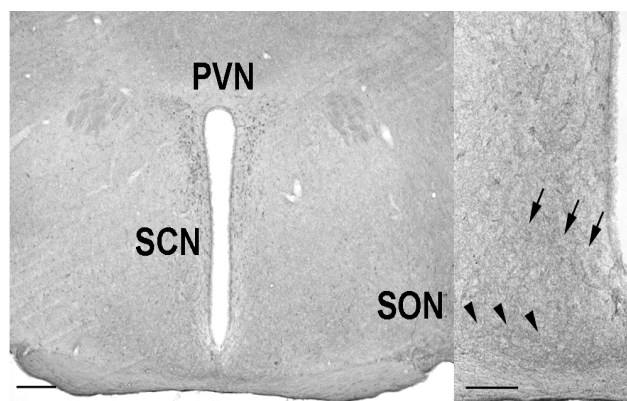
Mittels immunhistochemischer Untersuchungen wurde die Expression der Purinrezeptoren  $P2X_{1-7}$  sowie  $P2Y_{1-2}$ ,  $P2Y_4$ ,  $P2Y_6$  und  $P2Y_{11-14}$  auf Proteinebene untersucht. Hinsichtlich der Analyse des räumlichen Verteilungsmusters wurden die beiden Subregionen des SCN – vlSCN sowie dmSCN – berücksichtigt. Die Gehirnregionen wurden mit Hilfe des anatomischen Atlas des Mäusehirns (*The Mouse Brain in stereotaxic coordinates; Keith B.J. Franklin & George Paxinos; 3rd Edition*) klassifiziert. Zunächst wird die Lokalisation der Purinrezeptoren im SCN im Vergleich zu PVN und SON gezeigt. Nachfolgend findet sich die tageszeitliche Expression der o.g. Rezeptoren unter 12L:12D-Lichtverhältnissen. Rezeptoren mit besonders ausgeprägten Schwankungen im tageszeitlichen Expressionsverlauf wurden zusätzlich unter 12D:12D-Lichtverhältnissen untersucht.

#### 4.2.1 Topografie der P2X-Rezeptoren im Hypothalamus

Die Proteinexpression der Purinrezeptoren P2X<sub>1-7</sub> wurde zunächst im Hypothalamus der Maus zum Zeitpunkt ZT02 dargestellt. Hierzu wurde die Rezeptorlokalisierung in den Regionen SCN, PVN und SON betrachtet. Für den Bereich des SCN wurde zusätzlich die Immunreaktivität der Rezeptoren im vISCN sowie dmSCN in stärkerer Vergrößerung dargestellt.

##### P2X<sub>1</sub>:

Die hypothalamische Proteinexpression von P2X<sub>1</sub> ist sehr deutlich im Bereich des PVN zu erkennen. Hier zeigt sich im gesamten Kerngebiet eine manifeste Immunreaktivität. Die Kerngebiete des SCN sowie des SON sind im Vergleich zum PVN weniger stark immunreaktiv. In der stärkeren Vergrößerung lassen sich die Bereiche vISCN und dmSCN in der Immunreaktion nicht voneinander abgrenzen. Die Immunreaktivität ist hier homogen verteilt und isointens. Abbildung 20 zeigt die topographische Verteilung von P2X<sub>1</sub> im SCN, PVN und SON.

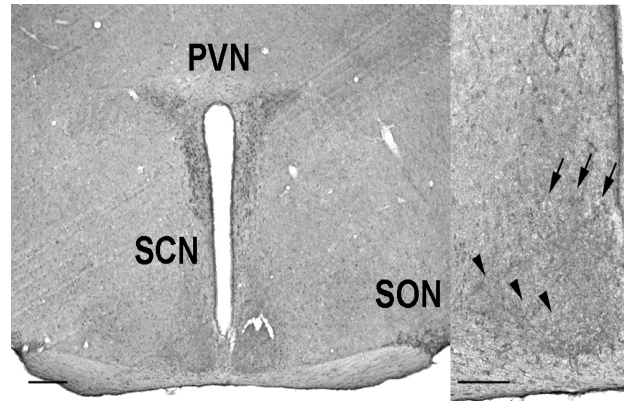


**Abb. 20: Immunreaktivität (IR) von P2X<sub>1</sub> im Hypothalamus der Maus im Koronarschnitt.** Skala = 200  $\mu$ m; Inset: Skala = 100  $\mu$ m; (→) dmSCN, (▶) vISCN. Miniaturansichten geteilt; (links) IR von P2X<sub>1</sub> im Bereich des SCN, PVN sowie SON; (rechts) stärkere Vergrößerung des rechten SCN mit Darstellung des vISCN sowie dmSCN. P2X<sub>1</sub> mit stärkster IR im Bereich des PVN. Die Regionen vISCN sowie dmSCN zeigen sich homogen schwach immunreaktiv mit isointensem Signal.

##### P2X<sub>2</sub>:

Die Proteinexpression von P2X<sub>2</sub> zeigt eine deutliche Immunreaktivität im PVN sowie SON. Die Immunreaktivität im SCN ist schwächer als im PVN und SON, grenzt sich jedoch deutlich von der umliegenden anterolateralen Region des Hypothalamus ab. Im Bereich des vISCN und dmSCN zeigt sich die Immunreaktivität homogen und

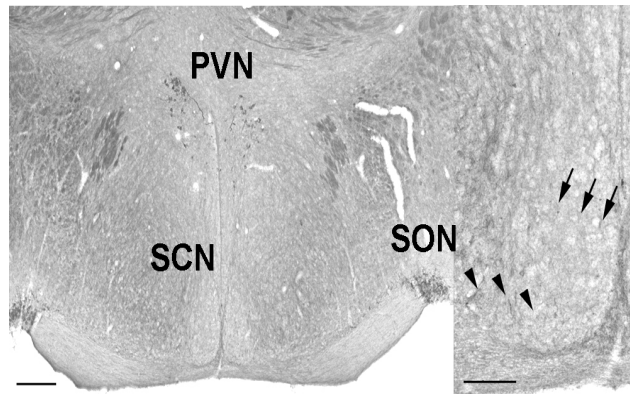
isointens. Unterschiede in der Immunreaktivität zwischen vSCN und dmSCN lassen sich nicht erkennen. Abbildung 21 zeigt die topographische Verteilung von P2X<sub>2</sub> im SCN, PVN und SON.



**Abb. 21: Immunreaktivität (IR) von P2X<sub>2</sub> im Hypothalamus der Maus im Koronarschnitt.** Skala = 200  $\mu\text{m}$ ; Inset: Skala = 100  $\mu\text{m}$ ; ( $\rightarrow$ ) dmSCN, ( $\blacktriangleright$ ) vSCN. Miniaturansichten geteilt; (links) IR von P2X<sub>2</sub> im Bereich des SCN, PVN sowie SON; (rechts) stärkere Vergrößerung des rechten SCN mit Darstellung des vSCN sowie dmSCN. P2X<sub>2</sub> mit deutlicher IR im PVN und SON. SCN schwach immunreaktiv mit homogener und isointenser Signalverteilung im vSCN und dmSCN.

### P2X<sub>3</sub>:

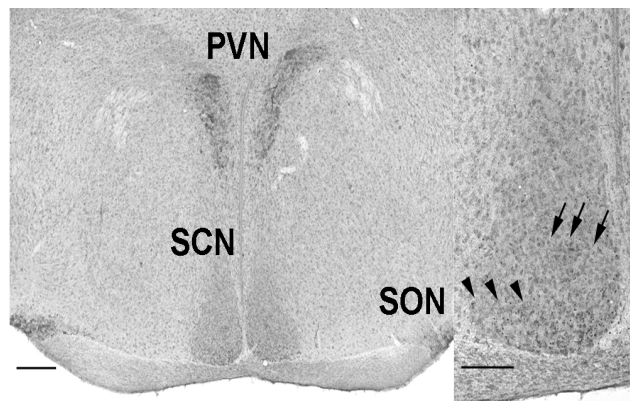
Abbildung 22 zeigt die Proteinexpression von P2X<sub>3</sub> in den hypothalamischen Regionen des SCN, PVN sowie SON. Auffallend ist eine schwache Immunreaktivität im PVN. Der SON weist von allen Regionen die stärkste Immunreaktivität für P2X<sub>3</sub> auf. Im Bereich des SCN ist die Immunreaktivität schwach. In der stärkeren Vergrößerung lassen sich die Regionen vSCN sowie dmSCN nicht durch Immunreaktivitätsunterschiede voneinander abgrenzen. Beide Areale erweisen sich hier als gleichermaßen schwach immunreaktiv.



**Abb. 22: Immunreaktivität (IR) von P2X<sub>3</sub> im Hypothalamus der Maus im Koronarschnitt.** Skala = 200  $\mu\text{m}$ ; Inset: Skala = 100  $\mu\text{m}$ ; ( $\rightarrow$ ) dmSCN, ( $\blacktriangleright$ ) vlSCN. Miniaturansichten geteilt; (links) IR von P2X<sub>3</sub> im Bereich des SCN, PVN sowie SON; (rechts) stärkere Vergrößerung des rechten SCN mit Darstellung des vlSCN sowie dmSCN. P2X<sub>3</sub> mit deutlicher IR im SON, mäßiger IR im PVN und schwacher IR im SCN. Homogen schwache, isointense IR im vlSCN und dmSCN.

#### P2X<sub>4</sub>:

Der Rezeptor P2X<sub>4</sub> zeigt eine moderate Immunreaktivität im SCN, PVN sowie SON. Alle drei Kerngebiete sind gut von ihrer Umgebung abgrenzbar. In der stärkeren Vergrößerung des SCN zeigen sich die Regionen vlSCN und dmSCN stark immunreaktiv. Insgesamt ist die Immunreaktivität von vlSCN sowie dmSCN isointens. Abbildung 23 gibt eine Übersicht der Proteinexpression von P2X<sub>4</sub> im Hypothalamus.

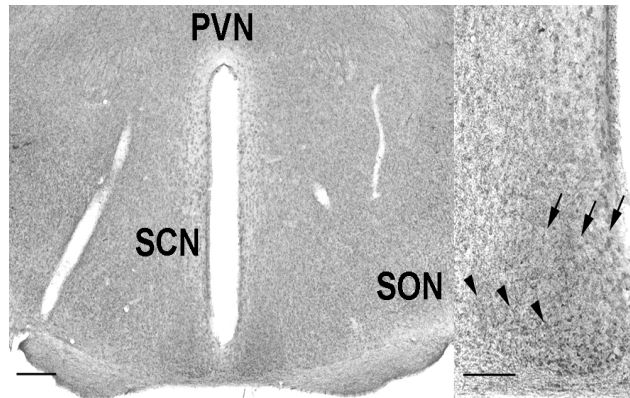


**Abb. 23: Immunreaktivität (IR) von P2X<sub>4</sub> im Hypothalamus der Maus im Koronarschnitt.** Skala = 200  $\mu\text{m}$ ; Inset: Skala = 100  $\mu\text{m}$ ; ( $\rightarrow$ ) dmSCN, ( $\blacktriangleright$ ) vlSCN. Miniaturansichten geteilt; (links) IR von P2X<sub>4</sub> im Bereich des SCN, PVN sowie SON; (rechts) stärkere Vergrößerung des rechten SCN mit Darstellung des vlSCN sowie dmSCN. P2X<sub>4</sub> mit starker IR im SCN, PVN und SON. Die IR im Bereich von vlSCN und dmSCN ist isointens.



**P2X<sub>5</sub>:**

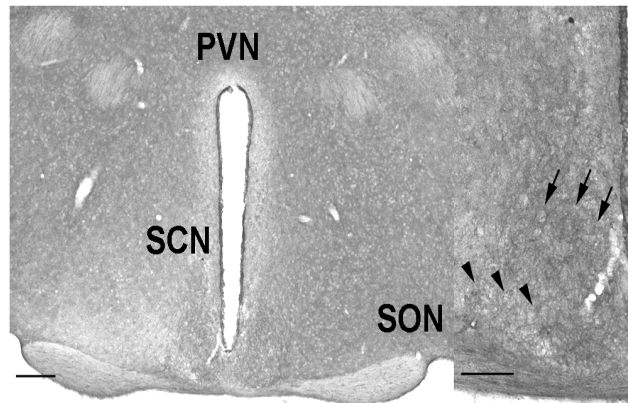
Die Proteinexpression von P2X<sub>5</sub> in den hypothalamischen Regionen des SCN, PVN sowie SON ist in Abbildung 24 dargestellt. Lediglich im Kerngebiet des SCN und PVN zeigt sich eine moderate Immunreaktivität. Der SON zeigt sich nicht immunreaktiv. In der stärkeren Vergrößerung des SCN erkennt man eine homogene, isointense Immunreaktivität im Bereich des vlSCN und des dmSCN.



**Abb. 24: Immunreaktivität (IR) von P2X<sub>5</sub> im Hypothalamus der Maus im Koronarschnitt.** Skala = 200  $\mu\text{m}$ ; Inset: Skala = 100  $\mu\text{m}$ ; ( $\rightarrow$ ) dmSCN, ( $\blacktriangleright$ ) vlSCN. Miniaturansichten geteilt; (links) IR von P2X<sub>5</sub> im Bereich des SCN, PVN sowie SON; (rechts) stärkere Vergrößerung des rechten SCN mit Darstellung des vlSCN sowie dmSCN. Schwache IR von P2X<sub>5</sub> im SCN mit isointenser IR im vlSCN sowie dmSCN. Keine IR im PVN und SON.

**P2X<sub>6</sub>:**

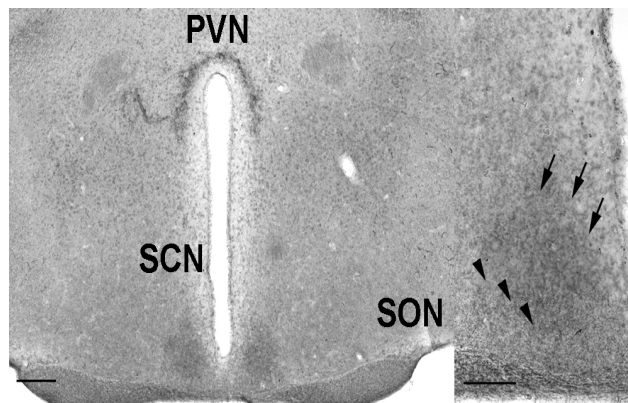
P2X<sub>6</sub> zeigt im SCN eine schwache Immunreaktivität. In den Regionen des PVN sowie SON stellt sich keine Immunreaktion dar. In stärkerer Vergrößerung zeigen sich die Regionen vlSCN sowie dmSCN gleichermaßen immunreaktiv. Abbildung 25 zeigt die Immunreaktivität für P2X<sub>6</sub> im Hypothalamus der Maus.



**Abb. 25: Immunreaktivität (IR) von P2X<sub>6</sub> im Hypothalamus der Maus im Koronarschnitt.** Skala = 200  $\mu\text{m}$ ; Inset: Skala = 100  $\mu\text{m}$ ; ( $\rightarrow$ ) dmSCN, ( $\blacktriangleright$ ) vlSCN. Miniaturansichten geteilt; (links) IR von P2X<sub>6</sub> im Bereich des SCN, PVN sowie SON; (rechts) stärkere Vergrößerung des rechten SCN mit Darstellung des vlSCN sowie dmSCN. Schwache IR von P2X<sub>6</sub> im SCN, mit gleichmäßiger IR im vlSCN und dmSCN. Keine IR im PVN und SON.

### P2X<sub>7</sub>:

Der Rezeptor P2X<sub>7</sub> ist besonders stark in den hypothalamischen Regionen des SCN und PVN exprimiert. Im SON ist seine Immunreaktivität nur schwach ausgeprägt. In der stärkeren Vergrößerung des SCN erkennt man eine verstärkte Immunreaktivität im Bereich des dmSCN im Vergleich zum vlSCN. Abbildung 26 zeigt die Immunreaktivität für P2X<sub>7</sub> im Hypothalamus der Maus.

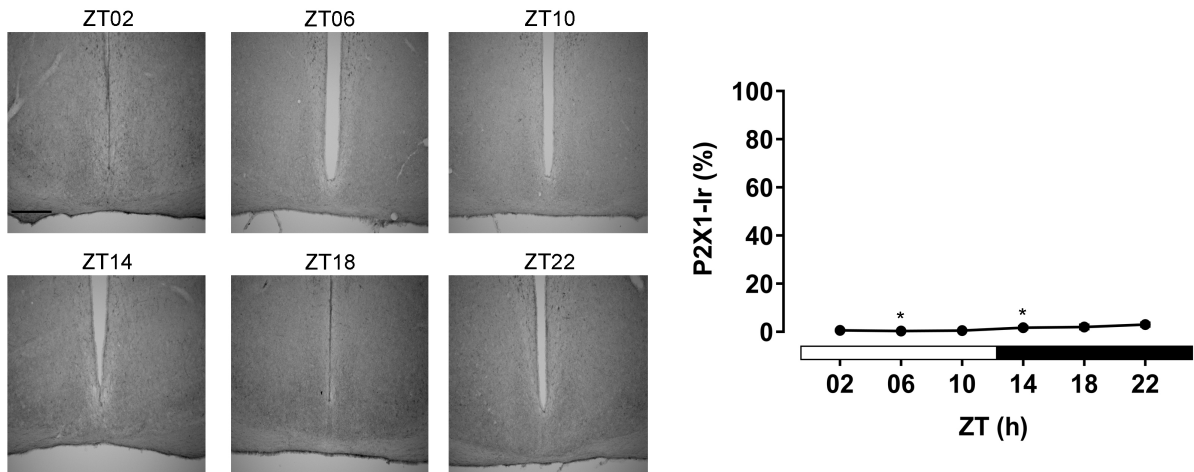


**Abb. 26: Immunreaktivität (IR) von P2X<sub>7</sub> im Hypothalamus der Maus im Koronarschnitt.** Skala = 200  $\mu\text{m}$ ; Inset: Skala = 100  $\mu\text{m}$ ; ( $\rightarrow$ ) dmSCN, ( $\blacktriangleright$ ) vlSCN. Miniaturansichten geteilt; (links) IR von P2X<sub>7</sub> im Bereich des SCN, PVN sowie SON; (rechts) stärkere Vergrößerung des rechten SCN mit Darstellung des vlSCN sowie dmSCN. Deutliche IR von P2X<sub>7</sub> im SCN und PVN. Schwache IR im SON. Im Bereich des vlSCN und dmSCN zeigt sich die IR verstärkt im dmSCN.

#### 4.2.2 Immunreaktivität der P2X-Rezeptoren im SCN unter 12L:12D

##### P2X<sub>1</sub>:

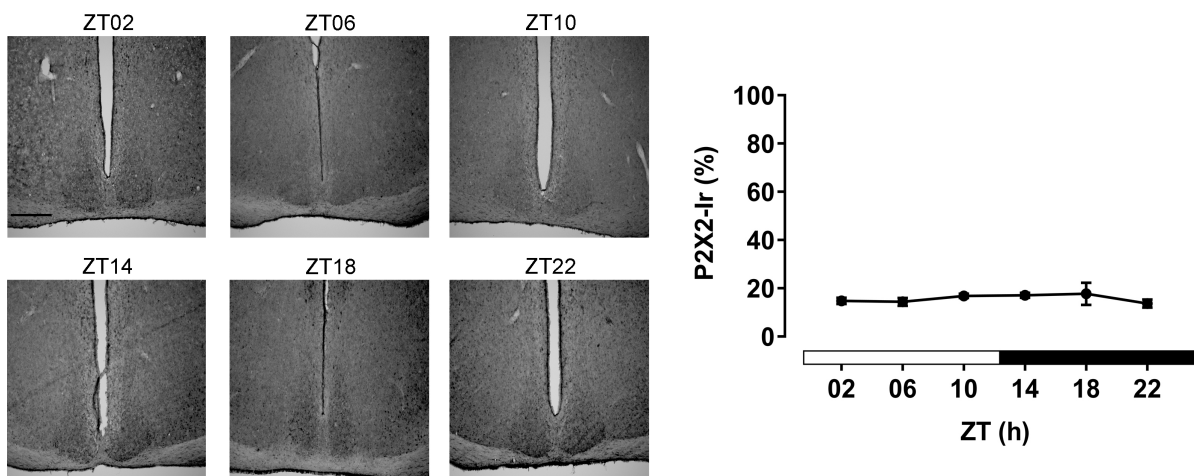
In den Aufnahmen aus Abbildung 27 zeigt sich eine schwache Immunreaktivität von P2X<sub>1</sub> im SCN. Bei allen Messungen war der Standardfehler sehr klein. Signifikante Unterschiede in der Immunreaktivität von P2X<sub>1</sub> zeigen sich zwischen ZT06 und ZT22 ( $p = 0,0322$ ) sowie zwischen ZT10 und ZT22 ( $p = 0,0443$ ) (Abb. 27).



**Abb. 27:** Immunreaktivität von P2X<sub>1</sub> im tageszeitlichen Verlauf zu den Zeitpunkten ZT02, ZT06, ZT10, ZT14, ZT18 und ZT22. Signifikante Expressionsunterschiede zeigen sich zwischen ZT02 und ZT22 sowie ZT14 und ZT22. Skala = 100  $\mu$ m; MW  $\pm$  SEM, einfaktorielles ANOVA. \*  $p \leq 0,05$  vs. ZT22.

