

Aus dem Universitätsklinikum Münster  
Institut für Physiologie I  
-Direktor: Univ.-Prof. Dr. rer. nat. H.-C. Pape-

Genexpression molekularer Komponenten der biologischen Uhr  
im Hippokampus der Ratte

INAUGURAL – DISSERTATION  
zur  
Erlangung des doctor medicinae dentium  
der Medizinischen Fakultät  
der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

vorgelegt von  
Tim Patric Kühn  
aus Braunschweig

Dezember 2004

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Westfälischen  
Wilhelms-Universität Münster

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. H. Jürgens

1. Berichterstatter: Prof. Dr. rer. nat. U. Mußhoff

2. Berichterstatter: Prof. Dr. med. dent. U. Stratmann

Tag der mündlichen Prüfung: 6.06.2005

Aus dem Universitätsklinikum Münster  
Institut für Physiologie I  
-Direktor: Univ.-Prof. Dr. rer. nat. H.-C. Pape-  
Referent: Prof. Dr. rer. nat. U. Mußhoff  
Koreferent: Prof. Dr. med. dent. U. Stratmann

## ZUSAMMENFASSUNG

### **Genexpression molekularer Komponenten der biologischen Uhr im Hippokampus der Ratte**

Kühn, Tim Patric

Die meisten Organismen besitzen „innere Uhren“, die ihnen eine zeitliche Steuerung ihrer Lebensvorgänge ermöglichen. Der zentrale circadiane Schrittmacher bei den Säugetieren ist im Nucleus suprachiasmaticus (SCN) lokalisiert. Die molekulare Basis dieses circadianen Systems stellen oszillierend transkribierte RNA-Moleküle und ihre Produkte dar. Diese molekularen Komponenten der circadianen Uhr sind mittlerweile außer im SCN auch für viele periphere Gewebe wie z.B. Leber, Skelettmuskel und Lunge nachgewiesen worden.

In der vorliegenden Arbeit wurde mit Hilfe molekularbiologischer Techniken untersucht, ob im Hippokampus von Ratten messenger-RNA (m-RNA) für die molekularen Proteinkomponenten der inneren Uhr (Per 1, Per 2, Per 3, Cry 1, Cry 2, Bmal 1, Clock und Timeless) nachzuweisen ist. Dieser Nachweis erfolgte mit Hilfe der Reverse Transkriptase-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR). Dazu wurden geeignete Primer anhand der vorliegenden cDNA-Sequenzen für das Rattengesamthirn oder Maus-Gehirn konstruiert, die optimale Annealingtemperatur für die jeweiligen Primerpaare bestimmt, und m-RNA aus dem Hippokampus der Ratte eingesetzt.

Es konnte so der Nachweis der Gentranskripte für die oben genannten Komponenten der inneren Uhr im Hippokampus geführt werden. Die gefundenen Gentranskripte sind ein Hinweis darauf, daß im Hippokampus, ähnlich wie in anderen peripheren Geweben, eine circadiane Uhr vorhanden ist. Der Nachweis der molekularen Uhrenkomponenten in Zellen des Hippokampus könnte auf eine circadiane Steuerung hippokampaler Funktionen, wie Lern- und Gedächtnisprozesse, hindeuten.

Die tierexperimentellen Arbeiten wurden durch die Bezirksregierung Münster genehmigt. (Genehmigung vom 23.10.1997, verlängert: am 7.9.2000; AZ.: 23.0835.1.0 (G 32/97)).

Tag der mündlichen Prüfung: 6.06.2005

## Inhaltsverzeichnis

### 1. Einleitung

1.1 Circadiane Rhythmik in der historischen Entwicklung .....	1
1.2 Der SCN als zentraler Oszillator.....	3
1.3 Funktionelle Bedeutung der molekularen Uhrenkomponenten .....	4
1.4 Periphere Oszillatoren.....	7
1.5 Funktion und Aufbau des Hippokampus .....	7
1.6 Fragestellung und Ziel der Arbeit.....	9

### 2. Methodik

2.1 Gewebepräparation .....	11
2.2 RNA Gewinnung durch Extraktion nach Chomeczynski und Sacchi .....	11
2.3 Quantitative RNA-Bestimmung.....	12
2.5 Primersynthese.....	13
2.5.1 Primer für Bmal 1 .....	14
2.5.2 Primer für Clock .....	15
2.5.3 Primer für Per 1.....	15
2.5.4 Primer für Per 2.....	16
2.5.5 Primer für Per 3.....	16
2.5.6 Primer für Cry 1 .....	17
2.5.7 Primer für Cry 2.....	17
2.5.8 Primer für Timeless.....	18
2.6 Polymerasekettenreaktion (PCR).....	18
2.7 Spezifitätskontrolle .....	21
2.7.1 DNase-Behandlung.....	21
2.7.2 Restriktionsanalyse .....	22
2.8 Nachweis der PCR-Produkte mittels der Agarosegel-Elektrophorese.....	25
2.9 Dokumentation der Gelelektrophorese .....	26

### 3. Ergebnisse

3.1 Nachweis von Bmal 1-Gentranskripten .....	27
3.2 Nachweis von Clock-Gentranskripten .....	30
3.3 Nachweis von Per 1-Gentranskripten .....	32

3.4 Nachweis von Per 2-Gentranskripten .....	34
3.5 Nachweis von Per 3-Gentranskripten .....	36
3.6 Nachweis von Cry 1-Gentranskripten.....	38
3.7 Nachweis von Cry 2-Gentranskripten.....	40
3.8 Nachweis von Timeless-Gentranskripten .....	42
4. Diskussion	
4.1 Methodenkritische Reflexion.....	44
4.2 Nachweis im Hippokampusgewebe.....	45
4.3 Tageszeitliche Rhythmen im Hippokampus .....	46
4.3.1 Hippokampus und Lernen und Gedächtnis.....	46
4.3.2 Hippokampus und circadiane Rhythmik.....	48
4.4 Ist der Hippokampus ein peripherer Oszillator? .....	48
4.4.1 Vorhandener Nachweis für Oszillation in peripheren Geweben .....	48
4.4.2 Hinweise für periphere Oszillation im Hippokampus .....	49
4.5 Ausblick .....	51
Literaturverzeichnis .....	52
Danksagung.....	59
Tabellarischer Lebenslauf.....	60
Anhang .....	60

## Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1: Circadianer Rhythmus und typische Veränderungen bei verschiedenen Experimenten (zusammenfassende Darstellung eines hypothetischen Versuchs).....	2
Abb. 1.2: Neuronale Organisation des circadianen Systems bei Säugetieren.....	4
Abb. 1.3: Modell des molekularen Uhrwerks in einem Neuron des SCN .....	5
Abb. 1.4: Schematisierte Darstellung eines hippocampalen Gewebeschnittes.....	8
Abb. 3.1: Nachweis von Gen-Transkripten für Bmal 1 im Nervengewebe der Ratte .....	29
Abb. 3.2: Nachweis von Gen-Transkripten für Clock im Nervengewebe der Ratte .....	31
Abb. 3.3: Nachweis von Gen-Transkripten für Per 1 im Nervengewebe der Ratte .....	33
Abb. 3.4: Nachweis von Gen-Transkripten für Per 2 im Nervengewebe der Ratte .....	35
Abb. 3.5: Nachweis von Gen-Transkripten für Per 3 im Nervengewebe der Ratte .....	37
Abb. 3.6: Nachweis von Gen-Transkripten für Cry 1 im Nervengewebe der Ratte .....	39
Abb. 3.7: Nachweis von Gen-Transkripten für Cry 2 im Nervengewebe der Ratte .....	41
Abb. 3.8: Nachweis von Gen-Transkripten für Timeless im Nervengewebe der Ratte .....	43

## Tabellenverzeichnis

Tab. 2.1: Zusammensetzung und Konzentration der Pufferlösungen für die RNA-Extraktion nach Chomczynski und Sacchi.....	12
Tab. 2.2: Zusammensetzung der Pufferlösungen für die DNase-Behandlung .....	21
Tab. 2.3: Restriktionsenzyme für molekulare Uhrenkomponenten mit Erkennungssequenzen .....	23
Tab. 2.4: Basenpaarlängen der amplifizierten DNA-Stränge, der jeweiligen spezifischen Restriktionsendonucleasen und ihrer Schnittprodukte .....	23
Tab. 2.5: Eigenschaften und Konzentration der Restriktionsendonucleasen sowie der verwendeten Puffersysteme .....	24
Tab. 2.6: Zusammensetzung der bei der Enzymrestriktion eingesetzten Puffersysteme .....	25

## Abkürzungsverzeichnis

AVP:	Vasopressin
Bbv 1:	Enzym von <i>Bacillus brevis</i>
Bfa 1:	Enzym von <i>Bacteroides fragilis</i>
Blp 1:	Enzym von <i>Bacillus lentus</i>
bp:	basepaar / Basenpaare
Cry:	Cryptochrome
cDNA:	complementäre Desoxyribonucleinsäure
DBP:	albumin D-element binding protein
DNA:	Desoxyribonucleinsäure
dNTP:	Desoxynucleosidtriphosphat
EPSP:	Exzitatorisches postsynaptisches Potential
FASP:	Familial Advanced Sleep Phase
HC:	Hippocampus
Hga 1:	Enzym von <i>Haemophilus gallinarum</i>
Hinf 1:	Enzym von <i>Haemophilus influenzae</i> Rf
HPLC:	High Performance Liquid Chromatography
LTP:	long term potentiation / Langzeitpotenzierung
m-Cry:	mouse-Cryptochrome
m-Per:	mouse-Period
m-RNA:	messenger Ribonucleinsäure
Mse 1:	Enzym von <i>Micrococcus species</i>
NBCI:	National Center for Biotechnology Information
OD:	Optische Dichte
PCR:	polymerase chain reaction / Polymerasekettenreaktion
Per:	Period
RNA:	Ribonucleinsäure
RT:	Reverse Transkriptase
Stu 1:	Enzym von <i>Streptomyces tubercidicus</i>
TAE:	Puffer aus Trizma-base, Natriumacetat, EDTA, pH mit Essigsäure gepuffert
Taq:	<i>Thermophilus aquaticus</i>
Tim:	Timeless

Tris-HCL: Triznabase-HCL

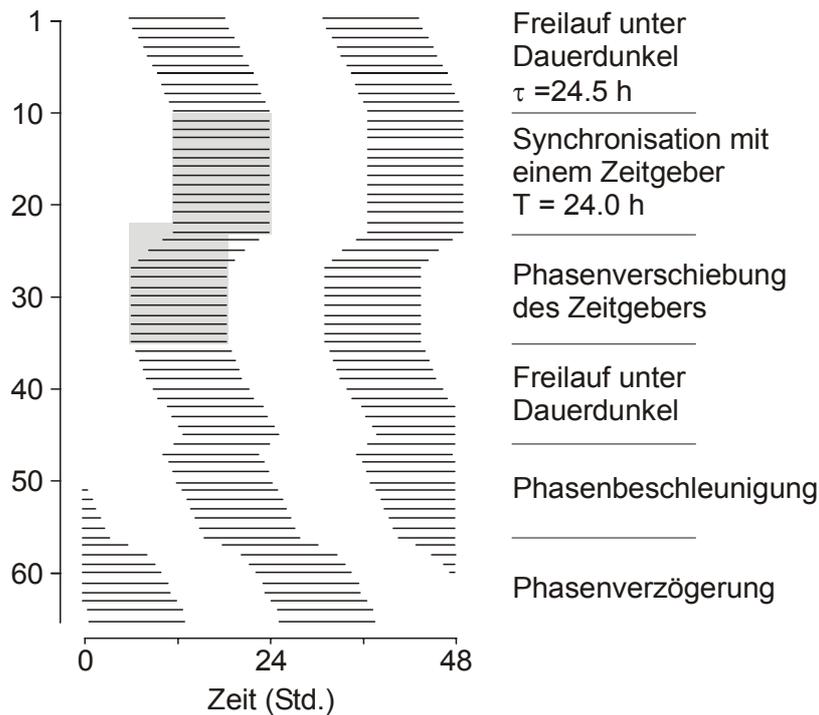
ZNS: Zentralnervensystem

## 1. Einleitung

### 1.1 Circadiane Rhythmik in der historischen Entwicklung

Durch die tägliche Rotation der Erde um ihre eigene Achse sind alle Organismen tagesperiodischen Veränderungen ausgesetzt. Bis ins 18. Jahrhundert sah man diese Schwankungen als passive Reaktion der Organismen auf ihre Umwelt an. Erst im Jahre 1729 gelangte der Astronom de Mairan zu der Erkenntnis, dass die Tagesperiodik von Organismen nicht immer von den aktuellen geophysikalischen Umwelteinflüssen verursacht wurde, sondern in vielen Fällen endogenen Ursprungs war [WOLLNIK 1995]. Er entdeckte, dass die täglichen Blattbewegungen der Mimose auch in permanenter Dunkelheit ungefähr tagesrhythmisch weitergehen. Die weitere wissenschaftliche Untersuchung dieses Phänomens einer „inneren Uhr“ mit selbstständigem Rhythmus erfolgte genauer erst ab den fünfziger Jahren des 20. Jahrhunderts. Forscher wie Wilhelm Pfeffer, Erwin Brüning, Karl von Frisch, Colin Pittendrigh und Jürgen Aschoff fanden heraus, dass unter konstanten externen Bedingungen die rhythmischen Tagesschwankungen von Stoffwechselfunktionen und Verhaltensweisen bei Pflanzen, Pilzen, Insekten, sowie auch bei Wirbeltieren und Menschen im Laborexperiment weiterschwingen. Da die Periodenlänge allerdings nur ungefähr 24 Stunden beträgt, wurde von Halberg der Begriff der „circadianen Uhr“ (ungefähr ein Tag) vorgeschlagen [PIECHULLA und ROENNEBERG 1999]. Im allgemeinen sind circadiane Rhythmen dadurch gekennzeichnet, dass sie unter konstanten Umweltbedingungen, das heißt ohne Einfluß äußerer Zeitgeber wie Licht- oder Temperaturschwankungen, erhalten bleiben und dann eine endogene Periodenlänge haben, die häufig systematisch von der 24 Stunden-Periodik der Umwelt abweicht (vgl. Abb. 1.1).

Nach der Entdeckung biologischer Uhren bei Fliegen und Menschen Ende der fünfziger Jahre des 20. Jahrhunderts, galt es lange Zeit als selbstverständlich, dass circadiane Uhren nur im Gehirn angesiedelt sein können und von dort aus die physiologischen Änderungen im Tagesablauf zentral steuern müssen. Doch dann wurden circadiane Rhythmen auch in Bakterien, Pilzen und Pflanzen nachgewiesen, die über keine zentrale Steuereinheit verfügen. Einzellige Algen wie Euglena oder Chlamydomonas zeigen einen circadianen Rhythmus der Phototaxis. Aber auch in heterotrophen Einzellern, wie Paramecium, werden viele Prozesse circadian kontrolliert. Das circadiane Uhrwerk befindet sich demnach innerhalb der Zelle und bedarf nicht des Zusammenspiels von Zellnetzwerken [RENSING 1995, PIESCHULLA und ROENNEBERG 1999].



**Abb. 1.1:** *Circadianer Rhythmus und typische Veränderungen bei verschiedenen Experimenten (zusammenfassende Darstellung eines hypothetischen Versuchs): Freilauf unter Dauerdunkel mit der Periodenlänge  $\tau = 24,5$  h; Synchronisation durch einen Licht-Dunkelwechsel mit einer Zeitgeberperiode  $T = 24,0$  h; Phasenverschiebung des Zeitgebers; Freilauf unter Dauerdunkel; Phasenbeschleunigung oder Phasenverzögerung des freilaufenden Rhythmus nach Applikation einzelner Lichtimpulse [nach WOLLNIK 1995].*

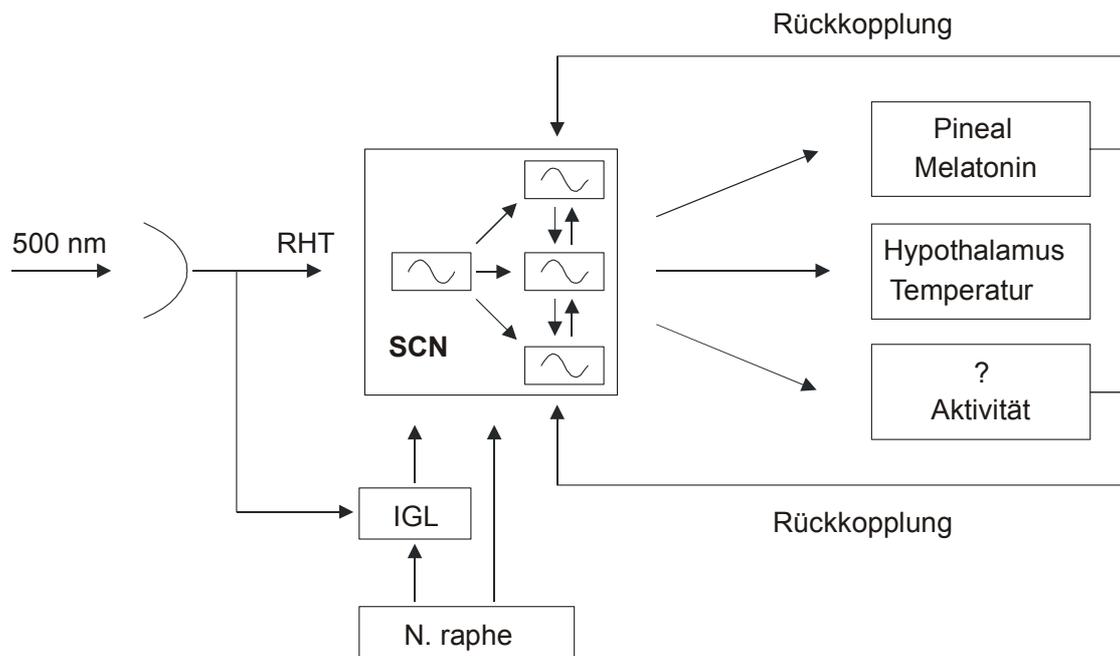
Molekulargenetische Forschung hat dann zur Entdeckung von verschiedenen Genen geführt, die rhythmisch transkribiert werden. Es sind diese oszillierend transkribierten RNA-Moleküle und ihre Produkte, die die molekulare Basis des circadianen Systems darstellen [MEYER und STEINMANN 2000].

Einem Modell folgend besteht die circadiane Uhr nach dem heutigen Wissensstand aus drei funktionellen Einheiten. Sie wird von so genannten Zeitgebern (1.Einheit) synchronisiert. Solche Zeitgeber sind zum Beispiel Licht, Temperaturveränderungen, Vorhandensein von Futter sowie soziale Einflüsse. Kernstück der inneren Uhr ist der unabhängige, endogene Schrittmacher (2.Einheit), der zahlreiche Prozesse in den Zellen, Organen und des Gesamtorganismus auf häufig noch ungeklärtem Wege steuert. Die efferenten neuronalen Projektionen zur Steuerung verschiedener Körperfunktionen bilden schließlich die dritte Einheit [RENSING 1995].

## 1.2 Der SCN als zentraler Oszillator

Der circadiane Schrittmacher bei den Säugetieren ist im Nucleus suprachiasmaticus (SCN) lokalisiert, einem hypothalamischen Kerngebiet, das zu beiden Seiten des dritten Ventrikels direkt oberhalb des optischen Chiasma liegt. Seine zentrale Schrittmacherfunktion wurde in verschiedenen Experimenten nachgewiesen. Der aussagekräftigste Nachweis wurde Mitte der achtziger Jahre in Transplantationsexperimenten erbracht. Dabei wurde einem adulten Tier der SCN operativ entfernt, woraufhin sein Aktivitätsmuster und andere Körperfunktionen arrhythmisch wurden. Wenn nun neonatales Hypothalamusgewebe in den dritten Ventrikel des Versuchstieres transplantiert wurde, war die circadiane Organisation der Aktivität wiederhergestellt. Die Periodenlänge des wiederhergestellten Aktivitätsrhythmus war eindeutig die des Spendertieres und nicht die ursprüngliche Periodenlänge des Empfängertieres [WOLLNIK 1995, MEYER und STEINMANN 2000].

Bei den Säugetieren werden Lichtinformationen ausschließlich über die Retina empfangen. Der SCN erhält synaptischen „Input“ aus der Retina über den retino-hypothalamischen Trakt (RHT), und so Informationen den umgebenden Hell-Dunkel Zyklus betreffend, die erforderlich sind die circadiane Uhr zu stellen [WHITMORE et al. 2000]. Eine spezielle Klasse von retinalen Ganglienzellen vermittelt den direkten Input zum SCN [vgl. YANNIELLI und HARRINGTON 2004]. Außer dem RHT erreichen den SCN visuelle Informationen indirekt über eine schmale Zellreihe, die zwischen den dorsalen und ventralen Anteilen des Corpus geniculatum laterale liegt (intergeniculate leaflet, IGL) und vom Nucleus raphe [WOLLNIK 1995]. Ihre genauen Funktionen sind jedoch noch nicht weiter erforscht. Vom SCN gehen efferente neuronale Projektionen zu verschiedenen Gebieten des Gehirns, um eine Vielzahl zyklischer Körperfunktionen wie zum Beispiel Körpertemperatur, Melatonin-Sekretion und Aktivität zu steuern. Gut erforscht ist die Projektion zum Pinealorgan, über die der tagesperiodische Rhythmus der Melatoninsynthese gesteuert wird. Der SCN ist wiederum über eine Rückkopplungsschleife Zielgebiet des Melatonins. Es kann die neuronale Aktivität im SCN blockieren und damit eine Synchronisierung im circadianen System bewirken (vgl. Abb.1.2).



**Abb. 1.2:** Neuronale Organisation des circadianen Systems bei Säugetieren: Der circadiane Schrittmacher besteht aus einer Vielzahl von Oszillatoren im Nucleus suprachiasmaticus (SCN), die miteinander hierarchisch und parallel gekoppelt sind [nach WOLLNIK 1995].

### 1.3 Funktionelle Bedeutung der molekularen Uhrenkomponenten

Circadiane Uhrwerke können in einzelligen Tieren wie auch in Vielzellern organisiert sein. Bei vielzelligen Tieren, z.B. den Säugern stellt der SCN die biologische, endogene Uhr dar. Auf beiden Seiten des dritten Ventrikels oberhalb des optischen Chiasma sind die Nuclei lokalisiert. Jeder dieser Nuclei ist aus circa 8000 eng gepackten Neuronen bei der Ratte und etwa 10000 Neuronen beim Menschen zusammengesetzt. Die Neurone des SCN sind nicht homogen und wurden nach ihren Neuropeptiden klassifiziert. In einer vereinfachten Sicht hat der SCN bei Nagetieren einen Kern bestehend aus Neuronen, die Vasoaktive Intestinale Peptide (VIP) exprimieren, und einen umgebenden Bereich von Arginin Vasopressin Peptiden (AVP) exprimierenden Neuronen [CERMAKIAN und BOIVIN 2003].

Experimente an dissoziierten individuellen Neuronen des SCN haben gezeigt, dass circadiane Rhythmik intrazellulär erzeugt wird [ALLADA et al. 2001]. Interzelluläre Mechanismen können als wichtige Einflußgröße auf die Rhythmik zwar nicht ausgeschlossen werden, dennoch befindet sich das circadiane Uhrwerk innerhalb einzelner Zellen. Die circadiane Uhr ist in einzelnen Neuronen des SCN vorhanden und



Komplexe und werden in den Zellkern transloziert. Hier bilden die CRY-Proteine eine negative Rückkopplungsschleife, indem sie die durch CLOCK und BMAL 1 aktivierte Transkription unterdrücken. Gleichzeitig reguliert mPer 2 in einer positiven Schleife die Transkription von Bmal 1 (vgl. Abb. 1.3). Die Expression von Bmal 1 und die der mPer- und mCry-RNA ist antiphasisch, d. h. die Bmal 1-Transkripte sind gehäuft, wenn die mPer- und mCry-Transkripte niedrig sind und umgekehrt. So sind am Ende eines circadianen Tages vermehrt BMAL 1-Proteine vorhanden und der nächste circadiane Kreislauf kann beginnen. Die Genexpression von Clock ist im Gegensatz zu Bmal1 nicht zyklisch [vgl. REPPERT und WEAVER 2001, CHANG und REPPERT 2001, YOUNG 2000].