##### P2X<sub>2</sub>:

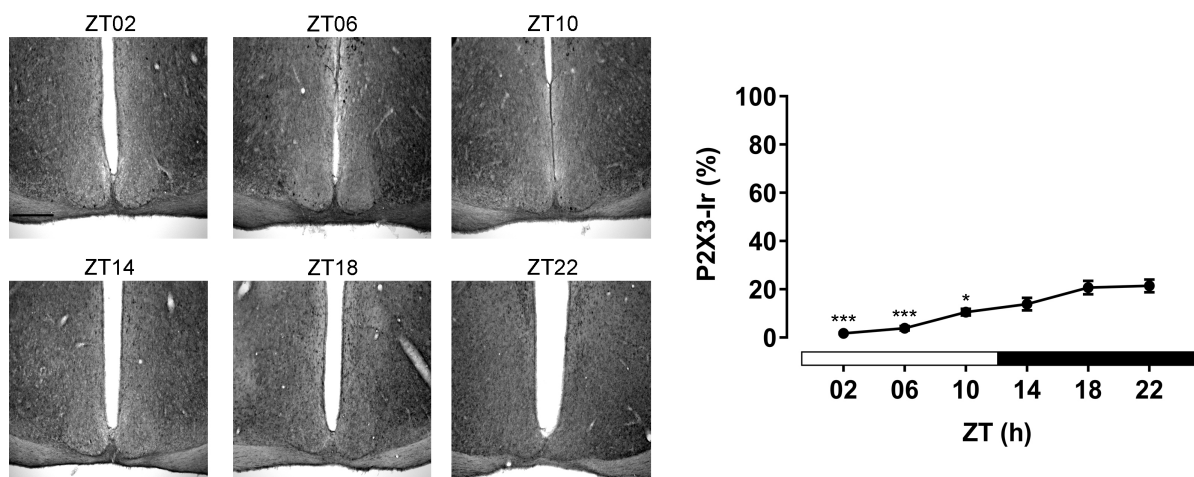
Zu allen untersuchten Zeitpunkten ist eine Immunreaktivität von P2X<sub>2</sub> im SCN erkennbar (Abb. 28). Es ist kein tageszeitlicher Rhythmus zu verzeichnen.



**Abb. 28:** Immunreaktivität von P2X<sub>2</sub> im tageszeitlichen Verlauf zu den Zeitpunkten ZT02, ZT06, ZT10, ZT14, ZT18 und ZT22. Es zeigen sich keine statistisch signifikanten Unterschiede in der Immunreaktivität zwischen den Zeitpunkten. Skala = 100  $\mu$ m; MW  $\pm$  SEM, einfaktorielles ANOVA.

**P2X<sub>3</sub>:**

Wie die repräsentativen Aufnahmen in Abbildung 29 zeigen, steigt die P2X<sub>3</sub>-Immunreaktivität im Tagesverlauf langsam aber stetig von 10% auf 25% an. Während der Lichtphase ist die Immunreaktivität im SCN deutlich niedriger als im direkt angrenzenden Neuropil. Hingegen steigt die Immunreaktivität im SCN während der Dunkelphase auf das Niveau des umgebenden Neuropils an. Ein signifikanter Unterschied in der Immunreaktivität findet sich zwischen den Zeitpunkten ZT02 und ZT14 ( $p = 0,0112$ ), ZT02 und ZT18 ( $p = 0,0003$ ), ZT02 und ZT22 ( $p = 0,0002$ ), ZT06 und ZT14 ( $p = 0,0394$ ), ZT06 und ZT18 ( $p = 0,0008$ ), ZT06 und ZT22 ( $p = 0,0005$ ), ZT10 und ZT18 ( $p = 0,0349$ ) sowie ZT10 und ZT22 ( $p = 0,0229$ ). Aus Gründen der Übersichtlichkeit sind in Abbildung 29 nur die Unterschiede zum Zeitpunkt ZT22 dargestellt.

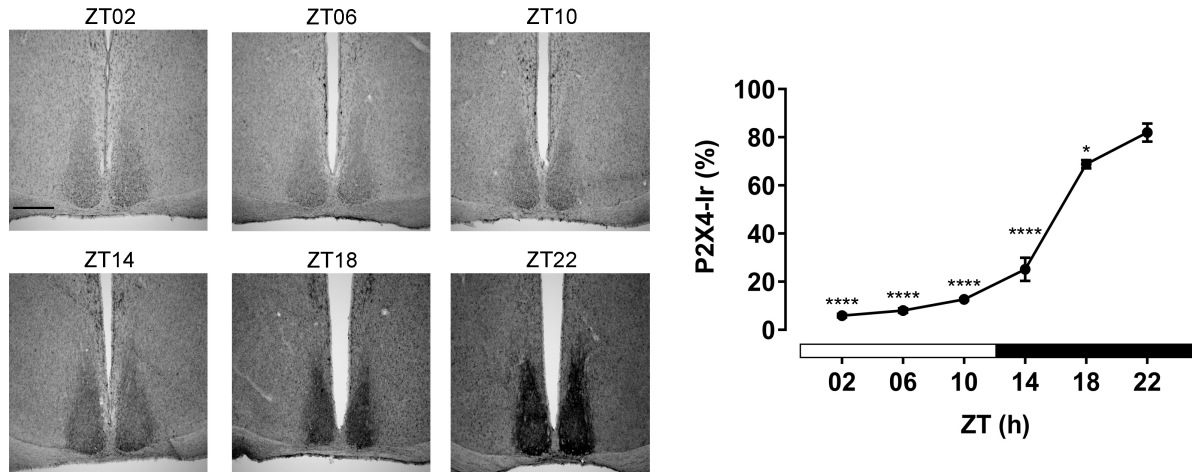


**Abb. 29:** Immunreaktivität von P2X<sub>3</sub> im tageszeitlichen Verlauf zu den Zeitpunkten ZT02, ZT06, ZT10, ZT14, ZT18 und ZT22. Skala = 100  $\mu$ m; MW  $\pm$  SEM, einfaktorielles ANOVA. \*  $p \leq 0,05$ , \*\*\*  $p \leq 0,001$  vs. ZT22.

**P2X<sub>4</sub>:**

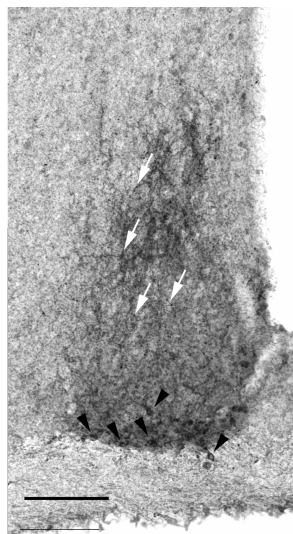
Wie aus Abbildung 30 ersichtlich, zeigt die P2X<sub>4</sub>-Immunreaktivität die drastischste Veränderung aller untersuchten Purinrezeptoren im Tagesverlauf. Während der Lichtphase ist die P2X<sub>4</sub>-Immunreaktivität annähernd konstant. Sie nimmt jedoch in der Dunkelphase signifikant zu und erreicht in der späten Dunkelphase (ZT22) Maximalwerte. Die Zeitpunkte ZT02 und ZT14 ( $p = 0,0024$ ), ZT02 und ZT18 ( $p < 0,0001$ ), ZT02 und ZT22 ( $p < 0,0001$ ), ZT06 und ZT14 ( $p = 0,0061$ ), ZT06 und ZT18 ( $p < 0,0001$ ), ZT06 und ZT22 ( $p < 0,0001$ ), ZT10 und ZT14 ( $p = 0,0491$ ), ZT10 und ZT18 ( $p < 0,0001$ ), ZT10 und ZT22 ( $p < 0,0001$ ), ZT14 und ZT18 ( $p < 0,0001$ ), ZT14

und ZT22 ( $p < 0,0001$ ) sowie ZT18 und ZT22 ( $p = 0,0370$ ) sind jeweils signifikant unterschiedlich. Aus Gründen der Übersichtlichkeit sind in Abbildung 30 nur signifikante Unterschiede gegenüber dem Zeitpunkt ZT22 dargestellt.



**Abb. 30: Immunreaktivität von P2X<sub>4</sub> im tageszeitlichen Verlauf zu den Zeitpunkten ZT02, ZT06, ZT10, ZT14, ZT18 und ZT22.** Skala = 100  $\mu\text{m}$ ; MW  $\pm$  SEM, einfaktorielles ANOVA. \*  $p \leq 0,05$ , \*\*\*\*  $p \leq 0,0001$  vs. ZT22.

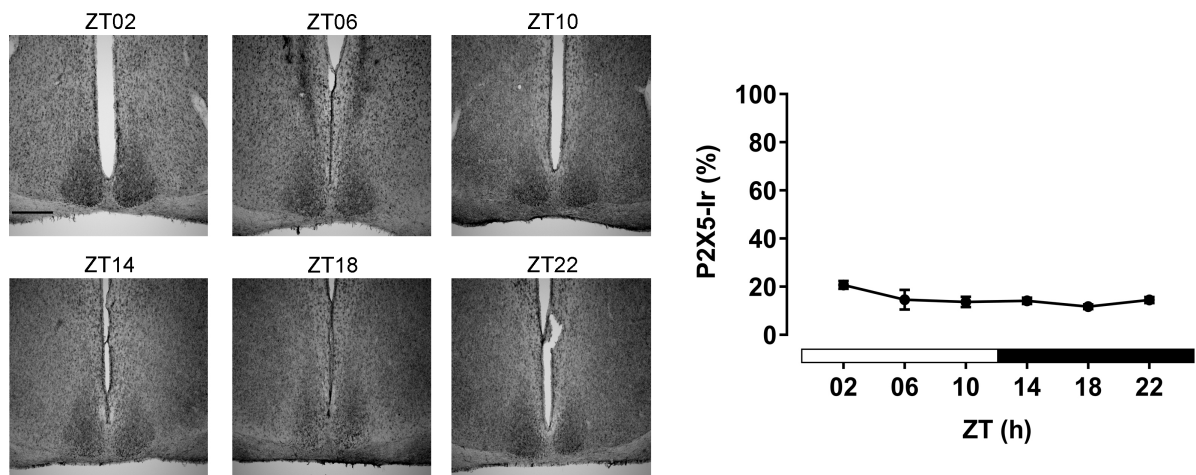
Eine genauere Analyse der subzellulären Lokalisation der P2X<sub>4</sub>-Immunreaktion im SCN zum Zeitpunkt ZT18 zeigt eine starke Immunreaktivität auf Somata von SCN-Zellen mit neuronaler Morphologie im Bereich des vlSCN (Abb. 31). Auch im Bereich des dmSCN zeigt sich eine starke Immunreaktivität für P2X<sub>4</sub> im Bereich eines dichten Fasernetzwerks (Abb. 31).



**Abb. 31: Koronarschnitt (30  $\mu\text{m}$ ) durch den SCN einer Maus des Wildtyp-Stamms C57Bl/6 nach immunhistochemischer DAB-Färbung von P2X<sub>4</sub> zum Zeitpunkt ZT18.** Skala = 100  $\mu\text{m}$ . (→) Immunreaktive Fasern im Bereich des dmSCN. (▶) Immunreaktive Somata von SCN-Zellen mit neuronaler Morphologie im Bereich des vlSCN.

**P2X<sub>5</sub>:**

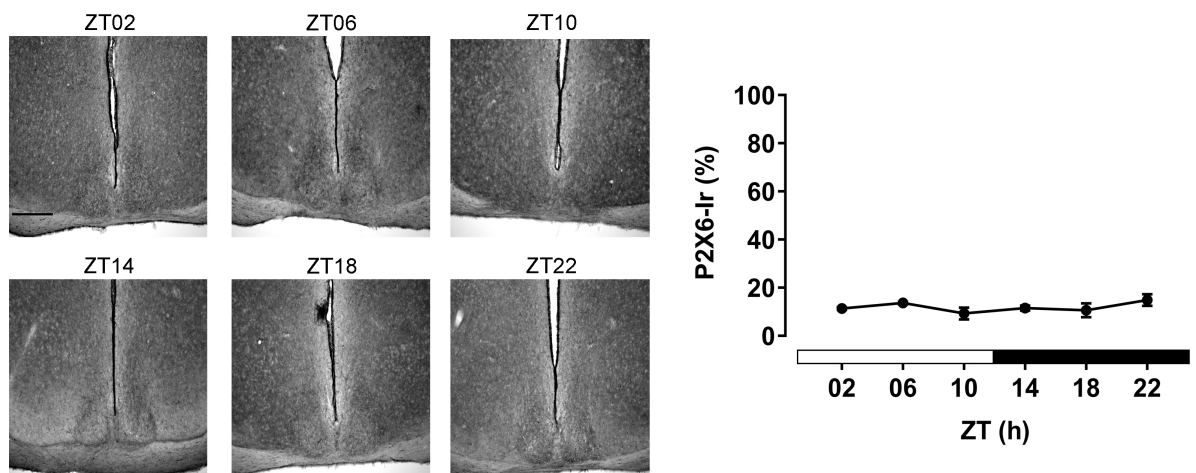
In Abbildung 32 ist die Immunreaktivität von P2X<sub>5</sub> dargestellt. In den Aufnahmen zeigt sich der SCN im Vergleich zum umgebenden Neuropil deutlich immunreaktiv. Es bestehen keine signifikanten Unterschiede in der Immunreaktivität zwischen den untersuchten Zeitpunkten (Abb. 32).



**Abb. 32: Immunreaktivität von P2X<sub>5</sub> im tageszeitlichen Verlauf zu den Zeitpunkten ZT02, ZT06, ZT10, ZT14, ZT18 und ZT22.** Es zeigen sich keine statistisch signifikanten Unterschiede in der Immunreaktivität zwischen den Zeitpunkten. Skala = 100  $\mu$ m; MW  $\pm$  SEM, einfaktorielle ANOVA.

**P2X<sub>6</sub>:**

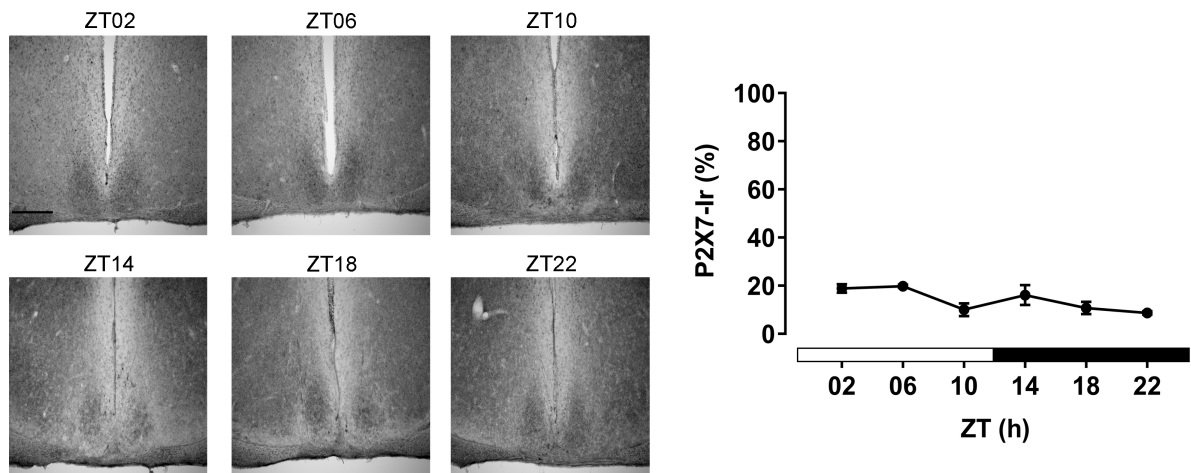
Die Immunreaktivität von P2X<sub>6</sub> im SCN ist in Abbildung 33 dargestellt. Der SCN hebt sich nur geringfügig vom umgebenden Neuropil ab und es ist keine tageszeitliche Schwankung der P2X<sub>6</sub>-Immunreaktivität zu erkennen (Abb. 33).



**Abb. 33: Immunreaktivität von P2X<sub>6</sub> im tageszeitlichen Verlauf zu den Zeitpunkten ZT02, ZT06, ZT10, ZT14, ZT18 und ZT22.** Es zeigen sich keine statistisch signifikanten Unterschiede in der Immunreaktivität zwischen den Zeitpunkten. Skala = 100  $\mu$ m; MW  $\pm$  SEM, einfaktorielle ANOVA.

**P2X<sub>7</sub>:**

P2X<sub>7</sub> weist im Tagesverlauf eine etwa gleichbleibende Immunreaktivität im SCN auf und es ist kein tageszeitlicher Unterschied in den Subregionen des SCN zu verzeichnen (Abb. 34). Die Konturen des SCN sind gut erkennbar, da die Immunreaktivität im direkt an den SCN-angrenzenden Neuropil vergleichsweise schwach ausgeprägt ist.



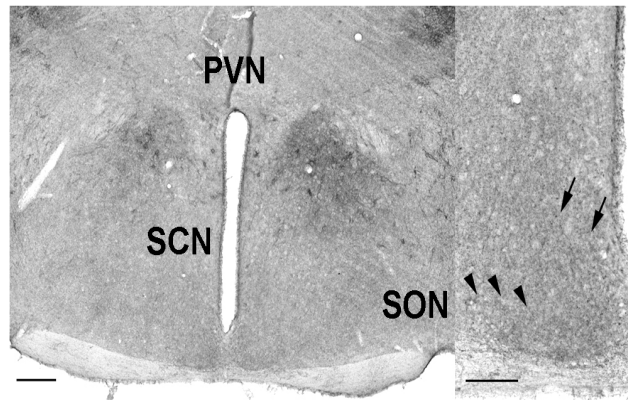
**Abb. 34:** Immunreaktivität von P2X<sub>7</sub> im tageszeitlichen Verlauf zu den Zeitpunkten ZT02, ZT06, ZT10, ZT14, ZT18 und ZT22. Es zeigen sich keine statistisch signifikanten Unterschiede in der Immunreaktivität zwischen den Zeitpunkten. Skala = 100 µm; MW ± SEM, einfaktorielles ANOVA.

#### 4.2.3 Topografie der P2Y-Rezeptoren im Hypothalamus

Die Immunreaktion der Purinrezeptoren P2Y<sub>1-2</sub>, P2Y<sub>4</sub>, P2Y<sub>6</sub> sowie P2Y<sub>11-14</sub> wird zunächst im Hypothalamus der Maus zum Zeitpunkt ZT02 dargestellt. Hierzu wurde die Rezeptorlokalisierung in den Regionen SCN, PVN und SON verglichen. Für den Bereich des SCN wurde zusätzlich die Immunreaktivität der Rezeptoren im vSCN sowie dmSCN bei höherer Vergrößerung dargestellt.

**P2Y<sub>1</sub>:**

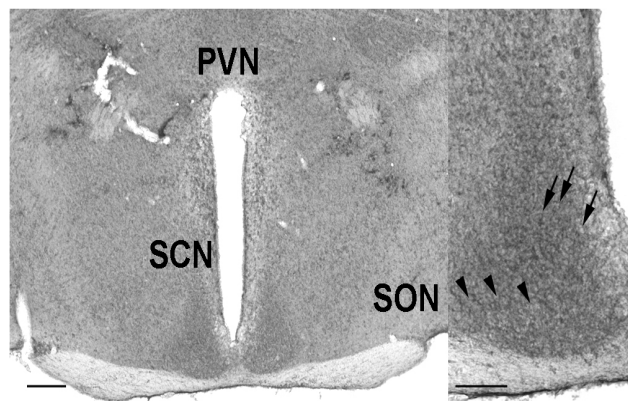
Die Immunreaktivität für P2Y<sub>1</sub> zeigt sich im Bereich des SCN, PVN und SON schwach ausgeprägt. Der SON weist dabei die geringste Immunreaktivität auf. In der stärkeren Vergrößerung des SCN zeigen sich die Regionen vSCN und dmSCN als gleichermaßen immunreaktiv. Immunreaktivitätsunterschiede zwischen vSCN und dmSCN sind daher nicht zu erkennen (Abb. 35).



**Abb. 35: Immunreaktivität (IR) von P2Y<sub>1</sub> im Hypothalamus der Maus im Koronarschnitt.** Skala = 200  $\mu\text{m}$ ; Inset: Skala = 100  $\mu\text{m}$ ; ( $\rightarrow$ ) dmSCN, ( $\blacktriangleright$ ) vlSCN. Miniaturansichten geteilt; (links) IR von P2Y<sub>1</sub> im Bereich des SCN, PVN sowie SON; (rechts) stärkere Vergrößerung des rechten SCN mit Darstellung des vlSCN sowie dmSCN. P2Y<sub>1</sub> mit schwacher IR im Bereich des SCN, PVN und SON. Der SON zeigt die geringste IR. Die Regionen vlSCN sowie dmSCN zeigen sich homogen schwach immunreaktiv.

### P2Y<sub>2</sub>:

P2Y<sub>2</sub> zeigt im Bereich des SCN und PVN eine moderate Immunreaktivität. Der SON zeigt im Vergleich hingegen nur eine schwache Immunreaktion. In der stärkeren Vergrößerung des SCN erkennt man eine deutlich homogene Immunreaktivität im vlSCN und dmSCN. Immunreaktivitätsunterschiede zwischen vlSCN und dmSCN sind nicht zu erkennen. Die beiden Regionen stellen sich isointens dar (Abb. 36).