Das Timeless-Gen der Maus, ist in seiner Aminosäuresequenz stark homolog zu dem Timeless-Gen von Drosophila. Es hat aber nicht mehr dessen essentielle Funktion und es ist nicht klar, welche Rolle es innerhalb des molekularen Mechanismus der Säugetieruhr spielt. Man geht davon aus, daß die Funktion der Timeless-Proteine durch die mCRY-Proteine ersetzt wurde [REPPERT und WEAVER 2001, ZYLKA et al. 1998].

Die genauen Funktionen von mPer 1 und mPer 3 sind noch nicht geklärt. mPer 1 spielt wohl wie mPer 2 eine Rolle bei der Aufrechterhaltung der circadianen Rhythmik. Es beeinflusst das circadiane Uhrwerk allerdings durch Interaktion mit anderen Regulatorproteinen. mPer 3 ist nicht essentiell für das Herzstück des molekularen Uhrwerks und scheint eher zu den so genannten Outputgenen zu gehören [BAE et al. 2001, SHEARMAN et al. 2000].

Obwohl man große Fortschritte bei der Identifizierung von den Uhrengenen gemacht hat, weiß man bisher wenig darüber, wie die oszillierende Expression dieser Gene auf andere neuronale Substrate wirkt und letztlich zur Steuerung verschiedener Körperfunktionen beiträgt. In vielen Organismen scheinen diverse Teile des Genoms unter circadianer Kontrolle zu stehen. Die meisten dieser uhrenkontrollierten Gene werden wahrscheinlich indirekt kontrolliert. Einige wenige scheinen direkte Ziele der Uhrengene zu sein. Vasopressin (AVP) ist ein Beispiel eines uhrenkontrollierten Genes, das direkt vom Clock/Bmal 1- Komplex im SCN reguliert wird. Das albumin D-element binding protein (DBP) stellt ebenfalls ein Beispiel für ein direkt kontrolliertes Gen dar. Wie oben erwähnt vermutet man auch bei Per 3, dass es zu den so genannten Outputgenen gehört [ALLADA et al. 2001, OKAMURA et al. 2002, REPPERT und WEAVER 2000].

Mutationen von Uhrengenen führen bei Mäusen zu abnormalen circadianen Rhythmen der Laufaktivität. Man hat in Experimenten mit Knock-out-Mäusen herausgefunden, daß Mäuse mit mutiertem *mPer 2*-Gen einen verkürzten Rhythmus haben. Ein ähnliches Phänomen wurde bei Menschen, die unter dem Familial Advanced Sleep Phase (FASP)-Syndrom leiden, gefunden. Bei dieser Schlafstörung überfällt die Patienten am frühen Abend die große Müdigkeit. Sie schlafen dann normale neun Stunden, wachen aber meist schon vor der Dämmerung auf. Ihr circadianer Rhythmus ist damit um vier Stunden verschoben. Ptacek et. al. entdeckten, dass diesem Syndrom eine Mutation im *Per 2*-Gen zugrunde liegt [ALBRECHT und EICHELE 2003, CERMAKIAN und BOIVIN 2003].

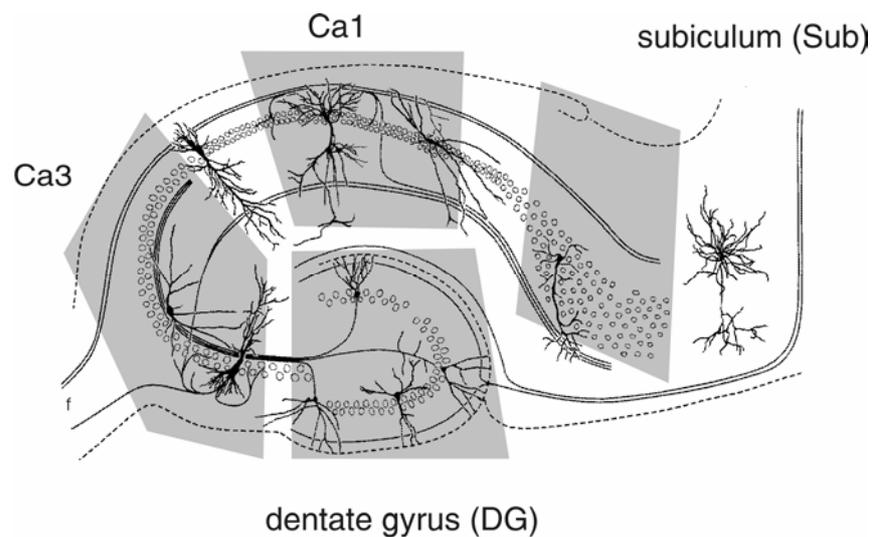
#### **1.4 Periphere Oszillatoren**

Nach der Entdeckung biologischer Uhren bei Fliegen und beim Menschen galt es lange Zeit als selbstverständlich, dass die circadiane Uhr nur im Gehirn angesiedelt sein könne. Da jedoch auch circadiane Rhythmen in Bakterien, Pilzen und Pflanzen nachgewiesen wurden, die über keine zentrale Steuereinheit verfügen, lag die Vermutung nahe, dass biologische Uhren sich auch in nicht-neuronalen Zellen befinden können. Daraufhin begann man auch bei Tieren in nicht-neuronalem Gewebe nach solchen molekularen Uhrenkomponenten zu suchen [GROB 2000]. Bei Säugetieren wurde, bevor man in der Lage war, Uhrengene zu klonen, die Retina als die einzige Struktur mit einer eigenständigen circadianen Uhr neben dem SCN angesehen. Mit dem Klonen der *Period*-Gene in Säugetieren fand man heraus, dass diese Gene jedoch in vielen Geweben, wie zum Beispiel in der Leber, dem Skelettmuskel und der Lunge exprimiert werden. In diesen sogenannten peripheren Geweben ist die Oszillation der *mPer*-Gene jedoch um 3-9 Stunden verspätet im Vergleich zu der Expression im SCN. Dies legt die Vermutung nahe, dass die peripheren Oszillatoren entweder durch den SCN direkt beeinflusst oder zumindest auf noch unbekannter Art zeitlich gesteuert werden [REPPERT und WEAVER 2001, 2000, WHITMORE et al. 2000]. Auch in peripheren Geweben wie dem Herzen der Ratte konnte man die rhythmische Expression der Uhrengene in einzelnen Zellen nachweisen [YOUNG et al. 2001]. Wenig bekannt ist bisher über Uhren-Gene in anderen Strukturen des ZNS wie z.B. dem Hippokampus.

#### **1.5 Funktion und Aufbau des Hippokampus**

Der Hippokampus liegt im Bereich der medialen Hemisphäre im Temporallappen. Er bildet mit dem Gyrus dentatus, dem Subikulum und dem enthorinalen Kortex als

wesentlicher Bestandteil des limbischen Systems die Hippokampusformation. Traditionell teilt man den Hippokampus in die vier Regionen CA1-CA4. Sowohl der Hippokampus als auch der Gyrus dentatus bestehen aus drei Hauptschichten: Stratum oriens mit zahlreichen basalen Dendriten, Str. pyramidale mit den Zellkörpern sowie Str. radiatum mit Str. lacunosum-molekulare, die die proximalen und distalen Dendriten der Pyramidenzellen umfassen. Abb. 1.4. zeigt einige der neuronalen Elemente in einem Hippokampusschnittpräparat transversal zur Längsachse.



**Abb. 1.4:** Schematisierte Darstellung eines hippocampalen Gewebeschnittes  
[Modifiziert nach CAJAL und RAMON 1911; aus BROWN und ZADOR 1990].

Die funktionelle Organisation des Hippokampus ist traditionell als trisynaptischer Kreislauf beschrieben worden [BROWN und ZADOR 1990]. Afferenzen erhält die Hippokampusformation u. a. aus dem entorhinalen Kortex über den Traktus perforans. Dieser ist synaptisch mit dendritischen Anteilen der Körnerzellen des Gyrus dentatus verbunden. Diese Körnerzellen innervieren über die Moosfasern CA3-Pyramidenzellen. Die CA3-Pyramidenzellen projizieren wiederum zum einen durch den Fornix in kortikale und subkortikale Gebiete, zum anderen über die Schaffer-Kollaterale zu CA1-Pyramidenneuronen. Diese drei synaptischen Verbindungen definieren den trisynaptischen Kreislauf. Efferent sind die Fasern der CA1-Pyramidenzellen durch den Fornix mit kortikalen und subkortikalen Strukturen verbunden und projizieren gleichzeitig direkt oder indirekt über Neurone des Subikulums auf Bereiche des entorhinalen Kortex.

Neuropsychologische Studien geben Hinweise darauf, dass der Hippokampus eine Schlüsselrolle bei kognitiven Prozessen wie dem Lernen und der Gedächtnisbildung spielt [BROWN und ZADOR 1990]. Die Intaktheit des Hippokampus ist zur Überführung von Informationen vom Kurzzeitgedächtnis in das Langzeitgedächtnis, also für den Prozeß der Konsolidierung, notwendig. Seine beidseitige Zerstörung führt zu fast völliger anterograder Amnesie [BIRBAUMER und SCHMIDT in SCHMIDT/THEWS 1997]. Beim Menschen ist der tragische Fall des Patienten H.M., der 1953 nach beidseitiger Entfernung der Hippokampi und der darüberliegenden Kortexschichten eine schwere anterograde Amnesie erlitt, die auch vierzig Jahre nach der Operation noch unverändert geblieben ist, der meist zitierte Fall. Auch bei Ratten hat die Hippokampusformation eine wichtige Funktion bei der Gedächtniskonsolidierung. Man hat festgestellt, dass einige hippokampale Neurone mit der räumlichen Orientierung in der Umwelt in Zusammenhang zu stehen scheinen [vgl. BROWN und ZADOR 1990]. Tierexperimentelle Studien zeigen zudem, dass der Hippokampus bei den meisten Säugetieren eine elektrophysiologische Eigenschaft besitzt, die erklären könnte, wie Informationen in eine länger anhaltende Form überführt werden. Dieses Phänomen wird Langzeitpotenzierung (LTP) genannt und stellt ein zelluläres Modell für Lernprozesse dar [BLISS und COLLINDRIDGE 1993]. Unter Langzeitpotenzierung versteht man die Tatsache, dass die Amplitude und Dauer exzitatorischer postsynaptischer Potentiale (EPSP) über Stunden, Tage und Wochen erhöht werden kann, wenn die afferenten Axone durch 2 gleichzeitige elektrische Stimuli aktiviert werden [vgl. DUDEL in SCHMIDT/THEWS 1997]. Studien an Gewebeschnittpräparaten des Hippokampus zeigten, dass LTP an den synaptischen Kontakten des trisynaptischen Kreislaufs (Traktus perforans / Körnerzellsynapse; Moosfaser / CA3-Synapse; Schaffer-Kollateral / CA1-Synapse) auslösbar ist [vgl. BROWN und ZADOR 1990].

### **1.6 Fragestellung und Ziel der Arbeit**

Die molekularen Uhrenkomponenten der circadianen Uhr sind mittlerweile für viele periphere Gewebe nachgewiesen. Der Hippokampus hat, wie oben beschrieben, eine elementare Bedeutung für kognitive Prozesse wie Lernen und Gedächtnisbildung. Das Ziel dieser Arbeit ist zu untersuchen, ob die Uhrengene auch im Hippokampus der Ratte exprimiert werden. Dazu soll m-RNA für die molekularen Proteinkomponenten der inneren Uhr (Per 1, Per 2, Per 3, Cry 1, Cry 2, Bmal 1, Clock und Timeless) im Hippokampus nachgewiesen werden. Methodisch wurde mit der Reverse Transkriptase-

Polymerasekettenreaktion (RT-PCR) gearbeitet. Nach Gewebepräparation und Extraktion wurde die m-RNA mittels einer Reverse-Transkriptase-Reaktion (RT-Reaktion) in copy-DNA (cDNA) umgeschrieben. Anschließend folgte die Polymerasekettenreaktion (PCR), mit deren Hilfe die konstruierten Sonden entsprechenden cDNA-Sequenzen amplifiziert wurden.

Der Nachweis der molekularen Proteinkomponenten der inneren Uhr in Zellen des Hippokampus könnte auf eine circadiane Steuerung hippokampaler Funktionen, wie Lern- und Gedächtnisprozesse, hindeuten.

## 2. Methodik

Mit Hilfe molekularbiologischer Techniken wurde untersucht, ob im Hippokampus von Ratten messenger-RNA (m-RNA) für die molekularen Proteinkomponenten der inneren Uhr (Per 1, Per 2, Per 3, Cry 1, Cry 2, Bmal 1, Clock und Timeless) nachzuweisen ist. Nach Gewebepräparation und einem Extraktionsverfahren wurde die m-RNA mittels einer Reverse-Transkriptase-Reaktion (RT-Reaktion) in copy-DNA (cDNA) umgeschrieben. Anschließend erfolgte die Polymerasekettenreaktion (PCR), mit deren Hilfe die den konstruierten Sonden entsprechenden cDNA-Sequenzen amplifiziert wurden. Mit der Gelelektrophorese erfolgte schließlich die Auswertung der Ergebnisse.

### 2.1 Gewebepräparation

Für die RNA-Extraktion wurden die Hippocampus-Regionen männlicher Ratten verwendet. Die Tiere stammten aus institutseigener Tierzucht. Sie wurden in einem abgeschlossenen Raum unter künstlicher Beleuchtung gehalten. Die Beleuchtungs- bzw. Dunkelzeiten betragen jeweils 12 Stunden; die Beleuchtungszeit begann jeweils um 6:00 Uhr. Präpariert wurden Ratten mit einem Lebendgewicht von 180-300 g. Die Präparation fand am Vormittag, 3 Stunden nach Beginn der Lichtphase, statt. Die Tiere wurden in einem Glasgefäß mit Äther narkotisiert. Nach der Dekapitation erfolgte die Freilegung des Hirns und die Präparation der Hippokampi.

### 2.2 RNA Gewinnung durch Extraktion nach Chomczynski und Sacchi

#### [CHOMCZYNSKI und SACCHI, 1987]

Die RNA-Extraktion wurde folgendermaßen durchgeführt: Für die Proteindenaturierung wurde eine Denaturierungslösung (Lösung D) verwendet (Tab. 2.1). Zunächst erfolgte eine manuelle Homogenisation des Gewebes mit einem Pistill in einem Glasgefäß. Dazu wurden ca. 100 mg des tiefgefrorenen Gewebes abgewogen und mit 1 ml der Lösung D versetzt. Dem Homogenisat wurde nun 0,1 ml 2 M Natriumacetat (pH = 4), 1 ml 99 %ige Phenollösung und 1 ml Chloroform-Isoamylalkohol-Gemisches (25:1,v/v) hinzugegeben. Nach jeder Zugabe wurde die Suspension kräftig gemischt. Die Gesamtlösung wurde nun für 15 Minuten auf Eistemperatur gehalten, anschließend erfolgte eine Phasentrennung durch Zentrifugation für 20 Minuten bei 8000 g bei 4°C (Eppendorfzentrifuge, 5804R). Die obere wässrige Phase mit der RNA wurde abpipetiert und in ein neues

Zentrifugenröhrchen überführt. Die Interphase und die phenolhaltige Phase mit der DNA und den denaturierten Proteinen wurden verworfen. Die wässrige Phase wurde mit 1 ml Isopropanol versetzt und eine Präzipitation über eine Stunde bei  $-20^{\circ}\text{C}$  durchgeführt. Die Pelletierung der RNA geschah erneut durch Zentrifugation für 20 Minuten bei  $8000\text{ g}$  unter  $4^{\circ}\text{C}$  in der Eppendorffzentrifuge. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 0,3 ml der Lösung D aufgelöst. Eine weitere Fällung über Nacht bei  $-20^{\circ}\text{C}$  wurde nach Zugabe von 0,1 Vol.-% 3 M Natriumacetat und 2,5-Vol.-% Ethanol durchgeführt. Eine Pelletierung der RNA erfolgte wie oben beschrieben. Das erhaltene RNA-Pellet wurde mit Aqua bidest. versetzt und nach DNase-Behandlung, Konzentrationsbestimmung und Portionierung bei einer Temperatur von  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert.

Lösung D:	Sarcosyl	0,5 %
	Natriumcitrat	25 mM, pH = 7
	Guanidinthiozyanat	5 M
	$\beta$ -Mercaptoethanol	0,08 M
	Chloroform-Isoamyalkohol	25:1,v/v
	Phenol	99 %
	Na-Acetat	2 M

**Tabelle 2.1:** Zusammensetzung und Konzentration der Pufferlösungen für die RNA-Extraktion nach Chomczynski und Sacchi

### 2.3 Quantitative RNA-Bestimmung

Die Konzentration der gewonnenen RNA wird mittels eines photometrischen Verfahrens ermittelt. Hierzu wurde  $1\ \mu\text{l}$  der RNA-Lösung mit Aqua dest. im Verhältnis 1:300 verdünnt und die Extinktion bei 260 nm und 280 nm ermittelt. Die Konzentration ergab sich aus der optischen Dichte (OD) bei 260 nm Wellenlänge ( $1\ \text{OD}_{260} = 40\ \mu\text{g RNA / ml}$ ). Der Reinheitsgrad der RNA wurde aus dem Quotienten der  $\text{OD}_{260}$  und  $\text{OD}_{280}$  (OD = optische Dichte bei der angegebenen Wellenlänge) bestimmt.

Für die quantitative RNA-Bestimmung wurde ein Photometer (Ultraspec 2000, Pharmacia Biotech) verwendet. Quarzküvetten wurden mit  $1\ \mu\text{l}$  aus der gewonnenen RNA-Extraktionslösung und  $299\ \mu\text{l}$  Aqua bidest. gefüllt. Anschließend erfolgte die Absorptionsmessung bei den angegebenen Wellenlängen. Die ermittelten Extinktionswerte wurden um den zuvor bestimmten Leerwert korrigiert. Anhand der Konzentrationsbestimmung erfolgte eine Portionierung der Proben zu je  $2,5\ \mu\text{g RNA}$ .

## 2.4 cDNA-Synthese (RT-Reaktion)

Die gewonnene m-RNA wurde mit Hilfe des Enzyms Reverse Transkriptase in cDNA überführt. Dabei werden randomisierte Oligonukleotidfragmente als Primer benutzt. Die Primer bestehen aus möglichst verschiedenen Sequenzen und besitzen somit die Fähigkeit an vielen Stellen der RNA gleichzeitig zu binden. Es wird so ein Primer-RNA-Hybrid gebildet. Die Reverse Transkriptase synthetisiert dann ein RNA-DNA-Hybrid.

In der vorliegenden Untersuchung wurde die cDNA-Synthese mit Hilfe eines „Kits“ („First-Strand cDNA Synthesis Kit“ von Amersham Pharmacia Biotech) durchgeführt. Dazu wurden zunächst 2,5 µg der aus den Gewebeproben gewonnenen RNA in 20 µl RNase freiem Wasser für zehn Minuten bei 65°C erhitzt, um mögliche RNA-Sekundärstrukturen zu lösen. Das schnelle Abkühlen in Eiswasser stabilisierte den Zustand der denaturierten RNA-Stränge. Anschließend wurde die Reaktionlösung mit 11 µl eines „Bulk First Strand Mix“-Puffers (45 mM Tris, pH = 8,3; 86 mM KCl; 9 mM MgCl<sub>2</sub>; 80 µg / ml BSA; je 1,8 mM dNTP), mit einer geklonten Reversen Transkriptase des Moloney Murine Leukämie Virus (MMLV), 1 µl 15 mM DTT und 1 µl randomisierter Hexanucleotide, dem pd(N)<sub>6</sub>-Primer, versetzt. Die Suspension wurde bei 37°C für 60 Minuten inkubiert und anschließend bei -20°C gelagert.

## 2.5 Primersynthese

Mit Hilfe der PCR ist es möglich, spezifische DNA-Sequenzen zu amplifizieren. Dazu sind neben der DNA-Matrize zwei Primer erforderlich, die als Startermoleküle für die DNA-Polymerase dienen. Diese Primer sind Oligonukleotide, deren Sequenz komplementär zur Sequenz der bekannten DNA-Matrize ist. Man benötigt einen sogenannten up-Primer, der am 3'-Ende des 3'-5'-Stranges ansetzt und einen low-Primer, der am 5' Ende des 5'-3'-Stranges ansetzt. Da die Synthese des neuen komplementären DNA-Stranges durch die DNA-Polymerase in 5'-3'-Richtung erfolgt, kann die Sequenz des 5'-Primers direkt aus der DNA-Nukleotidsequenz abgelesen werden. Der 5'-Primer dient dann als Ausgangspunkt der vorwärts vollziehenden Synthese. Für die Zusammensetzung des 3'-Primers ist hingegen die Sequenz der 5'-3'-DNA-Vorlage umzudrehen und gleichzeitig sind die komplementären Basen einzusetzen. Der 3'-Primer dient somit als Startermolekül für den komplementären Strang einer doppelsträngigen DNA.

Bei der Konstruktion der Primer sind bestimmte Bedingungen zu berücksichtigen. Optimal ist eine Länge der Primer zwischen 20 und 25 Basenpaaren, damit eine ausreichende Spezifität gewährleistet ist. Die Länge der Primer hat direkten Einfluß auf ihre Schmelztemperatur  $T_m$ , die in der Regel zwischen 55°C und 68°C liegen sollte (NEWTON und GRAHAM, 1994; SCHEINERT, 1994). Es ist bei der Primerkonstruktion darauf zu achten, daß die Schmelztemperaturen des up- und low-Primers möglichst ähnlich sind. Außerdem sollten die Primer weder intra- noch intermolekular komplementäre Sequenzen aufweisen, um Sekundärstrukturbildungen zu vermeiden. Der Anteil an den Basen Guanin und Cytosin (G/C-Anteil) sollte bei etwa 50% liegen (NEWTON und GRAHAM, 1994; SCHEINERT, 1994).

Für die Primersynthese wurde die jeweilige cDNA Sequenz aus der Datenbank des „National Center for Biotechnology Information“ (NCBI) zugrunde gelegt. Die Herstellung der Primer erfolgte durch die Firma MWG Biotech. Die Primer wurden HPLC-gereinigt und im lyophilisierten Zustand geliefert. Durch Zugabe von Aqua bidest. erfolgte die Resuspension der Primer derart, dass diese Stammlösungen in einer Konzentration von 0,1 mM vorlagen. Für die PCR wurden durch Verdünnung Gebrauchslösungen der Primer, mit einer Konzentration von 0,025 mM hergestellt. Stamm- und Gebrauchslösungen wurden bei -20°C gelagert. Für die einzelnen Untersuchungen wurden folgende Primerpaare eingesetzt:

### 2.5.1 Primer für Bma1

Die Konstruktion spezifischer Primer für Bma1 basierte auf einer klonierten cDNA-Sequenz. Diese ist von der Ratte (*Rattus norvegicus*) mit der Assoziationsnummer AB012600 in der Genbank der „National Center for Biotechnology Information“ (NCBI) zu finden. Es wurden Primer gewählt, die ein 473 bp langes Teilstück der cDNA umfassen. Der Bma1 up-Primer hybridisiert an Nukleotiden der Position 499 bis 520, während der Bma1 low-Primer an Nukleotide der Position 951 bis 971 bindet. Die Primer weisen folgende Charakteristika auf:

Bma1-up: Sequenz	5'-ttgtcgtaggatgtgaccgagg-3'
Länge	22 Basenpaare
Schmelztemperatur	59,6°C
G/C-Anteil	54,5%

Bmal1-low: Sequenz	5'-ctgagctgcctcgttgcaatc-3'
Länge	21 Basenpaare
Schmelztemperatur	59,9°C
G/C-Anteil	57,1%