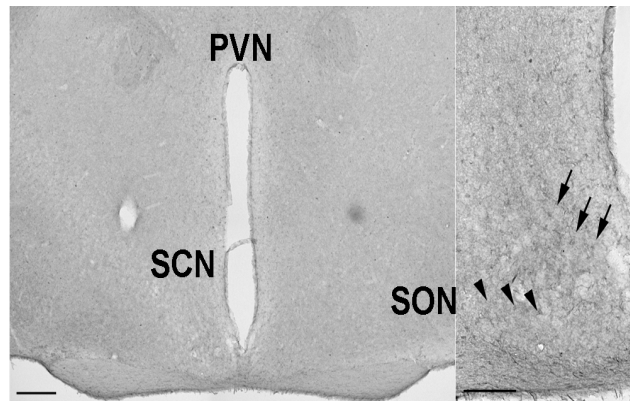


**Abb. 36: Immunreaktivität (IR) von P2Y<sub>2</sub> im Hypothalamus der Maus im Koronarschnitt.** Skala = 200  $\mu\text{m}$ ; Inset: Skala = 100  $\mu\text{m}$ ; ( $\rightarrow$ ) dmSCN, ( $\blacktriangleright$ ) vlSCN. Miniaturansichten geteilt; (links) IR von P2Y<sub>2</sub> im Bereich des SCN, PVN sowie SON; (rechts) stärkere Vergrößerung des rechten SCN mit Darstellung des vlSCN sowie dmSCN. P2Y<sub>2</sub> mit deutlicher IR im SCN und PVN mit homogener Verteilung im vlSCN und dmSCN. Der SON ist nur schwach immunreaktiv.



**P2Y<sub>4</sub>:**

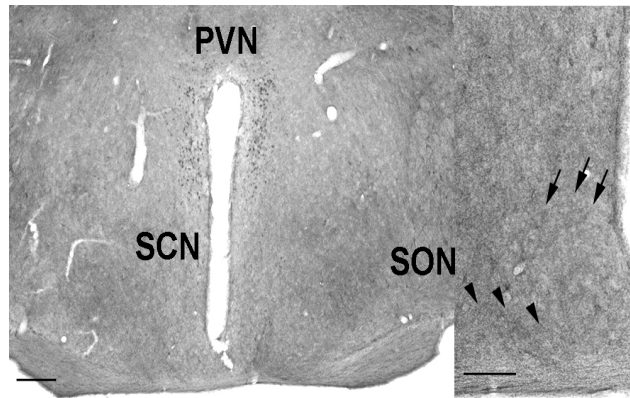
P2Y<sub>4</sub> zeigt sowohl im SCN, PVN als auch im SON eine sehr geringe Immunreaktivität. In der stärkeren Vergrößerung des SCN stellen sich auch die Regionen vSCN und dmSCN schwach immunreaktiv dar. Eine sichere Abgrenzung zwischen den beiden Regionen durch Immunreaktivitätsunterschiede ist nicht möglich (Abb. 37).



**Abb. 37: Immunreaktivität (IR) von P2Y<sub>4</sub> im Hypothalamus der Maus im Koronarschnitt.** Skala = 200  $\mu$ m; Inset: Skala = 100  $\mu$ m; (→) dmSCN, (▶) vSCN. Miniaturansichten geteilt; (links) IR von P2Y<sub>4</sub> im Bereich des SCN, PVN sowie SON; (rechts) stärkere Vergrößerung des rechten SCN mit Darstellung des vSCN sowie dmSCN. P2Y<sub>4</sub> mit schwacher IR im SCN, PVN und SON. Homogen schwache IR im vSCN und dmSCN.

**P2Y<sub>6</sub>:**

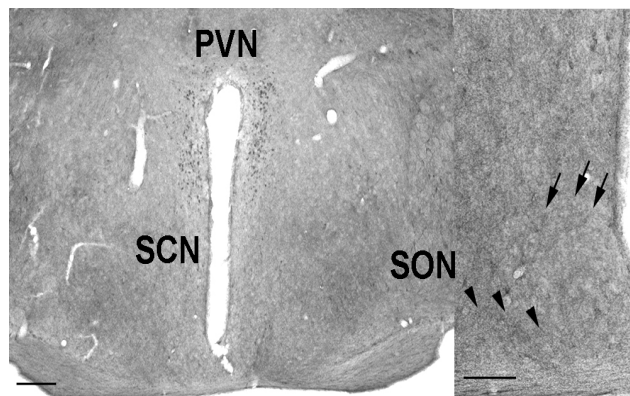
Die Immunreaktivität von P2Y<sub>6</sub> zeigt im Bereich des SCN, PVN sowie SON eine schwache Immunreaktion. Im Bereich des SCN erkennt man in der stärkeren Vergrößerung eine homogene Immunreaktivität im vSCN sowie dmSCN. Unterschiede in der Immunreaktivität zwischen vSCN und dmSCN finden sich nicht (Abb. 38).



**Abb. 38: Immunreaktivität (IR) von P2Y<sub>6</sub> im Hypothalamus der Maus im Koronarschnitt.** Skala = 200  $\mu\text{m}$ ; Inset: Skala = 100  $\mu\text{m}$ ; ( $\rightarrow$ ) dmSCN, ( $\blacktriangleright$ ) vlSCN. Miniaturansichten geteilt; (links) IR von P2Y<sub>6</sub> im Bereich des SCN, PVN sowie SON; (rechts) stärkere Vergrößerung des rechten SCN mit Darstellung des vlSCN sowie dmSCN. P2Y<sub>6</sub> mit schwacher IR im SCN, PVN und SON. Homogen schwache IR im vlSCN und dmSCN.

### P2Y<sub>11</sub>:

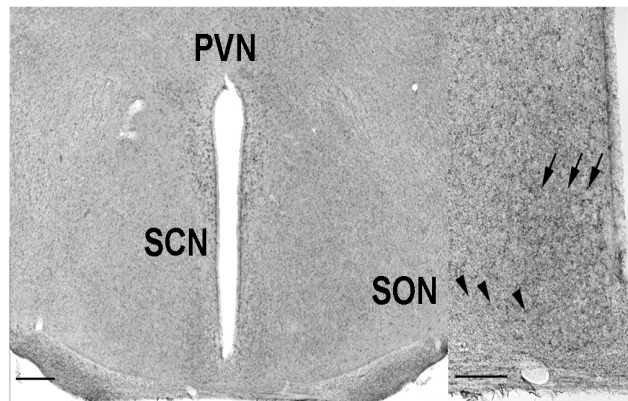
Die Proteinexpression von P2Y<sub>11</sub> im Bereich des Hypothalamus zeigt sich vor allem im Bereich des PVN. Der SCN sowie der SON zeigen eine schwache Immunreaktion für P2Y<sub>11</sub>. In der stärkeren Vergrößerung stellen sich die Regionen vlSCN und dmSCN homogen immunreaktiv dar. Immunreaktive Unterschiede zwischen den Regionen sind nicht zu erkennen (Abb. 39).



**Abb. 39: Immunreaktivität (IR) von P2Y<sub>11</sub> im Hypothalamus der Maus im Koronarschnitt.** Skala = 200  $\mu\text{m}$ ; Inset: Skala = 100  $\mu\text{m}$ ; ( $\rightarrow$ ) dmSCN, ( $\blacktriangleright$ ) vlSCN. Miniaturansichten geteilt; (links) IR von P2Y<sub>11</sub> im Bereich des SCN, PVN sowie SON; (rechts) stärkere Vergrößerung des rechten SCN mit Darstellung des vlSCN sowie dmSCN. IR von P2Y<sub>11</sub> am stärksten im PVN. Schwache IR im SCN und SON mit homogener IR im vlSCN und dmSCN.

**P2Y<sub>12</sub>:**

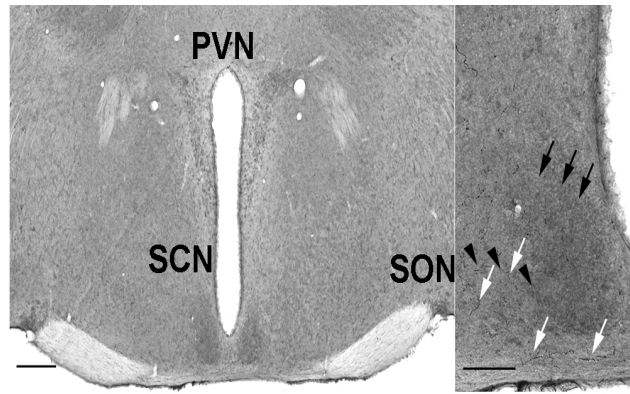
P2Y<sub>12</sub> zeigt eine moderate Immunreaktivität im Bereich des SCN und PVN. Die Immunreaktivität von P2Y<sub>12</sub> im Bereich des SON ist gering. In der stärkeren Vergrößerung des SCN zeigt sich eine deutlichere Immunreaktivität im Bereich des dmSCN als im Bereich des vlSCN (Abb. 40).



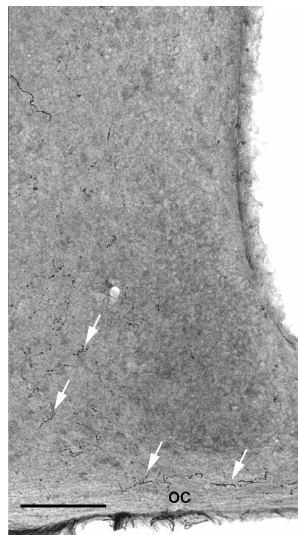
**Abb. 40: Immunreaktivität (IR) von P2Y<sub>12</sub> im Hypothalamus der Maus im Koronarschnitt.** Skala = 200  $\mu$ m; Inset: Skala = 100  $\mu$ m; (→) dmSCN, (▶) vlSCN. Miniaturansichten geteilt; (links) IR von P2Y<sub>12</sub> im Bereich des SCN, PVN sowie SON; (rechts) stärkere Vergrößerung des rechten SCN mit Darstellung des vlSCN sowie dmSCN. Moderate IR von P2Y<sub>12</sub> im SCN und PVN, mit stärkerer IR im dmSCN im Vergleich zum vlSCN. Schwache IR im SON.

**P2Y<sub>13</sub>:**

Die Proteinexpression von P2Y<sub>13</sub> im Hypothalamus der Maus zeigt Abbildung 41. Im Bereich des SCN, PVN und SON findet sich eine starke Immunreaktivität. In der stärkeren Vergrößerung des SCN zeigt sich die Region vlSCN deutlicher immunreaktiv als die Region dmSCN. Bei noch höherer Vergrößerung erkennt man vor allem im Bereich des vlSCN immunreaktive, fadenförmige Strukturen mit kleineren Auftreibungen (Abb. 42). Aufgrund der Lokalisation und der Morphologie könnte es sich um Axonterminalien des RHT handeln. Diese Annahme müsste jedoch durch weitergehende Untersuchungen geprüft werden.



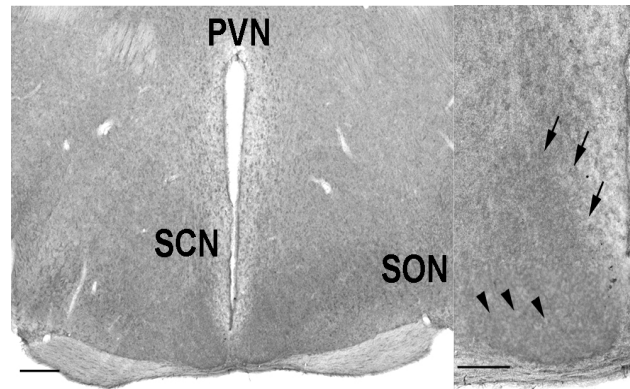
**Abb. 41: Immunreaktivität (IR) von P2Y<sub>13</sub> im Hypothalamus der Maus im Koronarschnitt.** Skala = 200 µm; Inset: Skala = 100 µm; (→) dmSCN, (▶) vSCN. Miniaturansichten geteilt; (links) IR von P2Y<sub>13</sub> im Bereich des SCN, PVN sowie SON; (rechts) stärkere Vergrößerung des rechten SCN mit Darstellung des vSCN sowie dmSCN. Deutliche IR von P2Y<sub>13</sub> im SCN, PVN und SON. Im Bereich des vSCN zeigt sich die IR stärker als im dmSCN. Die weißen Pfeile markieren besonders immunreaktive Bereiche im vSCN und dem Chiasma opticum.



**Abb. 42: Koronarschnitt (30 µm) durch den SCN einer Maus des Wildtyp-Stamms C57Bl/6 nach immunohistochemischer DAB-Färbung von P2Y<sub>13</sub> zum Zeitpunkt ZT02.** Skala = 100 µm. (→) Immunreaktive Fasern im Bereich des vSCN in direkter Nähe zum Chiasma opticum (OC).

#### P2Y<sub>14</sub>:

Eine Immunreaktion von P2Y<sub>14</sub> zeigt sich im Hypothalamus der Maus vor allem im Bereich des SCN. Hier zeigt sich in der stärkeren Vergrößerung eine homogene Immunreaktivität in den Regionen vSCN und dmSCN. In der Region des PVN und SON ist die Immunreaktivität schwächer ausgeprägt (Abb. 43).

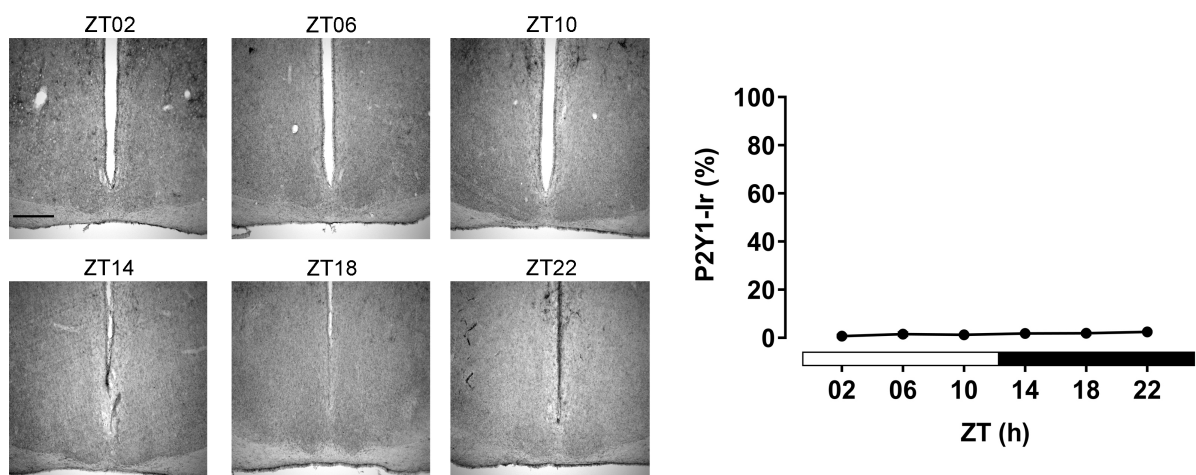


**Abb. 43: Immunreaktivität (IR) von P2Y<sub>14</sub> im Hypothalamus der Maus im Koronarschnitt.** Skala = 200  $\mu\text{m}$ ; Inset: Skala = 100  $\mu\text{m}$ ; (→) dmSCN, (▶) vSCN. Miniaturansichten geteilt; (links) IR von P2Y<sub>14</sub> im Bereich des SCN, PVN sowie SON; (rechts) stärkere Vergrößerung des rechten SCN mit Darstellung des vSCN sowie dmSCN. IR von P2Y<sub>14</sub> am stärksten im SCN und homogener IR im vSCN und dmSCN. Schwache IR im PVN und SON.

#### 4.2.4 Immunreaktivität der P2Y-Rezeptoren im SCN unter 12L:12D

##### P2Y<sub>1</sub>:

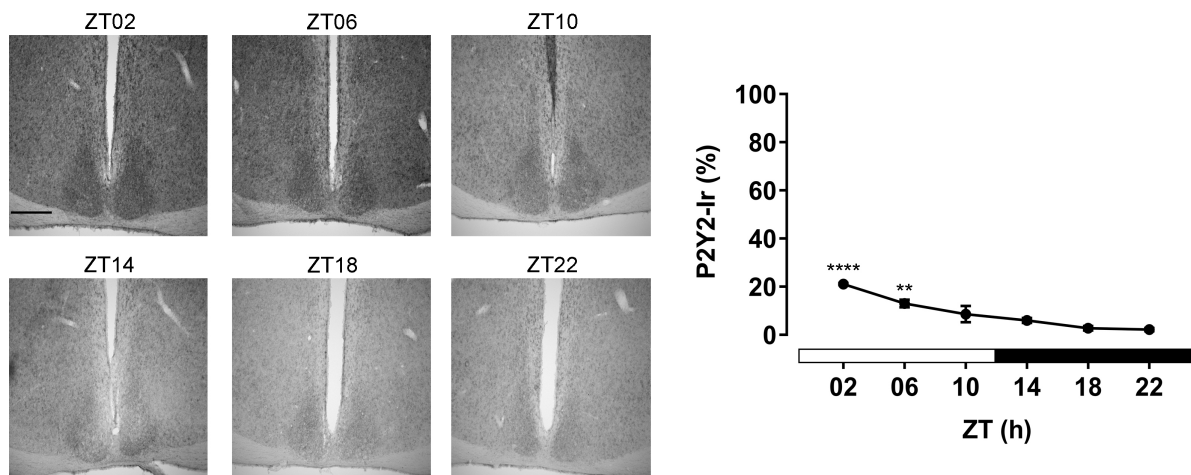
Die Immunreaktivität von P2Y<sub>1</sub> im SCN zeigt sich im tageszeitlichen Verlauf auf einem konstant niedrigen Niveau. In Abbildung 44 ist die Begrenzung des SCN in den Aufnahmen besonders zu den Zeitpunkten ZT02, ZT06 und ZT18 erkennbar. Der anteriore und anterolaterale Hypothalamus sind zu allen Zeitpunkten signalarm. Die Unterschiede in der Immunreaktivität zwischen den einzelnen Zeitpunkten sind statistisch nicht signifikant (Abb. 44).



**Abb. 44: Immunreaktivität von P2Y<sub>1</sub> im tageszeitlichen Verlauf zu den Zeitpunkten ZT02, ZT06, ZT10, ZT14, ZT18 und ZT22.** Es zeigen sich keine statistisch signifikanten Unterschiede in der Immunreaktivität zwischen den Zeitpunkten. Skala = 100  $\mu\text{m}$ ; MW  $\pm$  SEM, einfaktorielles ANOVA.

**P2Y<sub>2</sub>:**

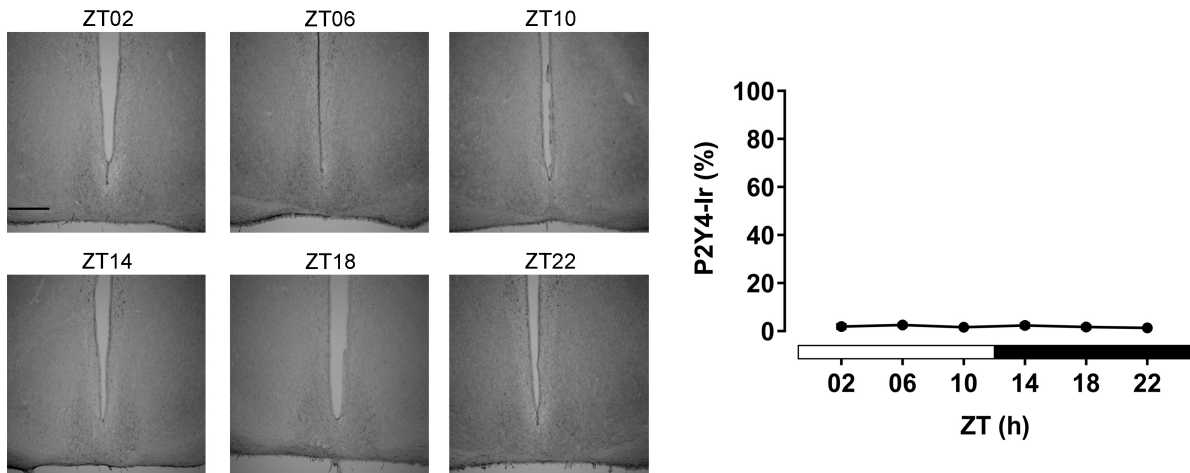
Abbildung 45 zeigt die Expression von P2Y<sub>2</sub> im SCN. Zu allen Zeitpunkten ist der SCN sehr gut vom umliegenden Neuropil abgegrenzt. In den Aufnahmen ist eine abnehmende Immunreaktivität des SCN zwischen den Zeitpunkten ZT02 und ZT22 sichtbar. Statistisch signifikante Unterschiede in der Immunreaktivität finden sich zwischen ZT02 und ZT06 ( $p = 0,0426$ ), ZT02 und ZT10 ( $p = 0,0019$ ), ZT02 und ZT14 ( $p = 0,0003$ ), ZT02 und ZT18 ( $p < 0,0001$ ), ZT02 und ZT22 ( $p < 0,0001$ ), ZT06 und ZT18 ( $p = 0,0088$ ) sowie ZT06 und ZT22 ( $p = 0,0058$ ). In der graphischen Darstellung (Abb. 45) sind hiervon nur statistisch signifikante Unterschiede zum Zeitpunkt ZT22 eingetragen. Die Expression von P2Y<sub>2</sub> ist während der Lichtphase (ZT02-ZT10) höher als in der Dunkelphase (ZT14-ZT22).