### 2.5.2 Primer für Clock

Für die Synthese der Primer für Clock wurde die Nukleotidsequenz von der Ratte (*Rattus norvegicus*) mit der Assoziationsnummer NM\_021856 zugrunde gelegt. Die gewählten Primer umfassen ein 401 Basenpaare langes Teilstück der cDNA. Der Clock up-Primer hybridisiert an Nukleotiden der Position 881 bis 902, während der Clock low-Primer an die Nukleotide der Position 1257 bis 1280 bindet. Ihre Charakteristika sind wie folgt:

Clock-up: Sequenz	5'-cgccaatcataggctatctgcc-3'
Länge	22 Basenpaare
Schmelztemperatur	59,0°C
G/C-Anteil	54,5 %
Clock-low: Sequenz	5'-agcactggaaagggtcgatcac-3'
Länge	22 Basenpaare
Schmelztemperatur	58,7°C
G/C-Anteil	50,0 %

### 2.5.3 Primer für Per 1

Für die Konstruktion der Primer für Per 1 wurde die Nukleotidsequenz von der Maus (*Mus musculus*) mit der Assoziationsnummer AB030818 zugrunde gelegt. Entsprechende Sequenzen von der Ratte lagen nicht vor. Die gewählten Primer umfassen ein 461 Basenpaare langes Teilstück der cDNA. Der Per1 up-Primer bindet an Nukleotiden der Position 13037 bis 13059, während der Per1 low-Primer von Position 13804 bis 18025 bindet. Sie haben folgende Charakteristika:

Per 1-up: Sequenz	5'-cactgttcaactcgagatgcagc-3'
Länge	23 Basenpaare
Schmelztemperatur	59,7°C
G/C-Anteil	52,2 %

Per 1-low:	Sequenz	5' tctggttcaggatcccacgaag-3'
	Länge	22 Basenpaare
	Schmelztemperatur	59,8°C
	G/C-Anteil	54,5 %

#### 2.5.4 Primer für Per 2

Für die Konstruktion der Primer für Per 2 wurde die Nukleotidsequenz von der Ratte (*Rattus norvegicus*) mit der Assoziationsnummer NM\_031678 verwendet. Die gewählten Primer umfassen ein 479 Basenpaare langes Teilstück der cDNA. Der Per2 up-Primer hybridisiert an die Nukleotide der Position 1346 bis 1365, während der Per2 low-Primer von Position 1804 bis 1824 bindet. Sie haben folgende Charakteristika:

Per 2-up:	Sequenz	5'-cttcatcaaccegtggagca-3'
	Länge	20 Basenpaare
	Schmelztemperatur	58,5°C
	G/C-Anteil	55,0 %
Per 2-low:	Sequenz	5'-aggctagctttccagaggaac-3'
	Länge	21 Basenpaare
	Schmelztemperatur	57,7°C
	G/C-Anteil	52,4 %

#### 2.5.5 Primer für Per 3

Für die Konstruktion der Primer für Per 3 wurde die Nukleotidsequenz von der Ratte (*Rattus norvegicus*) mit der Assoziationsnummer AF311875 verwendet. Die gewählten Primer umfassen ein 295 Basenpaare langes Teilstück der cDNA. Der Per3 up-Primer hybridisiert an die Nukleotide der Position 51 bis 72, während der Per3 low-Primer von Position 323 bis 345 bindet. Sie haben folgende Charakteristika:

Per 3-up:	Sequenz	5'-tgatagaacggacgccagagt-3'
	Länge	22 Basenpaare
	Schmelztemperatur	59,9°C
	G/C-Anteil	54,5 %

Per 3-low: Sequenz	5'-cacagctgttcaactgggtgtctt-3'
Länge	23 Basenpaare
Schmelztemperatur	59,2°C
G/C-Anteil	47,8 %

### 2.5.6 Primer für Cry 1

Für die Konstruktion der Primer für Cry 1 wurde die Nukleotidsequenz von der Maus (*Mus musculus*) mit der Assoziationsnummer AF156986 verwendet. Von der Ratte lag keine Nukleotidsequenz vor. Die gewählten Primer umfassen ein 362 Basenpaare langes Teilstück der cDNA. Der Cry1 up-Primer hybridisiert an die Nukleotide der Position 118 bis 138, während der Cry1 low-Primer von Position 460 bis 479 bindet. Sie haben folgende Charakteristika:

Cry 1-up: Sequenz	5'-ctccattcatctgccagctgc-3'
Länge	21 Basenpaare
Schmelztemperatur	59,6°C
G/C-Anteil	57,1 %
Cry 2-low: Sequenz	5'-ggcatcaacaggtggcgatt-3'
Länge	20 Basenpaare
Schmelztemperatur	59,5°C
G/C-Anteil	55,0 %

### 2.5.7 Primer für Cry 2

Für die Konstruktion der Primer für Cry 2 wurde die Nukleotidsequenz von der Maus (*Mus musculus*) mit der Assoziationsnummer AF156987 verwendet. Von der Ratte lag keine Nukleotidsequenz vor. Die gewählten Primer umfassen ein 389 Basenpaare langes Teilstück der cDNA. Der Cry2 up-Primer hybridisiert an die Nukleotide der Position 1240 bis 1259, während der Cry2 low-Primer von Position 1610 bis 1628 bindet. Sie haben folgende Charakteristika:

Cry 2-up: Sequenz	5'-gtgtgaatgcaggcagctgg-3'
Länge	20 Basenpaare
Schmelztemperatur	60,2°C
G/C-Anteil	60,0 %

Cry 2-low:	Sequenz	5'-ggcagagcctggtcaagc-3'
	Länge	19 Basenpaare
	Schmelztemperatur	59,6°C
	G/C-Anteil:	63,2 %

### 2.5.8 Primer für Timeless

Für die Konstruktion der Primer für Timeless wurde die Nukleotidsequenz von der Ratte (*Rattus norvegicus*) mit der Assoziationsnummer AB019576 verwendet. Die gewählten Primer umfassen ein 458 Basenpaare langes Teilstück der cDNA. Der up-Primer hybridisiert an die Nukleotide der Position 1303 bis 1324, während der low-Primer von Position 1742 bis 1760 bindet. Sie haben folgende Charakteristika:

Timeless-up:	Sequenz	5'-tctgagaccctcagtatccgga-3'
	Länge	22 Basenpaare
	Schmelztemperatur	59,8°C
	G/C-Anteil	54,5 %
Timeless-low:	Sequenz	5'-cacgtagccctgaggagct-3'
	Länge	19 Basenpaare
	Schmelztemperatur	59,5°C
	G/C-Anteil	63,2 %

## 2.6 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die PCR dient dazu, bekannte DNA-Sequenzen *in vitro* zu amplifizieren. An diesen Sequenzen hybridisieren entsprechend komplementäre Primer. Sie dienen als Startmolekül für eine hitzeunempfindliche DNA-Polymerase. Ein PCR-Zyklus besteht dabei aus drei Temperaturschritten mit den folgenden Prozessen:

1. Denaturierung der DNA,
2. Anlagerung der Primer (annealing)
3. Verlängerung der Primer (Polymerisation)

Zunächst erfolgt eine Denaturierung der DNA-Matrize, um eine Anlagerung der Oligonukleotide zu ermöglichen. Dazu wird die Probe mit den vier dNTP's, den Oligonukleotidprimern, der DNA-Polymerase und dem geeigneten Reaktionspuffer auf 94°C erhitzt. Die optimale Annealingtemperatur ist unter anderem durch die Spezifität der Primer gegeben [NEWTON und GRAHAM, 1994; GASSEN, 1991]. Bei den für die

jeweiligen Primer optimalen Temperaturen erfolgt eine Hybridisierung an die einsträngige DNA. Danach wird der neue DNA-Strang durch Einbau komplementärer Desoxynucleosidtriphosphate mit Hilfe der DNA-Polymerase bei einer Temperatur von 72°C synthetisiert. Diese Temperatur ist optimal für die am häufigsten und zuerst verwendete hitzestabile DNA-Polymerase, die Taq-Polymerase [NEWTON und GRAHAM, 1994; SAIKI et al., 1988]. Bei den vorliegenden Experimenten wurden jeweils 35 Zyklen benutzt.

Bei der vorliegenden Untersuchung wurden zunächst die optimalen Annealingtemperaturen der jeweiligen Primerpaare mit Hilfe einer Gradienten-PCR (Mastercycler<sup>®</sup>gradient, Eppendorf) bestimmt. Als Ausgangspunkt für die Polymerasekettenreaktion wurden 3 µl des Produktes der RT-Reaktion mit Rattenhirn verwendet. Folgende Substanzen wurden dann nacheinander hinzugegeben:

- 5 µl PCR-Puffer (Bestandteile: Tris-HCL, KCL, MgCL<sub>2</sub>, Gelantine )
- 1 µl dNTP-Lösung
- 1 µl des up-Primers
- 1 µl des low-Primers
- 10 µl Taq-Master
- 0,5 µl Eppendorf Taq

Die Lösung wurde mit Aqua bidest. auf 50 µl aufgefüllt. Dieser Ansatz wurde 10 Mal hergestellt und dann in die jeweiligen Fächer des Mastercycler gestellt. Mit diesem Thermocycler war es möglich die PCR mit 10 verschiedenen Annealingtemperaturen durchzuführen. Es wurde i.d.R. ein Gradient mit den Temperaturen 52°C; 53°C; 54,2°C; 55,4°C; 56,7°C; 58,1°C; 59,4°C; 60,6°C; 61,6°C und 62,2°C gewählt.

Folgende Programmschritte werden durchgeführt:

- |                                 |            |
|---------------------------------|------------|
| 1. 94°C                         | für 1 min  |
| 2. je nach Fach 52°C;...;62,2°C | für 1 min  |
| 3. 72°C                         | für 1 min  |
| 4. Schritte 1.-3.; 35-mal       |            |
| 5. 72°C                         | für 15 min |
| 6. 4°C                          |            |

Die Polymerase-Kettenreaktionen wurden dabei mit einem sogenannten „Hot-Start“ durchgeführt, d.h. beim ersten Durchlauf der Schleife von 1.–3. wurde Schritt 1 manuell auf 3 Minuten verlängert. Die dreiminütige Denaturierung vor Zugabe des

Enzyms erfolgt, um die Effektivität der PCR zu erhöhen [CHOU et al., 1992]. Erst anschließend wurden zur Lösung 0,5 µl Taq-Polymerase hinzugegeben. Das Programm wurde dann ab Schritt 2 wieder normal ausgeführt. Nach Erreichen von Schritt 6 konnten die Lösungen aus dem Thermocycler entnommen und bei -20°C gelagert werden. Das gesamte Vorgehen wurde für alle Primerpaare mit 10 Ansätzen durchgeführt.

Nachdem mit Hilfe der Agarosegel-elektrophorese und anschließendem Sichtbarmachen der Banden die optimale Annealingtemperatur für die jeweiligen Primerpaare bestimmt worden war, wurden die PCR-Schritte mit dem Trio Thermoblock von Biometra durchgeführt. Es wurde nun als Ausgangsprodukt für die Polymerasekettenreaktion 3 µl des Produktes der RT-Reaktion mit m-RNA aus dem Hippocampus der Ratte verwendet. Folgende Substanzen wurden hinzugegeben:

- 5 µl PCR-Puffer
- 1 µl dNTP-Lösung
- 1 µl des up-Primers
- 1 µl des low-Primers
- 10 µl Taq-Master
- 0,5 µl Eppendorf-Taq

Mit Aqua bidest. wurde die Lösung auf 50 µl aufgefüllt. Die Lösung wurde mit Gefäß in einen Heizblock des Biometra-Trio Heizgerätes gestellt.

Folgende Programmschritte wurden durchgeführt:

1. 94°C für 1 min
2. je nach für die jeweilige molekulare Uhrenkomponente  
bestimmter optimaler Annealingtemperatur für 1 min
3. 72°C für 1 min
4. Schritte 1.-3. Wurden 35-mal ausgeführt
5. 72°C für 15 min
6. 4°C

Auch hier wurde die PCR mit dem „Hot-Start“ durchgeführt. Nach dem Durchlaufen der 35 Zyklen wurde die Lösung aus dem Heizblock genommen und bei -20°C gelagert.

## 2.7 Spezifitätskontrolle

### 2.7.1 DNase-Behandlung

Um die Kontamination durch genomische DNA zu verhindern, wurde das nach der Extraktion gewonnene RNA-Pellet in Aqua bidest. gelöst und eine DNase-Behandlung durchgeführt. Nach der Überführung der mRNA in eine cDNA und spezifischer Amplifikation mit Hilfe der PCR lassen sich Rückschlüsse auf die Genexpression ziehen. Verbliebene Reste genomischer DNA in der Lösung hätten dabei jedoch Ansatzstellen für die spezifischen Primer darstellen können und hinsichtlich der Genexpression falsch positive Aussagen geliefert.

Für die DNase-Behandlung wurde die RQ1 Rnase-freie Dnase von Promega in einem geeigneten Puffer verwendet. Die DNase-Aktivität kann nach Beendigung der Behandlung durch Salzkonzentrationen von mehr als 100 mM reduziert oder durch Wärmebehandlung bei 65°C bis 100°C inaktiviert werden. Für die Durchführung wurden neben der DNase ein DNase-Puffer, Phenol, Chloroform-Isoamylalkohol, Natriumacetat sowie Ethanol (Tab. 2.2.) verwendet.

DNase-Puffer :	NaCl ( 10 mM )
	Tris-HCL (40mM, pH = 7,5)
	MgCl <sub>2</sub> (6 mM)
	CaCl <sub>2</sub> (10 mM)
Phenol :	EDTA (1 mM)
	Tris-HCL (40 mM, pH = 7,5)
	Chloroform-Isoamylalkohol (25 :1,v/v)
	Natriumacetat (3 M)
	Ethanol (99,8 %)

**Tabelle 2.2 :** Zusammensetzung der Pufferlösungen für die DNase-Behandlung

Das Pellet aus der RNA-Extraktion wurde zunächst in 50 µl Aqua bidest. resuspendiert und danach mit 490 µl DNase-Puffer sowie mit 10 µl DNase, in einer Konzentration von 0,2 mM versetzt. Die Lösung wurde über 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Unter Vermischung wurden anschließend nacheinander 1 Vol.-% Phenol und 1 Vol.-% Chloroform-Isoamylalkohol hinzugegeben. Durch Zentrifugation in einer Zentrifuge (Biofuge Haereus), die über zwei Minuten bei Raumtemperatur und 10<sup>4</sup> min<sup>-1</sup> in dem Festwinkelrotor HFA 17.1 durchgeführt wurde, erfolgte eine Phasentrennung. Die

obere wässrige Phase mit der RNA wurde abpipetiert und erneut mit 1 Vol.-% Chloroform-Isoamylalkohol versetzt. Nach erneuter Zentrifugation über fünf Minuten bei Raumtemperatur und  $10^4 \text{ min}^{-1}$  Umdrehungen wurde der Überstand abpipetiert und eine Präzipitation bei  $-20^\circ\text{C}$  über mindestens 12 Stunden eingeleitet. Dazu wurden 0,1 Vol.-% 3 M Natriumacetat und 2,5 Vol.-% Ethanol dazu gegeben. Nach Zentrifugation wurde die RNA durch Pelletierung gewonnen. Dieses Pellet wurde in Aqua. bidest resuspendiert und nach Konzentrationsbestimmung mit einem RNA-Gehalt zu je  $2,5 \mu\text{g}$  portioniert und bei  $-80^\circ\text{C}$  gelagert.

### 2.7.2 Restriktionsanalyse

Mit Hilfe von Restriktionsendonucleasen lässt sich der Nachweis des spezifischen Amplikons erbringen. Diese sind in der Lage einzel- oder doppelsträngige DNA an spezifischen Stellen zu hydrolysieren und dadurch für das mittels Polymerasekettenreaktion amplifizierte DNA-Stück spezifische Schnittprodukte zu erzeugen. Voraussetzung dafür ist, daß das Enzym innerhalb der DNA-Sequenz eine Erkennungsstelle findet. Die Erkennungsstelle kann aus vier bis acht Basen bestehen und ist für jedes Enzym spezifisch. Es wurden Endonucleasen verwendet, die innerhalb der amplifizierten DNA nur eine einzige Erkennungssequenz besitzen. Der amplifizierte DNA-Strang wird dadurch in zwei DNA-Stränge bekannter Länge durchtrennt. Die spezifischen DNA-Fragmente lassen sich im Agarosegel mit Hilfe der Elektrophorese trennen und nachweisen.

Es wurden für die Spezifitätskontrolle der einzelnen molekularen Uhrenkomponenten folgende Restriktionsendonucleasen mit den in Tabelle 2.3 dargestellten Erkennungssequenzen verwendet:

Die dabei erzielten Hydrolyseprodukte sind in der Tabelle 2.4 mit ihren jeweiligen Basenpaarlängen aufgeführt.

Molekulare Uhrenkomponente	Restriktionsenzym	Erkennungssequenz
Bmal 1	Stu 1	5'-(N) <sub>n</sub> ...AGG   CCT...(N) <sub>m</sub> -3' 3'-(N) <sub>n</sub> ...TCC   GGA...(N) <sub>m</sub> -5'
Clock	Bbv 1	5'-(N) <sub>n</sub> ...   GCTGC...(N) <sub>m</sub> -3' 3'-(N) <sub>n</sub> ...   CGACG...(N) <sub>m</sub> -5'
Per 1	Blp 1	5'-(N) <sub>n</sub> ...GC   TGAG...(N) <sub>m</sub> -3' 3'-(N) <sub>n</sub> ...CGANT   CG...(N) <sub>m</sub> -5'
Per 2	Mse 1	5'-(N) <sub>n</sub> ...T   TAA...(N) <sub>m</sub> -3' 3'-(N) <sub>n</sub> ...AAT   T...(N) <sub>m</sub> -5'
Per 3	Bbv 1	5'-(N) <sub>n</sub> ...GCAGC   ... (N) <sub>m</sub> -3' 3'-(N) <sub>n</sub> ...CGTCG   ... (N) <sub>m</sub> -5'
Cry 1	Hinf 1	5'-(N) <sub>n</sub> ...G   ACTC...(N) <sub>m</sub> -3' 3'-(N) <sub>n</sub> ...CTNA   G...(N) <sub>m</sub> -5'
Cry 2	Bfa 1	5'-(N) <sub>n</sub> ...C   TAG...(N) <sub>m</sub> -3' 3'-(N) <sub>n</sub> ...GAT   C...(N) <sub>m</sub> -5'
Timeless	Hga 1	5'-(N) <sub>n</sub> ...GACGC   ... (N) <sub>m</sub> -3' 3'-(N) <sub>n</sub> ...CTGCG   ... (N) <sub>m</sub> -5'

**Tabelle 2.3 :** Restriktionsenzyme für molekulare Uhrenkomponenten mit Erkennungssequenzen

Molekulare Uhrenkomponente	Restriktions-Enzym	Amplifizierte DNA in Basenpaare (bp)	Länge der Schnittprodukte in Basenpaare (bp)	
Bmal 1	Stu 1	473	287	186
Clock	Bbv 1	401	312	84
Per 1	Blp 1	317	178	139
Per 2	Mse 1	479	303	176
Per 3	Bbv 1	295	181	114
Cry 1	Hinf 1	362	236	126
Cry 2	Bfa 1	389	254	135
Timeless	Hga 1	458	276	182

**Tabelle 2.4 :** Basenpaarlängen der amplifizierten DNA-Stränge, der jeweiligen spezifischen Restriktionsendonucleasen und ihrer Schnittprodukte

Die Durchführung der Restriktionsanalyse geschah in der Form, daß von den jeweiligen PCR-Produkten 22 µl abgenommen und in ein separates steriles Eppendorfgefäß gefüllt wurden. Es erfolgte nach der Zugabe von 10 Vol- % Natriumacetat ( 2M ) und 250 Vol.-% Ethanol eine Präzipitation der Nukleinsäuren bei -40°C über mindestens acht

Stunden. Danach wurde das DNA-Pellet durch Zentrifugation in einer Zentrifuge (Biofuge Haereus) für zehn Minuten bei  $10^4 \text{ min}^{-1}$  Umdrehungen in einem Festwinkelrotor und Raumtemperatur gewonnen. Der Überstand wurde abpipettiert und das Pellet bei Raumtemperatur ausreichend getrocknet. Anschließend wurde das Pellet in 18  $\mu\text{l}$  Aqua bidest. resuspendiert. Je nach zugesetzter Endonuclease wurde die Reaktionslösung mit 2  $\mu\text{l}$  eines zugehörigen, zehnfach konzentrierten Puffers komplettiert und die Lösung über einen Zeitraum von 16 Stunden bei einer Temperatur von  $37^\circ \text{C}$  inkubiert. Die Menge bzw. Konzentration des beigemengten Enzyms betrug etwa zwei bis fünf Units pro Reaktionsvolumen, abhängig vom entsprechenden Enzym. Einzelheiten sind der Tabelle 2.5 zu entnehmen. Sämtliche Enzyme wurden mit zugehörigen Puffern von der Firma New England Biolabs Inc. geliefert (vgl. Tabelle 2.6). Im Anschluss an die Behandlung mit Restriktionsendonucleasen wurden die einzelnen DNA-Fragmente mit Hilfe der Elektrophorese in einem Agarosegel getrennt. Durch die Behandlung mit Ethidiumbromid und Anregung dieses planaren Aromaten mit UV-Licht konnten die DNA-Produkte visualisiert werden.

<b>Restriktions-Enzym</b>	<b>Enzymmenge für 1 <math>\mu\text{l}</math> DNA [Units]</b>	<b>Konzentration im Aufbewahrungspuffer [Units / ml]</b>	<b>Eingesetzte Enzymmenge [Units]</b>	<b>Puffertyp</b>
Stu 1	0,5	10.000	5	2
Bbv 1	1	2.000	2	2
Blp 1	0,5	10.000	5	4
Mse 1	0,5	4.000	2	2
Hinf 1	0,5	10.000	5	2
Bfa 1	1	5.000	5	4
Hga 1	2	2.000	2	1

**Tabelle 2.5 :** *Eigenschaften und Konzentrationen der Restriktionsendonucleasen sowie der verwendeten Puffersysteme*

<b>Puffertyp</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>4</b>
Natriumchlorid	-	50 mM	-
Tris-HCL	-	10 mM	-
Magnesiumchlorid	10 mM	10 mM	-
Kaliumacetat	-	-	50 mM
TRIS-Acetat	-	-	20 mM
Bis Tris Propan-HCL	10 mM	-	-
Magnesiumacetat	-	-	10 mM
DTT	1 mM	1 mM	1 mM
PH-Wert, $\delta = 25^{\circ}\text{C}$	7,0	7,9	7,9

**Tabelle 2.6 :** *Zusammensetzung der bei der Enzymrestriktion eingesetzten Puffersysteme*

## 2.8 Nachweis der PCR-Produkte mittels der Agarosegel-Elektrophorese

Um die Ergebnisse der Polymerasekettenreaktion darzustellen, wurde mit der Agarosegel-Elektrophorese gearbeitet [MANTIATIS et al., 1982]. Die Laufweite der DNA in dem Agarosegel nimmt mit steigender Molekülgröße ab. Zur Darstellung der DNA-Banden in Agarosegelen nutzt man die Fluoreszenz von Ethidiumbromid. Nach Anregung durch UV-Licht bei 300 nm emittiert Ethidiumbromid monochromatisches Licht bei einer Wellenlänge von 590 nm. Diese Emission kann denn mittels photographischer Methoden oder mit computergestützten Videosystemen erfasst werden. Für die Herstellung der Agarosegele wurde eine 2 %ige Agaroselösung verwendet. Je nach Größe des Laufbehälters wurden 0,66 g bzw. 1 g Agarose-Pulver in 30 ml bzw. 50 ml TAE-Lösung (Bestandteile: Trisma Base 1,6 mol/l; Natriumacetat 0,8 mol/L; EDTA 0,04 mol/l) gelöst. Das Gemisch wurde in einer Mikrowelle zum Kochen gebracht. Zur erhitzten Lösung wurden 50  $\mu\text{l}$  Ethidiumbromid hinzugegeben. Die Lösung wurde in einen Gelbehälter gegossen. Der Behälter wurde vorher an den Seiten zur Abdichtung mit Tesafilm abgeklebt. Im Behälter war an vorgesehener Stelle ein „Lochkamm“ eingebracht, um im Gel die für die Lösungen benötigten Vertiefungen herzustellen. Das Gel wurde für 30 Minuten zum Trocknen belassen. Nachdem das Gel bei Raumtemperatur polymerisiert war, wurde der Behälter mit TAE-Lösung aufgefüllt, so daß sich das Gel knapp unter der Flüssigkeitsoberfläche befand. Der Lochkamm konnte nun aus dem Gel gezogen werden. Die unterschiedlichen Laflösungen wurde aus 12  $\mu\text{l}$  PCR-Produkt durch Zugabe von 3  $\mu\text{l}$  Saccharose-Lösung hergestellt und nun

mit einer Pipette in die Vertiefungen des Gels gefüllt. In eine freie Vertiefung wurde eine Längenstandard-Lösung gegeben, um bei der Betrachtung des Ergebnisses der Gelelektrophorese, die Länge der PCR-Produkte in Basenpaaren feststellen zu können. Diese enthielt Fragmente mit den Längen ganzzahliger Vielfacher von 100 Basenpaaren. Nach Zugabe der Lösungen in die jeweiligen Slots wurde an die Elektroden des Gelbades eine Gleichspannung von 60 V angelegt. Nach 60 Minuten wurde die Spannung abgestellt. Das Gel konnte aus dem Behälter entnommen werden und unter UV-Licht betrachtet werden.