**Abb. 45: Immunreaktivität von P2Y<sub>2</sub> im tageszeitlichen Verlauf zu den Zeitpunkten ZT02, ZT06, ZT10, ZT14, ZT18 und ZT22.** Aus Übersichtsgründen wurden nur statistisch signifikante Unterschiede der Immunreaktivität zwischen den Zeitpunkten ZT02 und ZT22 sowie ZT06 und ZT22 abgebildet. Skala = 100  $\mu$ m; MW  $\pm$  SEM, einfaktorielle ANOVA. \*\*  $p \leq 0,01$ , \*\*\*\*  $p \leq 0,0001$  vs. ZT22.

**P2Y<sub>4</sub>:**

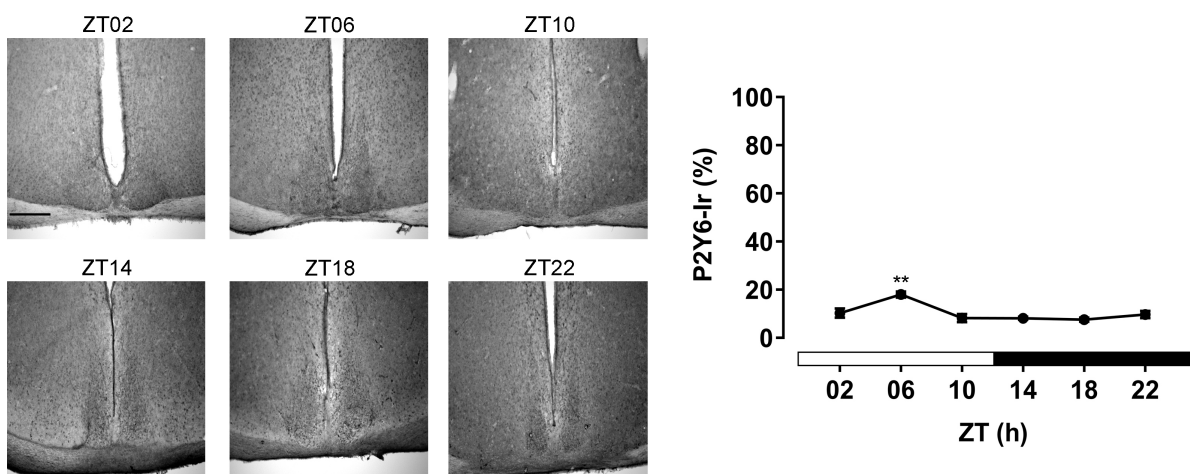
Die Expression von P2Y<sub>4</sub> im SCN ist im tageszeitlichen Verlauf über die Zeitpunkte ZT02-ZT22 betrachtet schwach. Auf die Gesamtfläche des SCN bezogen, ergeben sich Immunreaktivitäten von weniger als 10%. Die Aufnahmen aus Abbildung 46 zeigen eine annähernd konstante Expression von P2Y<sub>4</sub> sowohl in der Licht- als auch in der Dunkelphase. Statistisch signifikante Unterschiede im Expressionsverlauf zwischen ZT02, ZT06, ZT10, ZT14, ZT18 und ZT22 finden sich nicht (Abb. 46).



**Abb. 46:** Immunreaktivität von P2Y<sub>4</sub> im tageszeitlichen Verlauf zu den Zeitpunkten ZT02, ZT06, ZT10, ZT14, ZT18 und ZT22. Es zeigen sich keine statistisch signifikanten Unterschiede in der Immunreaktivität zwischen den Zeitpunkten. Skala = 100 µm; MW ± SEM, einfaktorielle ANOVA.

### P2Y<sub>6</sub>:

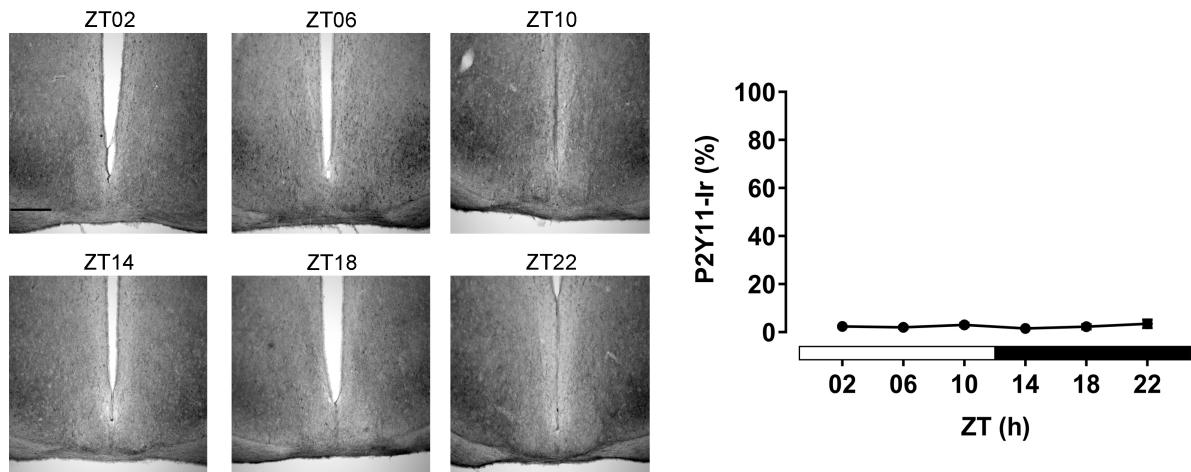
In Abbildung 47 erkennt man in den Miniaturaufnahmen eine gute Abgrenzung des SCN zum umliegenden Neuropil. Während der Lichtphase nimmt die Expression von P2Y<sub>6</sub> im SCN vor allem zwischen ZT02 und ZT06 zu. Ausgehend von ZT06 flacht die Immunreaktivität bis zum Zeitpunkt ZT10 ab (Abb. 47). Statistisch signifikante Unterschiede im Expressionsverlauf finden sich zwischen den Zeitpunkten ZT02 und ZT06 ( $p = 0,0171$ ), ZT06 und ZT10 ( $p = 0,0028$ ), ZT06 und ZT14 ( $p = 0,0027$ ), ZT06 und ZT18 ( $p = 0,0017$ ) sowie ZT06 und ZT22 ( $p = 0,0100$ ). Abbildung 47 zeigt die Expression von P2Y<sub>6</sub> im SCN im tageszeitlichen Verlauf. Aus Gründen der Übersicht sind nur signifikante Unterschiede zum Zeitpunkt ZT22 abgebildet.



**Abb. 47:** Immunreaktivität von P2Y<sub>6</sub> im tageszeitlichen Verlauf zu den Zeitpunkten ZT02, ZT06, ZT10, ZT14, ZT18 und ZT22. Aus Übersichtsgründen wurden nur statistisch signifikante Unterschiede der Immunreaktivität zwischen dem Zeitpunkt ZT06 und ZT22 abgebildet. Skala = 100 µm; MW ± SEM, einfaktorielle ANOVA. \*\*  $p \leq 0,01$  vs. ZT22.

**P2Y<sub>11</sub>:**

In den Miniaturaufnahmen aus Abbildung 48 sind die Abgrenzungen des SCN zum umliegenden Neuropil kaum erkennbar. Statistisch signifikante Expressionsunterschiede im tageszeitlichen Verlauf ergeben sich nicht.

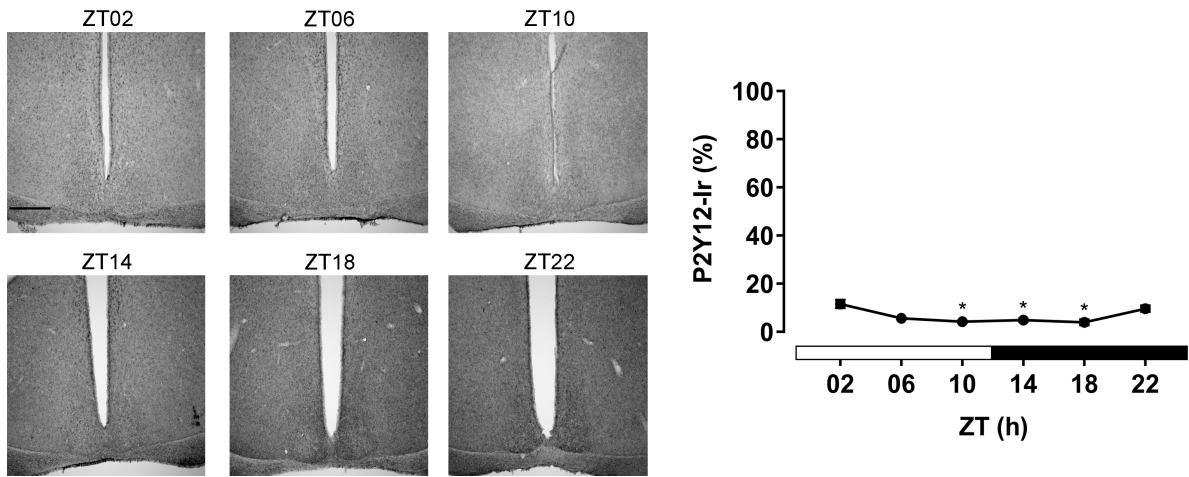


**Abb. 48: Immunreaktivität von P2Y<sub>11</sub> im tageszeitlichen Verlauf zu den Zeitpunkten ZT02, ZT06, ZT10, ZT14, ZT18 und ZT22.** Es zeigen sich keine statistisch signifikanten Unterschiede in der Immunreaktivität zwischen den Zeitpunkten. Skala = 100  $\mu$ m; MW  $\pm$  SEM, einfaktorielles ANOVA.

**P2Y<sub>12</sub>:**

In den Miniaturaufnahmen aus Abbildung 49 ist der Bereich des SCN zu allen Zeitpunkten gegenüber dem umliegenden Neuropil gut abgrenzbar. Im zeitlichen Verlauf erkennt man einen Anstieg der Expression von P2Y<sub>12</sub> zwischen ZT18 und ZT22. Während der Lichtphase nimmt die Expression zwischen ZT02 und ZT10 ab und steigt zwischen ZT14 und ZT22 wieder an. Dadurch ergeben sich statistisch signifikante Unterschiede zwischen ZT02 und ZT06 ( $p = 0,0117$ ), ZT02 und ZT10 ( $p = 0,0022$ ), ZT02 und ZT14 ( $p = 0,0048$ ), ZT02 und ZT18 ( $p = 0,0016$ ), ZT10 und ZT22 ( $p = 0,0218$ ), ZT14 und ZT22 ( $p = 0,0499$ ) sowie ZT18 und ZT22 ( $p = 0,0156$ ). Abbildung 49 zeigt nur statistisch signifikante Unterschiede zum Zeitpunkt ZT22.

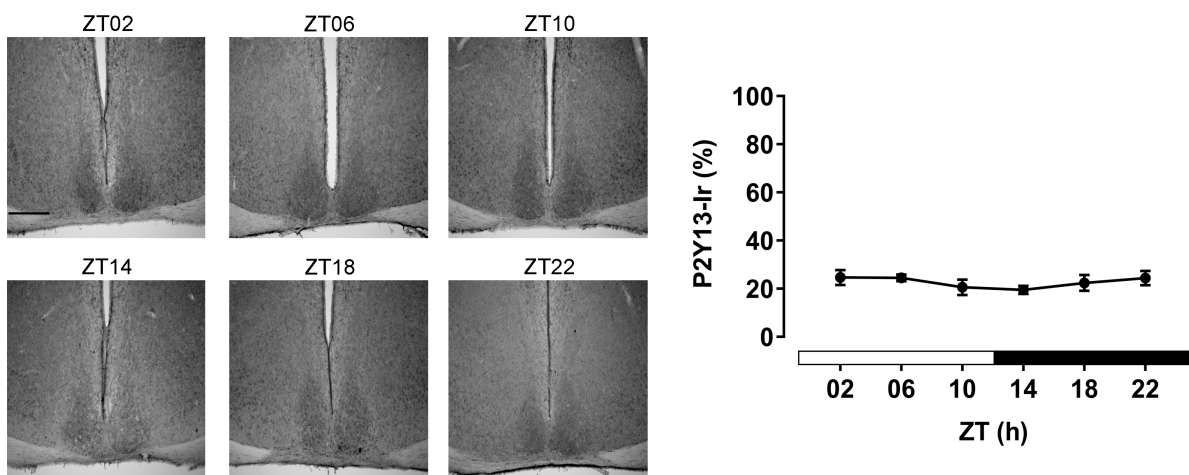




**Abb. 49: Immunreaktivität von P2Y<sub>12</sub> im tageszeitlichen Verlauf zu den Zeitpunkten ZT02, ZT06, ZT10, ZT14, ZT18 und ZT22.** Aus Übersichtsgründen wurden nur statistisch signifikante Unterschiede der Immunreaktivität zwischen dem Zeitpunkt ZT10 und ZT22, ZT14 und ZT22 sowie ZT18 und ZT22 abgebildet. Skala = 100 µm; MW ± SEM, einfaktorielle ANOVA. \* p ≤ 0,05 vs. ZT22.

### P2Y<sub>13</sub>:

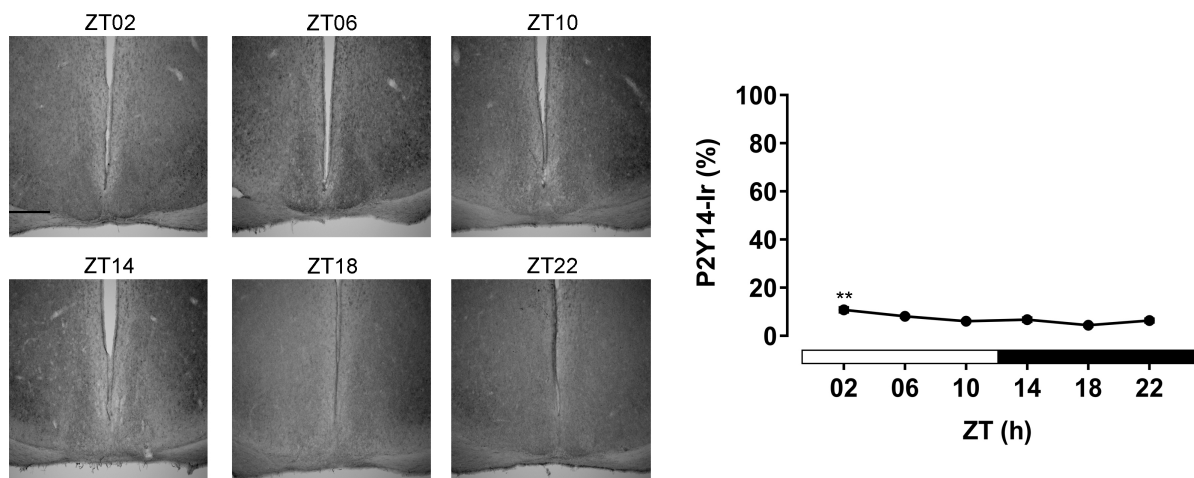
Die tageszeitliche Expression von P2Y<sub>13</sub> im SCN zeigt Abbildung 50. In den Miniaturaufnahmen erkennt man eine deutliche immunreaktive Signalstärke im SCN. Während der Licht- und Dunkelphase ist die Expression von P2Y<sub>13</sub> mit Werten zwischen 20 und 30% annähernd konstant. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Zeitpunkten ergeben sich nicht.



**Abb. 50: Immunreaktivität von P2Y<sub>13</sub> im tageszeitlichen Verlauf zu den Zeitpunkten ZT02, ZT06, ZT10, ZT14, ZT18 und ZT22.** Es zeigen sich keine statistisch signifikanten Unterschiede in der Immunreaktivität zwischen den Zeitpunkten. Skala = 100 µm; MW ± SEM, einfaktorielle ANOVA.

**P2Y<sub>14</sub>:**

Im Verlauf des Tages nimmt die Immunreaktivität von P2Y<sub>14</sub> leicht ab und erreicht zum Zeitpunkt ZT18 den Minimalwert (Abb. 51). In den Miniaturaufnahmen ist der SCN zum Zeitpunkt ZT18 kaum noch vom umliegenden Neuropil abzugrenzen. Die Lichtphase weist zum Zeitpunkt ZT02 eine höhere Immunreaktivität von P2Y<sub>14</sub> auf als die Dunkelphase. Statistisch signifikante Unterschiede finden sich zwischen ZT02 und ZT10 ( $p = 0,0055$ ), ZT02 und ZT14 ( $p = 0,0150$ ), ZT02 und ZT18 ( $p = 0,0004$ ), ZT02 und ZT22 ( $p = 0,0079$ ) sowie ZT06 und ZT18 ( $p = 0,0284$ ).

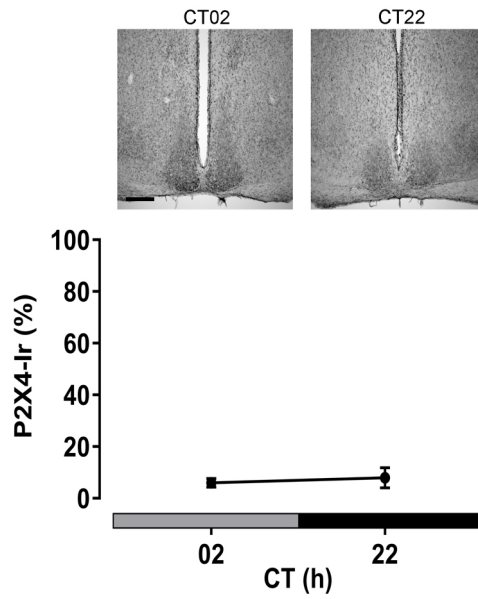


**Abb. 51: Immunreaktivität von P2Y<sub>14</sub> im tageszeitlichen Verlauf zu den Zeitpunkten ZT02, ZT06, ZT10, ZT14, ZT18 und ZT22.** Aus Übersichtsgründen wurden nur statistisch signifikante Unterschiede der Immunreaktivität zwischen dem Zeitpunkt ZT02 und ZT22 abgebildet. Skala = 100  $\mu$ m; MW  $\pm$  SEM, einfaktorielle ANOVA. \*\*  $p \leq 0,01$  vs. ZT22.

#### 4.2.5 Immunreaktivität von P2X<sub>4</sub> und P2Y<sub>2</sub> im SCN unter 12D:12D

**P2X<sub>4</sub>:**

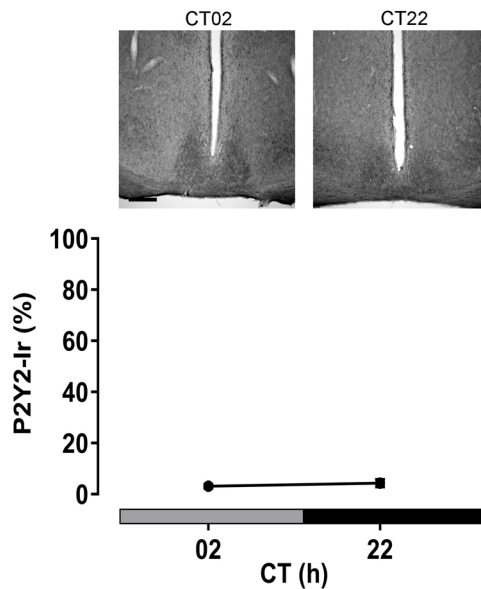
Abbildung 52 zeigt den Verlauf der Immunreaktivität von P2X<sub>4</sub> im SCN unter Dauerdunkelheit. In den Aufnahmen ist der Umriss des SCN zu den Zeitpunkten CT02 und CT22 gut erkennbar. Der Unterschied in der Immunreaktivität zwischen CT02 und CT22 ist statistisch nicht signifikant.



**Abb. 52: Immunreaktivität von P2X<sub>4</sub> unter Dauerdunkelheit zu den Zeitpunkten CT02 und CT22.** Die Zeitpunkte CT02 und CT22 sind dabei in den Unterschieden ihrer Immunreaktivität statistisch nicht signifikant. Skala = 100  $\mu$ m; MW  $\pm$  SEM Mann-Whitney-U/Wilcoxon-Test.

### P2Y<sub>2</sub>:

Unter Dauerdunkelheit zeigt sich für P2Y<sub>2</sub> im Expressionsverlauf zwischen den Zeitpunkten CT02 und CT22 kein statistisch signifikanter Unterschied (Abb. 53).



**Abb. 53: Immunreaktivität von P2Y<sub>2</sub> unter Dauerdunkelheit zu den Zeitpunkten CT02 und CT22.** Es zeigen sich keine statistisch signifikanten Unterschiede in der Immunreaktivität zwischen den Zeitpunkten. Skala = 100  $\mu$ m; MW  $\pm$  SEM Mann-Whitney-U/Wilcoxon-Test.