### **2.9 Dokumentation der Gelelektrophorese**

Nach der Elektrophorese wurden die Banden unter UV-Licht mit Hilfe einer CCD-Kamera im Gel sichtbar gemacht. Dazu wurde der Transilluminator TI 3 und das Dokumentationssystem BioDok II<sup>TM</sup> von Biometra<sup>®</sup> verwendet.

### 3. Ergebnisse

Die vorliegenden Experimente hatten den Nachweis von Gentranskripten für die molekularen Uhrenkomponenten im Hippokampusgewebe der Ratte zum Ziel. Der Nachweis erfolgte mit Hilfe der Reverse Transkriptase-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR). Dazu wurden geeignete Primer anhand der vorliegenden cDNA-Sequenzen für des Rattengesamthirn oder Maus-Gehirn konstruiert, die optimale Annealingtemperatur für die jeweiligen Primerpaare bestimmt, und m-RNA aus dem Hippokampus der Ratte eingesetzt. Es wurde außerdem eine Spezifitätskontrolle mit ausgewählten Restriktionsenzymen durchgeführt, um sicherzustellen, dass das richtige PCR-Produkt gefunden wurde.

#### 3.1 Nachweis von Bmal 1-Gentranskripten

Um nachzuweisen, dass m-RNA für Bmal 1 im Hippokampus der Ratte vorhanden ist, wurden zunächst unter Berücksichtigung der Bedingungen für die Primersynthese entsprechende Primer konstruiert.

In Abb.3.1A ist ein Ausschnitt aus der „Bmal1“-cDNA-Sequenz der Ratte aus der Datenbank des „National Center for Biotechnology Information“ abgebildet. Die gewählten Primer sind grau schraffiert hervorgehoben. Das durch sie erfasste und zu amplifizierende Teilstück ist 473 Basenpaare lang. Der Bmal1 up-Primer hybridisiert an Nukleotiden der Position 499 bis 520, während der Bmal1 low-Primer an Nukleotide der Position 951 bis 971 bindet. Mit einem Kasten gekennzeichnet ist die Erkennungsstelle, an die das zur Spezifitätskontrolle gewählte Restriktionsenzym Stu 1 bindet. Die Schnittstelle ist mit einem dicken Balken gekennzeichnet.

In Abb.3.1B ist ein Gel zur Bestimmung der optimalen Hybridisierungstemperatur für das ausgesuchte Primerpaar dargestellt. Bei den Temperaturen 53,0°C bis 59,4°C ist eine zweite Bande zu erkennen. Die Hybridisierungstemperatur für die weiteren Experimente wurde mit 61,6°C gewählt.

In Abb.3.1C ist die positive Spezifitätskontrolle mit dem Restriktionsenzym Stu 1 dargestellt. Es schneidet das durch die Primer erfasste DNA-Stück von 473 Basenpaaren in zwei Teilstücke mit 287 und 186 Basenpaaren. Außerdem ist eine dünne Bande bei 473 Basenpaaren zu erkennen, die durch das Enzym nicht geschnittene DNA zeigt. Im Kontrollansatz wurde kein Enzym hinzugegeben und dementsprechend ist nur eine ungeschnittene Bande im Bereich von 473 Basenpaaren vorhanden.

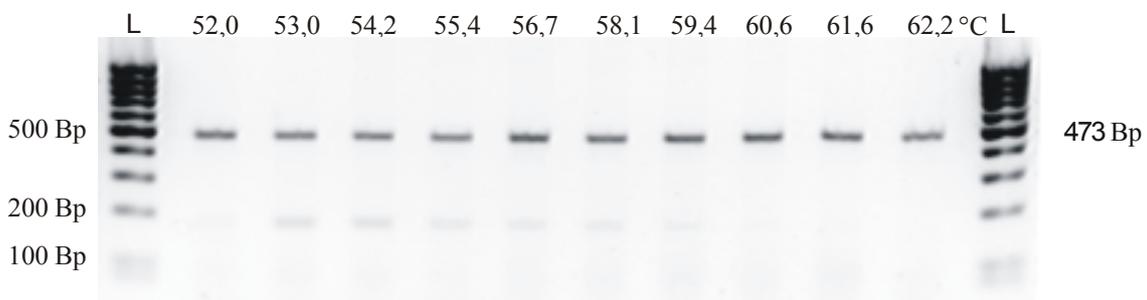
In Abb.3.1D ist der gelelektrophoretische Nachweis von Bmal 1 im Gesamthirn und im Hippokampus der Ratte mit Hilfe der konstruierten Primer und unter Berücksichtigung der bestimmten Annealingtemperatur dargestellt. Es sind klare Signale im Bereich von 473 Basenpaaren erkennbar.

**A** Bmal1-cDNA-Sequenz (Rattus norvegicus):

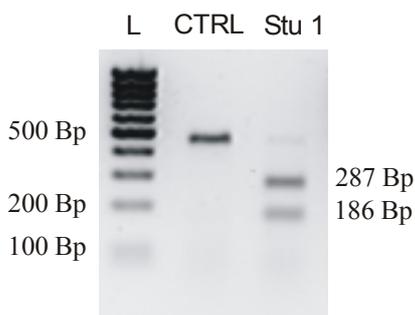
```

cagcagatggatTTTTGTTGTCGtaggatGTGaccgaggggaagatcctcttTGTctccg
aatctgtcttcaagatcctcaattatagccagaatgaccttattggccagagtttGttcg
actacctgcatccaaaagatattgccaaagttaaggaacagctatcttctcggacactg
cacctcgggagcgactcatcgatgccaagactggacttccgggttaaaccggatataacc
ctgggcccctcccgattgtgctctggagctcggcgctctttcttctgtaggatgaagtga
acagg ccttcagtaaaggTGAagataaggacttcgcctccacctgttcaaagaaaaag
cagatcgaaagagcttctgcacaatccacagcacaggctacttgaaaagctggccacca
caaagatggggctggacgaagacagtgaaccagacaatgagggctgcaatctgagctgcc
tcgttgcaatcgggagcactgcactcacacatggtccacagccagtgaacggggaatac
    
```

**B** Bestimmung der optimalen Hybridisierungstemperatur



**C** Spezifitätskontrolle



**D** Nachweis im Nervengewebe

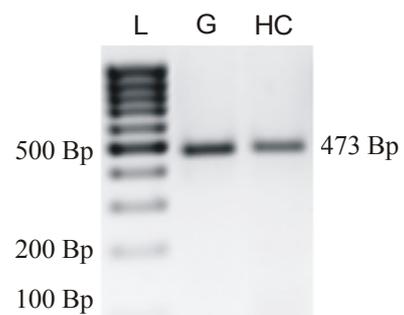


Abbildung 3.1 : Nachweis von Gen-Transkripten für Bmal 1 im Nervengewebe der Ratte. A: Ausschnitt aus der cDNA-Sequenz der Ratte für Bmal 1 mit Position der Primer (dunkelgrau) und Erkennungsstelle (hellgrauer Kasten) sowie Schnittstelle des gewählten Restriktionsenzym Stu 1 (Balken in Kasten). B: Gelelektrophoretischer Nachweis zur Bestimmung der optimalen Annealingtemperatur. C: Gelelektrophoretischer Nachweis zur Spezifitätskontrolle mit dem Restriktionsenzym Stu 1; der Kontrollansatz (CTRL) ist ohne Enzymbehandlung. D: Gelelektrophoretischer Nachweis von amplifizierter cDNA für Bmal 1 im Hippokampus (HC) und im Gesamthirn (G) der Ratte. Bp = Basenpaare, Stu 1 = Restriktionsenzym von *Streptomyces tubercidicus*, L= 100-Basenpaar-Standard

### 3.2 Nachweis von Clock-Gentranskripten

In Abb.3.2A ist ein Ausschnitt aus der „Clock“-cDNA-Sequenz der Ratte aus der Datenbank des „National Center for Biotechnology Information“ abgebildet. Die gewählten Primer sind grau schraffiert hervorgehoben. Das durch sie erfasste und zu amplifizierende Teilstück ist 401 Basenpaare lang. Der Clock up-Primer hybridisiert an Nukleotiden der Position 881 bis 902, während der Clock low-Primer an die Nukleotide der Position 1257 bis 1280 bindet. Mit einem Kasten gekennzeichnet ist die Erkennungsstelle, an die das zur Spezifitätskontrolle gewählte Restriktionsenzym Bbv 1 bindet. Die Schnittstelle ist mit einem dicken Balken gekennzeichnet.

In Abb.3.2B ist ein Gel zur Bestimmung der optimalen Hybridisierungstemperatur für das ausgesuchte Primerpaar dargestellt. Wie hieraus ersichtlich, fanden Amplifizierungen über einen weiten Temperaturbereich statt, ohne dass es zum Auftreten unspezifischer Banden kam. Bei 59,4°C liegt wahrscheinlich ein Fehlversuch vor. Die Hybridisierungstemperatur für die weiteren Experimente wurde mit 58,1°C gewählt.

In Abb.3.2C ist die positive Spezifitätskontrolle mit dem Restriktionsenzym Bbv 1 dargestellt. Es schneidet das durch die Primer erfasste DNA-Stück von 401 Basenpaaren in zwei Teilstücke mit 312 und 84 Basenpaaren. Im Kontrollansatz wurde kein Enzym hinzugegeben und dementsprechend ist nur eine ungeschnittene Bande im Bereich von 401 Basenpaaren vorhanden.

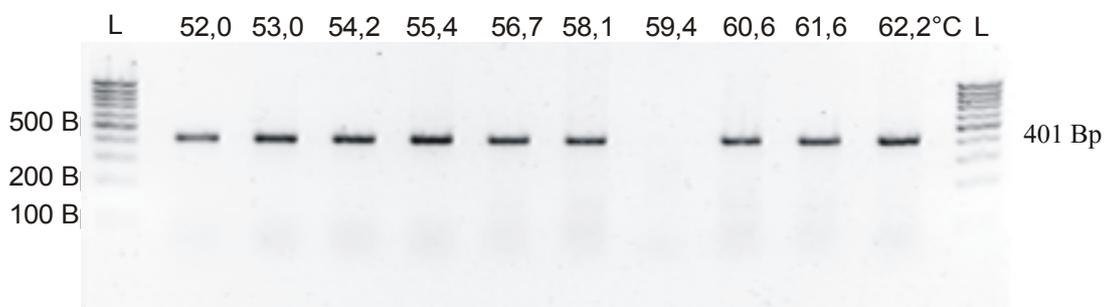
In Abb.3.2D ist der gelelektrophoretische Nachweis von Clock im Gesamthirn und im Hippokampus der Ratte mit Hilfe der konstruierten Primer und unter Berücksichtigung der bestimmten Annealingtemperatur dargestellt. Es sind klare Signale im Bereich von 401 Basenpaaren zu erkennen.