## 5 Diskussion

Die neuronale synaptische Signalübertragung mittels Neurotransmittern innerhalb des ZNS ist höchst komplex. Zahlreiche Neurotransmittersysteme werden derzeit genauer untersucht. Dabei stehen vor allem zelluläre Kommunikationsprozesse innerhalb des Hypothalamus – dem bedeutendsten Koordinationszentrum für vegetative Körperfunktionen – im Fokus des wissenschaftlichen Interesses. Vor allem die hypothalamische Regulation des Schlaf-Wach-Rhythmus wird aktuell von diversen Arbeitsgruppen untersucht [160, 161]. Besonders hervorzuheben sind hier Studien über zelluläre Kommunikationsprozesse innerhalb der hypothalamischen Region des SCN, dem Hauptschrittmacher zirkadianer Rhythmik [162, 163]. Diese Studien untersuchen hauptsächlich die molekulare Struktur und Funktion der Transmittersysteme innerhalb des SCN und wie sie den Schlaf-Wach-Rhythmus regulieren [164]. Erste Ergebnisse zeigen eine Beteiligung der Neurotransmitter ATP, ADP, AMP und Ado an der interzellulären synaptischen Transmission des SCN [144, 165-167]. Halassa et al. zeigten 2009, dass ATP, ADP, AMP und Ado als Neurotransmitter den Schlaf-Wach-Rhythmus modulieren [168]. Der Effekt des Nucleosids Ado auf den Schlaf-Wach-Rhythmus ist bereits gut untersucht [169].

Da Ado ein Abbauprodukt der Spaltung des Energiemoleküls ATP ist, gehen aktuelle Studien davon aus, dass Ado in die Energiehomöostase des Körpers während des Schlafs eingreift [170]. Die Regeneration von Energie für biologische Prozesse gilt als eine der Hauptfunktionen des Schlafs. Es konnte gezeigt werden, dass eine Steigerung der metabolischen und neuronalen Aktivität mit einer Steigerung der extrazellulären Ado-Konzentration einhergeht und damit mit dem Einsetzen von Müdigkeit [171]. Diese Wirkung von Ado konnte bisher an Ratten, Katzen aber auch an Mäusen gezeigt werden [172]. Der aktivierte  $A_1$ -Rezeptor führt zu einer Hyperpolarisation exzitatorischer Zellen durch eine Erhöhung der einwärtsgerichteten  $K^+$ -Leitfähigkeit [173]. Im Bereich des SCN inhibiert Ado dadurch die  $Ca^{2+}$ -Leitfähigkeit und gleichzeitig die Aktivität der im SCN in großer Anzahl vorkommenden GABAergen Neurone [147]. Stoffe mit bekannter Wirkung als Stimulanzien, wie Koffein und Theophyllin, antagonisieren den Ado-Effekt am  $A_1$ - und  $A_{2A}$ -Rezeptor und verringern so die Müdigkeitssymptomatik [174]. Auf molekularer Ebene haben diese Stoffe somit einen inversen Ado-Effekt.

Die Ergebnisse von Basheer et al. 2004 zeigen, dass der nukleosidische Neurotransmitter Ado seine schlafinduzierende Wirkung über P1-Rezeptoren in diversen Hirnarealen – wie beispielsweise dem basalen Vorderhirn, Thalamus, dorsalen Raphekern sowie der präoptischen Region des Hypothalamus – ausübt [169]. Auch diese Regionen innerhalb des ZNS sind – neben dem SCN – für die Schlafhomöostase von besonderer Bedeutung. Die schlafinduzierende Wirkung erzielt Ado somit durch eine Ligand-Rezeptor-Interaktion. Interessanterweise erfolgt der schlafinduzierende Effekt im basalen Vorderhirn durch Bindung von Ado an den Purinrezeptor  $A_1$  und im Subarachnoidalraum unterhalb des rostralen Vorderhirns über den Purinrezeptor  $A_{2A}$  [175, 176]. Auch im SCN konnte das Vorkommen von  $A_1$ - und  $A_2$ -Rezeptoren gezeigt werden [147]. Diese und andere Studien zeigen eine Beteiligung verschiedener Subtypen von P1-Rezeptoren an der Schlaf-Wach-Regulation [148]. Dies lässt vermuten, dass auch verschiedene Subtypen von P2-Rezeptoren in Hirnarealen zur Steuerung der zirkadianen Rhythmik exprimiert werden.

Neuere Studien erachten daher, neben den P1-Rezeptoren, auch P2-Rezeptoren zur Regulation des zirkadianen Systems als höchst relevant. Die derzeit vielversprechendsten Forschungsansätze befassen sich mit der Untersuchung von P2-Rezeptoren innerhalb des SCN. Diese Rezeptoren binden bekanntermaßen ATP und seine Derivate als Liganden [144, 177]. Del Puerto et al. berichteten 2013 von einem Vorkommen der P2-Rezeptoren in Neuronen diverser Hirnareale [178]. Die Studien von Collo et al. 1996, Xiang et al. 2006 und Bhattacharya et al. 2013 untersuchten die Expression von P2-Rezeptoren im SCN der Ratte [142-144]. Dadurch konnte die Kapazität des SCN zur Expression von P2X- und P2Y-Rezeptoren bereits gezeigt werden. Die genannten Studien untersuchten die Expression der P2-Rezeptoren vor allem auf mRNA-Ebene.

Die genaue Funktion der P2-Rezeptoren im SCN sowie die Proteinexpression der Rezeptoren in diesem Hirnareal ist jedoch weiterhin weitestgehend ungeklärt. Auch ist über die genaue Funktion von ATP innerhalb des SCN bislang wenig bekannt. Zudem ist die Wirkung von ATP auf die zirkadiane Rhythmik bislang unzureichend untersucht.

In dieser Arbeit wurde daher erstmals das Expressionsmuster der P2-Rezeptoren  $P2X_{1-7}$  sowie  $P2Y_{1-2}$ ,  $P2Y_4$ ,  $P2Y_6$  und  $P2Y_{11-14}$  im SCN der Maus untersucht [179]. Die Untersuchungen erfolgten auf mRNA- sowie Proteinebene. Hierzu kamen die Verfahren der qRT-PCR und Immunhistochemie zur Anwendung.

Unsere Studie unterscheidet sich von anderen Studien dieser Art (1) durch die Verwendung der Tierspezies Maus, (2) durch die Untersuchung nicht nur einzelner, sondern aller P2-Rezeptoren ( $P2X_{1-7}$  sowie  $P2Y_{1-2}$ ,  $P2Y_4$ ,  $P2Y_6$  und  $P2Y_{11-14}$ ), und (3) durch die Analyse des tageszeitabhängigen Expressionsmusters. Wir konnten in unserer Studie das Vorkommen aller der oben genannten Rezeptoren im SCN der Maus nachweisen [179]. Auch in den Bereichen PVN und SON des Hypothalamus fanden wir P2-Rezeptoren [180, 181].

### 5.1 Tageszeitlicher Verlauf der mRNA-Expression im SCN

Keine der aktuellen wissenschaftlichen Studien untersuchte bisher den tageszeitlichen Expressionsverlauf der P2-Rezeptoren im SCN. Wir konnten an nativen SCN-Stanzbiopsien der Maus tageszeitliche Variationen der Genexpression von  $P2X_{1-7}$  sowie  $P2Y_{1-2}$ ,  $P2Y_4$ ,  $P2Y_6$  und  $P2Y_{12-14}$  mittels qRT-PCR nachweisen. Derartige Untersuchungen an der nativen SCN-Stanze wurden bisher nur von Bhattacharya et al. 2013 im SCN der Ratte beschrieben [144]. Anders als in unserer Studie wurde bei Bhattacharya et al. der SCN aus ca. 250µm dicken nativen Koronarschnitten des Rattenhirns ausgestanzt; wir gewannen die Stanzbiopsie hingegen aus nativem Ganzhirn der Maus.

Es gelang uns in unserer Studie nicht, einen funktionsfähigen Primer für das Rezeptorgen  $P2Y_{11}$  zu generieren. Ein solcher Primer für die Maus ist bisher in der Literatur auch nicht beschrieben. Daher wurde der Rezeptor  $P2Y_{11}$  in der vorliegenden Studie allein immunhistochemisch auf Proteinebene untersucht. Zukünftige Studien, welche mRNA-Analysen von  $P2Y_{11}$  im SCN der Maus untersuchen, wären daher eine sinnvolle Ergänzung zu unserem Projekt.

Eine Studie der Arbeitsgruppe von Collo et al. 1996 zeigt im Rahmen der in-situ-Hybridisierung bereits das Vorkommen von  $P2X_2$ ,  $P2X_4$  und  $P2X_5$  in diversen hypothalamischen Regionen der Ratte; unter anderem dem SCN [142]. In ihrer Studie konnten sie  $P2X_5$  im SCN der Ratte nicht nachweisen. Wir fanden  $P2X_5$ -mRNA jedoch im SCN der Maus [179].  $P2X_1$ ,  $P2X_3$  und  $P2X_7$  wurden von Collo et al. 1996 nicht untersucht. Auch diese Rezeptoren wiesen wir im SCN auf mRNA-Ebene der Maus nach.

Bhattacharya et al. untersuchten 2013 die quantitative mRNA-Expression von  $P2X_{1-7}$  sowie  $P2Y_{1-2}$  und  $P2Y_{12}$  im SCN der Ratte, wobei die Hirnentnahmen zwischen 11:00

Uhr und 18:00 Uhr stattfanden [144]. Im Vergleich mit unserer Studie wurde demnach ein Zeitraum ohne standardisierte Zeitpunkte erfasst und alle Hirnentnahmen im Rahmen der Lichtphase durchgeführt. Dabei stellte sich für  $P2X_6$  die niedrigste mRNA-Expressionsrate dar. Auch in unserer Studie zeigt  $P2X_6$  die geringste mRNA-Expression aller P2X-Rezeptoren im SCN der Maus. Es sei hier jedoch kritisch anzumerken, dass in der Studie von Bhattacharya et al. *GAPDH* und in unserer Studie *Rn18S* als *housekeeping*-Gen verwendet wurde. Die relativen mRNA-Expressionslevel für die untersuchten P2X-Rezeptoren folgten bei Bhattacharya et al. folgender Reihenfolge:  $P2X_2 > P2X_7 > P2X_4 > P2X_5 > P2X_1 = P2X_3 > P2X_6$  [144]. In der gleichen Studie ergab sich für die P2Y-Rezeptoren die Reihenfolge  $P2Y_2 > P2Y_1 > P2Y_{12}$ . In unserer Studie fanden wir relative mRNA-Expressionslevel der P2X-Rezeptoren folgender Stärken:  $P2X_7 > P2X_3 > P2X_4 > P2X_2 > P2X_5 > P2X_1 > P2X_6$ . Die mRNA-Expressionslevel der P2Y-Rezeptoren wiesen folgende Stärken auf:  $P2Y_1 > P2Y_{14} > P2Y_{12} > P2Y_{13} > P2Y_4 > P2Y_6 > P2Y_2$ .

Bhattacharya et al. konnten weiterhin zeigen, dass die spontane inhibitorische postsynaptische Transmission im SCN durch ATP potenziert wird. Der genaue Mechanismus läuft hier über die Aktivierung präsynaptischer P2X-Rezeptoren. Aufgrund seiner starken Expression scheint  $P2X_2$  hier von besonderer Bedeutung zu sein. In unserer Studie konnten wir in der qRT-PCR zeigen, dass  $P2X_2$ -mRNA im SCN der Maus zwischen ZT10 und ZT14 am stärksten exprimiert wird. Auch  $P2X_1$  sowie  $P2X_3$ - $P2X_7$  weisen jeweils zwischen ZT10 und ZT14 die höchste mRNA-Expression auf. Am Übergang von der Licht- zur Dunkelphase scheint demnach die höchste Transkriptionsrate der P2X-Rezeptoren vorzuliegen.

Durch die Aktivierung von P2X- und P2Y-Rezeptoren wird die  $Ca^{2+}$ -Konzentration in den SCN-Zellen erhöht [144]. Wie durch Bhattacharya et al. gezeigt werden konnte, führt die  $P2X_2$ -Aktivierung durch die erhöhte  $Ca^{2+}$ -Konzentration zu einer Steigerung der Freisetzungsfrequenz des inhibitorischen Neurotransmitters GABA [144]. Auch in anderen Hirnarealen – so z.B. von Khakh et al. 2003 im Hippocampus gezeigt – führt die Aktivierung präsynaptischer  $P2X_2$ -Rezeptoren zu einer Frequenzsteigerung der Neurotransmitterfreisetzung; im Falle der GABAergen hippocampalen Interneurone zur Freisetzung von Glutamat [182].

$P2X_7$  wurde in der Studie von Bhattacharya et al. 2013 als zweithäufigster Purinrezeptor im SCN der Ratte nach  $P2X_2$  nachgewiesen [144]. In unserer Studie war

er sogar der Häufigste; mit einem Maximum der Expression zwischen ZT10 und ZT14. Es ist daher anzunehmen, dass auch P2X<sub>7</sub> eine fundamentale Rolle in der Kommunikation synaptischer Prozesse innerhalb des SCN spielt. Diverse Studien zeigen jedoch, dass P2X<sub>7</sub> vorzugsweise in Mikroglia und Astrozyten exprimiert wird und weniger stark in Neuronen [183-187]. Gleiches zeigt sich für die Expression von P2Y<sub>13</sub> in Astrozyten [188]. Wie Bhattacharya et al. bereits diskutierten, so vermuten daher auch wir, dass die starke mRNA-Expression von P2X<sub>7</sub> im SCN der Maus hauptsächlich durch das Vorhandensein von Mikroglia und Astrozyten begründet liegt. Unterstützt wird diese Vermutung durch die Studie von Morin et al. 1989, welche zeigt, dass Astrozyten in hoher Dichte im SCN vorkommen [189]. In diesem Zusammenhang wären sicher Kollokalisationsanalysen der Purinrezeptorexpression im SCN eine sinnvolle Ergänzung.

Die Rezeptoren P2X<sub>2</sub>, P2X<sub>3</sub>, P2X<sub>4</sub>, P2X<sub>5</sub> und P2X<sub>7</sub> werden auf mRNA-Ebene rhythmisch exprimiert. Auf Proteinebene werden von diesen allerdings nur P2X<sub>3</sub> und P2X<sub>4</sub> rhythmisch exprimiert. Zusätzlich findet sich auf Proteinebene eine rhythmische Expression von P2X<sub>1</sub>. Für die Rezeptoren P2Y<sub>1</sub>, P2Y<sub>4</sub>, P2Y<sub>6</sub>, P2Y<sub>12</sub> und P2Y<sub>14</sub> finden wir rhythmische mRNA-Expressionswerte im Tagesverlauf. Von diesen werden auf Proteinebene allerdings nur P2Y<sub>6</sub>, P2Y<sub>12</sub> und P2Y<sub>14</sub> rhythmisch exprimiert. Zusätzlich findet sich eine rhythmische Proteinexpression für P2Y<sub>2</sub>. Diese Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass eine Diskrepanz zwischen rhythmisch transkribiertem Gen und translatierter mRNA der Purinrezeptoren existiert.

## **5.2 Topografie der P2-Rezeptoren im SCN, PVN und SON**

### **5.2.1 P2X-Rezeptoren**

Zunächst untersuchten wir die Lokalisation der P2X-Rezeptoren im SCN sowie im PVN und im SON der Maus zum Zeitpunkt ZT02 mittels Immunhistochemie. Viele unserer Befunde decken sich mit Untersuchungen zur Expression von P2X-Rezeptoren im Hypothalamus der Ratte [78, 190].

Wir wiesen eine deutliche Immunreaktion von P2X<sub>1</sub> im PVN und SON nach. Im SCN war die Immunreaktion von P2X<sub>1</sub> vergleichsweise schwach bis moderat. 2006 wiesen Cham et al. P2X<sub>1</sub> im PVN der Ratte nach [75]. Im SON der Ratte wurde P2X<sub>1</sub> bisher nicht nachgewiesen [191].



In unserer Studie zeigte P2X<sub>2</sub> eine deutliche Immunreaktion im PVN und SON und eine nur mäßige Immunreaktion im SCN. Xiang et al. 1998 und Yao et al. 2003 fanden vor allem den P2X<sub>2</sub>-Rezeptor im PVN und SON der Ratte [78, 190]. Auch Guo et al. wiesen im Jahr 2008 P2X<sub>2</sub> im PVN und SON der Ratte nach [81, 191]. Weitere Studien konnten P2X<sub>2</sub> ebenfalls im PVN der Ratte nachweisen [75]. Zemkova et al. 2008 beschreiben das Fehlen von P2X<sub>2</sub>-Rezeptoren im SCN der Ratte; konnten P2X<sub>2</sub> hingegen im SON der Ratte nachweisen [177]. Wir fanden P2X<sub>2</sub> jedoch im SCN sowie SON der Maus.

P2X<sub>3</sub> zeigte sich deutlich immunreaktiv in PVN und SON mit geringerer Immunreaktivität im SCN. Im PVN der Ratte wurde P2X<sub>3</sub> nachgewiesen [75]. P2X<sub>3</sub> wurde im SON der Ratte bisher nicht nachgewiesen [191].

Der Rezeptor P2X<sub>4</sub> stellte sich in unserer Studie in PVN und SON deutlich immunreaktiv dar, wohingegen der SCN eine geringere Immunreaktion aufwies. Im PVN der Ratte wurde P2X<sub>4</sub> nachgewiesen [75]. Auch im SON der Ratte wurde P2X<sub>4</sub> nachgewiesen [191].

In unserer Studie waren die Rezeptoren P2X<sub>5</sub> und P2X<sub>6</sub> im SCN, PVN und SON moderat immunreaktiv. Beide Rezeptoren fanden sich im PVN und SON der Ratte [75, 81]. Eine weitere aussagekräftige Studie zur Expression von P2X-Rezeptoren im Hypothalamus der Ratte stammt von Xiang et al. 2006 [143]. Hier zeigte sich der Rezeptor P2X<sub>5</sub> in diversen Regionen des Hypothalamus, u.a. auch im SCN, PVN sowie im SON.

P2X<sub>7</sub> zeigt in unserer Studie eine deutliche Immunreaktion im PVN und eine moderate Immunreaktion im SCN. Studien zur Lokalisation von P2X<sub>7</sub> in SCN, PVN und SON der Ratte finden sich derzeit nicht.

### **5.2.2 P2Y-Rezeptoren**

Neben dem Vorkommen der P2X-Rezeptoren zeigt unsere Studie auch eine Proteinexpression aller P2Y-Rezeptoren im SCN der Maus. Somit konnten wir in der Immunhistochemie erstmalig das Vorkommen der P2-Rezeptoren P2Y<sub>1-2</sub>, P2Y<sub>4</sub>, P2Y<sub>6</sub> und P2Y<sub>11-14</sub> im SCN der Maus nachweisen. Im Gegensatz zu einer relativen Fülle von Publikationen über die Lokalisation der P2X-Rezeptoren im Hypothalamus, ist der Informationsgehalt über das Vorkommen von P2Y-Rezeptoren bis heute gering. Song

et al. 2011 untersuchten die Proteinexpression von P2Y<sub>4</sub> im ZNS der Ratte [192]. Sie fanden P2Y<sub>4</sub> dabei im PVN und SON. Eine Lokalisation von P2Y<sub>4</sub> im SCN ist von ihnen nicht explizit beschrieben, allerdings fanden sie eine moderate Immunreaktivität für P2Y<sub>4</sub> im anterioren Hypothalamus, einer Region in der auch der SCN liegt. Wir konnten die Rezeptoren P2Y<sub>1-2</sub>, P2Y<sub>4</sub>, P2Y<sub>6</sub> und P2Y<sub>11-14</sub> neben der Region des SCN auch im PVN und SON der Maus nachweisen.

### **5.2.3 Funktionelle Bedeutung der P2-Rezeptoren im SCN**

Für die von uns im SCN nachgewiesenen P2-Rezeptoren stellt ATP den favorisierten Liganden dar. Durch Womac et al. konnte 2009 ATP im SCN der Ratte identifiziert werden [151]. Detailliertere Untersuchungen schrieben den im SCN nachweislich in hoher Dichte vorkommenden Astrozyten die beobachtete ATP-Freisetzung zu [151, 189]. Diese Feststellung deckt sich mit Erkenntnissen anderer Arbeitsgruppen, die Astrozyten die Fähigkeit zur Ca<sup>2+</sup>-abhängigen Freisetzung zahlreicher weiterer Gliotransmitter, u.a. Glutamat, zuschreiben [193]. Auch die astrozytäre Freisetzung von ATP innerhalb des SCN ist kalziumabhängig [194]. Interessanterweise findet sich eine inverse Korrelation zwischen der intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Konzentration und der extrazellulären ATP-Konzentration [195]. Im Bereich des SCN – einer Region, die über den Schlaf-Wach-Rhythmus zirkadiane Schwankungen im Aktivitätsverhalten steuert – deutet dies auf eine Anpassung der astrozytären Ca<sup>2+</sup>-Konzentration an die Ca<sup>2+</sup>-Konzentration neuronaler SCN-Zellen hin [196, 197]. Das tageszeitliche Maximum der Ca<sup>2+</sup>-Konzentration in neuronalen SCN-Zellen stimmt mit dem Zeitpunkt des stärksten synaptischen Inputs von der Retina über den RHT überein und zeigt damit die höchste neuronale Aktivität an. Im Rahmen erhöhter synaptischer Aktivität innerhalb des SCN wird ATP vermehrt freigesetzt und bindet womöglich an die zahlreichen Purinrezeptoren, die wir in dieser Region nachweisen konnten. Mehrere Studien fanden viele dieser Rezeptoren auch in Astrozyten [198]. Da im Bereich des SCN sowohl Neurone als auch Astrozyten in großer Zahl vorhanden sind, gehen wir davon aus, dass diese beiden Zellpopulationen den größten Anteil an der von uns untersuchten Immunreaktivität ausmachen. Kollokalisationsuntersuchungen, die diese Vermutung bekräftigen könnten, führten wir jedoch bisher nicht durch. Im Einklang mit der Studie von Troadec et al. 1998, die zeigt, dass ATP als parakrin-autokriner *Messenger* den Ca<sup>2+</sup>-Influx über P2X<sub>2</sub>-Rezeptoren stimuliert und somit eine wichtige Rolle im SON der Ratte spielt, könnten die Ergebnisse unserer Studie auf ähnliche

Mechanismen im SCN der Maus hindeuten, da auch hier P2X<sub>2</sub> exprimiert wird [199]. ATP kommt im SCN nicht nur als Neurotransmitter vor, sondern zeigt eine an die zirkadiane Rhythmik angepasste Dynamik in seiner Freisetzung [151]. Auch Marpegan et al. zeigten 2009 die Beeinflussung der astrozytären ATP-Freisetzung durch das zirkadiane System innerhalb des SCN [200]. Expressionsunterschiede einzelner Proteine über den tageszeitlichen Verlauf wurden in Astrozyten – aber auch anderen Körperzellen – häufig beobachtet. Zu diesen Proteinen zählen z.B. die Uhrengene *Per*, *CRY*, *CLOCK*, *BMAL* sowie *TIM*, die in Schrittmacherzellen des SCN sowie Astrozyten der zirkadianen Rhythmik angepasste Expressionsunterschiede zeigen [201, 202]. Für die extrazelluläre Ado-Konzentration sowie die Expression von P1-Rezeptoren konnte am Säugetiermodell bereits eine zirkadiane Fluktuation in diversen Hirnarealen gezeigt werden [203, 204]. Unsere Studie zeigt erstmals die tageszeitliche Fluktuation im Expressionsverlauf von P2-Rezeptoren innerhalb des SCN. Hier zeigten wir vor allem Unterschiede zwischen Transkriptions- und Translationsprodukten der P2-Rezeptoren. Wir fanden im tageszeitlichen Verlauf deutliche Unterschiede der Expression von P2-Rezeptoren im SCN der Maus. Da diese Rezeptoren ATP binden, ist eine Anpassung der Rezeptorexpression an die unterschiedlichen tageszeitlichen ATP-Konzentrationen wahrscheinlich.

Auch wenn die Rolle von extrazellulärem ATP im Hypothalamus noch nicht hinreichend geklärt ist [177], deuten unsere Ergebnisse zur vielfältigen Expression von P2X-Rezeptoren im SCN auf eine gewisse Bedeutung der purinerger Signalübertragung in diesem hypothalamischen Kerngebiet hin.

### **5.3 Tageszeitlicher Verlauf der Proteinexpression im SCN**

Bislang wurden keine wissenschaftlichen Studien zur Untersuchung tageszeitlicher Unterschiede in der Proteinexpression der P2-Rezeptoren im SCN der Maus durchgeführt.

Es ist auffällig, dass tageszeitliche Unterschiede in der Rezeptorexpression innerhalb des SCN der Maus auf Proteinebene bei einer geringeren Anzahl an P2-Rezeptoren zu beobachten sind als auf mRNA-Ebene. Dies zeigte sich in unserer Studie durch den Vergleich beider Untersuchungsmethoden. Signifikante Unterschiede in der detektierten relativen mRNA-Expression finden sich für die Rezeptoren *P2X<sub>2</sub>*, *P2X<sub>3</sub>*, *P2X<sub>4</sub>*, *P2X<sub>5</sub>*, *P2X<sub>7</sub>*, *P2Y<sub>1</sub>*, *P2Y<sub>4</sub>*, *P2Y<sub>6</sub>*, *P2Y<sub>12</sub>* sowie *P2Y<sub>14</sub>*. Dies entspricht einer signifikanten Änderung der tageszeitlichen Transkriptmenge innerhalb des SCN bei

zehn von insgesamt 14 untersuchten P2-Rezeptoren. Dem gegenübergestellt findet sich eine signifikante Änderung des tageszeitlichen Proteinprodukts nur bei den P2-Rezeptoren P2X<sub>1</sub>, P2X<sub>3</sub>, P2X<sub>4</sub>, P2Y<sub>2</sub>, P2Y<sub>6</sub>, P2Y<sub>12</sub> sowie P2Y<sub>14</sub>. Da auf Proteinebene auch der Rezeptor P2Y<sub>11</sub> untersucht wurde, entspricht dies einer signifikanten Änderung der tageszeitlichen Proteinexpression im SCN der Maus bei sieben von 15 untersuchten P2-Rezeptoren. Offensichtlich werden die Transkriptionsprodukte der Rezeptoren P2X<sub>2</sub>, P2X<sub>5</sub>, P2X<sub>7</sub>, P2Y<sub>1</sub> und P2Y<sub>4</sub> im Tagesverlauf nicht synchron translatiert. In der Immunhistochemie zu erwartende signifikante Unterschiede im tageszeitlichen Verlauf des Translationsprodukts dieser Rezeptoren konnten von uns nicht nachgewiesen werden.

Von besonderer Relevanz sind vor allem Erkenntnisse darüber, welche Subtypen an P2-Rezeptoren im tageszeitlichen Verlauf unterschiedlich stark exprimiert werden. Anhand ihrer bekannten Funktion in anderen Geweben lassen sich hierdurch eventuell Rückschlüsse auf ihre Funktion im SCN ziehen.

In unseren Ergebnissen fällt vor allem der Rezeptor P2X<sub>4</sub> durch eine besonders starke Variation seiner tageszeitlichen Proteinexpression innerhalb des SCN auf. Wie aus unseren Ergebnissen ersichtlich, ist seine Expression in der späten Dunkelphase (ZT18 und ZT22) besonders stark. Interessanterweise zeigt sich diese starke Immunreaktion von P2X<sub>4</sub> verstärkt auf Zellsomata in der Region des vlSCN. Da der vlSCN zahlreiche afferente Faserverbindungen aus der Retina erhält und somit die Aktivität des SCN an die äußeren Lichtverhältnisse anpasst, vermuten wir eine Beteiligung von P2X<sub>4</sub> an der postsynaptischen Modulation von im SCN ankommenden retinalen Informationen. Generell sehen wir hier zwei Möglichkeiten der Regulation: (1) Regulation durch Lichtimpulse und (2) Regulation durch die Akkumulation von ATP. P2X<sub>4</sub> ist bei ZT18 und ZT22 besonders stark exprimiert, was durch eine Rezeptorsensibilisierung bei länger zurückliegender Lichtinformation (ZT10) erklärbar sein könnte, aber auch durch die unmittelbar bevorstehende Lichtphase (ZT02) begründet sein kann. Die hohe Expression von P2X<sub>4</sub> könnte auch durch eine ATP-Akkumulation zu den Zeitpunkten ZT18 und ZT22 bedingt sein. Zu diesen Zeitpunkten waren die Tiere bereits längere Zeit aktiv, sodass voraussichtlich ATP kumulierte. Dies könnte der Auslöser einer vermehrten Rezeptorbereitstellung für diesen Liganden sein. In Ergänzung zu den Ergebnissen von Bhattacharya et al. zur mRNA-Expression der Purinrezeptoren wäre daher anzunehmen, dass auch die spontane inhibitorische

postsynaptische Transmission im SCN zu diesen Tageszeiten besonders stark durch ATP beeinflusst werden kann.

Auch im Bereich des dichten Fasernetzwerks innerhalb des dmSCN zeigt P2X<sub>4</sub> eine deutliche Immunreaktion. Der dmSCN ist für die autonome Rhythmusgeneration des SCN und seine efferenten Verbindungen zu anderen Hirnregionen verantwortlich [141]. Diese Funktion des dmSCN setzt eine enge Kommunikation mit dem vlSCN voraus, sodass P2X<sub>4</sub> weiterhin auch eine entscheidende Rolle in der Signaltransduktion zwischen vlSCN und dmSCN spielen könnte. Da diese Signaltransduktion hauptsächlich durch GABAerge Neurotransmission vermittelt wird, könnte P2X<sub>4</sub> an der präsynaptischen Regulation der GABA-Freisetzung beteiligt sein.

Aufgrund seines ionotropen Aufbaus ist P2X<sub>4</sub> für eine schnelle Verarbeitung von synaptischen Kommunikationsprozessen bekannt. Da auch die zuvor beschriebenen Signale aus der Retina einer schnellen Verarbeitung verlangen, stützt dies unsere Hypothese einer Beteiligung von P2X<sub>4</sub> an diesem Prozess. Mit P2X<sub>1</sub> und P2X<sub>3</sub> fanden wir zwei weitere Rezeptoren, die der ionotropen Rezeptorfamilie zugehörig sind. Auch diese Rezeptoren zeigen – wie P2X<sub>4</sub> – eine verstärkte Immunreaktivität im SCN in der späten Dunkelphase. Da diese Immunreaktion nicht so stark ausgeprägt ist wie bei P2X<sub>4</sub>, könnte dies auf einen nur geringeren Einfluss auf die Verarbeitung retinaler Informationen innerhalb des SCN hindeuten. Womöglich unterstützen die Rezeptoren P2X<sub>1</sub> und P2X<sub>3</sub> die Funktion von P2X<sub>4</sub> im SCN. In der frühen Lichtphase zeigten sowohl P2X<sub>1</sub> und P2X<sub>3</sub> als auch P2X<sub>4</sub> eine geringe bis moderate Immunreaktion im SCN. Betrachtet man dazu die zuvor beschriebenen Maxima der tageszeitlichen mRNA-Expression von P2X<sub>1</sub>, P2X<sub>3</sub> und P2X<sub>4</sub>, so findet sich eine korrespondierende Änderung der entsprechenden Proteinexpression innerhalb der darauffolgenden 4-6 Stunden.

Auch bei der Betrachtung der Immunreaktion der Rezeptoren P2X<sub>2</sub>, P2X<sub>5</sub>, P2X<sub>6</sub> und P2X<sub>7</sub>, die alle keine signifikanten tageszeitlichen Unterschiede in der Proteinexpression zeigten, fand sich eine geringe bis moderate Proteinexpression zu Beginn der Lichtphase. Für den Rezeptor P2X<sub>2</sub> fanden wir sogar eine über den gesamten Tagesverlauf hinweg geringe Immunreaktivität im SCN der Maus. Dies deckt sich mit den Ergebnissen von Bhattacharya et al. 2013, die für P2X<sub>2</sub> ebenfalls eine geringe Immunreaktivität im SCN der Ratte zeigten [144]. Mit der Ausnahme von P2X<sub>7</sub> zeigten alle P2X-Rezeptoren eine homogene, isointense Immunreaktivität

sowohl im Bereich des vSCN als auch im Bereich des dmSCN. Dies steht im Einklang mit den Ergebnissen von Bhattacharya et al. 2013, die zeigen, dass ATP – über die Aktivierung präsynaptischer P2X-Rezeptoren – die Freisetzung des Neurotransmitters GABA im vSCN und dmSCN stimuliert [144]. In unserer Studie fanden wir für den Rezeptor P2X<sub>7</sub> eine stärkere Immunreaktion im dmSCN. Eine mögliche Erklärung dafür könnte das nachweisliche Fehlen einer Beteiligung von P2X<sub>7</sub> an der ATP-stimulierten GABA-Freisetzung durch SCN-Zellen sein [144]. Es konnte gezeigt werden, dass P2X<sub>7</sub> die Regulation der ATP-stimulierten intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Konzentration übernimmt [144].

Bei den signifikanten Unterschieden in der tageszeitlichen Proteinexpression der P2Y-Rezeptoren P2Y<sub>2</sub>, P2Y<sub>6</sub>, P2Y<sub>12</sub> und P2Y<sub>14</sub> finden sich keine derart starken Änderungen wie beim P2X-Rezeptor P2X<sub>4</sub>. Dies mag an der vom P2X<sub>4</sub>-Rezeptor abweichenden Zugehörigkeit der P2Y-Rezeptorklasse zur G-Protein-gekoppelten Rezeptorfamilie liegen. Da G-Protein-gekoppelte Rezeptoren keine Ionenkanäle bilden und sich hauptsächlich an der direkten und indirekten Regulation zellulärer Signalkaskaden beteiligen, benötigen sie für die zelluläre Informationsverarbeitung länger als P2X-Rezeptoren. Es ist daher anzunehmen, dass auch die Transkription und Translation der P2-Rezeptoren nicht derart schnellen Änderungen ausgesetzt ist, wie die der P2X-Rezeptoren. Betrachtet man in diesem Zusammenhang die signifikanten Unterschiede im tageszeitlichen Verlauf der Transkriptmenge von P2Y<sub>1</sub>, P2Y<sub>4</sub>, P2Y<sub>6</sub>, P2Y<sub>12</sub> und P2Y<sub>14</sub> so ist auffällig, dass die korrespondierenden Translationsprodukte erst in einem zeitlichen Abstand von ca. 12 Stunden eine immunreaktive Änderung zeigen. Bei den P2X-Rezeptoren erfolgte dies mit 4-6 Stunden bedeutend schneller. Auch bei den P2Y-Rezeptoren findet sich zu Beginn der Lichtphase eine geringe bis moderate Immunreaktion im SCN. P2Y<sub>2</sub>, P2Y<sub>12</sub> sowie P2Y<sub>14</sub> zeigen sogar ihre stärkste Immunreaktion zu Beginn der Lichtphase. P2Y<sub>6</sub> weist hingegen seine stärkste Immunreaktion in der Mitte der Lichtphase auf. Mit Ausnahme des Rezeptors P2Y<sub>12</sub>, der im Bereich des dmSCN eine stärkere Immunreaktion aufweist als im vSCN, findet sich bei den Rezeptoren P2Y<sub>1</sub>, P2Y<sub>2</sub>, P2Y<sub>4</sub>, P2Y<sub>6</sub>, P2Y<sub>11</sub>, P2Y<sub>13</sub> und P2Y<sub>14</sub> eine homogene, isointense Immunreaktion im vSCN und dmSCN. Diese Rezeptoren sind an der Modulation der ATP-stimulierten GABA-Freisetzung durch SCN-Zellen beteiligt [144]. P2Y<sub>12</sub> ist – genau wie P2X<sub>7</sub> – nicht an der Modulation der ATP-stimulierten GABA-Freisetzung durch SCN-Zellen beteiligt, sondern übernimmt ebenfalls die Regulation der ATP-stimulierten intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Konzentration [144].

Interessanterweise zeigte der Rezeptor P2Y<sub>13</sub> eine deutlich ausgeprägte Immunreaktion in Fasern des Chiasma opticum sowie in der Region des vSCN. Bekanntermaßen sind die Projektionen zwischen Retina und SCN über den RHT bedeutsam für die Anpassung des zirkadianen Rhythmus an die vorherrschenden äußeren Lichtverhältnisse. Weiterhin ist hinreichend bekannt, dass diese Projektionen über Fasern im Chiasma opticum verlaufen und über glutamaterge und PACAPerge (*pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide*) Neurotransmission ihre biochemische Information dem SCN übermitteln [205, 206]. Glutamat führt dabei zu Phasenverschiebungen des vom SCN-generierten Rhythmus während der Nacht, wohingegen PACAP derartige Phasenverschiebungen bei Tag reguliert [207, 208]. Aufgrund der Immunreaktion von P2Y<sub>13</sub> in Fasern des Chiasma opticum vermuten wir eine Modulation der Freisetzung von Glutamat und PACAP, die durch diesen Rezeptor vermittelt wird. Diese Hypothese wird durch Studien gestützt, die gezeigt haben, dass P2-Rezeptoren die Fähigkeit zur Steuerung der Freisetzung zahlreicher Neurotransmitter besitzen [144, 180, 209]. Für einige dieser Neurotransmitter – mitunter auch ATP – konnte eine Beeinflussung durch das zirkadiane System gezeigt werden. Womac et al. 2009 zeigten, dass die Konzentration extrazellulären ATPs im SCN der Ratte einem tageszeitlichen Rhythmus unterliegt [151]. Sie stellten fest, dass das Maximum der extrazellulären ATP-Konzentration zur Mitte der Dunkelphase auftritt [151]. Der von uns beschriebene Anstieg der Immunreaktivität von P2X<sub>4</sub> und P2X<sub>3</sub> zum Ende der Dunkelphase fällt in den Zeitraum einer erhöhten ATP-Konzentration innerhalb des SCN. Kurz nach dem Maximum der extrazellulären ATP-Konzentration steigt auch die Immunreaktivität der Rezeptoren P2Y<sub>2</sub>, P2Y<sub>12</sub>, P2Y<sub>14</sub> und P2Y<sub>6</sub> in der frühen Lichtphase an. Dieser verspätete Anstieg der Rezeptorexpression der P2Y-Rezeptoren könnte eine kompensatorische Anpassung an die fallende Konzentration des Agonisten ATP darstellen.

Auch für die Ektonukleotidasen, die durch schnelle hydrolytische Spaltung die Wirkung extrazellulären ATPs an P2-Rezeptoren terminieren, konnte eine zirkadiane Regulation in diversen Hirnregionen gezeigt werden [210, 211]. Durch die tageszeitliche Regulation der Ektonukleotidasen wird eine Desensibilisierung der P2-Rezeptoren durch ein Übermaß an ATP verhindert [212].

#### **5.4 Zirkadianer Verlauf der Proteinexpression im SCN**

Im Rahmen unserer Studie untersuchten wir auch den Einfluss von Licht auf die Expression der P2X<sub>4</sub>- und P2Y<sub>2</sub>-Rezeptoren. Unter Dauerdunkelheit (12D:12D) zeigten diese Rezeptoren zu den Zeitpunkten CT02 und CT22 keine signifikanten Unterschiede ihres Expressionsmusters. Unter Lichteinfluss sind die Unterschiede zu den Zeitpunkten ZT02 und ZT22 jedoch signifikant. Studien hierzu wurden bisher von anderen Arbeitsgruppen nicht durchgeführt. Unsere Hypothese ist daher, dass die tageszeitlichen Expressionsunterschiede von P2X<sub>4</sub> und P2Y<sub>2</sub> unter 12L:12D durch Licht getriggert sind. Kritisch sei jedoch anzumerken, dass wir unter 12D:12D nur zwei Zeitpunkte (CT02 und CT22) untersucht haben. Es kann daher nicht ausgeschlossen werden, dass die Phasenlage im Rhythmus der Rezeptorexpression unter diesen Dauerdunkel-Bedingungen verschoben ist und somit signifikante Unterschiede zu anderen Zeitpunkten beobachtet werden könnten.

#### **5.5 Ausblick**

Die Ergebnisse unserer Studie zeigen eine deutliche tageszeitliche Abhängigkeit der Gen- sowie Proteinexpression einzelner Purinrezeptoren im SCN der Maus. Zu den beiden Zeitpunkten unter Dauerdunkelbedingungen konnten keine Expressionsunterschiede festgestellt werden. Dies deutet darauf hin, dass entweder die rhythmische Expression von den rhythmischen Licht-Dunkelbedingungen angetrieben wird oder die Phasenlage der rhythmischen Expression unter Dauerdunkelbedingungen verschoben ist. Um dies zu klären, sollten die Experimente in Dauerdunkelheit mit Probennahme in kurzen zeitlichen Intervallen wiederholt werden.

Im SCN finden sich neben Astrozyten unterschiedliche Populationen von Neuronen, die sich durch unterschiedlichen Gehalt von Neurotransmittern wie GABA und Neuropeptiden wie VIP und AVP auszeichnen und unterschiedliche Funktionen ausüben. Da wir mit dieser Studie keine Aussagen über die Expression der Purinrezeptoren in den unterschiedlichen Zelltypen treffen können, sollten sich detaillierte Kolokalisationsstudien anschließen.



## 6 Literaturverzeichnis

1. Pflug, H.D., *Early diversification of life in the Archaean*. Zentralblatt für Bakteriologie Mikrobiologie und Hygiene: I. Abt. Originale C: Allgemeine, angewandte und ökologische Mikrobiologie, **1982**. 3(1): p. 53-64.
2. Woese, C., *The universal ancestor*. Proceedings of the National Academy of Sciences, **1998**. 95(12): p. 6854-6859.
3. Abrams, R. and M. Bentley, *Biosynthesis of nucleic acid purines. II. Role of hypoxanthine and xanthine compounds*. Arch Biochem Biophys, **1955**. 58(1): p. 109-18.
4. Mc, C.R. and C.M. Walsham, *The digestibility and absorption of the calories, proteins, purines, fat and calcium in wholemeal wheaten bread*. Br J Nutr, **1948**. 2(1): p. 26-41.
5. Watson, J.D. and F.H. Crick, *Genetical implications of the structure of deoxyribonucleic acid*. Nature, **1953**. 171(4361): p. 964-7.
6. Watson, J.D. and F.H. Crick, *Molecular structure of nucleic acids; a structure for deoxyribose nucleic acid*. Nature, **1953**. 171(4356): p. 737-8.
7. Watson, J.D. and F.H. Crick, *The structure of DNA*. Cold Spring Harb Symp Quant Biol, **1953**. 18: p. 123-31.
8. Rosemeyer, H., *The Chemodiversity of Purine as a Constituent of Natural Products*. Chemistry & Biodiversity, **2004**. 1(3): p. 361-401.
9. Ponnamperna, C., C. Sagan, and R. Mariner, *Synthesis of adenosine triphosphate under possible primitive earth conditions*. Nature, **1963**. 199.
10. Galimov, E.M., *Concept of sustained ordering and an ATP-related mechanism of life's origin*. International journal of molecular sciences, **2009**. 10(5): p. 2019-2030.
11. Feig, S.A., et al., *Energy metabolism in human erythrocytes. II. Effects of glucose depletion*. J Clin Invest, **1972**. 51(6): p. 1547-54.
12. Verkhatsky, A. and G. Burnstock, *Biology of purinergic signalling: its ancient evolutionary roots, its omnipresence and its multiple functional significance*. Bioessays, **2014**. 36(7): p. 697-705.
13. Lee, K.S. and B.C. Shin, *Studies on the active transport of calcium in human red cells*. J Gen Physiol, **1969**. 54(6): p. 713-29.
14. Adsett, C.A., *EMOTIONAL REACTIONS TO DISFIGUREMENT FROM CANCER THERAPY*. Can Med Assoc J, **1963**. 89: p. 385-91.

15. Drury, A.N. and A. Szent-Gyorgyi, *The physiological activity of adenine compounds with especial reference to their action upon the mammalian heart.* J Physiol, **1929**. 68(3): p. 213-37.
16. Barsoum, G.S. and J.H. Gaddum, *The pharmacological estimation of adenosine and histamine in blood.* J Physiol, **1935**. 85(1): p. 1-14.
17. Green, H.N. and H.B. Stoner, *Biological actions of the adenine nucleotides.* Biological actions of the adenine nucleotides., **1950**.
18. Holton, F.A. and P. Holton, *The capillary dilator substances in dry powders of spinal roots; a possible role of adenosine triphosphate in chemical transmission from nerve endings.* J Physiol, **1954**. 126(1): p. 124-40.
19. Holton, P., *The liberation of adenosine triphosphate on antidromic stimulation of sensory nerves.* J Physiol, **1959**. 145(3): p. 494-504.
20. Berne, R.M., *Cardiac nucleotides in hypoxia: possible role in regulation of coronary blood flow.* Am J Physiol, **1963**. 204: p. 317-22.
21. Robinson, F. and R.A. Hughes, *Effects of adenine compounds on electrocortical activity.* J Neurophysiol, **1951**. 14(5): p. 387-98.
22. Burnstock, G., et al., *Evidence that adenosine triphosphate or a related nucleotide is the transmitter substance released by non-adrenergic inhibitory nerves in the gut.* Br J Pharmacol, **1970**. 40(4): p. 668-88.
23. Hansen, M.B., *The enteric nervous system II: gastrointestinal functions.* Pharmacol Toxicol, **2003**. 92(6): p. 249-57.
24. Hansen, M.B., *Neurohumoral control of gastrointestinal motility.* Physiol Res, **2003**. 52(1): p. 1-30.
25. Burnstock, G., et al., *INHIBITION OF THE SMOOTH MUSCLE ON THE TAENIA COLI.* Nature, **1963**. 200: p. 581-2.
26. Burnstock, G., et al., *INNERVATION OF THE GUINEA-PIG TAENIA COLI: ARE THERE INTRINSIC INHIBITORY NERVES WHICH ARE DISTINCT FROM SYMPATHETIC NERVES?* Int J Neuropharmacol, **1964**. 3: p. 163-6.
27. Holman, M.E. and J.R. Hughes, *An inhibitory component of the response to distension of rat ileum.* Nature, **1965**. 207(997): p. 641-2.
28. Holman, M.E. and J.R. Hughes, *INHIBITION OF INTESTINAL SMOOTH MUSCLE.* Aust J Exp Biol Med Sci, **1965**. 43: p. 277-90.
29. Martinson, J., *Vagal relaxation of the stomach. Experimental re-investigation of the concept of the transmission mechanism.* Acta Physiol Scand, **1965**. 64(4): p. 453-62.

30. Burnstock, G., G. Campbell, and M.J. Rand, *The inhibitory innervation of the taenia of the guinea-pig caecum*. J Physiol, **1966**. 182(3): p. 504-26.
31. Burnstock, G., *Purinergic signalling: past, present and future*. Braz J Med Biol Res, **2009**. 42(1): p. 3-8.
32. Eccles, J.C., *physiology of synapses*. **1964**.
33. Burnstock, G., *Do some nerve cells release more than one transmitter?* Neuroscience, **1976**. 1(4): p. 239-48.
34. Eccles, J., *From electrical to chemical transmission in the central nervous system*. Notes Rec R Soc Lond, **1976**. 30(2): p. 219-30.
35. Burnstock, G., *Physiology and pathophysiology of purinergic neurotransmission*. Physiol Rev, **2007**. 87(2): p. 659-797.
36. Burnstock, G., *Purinergic receptors*. J Theor Biol, 1976. 62(2): p. 491-503.
37. Edwards, F.A., A.J. Gibb, and D. Colquhoun, *ATP receptor-mediated synaptic currents in the central nervous system*. Nature, **1992**. 359(6391): p. 144-7.
38. Evans, R.J., V. Derkach, and A. Surprenant, *ATP mediates fast synaptic transmission in mammalian neurons*. Nature, **1992**. 357(6378): p. 503-5.
39. Silinsky, E.M., V. Gerzanich, and S.M. Vanner, *ATP mediates excitatory synaptic transmission in mammalian neurones*. Br J Pharmacol, **1992**. 106(4): p. 762-3.
40. Kuroda, Y. and H. McIlwain, *Subcellular localization of (14C)adenine derivatives newly-formed in cerebral tissues and the effects of electrical excitation*. J Neurochem, **1973**. 21(4): p. 889-900.
41. Shimizu, H. and H. Okayama, *An ATP pool associated with adenylyl cyclase of brain tissue*. J Neurochem, **1973**. 20(4): p. 1279-83.
42. Phillis, J.W., G.K. Kostopoulos, and J.J. Limacher, *A potent depressant action of adenine derivatives on cerebral cortical neurones*. Eur J Pharmacol, **1975**. 30(1): p. 125-9.
43. Bodin, P. and G. Burnstock, *Purinergic signalling: ATP release*. Neurochem Res, **2001**. 26(8-9): p. 959-69.
44. Lazarowski, E.R., et al., *Molecular mechanisms of purine and pyrimidine nucleotide release*. Adv Pharmacol, **2011**. 61: p. 221-61.
45. Parpura, V., E. Scemes, and D.C. Spray, *Mechanisms of glutamate release from astrocytes: gap junction "hemichannels", purinergic receptors and exocytotic release*. Neurochem Int, **2004**. 45(2-3): p. 259-64.

46. Grondal, E.J. and H. Zimmermann, *Ectonucleotidase activities associated with cholinergic synaptosomes isolated from Torpedo electric organ*. J Neurochem, **1986**. 47(3): p. 871-81.
47. Zimmermann, H., *Extracellular metabolism of ATP and other nucleotides*. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol, **2000**. 362(4-5): p. 299-309.
48. Burnstock, G., *Neural nomenclature*. Nature, **1971**. 229(5282): p. 282-3.
49. Axelsson, J. and B. Holmberg, *The effects of extracellularly applied ATP and related compounds on electrical and mechanical activity of the smooth muscle taenia coli from the guinea-pig*. Acta Physiol Scand, **1969**. 75(1): p. 149-56.
50. Stafford, A., *Potentiation of adenosine and the adenine nucleotides by dipyridamole*. Br J Pharmacol Chemother, **1966**. 28(2): p. 218-27.
51. Burnstock, G., *A basis for distinguishing two types of purinergic receptor*. Cell membrane receptors for drugs and hormones: a multidisciplinary approach, **1978**: p. 107-118.
52. Majumder, P., et al., *New insights into purinergic receptor signaling in neuronal differentiation, neuroprotection, and brain disorders*. Purinergic Signalling, **2007**. 3(4): p. 317-331.
53. Thimm, D., et al., *Characterization of new G protein-coupled adenine receptors in mouse and hamster*. Purinergic Signal, **2013**. 9(3): p. 415-26.
54. Gustafsson, L., et al., *Inhibition of acetylcholine release in guinea pig ileum by adenosine*. Acta Physiol Scand, **1978**. 104(4): p. 469-78.
55. Sattin, A. and T.W. Rall, *The effect of adenosine and adenine nucleotides on the cyclic adenosine 3', 5'-phosphate content of guinea pig cerebral cortex slices*. Mol Pharmacol, **1970**. 6(1): p. 13-23.
56. Cobbin, L.B., R. Einstein, and M.H. Maguire, *Studies on the coronary dilator actions of some adenosine analogues*. Br J Pharmacol, **1974**. 50(1): p. 25-33.
57. van Calker, D., M. Muller, and B. Hamprecht, *Adenosine regulates via two different types of receptors, the accumulation of cyclic AMP in cultured brain cells*. J Neurochem, **1979**. 33(5): p. 999-1005.
58. Stone, T., *Purine receptors classification: a point for discussion*. Trends in Pharmacological Sciences, **1984**. 5: p. 492-493.
59. Londos, C., D.M. Cooper, and J. Wolff, *Subclasses of external adenosine receptors*. Proc Natl Acad Sci U S A, **1980**. 77(5): p. 2551-4.
60. Libert, F., et al., *Selective amplification and cloning of four new members of the G protein-coupled receptor family*. Science, **1989**. 244(4904): p. 569-72.

61. Ribeiro, J.A. and A.M. Sebastiao, *Adenosine receptors and calcium: basis for proposing a third (A3) adenosine receptor*. Prog Neurobiol, **1986**. 26(3): p. 179-209.
62. Burnstock, G. and C. Kennedy, *Is there a basis for distinguishing two types of P2-purinoceptor?* Gen Pharmacol, **1985**. 16(5): p. 433-40.
63. Krugel, U., *Purinergic receptors in psychiatric disorders*. Neuropharmacology, **2016**. 104: p. 212-25.
64. North, A.R., *P2X purinoceptor plethora*. Seminars in Neuroscience, **1996**. 8(4): p. 187-194.
65. Abbracchio, M.P. and G. Burnstock, *Purinoceptors: are there families of P2X and P2Y purinoceptors?* Pharmacol Ther, **1994**. 64(3): p. 445-75.
66. Hsu, S.M. and E. Soban, *Color modification of diaminobenzidine (DAB) precipitation by metallic ions and its application for double immunohistochemistry*. J Histochem Cytochem, **1982**. 30(10): p. 1079-82.
67. Khakh, B.S., et al., *International union of pharmacology. XXIV. Current status of the nomenclature and properties of P2X receptors and their subunits*. Pharmacol Rev, **2001**. 53(1): p. 107-18.
68. Khakh, B.S., *Molecular physiology of P2X receptors and ATP signalling at synapses*. Nat Rev Neurosci, **2001**. 2(3): p. 165-74.
69. Kawate, T., et al., *Crystal structure of the ATP-gated P2X(4) ion channel in the closed state*. Nature, **2009**. 460(7255): p. 592-8.
70. Brake, A.J., M.J. Wagenbach, and D. Julius, *New structural motif for ligand-gated ion channels defined by an ionotropic ATP receptor*. Nature, **1994**. 371(6497): p. 519-23.
71. Valera, S., et al., *A new class of ligand-gated ion channel defined by P2x receptor for extracellular ATP*. Nature, **1994**. 371(6497): p. 516-9.
72. Burnstock, G., *Purinergic signalling: Its unpopular beginning, its acceptance and its exciting future*. Bioessays, **2012**. 34(3): p. 218-25.
73. Pankratov, Y., et al., *P2X receptors and synaptic plasticity*. Neuroscience, **2009**. 158(1): p. 137-48.
74. Sperlagh, B., A. Heinrich, and C. Csölle, *P2 receptor-mediated modulation of neurotransmitter release-an update*. Purinergic Signal, **2007**. 3(4): p. 269-84.
75. Cham, J.L., et al., *P2X purinoceptor subtypes on paraventricular nucleus neurones projecting to the rostral ventrolateral medulla in the rat*. Exp Physiol, **2006**. 91(2): p. 403-11.

76. Rubio, M.E. and F. Soto, *Distinct Localization of P2X receptors at excitatory postsynaptic specializations*. J Neurosci, **2001**. 21(2): p. 641-53.
77. Rodrigues, R.J., et al., *Presynaptic P2X1-3 and  $\alpha$ 3-containing nicotinic receptors assemble into functionally interacting ion channels in the rat hippocampus*. Neuropharmacology, **2016**. 105: p. 241-257.
78. Xiang, Z., et al., *Localization of ATP-gated P2X2 receptor immunoreactivity in the rat hypothalamus*. Brain Res, **1998**. 813(2): p. 390-7.
79. Loesch, A., S. Miah, and G. Burnstock, *Ultrastructural localisation of ATP-gated P2X2 receptor immunoreactivity in the rat hypothalamo-neurohypophysial system*. J Neurocytol, **1999**. 28(6): p. 495-504.
80. Le<sup>^</sup>, K.T., et al., *Sensory presynaptic and widespread somatodendritic immunolocalization of central ionotropic P2X ATP receptors*. Neuroscience, **1998**. 83(1): p. 177-190.
81. Guo, W., et al., *Expression of P2X5 receptors in the mouse CNS*. Neuroscience, **2008**. 156(3): p. 673-692.
82. Atkinson, L., et al., *An ATP-gated ion channel at the cell nucleus*. Nature, **2002**. 420(6911): p. 42.
83. Florenzano, F., et al., *Cerebellar lesion up-regulates P2X1 and P2X2 purinergic receptors in precerebellar nuclei*. Neuroscience, **2002**. 115(2): p. 425-34.
84. Wollmann, G., C. Acuna-Goycolea, and A.N. van den Pol, *Direct excitation of hypocretin/orexin cells by extracellular ATP at P2X receptors*. J Neurophysiol, **2005**. 94(3): p. 2195-206.
85. Kanjhan, R., et al., *Localization of ATP-gated ion channels in cerebellum using P2x2R subunit-specific antisera*. Neuroreport, **1996**. 7(15-17): p. 2665-9.
86. Collden, G., C. Mangano, and B. Meister, *P2X2 purinoreceptor protein in hypothalamic neurons associated with the regulation of food intake*. Neuroscience, **2010**. 171(1): p. 62-78.
87. Wang, Y., et al., *Impaired long-term depression in P2X3 deficient mice is not associated with a spatial learning deficit*. J Neurochem, **2006**. 99(5): p. 1425-34.
88. Sim, J.A., et al., *Altered hippocampal synaptic potentiation in P2X4 knock-out mice*. J Neurosci, **2006**. 26(35): p. 9006-9.
89. Hejjas, K., et al., *Association between depression and the Gln460Arg polymorphism of P2RX7 gene: a dimensional approach*. Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet, **2009**. 150b(2): p. 295-9.
90. Brockhaus, J., et al., *Purinergic modulation of synaptic input to Purkinje neurons in rat cerebellar brain slices*. Eur J Neurosci, **2004**. 19(8): p. 2221-30.

91. Burnstock, G., *P2X receptors in sensory neurones*. Br J Anaesth, **2000**. 84(4): p. 476-88.
92. Krueger, J.M., et al., *ATP and the purine type 2 X7 receptor affect sleep*. J Appl Physiol (1985), **2010**. 109(5): p. 1318-27.
93. Labrousse, V.F., et al., *Impaired interleukin-1beta and c-Fos expression in the hippocampus is associated with a spatial memory deficit in P2X(7) receptor-deficient mice*. PLoS One, **2009**. 4(6): p. e6006.
94. Basso, A.M., et al., *Behavioral profile of P2X7 receptor knockout mice in animal models of depression and anxiety: relevance for neuropsychiatric disorders*. Behav Brain Res, **2009**. 198(1): p. 83-90.
95. Ralevic, V. and G. Burnstock, *Receptors for purines and pyrimidines*. Pharmacol Rev, 1998. 50(3): p. 413-92.
96. Communi, D., et al., *Identification of a novel human ADP receptor coupled to G(i)*. J Biol Chem, **2001**. 276(44): p. 41479-85.
97. Moore, D.J., et al., *Expression pattern of human P2Y receptor subtypes: a quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction study*. Biochim Biophys Acta, **2001**. 1521(1-3): p. 107-19.
98. Verkhratsky, A., *Physiology and pathophysiology of the calcium store in the endoplasmic reticulum of neurons*. Physiol Rev, **2005**. 85(1): p. 201-79.
99. Abbracchio, M.P., et al., *International Union of Pharmacology LVIII: update on the P2Y G protein-coupled nucleotide receptors: from molecular mechanisms and pathophysiology to therapy*. Pharmacol Rev, **2006**. 58(3): p. 281-341.
100. Ecke, D., et al., *Hetero-oligomerization of the P2Y11 receptor with the P2Y1 receptor controls the internalization and ligand selectivity of the P2Y11 receptor*. Biochem J, **2008**. 409(1): p. 107-16.
101. Fischer, W. and U. Krugel, *P2Y receptors: focus on structural, pharmacological and functional aspects in the brain*. Curr Med Chem, **2007**. 14(23): p. 2429-55.
102. Burnstock, G., et al., *Purinergic signalling: From normal behaviour to pathological brain function*. Progress in Neurobiology, **2011**. 95(2): p. 229-274.
103. Franke, H., et al., *P2 receptor-types involved in astrogliosis in vivo*. Br J Pharmacol, **2001**. 134(6): p. 1180-9.
104. Fumagalli, M., et al., *Cloning, pharmacological characterisation and distribution of the rat G-protein-coupled P2Y13 receptor*. Biochemical Pharmacology, **2004**. 68(1): p. 113-124.
105. Fricks, I.P., *Molecular pharmacology and function of the P2Y14 receptor*. **2009**: THE UNIVERSITY OF NORTH CAROLINA AT CHAPEL HILL.

106. Guzman, S.J., et al., *P2Y1 receptors inhibit long-term depression in the prefrontal cortex*. *Neuropharmacology*, **2010**. 59(6): p. 406-15.
107. Sergeeva, O.A., et al., *P2Y receptor-mediated excitation in the posterior hypothalamus*. *Eur J Neurosci*, **2006**. 24(5): p. 1413-26.
108. Kittner, H., et al., *Stimulation of P2Y1 receptors causes anxiolytic-like effects in the rat elevated plus-maze: implications for the involvement of P2Y1 receptor-mediated nitric oxide production*. *Neuropsychopharmacology*, **2003**. 28(3): p. 435-44.
109. Koizumi, S., et al., *UDP acting at P2Y(6) receptors is a mediator of microglial phagocytosis*. *Nature*, **2007**. 446(7139): p. 1091-1095.
110. Dreisig, K. and B.R. Kornum, *A critical look at the function of the P2Y11 receptor*. *Purinergic Signalling*, **2016**. 12(3): p. 427-437.
111. Liu, F., U.S. Tantry, and P.A. Gurbel, *P2Y12 receptor inhibitors for secondary prevention of ischemic stroke*. *Expert Opin Pharmacother*, **2015**. 16(8): p. 1149-65.
112. Moore, C.S., et al., *P2Y12 expression and function in alternatively activated human microglia*. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm*, **2015**. 2(2): p. e80.
113. Perez-Sen, R., et al., *Neuroprotection Mediated by P2Y13 Nucleotide Receptors in Neurons*. *Comput Struct Biotechnol J*, **2015**. 13: p. 160-8.
114. Bugge, A., et al., *Rev-erbalpha and Rev-erbbeta coordinately protect the circadian clock and normal metabolic function*. *Genes Dev*, **2012**. 26(7): p. 657-67.
115. Ingenwerth, M., et al., *Perturbation of the molecular clockwork in the SCN of non-obese diabetic mice prior to diabetes onset*. *Chronobiol Int*, **2016**. 33(10): p. 1369-1375.
116. Turek, F.W., *Circadian neural rhythms in mammals*. *Annu Rev Physiol*, **1985**. 47: p. 49-64.
117. von Gall, C. and D.R. Weaver, *Loss of responsiveness to melatonin in the aging mouse suprachiasmatic nucleus*. *Neurobiol Aging*, **2008**. 29(3): p. 464-70.
118. Grünthal, E., *Vergleichend anatomische und entwicklungsgeschichtliche Untersuchungen über die Zentren des Hypothalamus der Säuger und des Menschen*. *European Archives of Psychiatry and Clinical Neuroscience*, **1930**. 90(1): p. 216-267.
119. Bos, N.P. and M. Mirmiran, *Circadian rhythms in spontaneous neuronal discharges of the cultured suprachiasmatic nucleus*. *Brain Res*, **1990**. 511(1): p. 158-62.



120. Reppert, S.M. and D.R. Weaver, *Coordination of circadian timing in mammals*. Nature, **2002**. 418(6901): p. 935-41.
121. Liu, C. and S.M. Reppert, *GABA synchronizes clock cells within the suprachiasmatic circadian clock*. Neuron, **2000**. 25(1): p. 123-8.
122. van Esseveldt, L.E., M.N. Lehman, and G.J. Boer, *The suprachiasmatic nucleus and the circadian time-keeping system revisited*. Brain Research Reviews, **2000**. 33(1): p. 34-77.
123. Gachon, F., et al., *The mammalian circadian timing system: from gene expression to physiology*. Chromosoma, **2004**. 113(3): p. 103-112.
124. Balsalobre, A., F. Damiola, and U. Schibler, *A serum shock induces circadian gene expression in mammalian tissue culture cells*. Cell, **1998**. 93(6): p. 929-37.
125. Dibner, C., U. Schibler, and U. Albrecht, *The mammalian circadian timing system: organization and coordination of central and peripheral clocks*. Annu Rev Physiol, **2010**. 72: p. 517-49.
126. Cahill, G.M. and M. Menaker, *Responses of the suprachiasmatic nucleus to retinohypothalamic tract volleys in a slice preparation of the mouse hypothalamus*. Brain Res, **1989**. 479(1): p. 65-75.
127. Tokura, H. and J. Aschoff, *Effects of temperature on the circadian rhythm of pig-tailed macaques *Macaca nemestrina**. Am J Physiol, **1983**. 245(6): p. R800-4.
128. Sweeney, B.M., *Resetting the Biological Clock in *Gonyaulax* with Ultraviolet Light*. Plant Physiol, **1963**. 38(6): p. 704-8.
129. Decoursey, P.J., *Phase control of activity in a rodent*. Cold Spring Harb Symp Quant Biol, **1960**. 25: p. 49-55.
130. Winget, C.M., et al., *Mechanisms of action of light on circadian rhythms in the monkey*. Life Sci Space Res, **1970**. 8: p. 247-58.
131. LeSauter, J., et al., *A short half-life GFP mouse model for analysis of suprachiasmatic nucleus organization*. Brain Res, **2003**. 964(2): p. 279-87.
132. Van den Pol, A.N., *The hypothalamic suprachiasmatic nucleus of rat: intrinsic anatomy*. J Comp Neurol, **1980**. 191(4): p. 661-702.
133. Gillette, M.U. and S.M. Reppert, *The hypothalamic suprachiasmatic nuclei: circadian patterns of vasopressin secretion and neuronal activity in vitro*. Brain Res Bull, **1987**. 19(1): p. 135-9.
134. Moore, R.Y. and N.J. Lenn, *A retinohypothalamic projection in the rat*. J Comp Neurol, **1972**. 146(1): p. 1-14.

135. Hattar, S., et al., *Melanopsin-containing retinal ganglion cells: architecture, projections, and intrinsic photosensitivity*. *Science*, **2002**. 295(5557): p. 1065-70.
136. Swanson, L.W., W.M. Cowan, and E.G. Jones, *An autoradiographic study of the efferent connections of the ventral lateral geniculate nucleus in the albino rat and the cat*. *J Comp Neurol*, **1974**. 156(2): p. 143-63.
137. Pfeffer, M., H.W. Korf, and C. von Gall, *Chronotype and stability of spontaneous locomotor activity rhythm in BMAL1-deficient mice*. *Chronobiol Int*, **2015**. 32(1): p. 81-91.
138. von Gall, C., et al., *Clock gene protein mPER1 is rhythmically synthesized and under cAMP control in the mouse pineal organ*. *J Neuroendocrinol*, **2001**. 13(4): p. 313-6.
139. Field, M.D., et al., *Analysis of clock proteins in mouse SCN demonstrates phylogenetic divergence of the circadian clockwork and resetting mechanisms*. *Neuron*, **2000**. 25(2): p. 437-47.
140. Leak, R.K., J.P. Card, and R.Y. Moore, *Suprachiasmatic pacemaker organization analyzed by viral transynaptic transport*. *Brain Res*, **1999**. 819(1-2): p. 23-32.
141. Moore, R.Y., J.C. Speh, and R.K. Leak, *Suprachiasmatic nucleus organization*. *Cell Tissue Res*, **2002**. 309(1): p. 89-98.
142. Collo, G., et al., *Cloning OF P2X5 and P2X6 receptors and the distribution and properties of an extended family of ATP-gated ion channels*. *J Neurosci*, **1996**. 16(8): p. 2495-507.
143. Xiang, Z., C. He, and G. Burnstock, *P2X5 receptors are expressed on neurons containing arginine vasopressin and nitric oxide synthase in the rat hypothalamus*. *Brain Res*, **2006**. 1099(1): p. 56-63.
144. Bhattacharya, A., et al., *Potentialiation of inhibitory synaptic transmission by extracellular ATP in rat suprachiasmatic nuclei*. *J Neurosci*, **2013**. 33(18): p. 8035-44.
145. Vulchanova, L., et al., *Differential distribution of two ATP-gated channels (P2X receptors) determined by immunocytochemistry*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **1996**. 93(15): p. 8063-7.
146. Basheer, R., et al., *Sleep deprivation upregulates A1 adenosine receptors in the rat basal forebrain*. *Neuroreport*, **2007**. 18(18): p. 1895-9.
147. Chen, G. and A.N. van den Pol, *Adenosine modulation of calcium currents and presynaptic inhibition of GABA release in suprachiasmatic and arcuate nucleus neurons*. *J Neurophysiol*, **1997**. 77(6): p. 3035-47.

148. von Gall, C., et al., *Rhythmic gene expression in pituitary depends on heterologous sensitization by the neurohormone melatonin*. Nat Neurosci, **2002**. 5(3): p. 234-8.
149. Hallworth, R., et al., *Presynaptic adenosine A1 receptors regulate retinohypothalamic neurotransmission in the hamster suprachiasmatic nucleus*. J Neurobiol, **2002**. 52(3): p. 230-40.
150. Sigworth, L.A. and M.A. Rea, *Adenosine A1 receptors regulate the response of the mouse circadian clock to light*. Brain Res, **2003**. 960(1-2): p. 246-51.
151. Womac, A.D., et al., *Circadian rhythms of extracellular ATP accumulation in suprachiasmatic nucleus cells and cultured astrocytes*. Eur J Neurosci, **2009**. 30(5): p. 869-76.
152. Menger, G.J., et al., *Circadian profiling of the transcriptome in immortalized rat SCN cells*. Physiol Genomics, **2005**. 21(3): p. 370-81.
153. Yamazaki, S., Y. Ishida, and S. Inouye, *Circadian rhythms of adenosine triphosphate contents in the suprachiasmatic nucleus, anterior hypothalamic area and caudate putamen of the rat--negative correlation with electrical activity*. Brain Res, **1994**. 664(1-2): p. 237-40.
154. Suadicani, S.O., C.F. Brosnan, and E. Scemes, *P2X7 receptors mediate ATP release and amplification of astrocytic intercellular Ca<sup>2+</sup> signaling*. J Neurosci, **2006**. 26(5): p. 1378-85.
155. Festing, M.F. and D.G. Altman, *Guidelines for the design and statistical analysis of experiments using laboratory animals*. ILAR J, **2002**. 43(4): p. 244-58.
156. Uhl, E.W. and N.J. Warner, *Mouse Models as Predictors of Human Responses: Evolutionary Medicine*. Curr Pathobiol Rep, **2015**. 3(3): p. 219-223.
157. Arndt, S.S., et al., *Individual housing of mice--impact on behaviour and stress responses*. Physiol Behav, **2009**. 97(3-4): p. 385-93.
158. Marashi, V., et al., *Effects of different forms of environmental enrichment on behavioral, endocrinological, and immunological parameters in male mice*. Hormones and Behavior, **2003**. 43(2): p. 281-292.
159. Pfaffl, M.W., *A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR*. Nucleic Acids Res, **2001**. 29(9): p. e45.
160. Albrecht, U., *Timing to perfection: the biology of central and peripheral circadian clocks*. Neuron, **2012**. 74(2): p. 246-60.
161. Archer, S.N. and H. Oster, *How sleep and wakefulness influence circadian rhythmicity: effects of insufficient and mistimed sleep on the animal and human transcriptome*. J Sleep Res, **2015**. 24(5): p. 476-93.

162. Welsh, D.K., J.S. Takahashi, and S.A. Kay, *Suprachiasmatic nucleus: cell autonomy and network properties*. *Annu Rev Physiol*, **2010**. 72: p. 551-77.
163. Rocha, V.A., et al., *Intrinsic organization of the suprachiasmatic nucleus in the capuchin monkey*. *Brain Res*, **2014**. 1543: p. 65-72.
164. Saper, C.B., T.E. Scammell, and J. Lu, *Hypothalamic regulation of sleep and circadian rhythms*. *Nature*, **2005**. 437(7063): p. 1257-63.
165. Porkka-Heiskanen, T., et al., *Adenosine: a mediator of the sleep-inducing effects of prolonged wakefulness*. *Science*, **1997**. 276(5316): p. 1265-8.
166. Porkka-Heiskanen, T., R.E. Strecker, and R.W. McCarley, *Brain site-specificity of extracellular adenosine concentration changes during sleep deprivation and spontaneous sleep: an in vivo microdialysis study*. *Neuroscience*, **2000**. 99(3): p. 507-17.
167. Porkka-Heiskanen, T. and A.V. Kalinchuk, *Adenosine, energy metabolism and sleep homeostasis*. *Sleep Med Rev*, **2011**. 15(2): p. 123-35.
168. Halassa, M.M., et al., *Astrocytic modulation of sleep homeostasis and cognitive consequences of sleep loss*. *Neuron*, **2009**. 61(2): p. 213-9.
169. Basheer, R., et al., *Adenosine and sleep-wake regulation*. *Prog Neurobiol*, **2004**. 73(6): p. 379-96.
170. Chagoya de Sanchez, V., et al., *Day-night variations of adenosine and its metabolizing enzymes in the brain cortex of the rat--possible physiological significance for the energetic homeostasis and the sleep-wake cycle*. *Brain Res*, **1993**. 612(1-2): p. 115-21.
171. Tobler, I. and R. Scherschlicht, *Sleep and EEG slow-wave activity in the domestic cat: effect of sleep deprivation*. *Behav Brain Res*, **1990**. 37(2): p. 109-18.
172. Stenberg, D., et al., *Sleep and its homeostatic regulation in mice lacking the adenosine A1 receptor*. *J Sleep Res*, **2003**. 12(4): p. 283-90.
173. Arrigoni, E., et al., *Adenosine-mediated presynaptic modulation of glutamatergic transmission in the laterodorsal tegmentum*. *J Neurosci*, **2001**. 21(3): p. 1076-85.
174. Fredholm, B.B., et al., *Actions of caffeine in the brain with special reference to factors that contribute to its widespread use*. *Pharmacol Rev*, **1999**. 51(1): p. 83-133.
175. Benington, J.H., S.K. Kodali, and H.C. Heller, *Stimulation of A1 adenosine receptors mimics the electroencephalographic effects of sleep deprivation*. *Brain Res*, **1995**. 692(1-2): p. 79-85.

176. Matsumura, H., et al., *Prostaglandin D2-sensitive, sleep-promoting zone defined in the ventral surface of the rostral basal forebrain*. Proc Natl Acad Sci U S A, **1994**. 91(25): p. 11998-2002.
177. Zemkova, H., et al., *Molecular structure of purinergic P2X receptors and their expression in the hypothalamus and pituitary*. Physiol Res, **2008**. 57 Suppl 3: p. S23-38.
178. Del Puerto, A., F. Wandosell, and J.J. Garrido, *Neuronal and glial purinergic receptors functions in neuron development and brain disease*. Front Cell Neurosci, **2013**. 7: p. 197.
179. Lommen, J., et al., *Time-of-day-dependent expression of purinergic receptors in mouse suprachiasmatic nucleus*. Cell and Tissue Research, **2017**. 369(3): p. 579-590.
180. Mori, M., H. Tsushima, and T. Matsuda, *Antidiuretic Effects of Purinoceptor Agonists Injected into the Hypothalamic Paraventricular Nucleus of Water-Loaded, Ethanol-Anesthetized Rats*. Neuropharmacology, **1992**. 31(6): p. 585-592.
181. Buller, K.M., et al., *Central noradrenergic neurons signal via ATP to elicit vasopressin responses to haemorrhage*. Neuroscience, **1996**. 73(3): p. 637-42.
182. Khakh, B.S., et al., *ATP modulation of excitatory synapses onto interneurons*. J Neurosci, **2003**. 23(19): p. 7426-37.
183. Collo, G., et al., *Tissue distribution of the P2X7 receptor*. Neuropharmacology, **1997**. 36(9): p. 1277-83.
184. Monif, M., et al., *The P2X7 receptor drives microglial activation and proliferation: a trophic role for P2X7R pore*. J Neurosci, **2009**. 29(12): p. 3781-91.
185. Diaz-Hernandez, M., et al., *Inhibition of the ATP-gated P2X7 receptor promotes axonal growth and branching in cultured hippocampal neurons*. J Cell Sci, **2008**. 121(Pt 22): p. 3717-28.
186. Norenberg, W., et al., *Electrophysiological classification of P2X7 receptors in rat cultured neocortical astroglia*. Br J Pharmacol, **2010**. 160(8): p. 1941-52.
187. Hamilton, N., et al., *Mechanisms of ATP- and glutamate-mediated calcium signaling in white matter astrocytes*. Glia, **2008**. 56(7): p. 734-49.
188. Carrasquero, L.M., et al., *P2X7 and P2Y13 purinergic receptors mediate intracellular calcium responses to BzATP in rat cerebellar astrocytes*. J Neurochem, **2009**. 110(3): p. 879-89.
189. Morin, L.P., R.F. Johnson, and R.Y. Moore, *Two brain nuclei controlling circadian rhythms are identified by GFAP immunoreactivity in hamsters and rats*. Neurosci Lett, **1989**. 99(1-2): p. 55-60.

190. Yao, S.T., et al., *Localisation of P2X2 receptor subunit immunoreactivity on nitric oxide synthase expressing neurones in the brain stem and hypothalamus of the rat: a fluorescence immunohistochemical study*. *Neuroscience*, **2003**. 121(2): p. 411-9.
191. Guo, W., et al., *P2X receptors are differentially expressed on vasopressin- and oxytocin-containing neurons in the supraoptic and paraventricular nuclei of rat hypothalamus*. *Histochem Cell Biol*, **2009**. 131(1): p. 29-41.
192. Song, X., et al., *Regional expression of P2Y(4) receptors in the rat central nervous system*. *Purinergic Signal*, **2011**. 7(4): p. 469-88.
193. Volterra, A. and J. Meldolesi, *Astrocytes, from brain glue to communication elements: the revolution continues*. *Nat Rev Neurosci*, **2005**. 6(8): p. 626-40.
194. Guthrie, P.B., et al., *ATP released from astrocytes mediates glial calcium waves*. *J Neurosci*, **1999**. 19(2): p. 520-8.
195. Burkeen, J.F., et al., *Mitochondrial calcium signaling mediates rhythmic extracellular ATP accumulation in suprachiasmatic nucleus astrocytes*. *J Neurosci*, **2011**. 31(23): p. 8432-40.
196. Colwell, C.S., *Circadian modulation of calcium levels in cells in the suprachiasmatic nucleus*. *Eur J Neurosci*, **2000**. 12(2): p. 571-6.
197. Colwell, C.S., *Rhythmic coupling among cells in the suprachiasmatic nucleus*. *J Neurobiol*, **2000**. 43(4): p. 379-88.
198. Diaz-Hernandez, M., et al., *Independent receptors for diadenosine pentaphosphate and ATP in rat midbrain single synaptic terminals*. *Eur J Neurosci*, **2001**. 14(6): p. 918-26.
199. Troadec, J.D., et al., *ATP-evoked increases in [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> and peptide release from rat isolated neurohypophysial terminals via a P2X2 purinoceptor*. *J Physiol*, **1998**. 511 ( Pt 1): p. 89-103.
200. Marpegan, L., et al., *Circadian regulation of ATP release in astrocytes*. *J Neurosci*, **2011**. 31(23): p. 8342-50.
201. Prolo, L.M., J.S. Takahashi, and E.D. Herzog, *Circadian rhythm generation and entrainment in astrocytes*. *J Neurosci*, **2005**. 25(2): p. 404-8.
202. Shearman, L.P., et al., *Targeted disruption of the mPer3 gene: subtle effects on circadian clock function*. *Mol Cell Biol*, **2000**. 20(17): p. 6269-75.
203. Chagoya de Sanchez, V., *Circadian variations of adenosine and of its metabolism. Could adenosine be a molecular oscillator for circadian rhythms?* *Can J Physiol Pharmacol*, **1995**. 73(3): p. 339-55.
204. Florio, C., et al., *Circadian rhythm in adenosine A1 receptor of mouse cerebral cortex*. *Life Sci*, **1991**. 48(6): p. P125-9.

205. Castel, M., et al., *Glutamate-like immunoreactivity in retinal terminals of the mouse suprachiasmatic nucleus*. Eur J Neurosci, **1993**. 5(4): p. 368-81.
206. Hannibal, J., et al., *Pituitary adenylate cyclase-activating peptide (PACAP) in the retinohypothalamic tract: a potential daytime regulator of the biological clock*. J Neurosci, **1997**. 17(7): p. 2637-44.
207. Ding, J.M., et al., *Resetting the biological clock: mediation of nocturnal circadian shifts by glutamate and NO*. Science, **1994**. 266(5191): p. 1713-7.
208. Ding, J.M., et al., *Resetting the biological clock: mediation of nocturnal CREB phosphorylation via light, glutamate, and nitric oxide*. J Neurosci, **1997**. 17(2): p. 667-75.
209. Kapoor, J.R. and C.D. Sladek, *Purinergic and adrenergic agonists synergize in stimulating vasopressin and oxytocin release*. J Neurosci, **2000**. 20(23): p. 8868-75.
210. Homola, M., et al., *Melatonin receptor deficiency decreases and temporally shifts ecto-5'-nucleotidase mRNA levels in mouse prosencephalon*. Cell Tissue Res, **2016**. 365(1): p. 147-56.
211. Yegutkin, G.G., *Nucleotide- and nucleoside-converting ectoenzymes: Important modulators of purinergic signalling cascade*. Biochim Biophys Acta, **2008**. 1783(5): p. 673-94.
212. Junger, W.G., *Immune cell regulation by autocrine purinergic signalling*. Nat Rev Immunol, **2011**. 11(3): p. 201-12.

## 7 Anhang

**Tabelle 12: Herstellung der verwendeten Lösungen**

Lösung	Ansatz
4% Paraformaldehyd (PFA)	40g PFA 100µl 5N NaOH auffüllen auf 500ml Millipore-Wasser } Lösen in 100ml 10x PBS + 400ml Millipore-Wasser
10 x Phosphate-buffered-saline (PBS)	28,8g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2H <sub>2</sub> O 4g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 4g KCl 164g NaCl } Lösen in 2000ml Millipore-Wasser
1 x PBS	100ml 10x PBS 900ml Millipore-Wasser
0,2% 1 x PBS-Triton (PBS-T)	100ml 1x PBS 200µl Triton X-100
3% 1x PBS-T Goat Serum	100ml 1x PBS 200µl Triton X-100 3ml Goat Serum
3% 1x PBS-T Rabbit Serum	100ml 1x PBS 200µl Triton X-100 3ml Rabbit Serum
20% Saccharose	10g Saccharose 40ml Millipore-Wasser 5ml 10x PBS } Lösen und auf 50ml Millipore- Wasser auffüllen
0,24% Wasserstoffperoxid (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	1ml 1x PBS-T 0,2% 8µl 30% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
Vectastain Elite ABC Kit	30µl Reagenz A 30µl Reagenz B } Lösen in 2,5ml 1x PBS-T 0,2%
Cryoprotectant-Solution (Gefrierschutz)	620mg NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O 2,18g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> wasserfrei 18g NaCl } Lösen in 400ml Millipore-Wasser und pH-Wert 7,3 einstellen
	+
	600g Saccharose 20g Polyvinyl Pyrolidon } Auf 1,4 Liter Millipore- Wasser auffüllen und lösen
	+
	600ml Ethylenglykol
3,3'-Diaminobenzidin Tetrahydrochlorid Tabletten	2 Tabletten DAB 2 Tabletten H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> } Lösen in jeweils 10ml 1x PBS-T 0,2%
Gelatine	1g Gelatine 0,1g CrK(SO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> · 12 H <sub>2</sub> O 200ml Millipore-Wasser



## **Danksagung**

Zunächst möchte ich mich bei meiner Doktormutter Frau Professor Dr. Charlotte von Gall für die Überlassung des Themas sowie die hervorragende wissenschaftliche Betreuung herzlichst bedanken.

Auch meiner wissenschaftlichen Betreuerin Frau Dr. Anna Stahr bin ich zutiefst dankbar. Sie war zu jeder Zeit die beste Ansprechpartnerin, die man sich wünschen kann. Die aufopferungsvolle Unterstützung in Theorie und Praxis war eine enorme Bereicherung für mich.

Ein weiteres Dankeschön geht an Dr. Marc Ingenwerth, Angelika Hallenberger, Ralf Fassbender, Ursula Lammersen, Hanna Bellert und alle weiteren Mitarbeiter des Instituts für Anatomie II. Ohne sie wäre das Projekt nicht möglich gewesen.

In ewiger Dankbarkeit möchte ich meinen Eltern für die unermüdliche Unterstützung danken. Meiner Familie – insbesondere meiner Freundin Ann-Kristin – danke ich für die vielen aufbauenden Worte und konstruktive Kritik.

– Danke –