**A** Clock-cDNA-Sequenz (Rattus norvegicus):

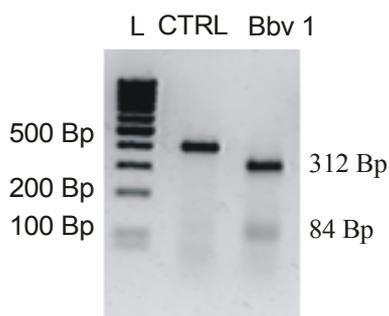
```

agtttagaatggaagtttctatttctagatcacagggcgccgccaatcataggctatctgcc
gtttgaagtcctgggaacatcaggctatgattactatcatgtggacgacctagaaagt
ctggcaaaatgtcatgagcacttaatgcaatatggaaaaggcaaatcatgttactatagg
ttctgaccaaaggacagcagtggtgattggcttcagactcattactatatcacttaccat
cagtggaactcaaggccagagttcatcgttgtactcacactgtagtaagttatgcagaa
gtagggctgaaagacggcgagaacttggcgtgaggagtcttcccgagaca|gctgct
gacaaaagccaagattctgggtctgacaatcgataaacacagtgagtctcaaggaagca
ctggaaagggttcgatcacagcccaactccttctgcctcctccagaagctcaagaaagtcc
    
```

**B** Bestimmung der optimalen Hybridisierungstemperatur



**C** Spezifitätskontrolle



**D** Nachweis im Nervengewebe

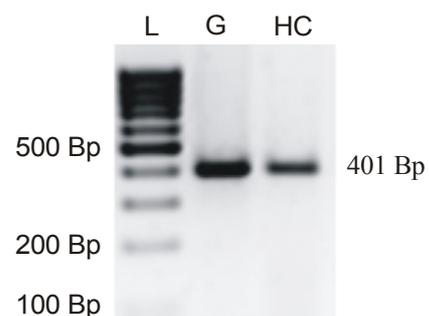


Abbildung 3.2: Nachweis von Gen-Transkripten für Clock im Nervengewebe der Ratte. A: Ausschnitt aus der cDNA-Sequenz der Ratte für Clock mit Position der Primer (dunkelgrau) und Erkennungsstelle (hellgrauer Kasten) sowie Schnittstelle des gewählten Restriktionsenzym *Bbv 1* (Balken in Kasten). B: Gelelektrophoretischer Nachweis zur Bestimmung der optimalen Annealingtemperatur. C: Gelelektrophoretischer Nachweis zur Spezifitätskontrolle mit dem Restriktionsenzym *Bbv 1*; der Kontrollansatz (CTRL) ist ohne Enzymbehandlung. D: Gelelektrophoretischer Nachweis von amplifizierter cDNA für Clock im Hippokampus (HC) und im Gesamthirn (G) der Ratte. Bp = Basenpaare, *Bbv 1* = Restriktionsenzym von *Bacillus brevis*, L=100-Basenpaar-Standard

### 3.3 Nachweis von Per 1-Gentranskripten

In Abb.3.3A ist ein Ausschnitt aus der „Per 1“-cDNA-Sequenz der Ratte aus der Datenbank des „National Center for Biotechnology Information“ abgebildet. Die gewählten Primer sind grau schraffiert hervorgehoben. Das durch sie erfasste und zu amplifizierende Teilstück ist 317 Basenpaare lang. Der Per1 up-Primer bindet an Nukleotiden der Position 13037 bis 13059, während der Per1 low-Primer von Position 13804 bis 18025 bindet. Mit einem Kasten gekennzeichnet ist die Erkennungsstelle, an die das zur Spezifitätskontrolle gewählte Restriktionsenzym Bsp 1 bindet. Die Schnittstelle ist mit einem dicken Balken gekennzeichnet.

In Abb.3.3B ist ein Gel zur Bestimmung der optimalen Hybridisierungstemperatur für das ausgesuchte Primerpaar dargestellt. Wie hieraus ersichtlich, fanden Amplifizierungen über einen weiten Temperaturbereich statt, ohne dass es zum Auftreten unspezifischer Banden kam. Die Hybridisierungstemperatur für die weiteren Experimente wurde mit 58,1°C gewählt.

In Abb.3.3C ist die positive Spezifitätskontrolle mit dem Restriktionsenzym Bsp 1 dargestellt. Es schneidet das durch die Primer erfasste DNA-Stück von 317 Basenpaaren in zwei Teilstücke mit 178 und 139 Basenpaaren. Im Kontrollansatz wurde kein Enzym hinzugegeben und dementsprechend ist nur eine ungeschnittene Bande im Bereich von 317 Basenpaaren vorhanden.

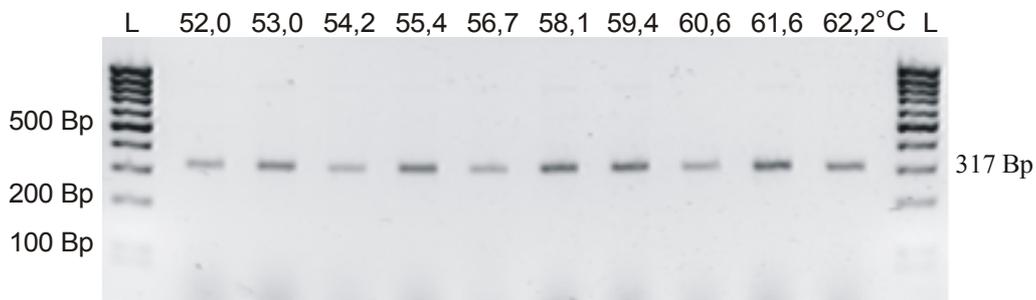
In Abb.3.3D ist der gelelektrophoretische Nachweis von Per 1 im Gesamthirn und im Hippokampus der Ratte mit Hilfe der konstruierten Primer und unter Berücksichtigung der bestimmten Annealingtemperatur dargestellt. Es sind klare Signale im Bereich von 317 Basenpaaren zu erkennen.

**A** Per 1-cDNA-Sequenz (Mus musculus):

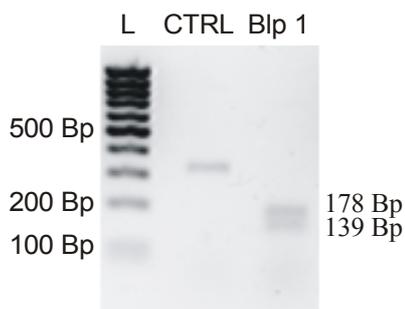
```

caccgccagactcccactggtcaactcgagatgcagctccccactccagctcaatctg
ctgcagctgaggagtcccccgcacggag gggggcgctgctgcaggaggcccaggaagc
agtctgggcccctgcctcccagtgaggagactgc | tgagccagaggccagattggtggaggt
tactgagtcgtccaatcaggatgcactttcaggctccagcgacctgctggagctactgctccaagaa
gactctcgctcgggcaacaggctccgcagcctcaggctccctgggctctggcctgggctct
gggtctgggtcaggatcccacgaagggggaagcacctcagccagcatcaccctgagtaa
    
```

**B** Bestimmung der optimalen Hybridisierungstemperatur



**C** Spezifitätskontrolle



**D** Nachweis im Nervengewebe

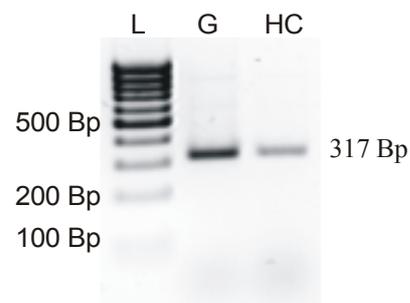


Abbildung 3.3 : Nachweis von Gen-Transkripten für Per 1 im Nervengewebe der Ratte.  
 A: Ausschnitt aus der cDNA-Sequenz der Maus für Per 1 mit Position der Primer (dunkelgrau) und Erkennungsstelle (hellgrauer Kasten) sowie Schnittstelle des gewählten Restriktionsenzymys B1p 1 (Balken in Kasten). B: Gelelektrophoretischer Nachweis zur Bestimmung der optimalen Annealingtemperatur. C: Gelelektrophoretischer Nachweis zur Spezifitätskontrolle mit dem Restriktionsenzym B1p 1; der Kontrollansatz (CTRL) ist ohne Enzymbehandlung. D: Gelelektrophoretischer Nachweis von amplifizierter cDNA für Per 1 im Hippokampus (HC) und im Gesamthirn (G) der Ratte. Bp = Basenpaare, B1p 1 = Restriktionsenzym von Bacillus lentus, L=100-Basenpaar-Standard

### 3.4 Nachweis von Per 2-Gentranskripten

In Abb.3.4A ist ein Ausschnitt aus der „Per 2“-cDNA-Sequenz der Ratte aus der Datenbank des „National Center for Biotechnology Information“ abgebildet. Die gewählten Primer sind grau schraffiert hervorgehoben. Das durch sie erfasste und zu amplifizierende Teilstück ist 479 Basenpaare lang. Der Per2 up-Primer hybridisiert an die Nukleotide der Position 1346 bis 1365, während der Per2 low-Primer von Position 1804 bis 1824 bindet. Mit einem Kasten gekennzeichnet ist die Erkennungsstelle, an die das zur Spezifitätskontrolle gewählte Restriktionsenzym Mse 1 bindet. Die Schnittstelle ist mit einem dicken Balken gekennzeichnet.

In Abb.3.4B ist ein Gel zur Bestimmung der optimalen Hybridisierungstemperatur für das ausgesuchte Primerpaar dargestellt. Wie hieraus ersichtlich, fanden Amplifizierungen über einen weiten Temperaturbereich statt, ohne dass es zum Auftreten unspezifischer Banden kam. Die Hybridisierungstemperatur für die weiteren Experimente wurde mit 58,1°C gewählt.

In Abb.3.4C ist die positive Spezifitätskontrolle mit dem Restriktionsenzym Mse 1 dargestellt. Es schneidet das durch die Primer erfasste DNA-Stück von 479 Basenpaaren in zwei Teilstücke mit 303 und 176 Basenpaaren. Im Kontrollansatz wurde kein Enzym hinzugegeben und dementsprechend ist nur eine ungeschnittene Bande im Bereich von 479 Basenpaaren vorhanden.

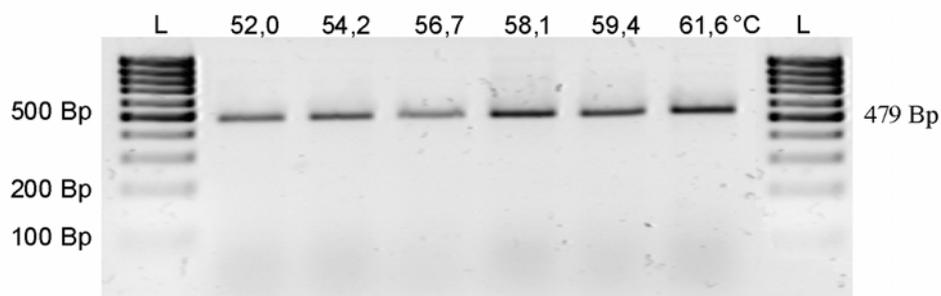
In Abb.3.4D ist der gelelektrophoretische Nachweis von Per 2 im Gesamthirn und im Hippokampus der Ratte mit Hilfe der konstruierten Primer und unter Berücksichtigung der bestimmten Annealingtemperatur dargestellt. Es sind klare Signale im Bereich von 479 Basenpaaren zu erkennen.

**A** Per2-cDNA-Sequenz (Rattus norvegicus):

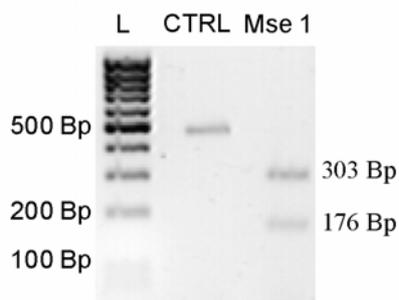
```

tcacactggacactagctgggtccagcttcatcaaccctgggagcaggaagatatccttca
tcacgaggagcacaagtcagggtaggccccttgaatgaggatgtgttcgcagcctccc
ctgcccagaggagaagactccgcaccccagcgttcaggagctcacagagcaaatccacc
ggctactgatgcaacctgtccccacagcggctccagtggtatgggagcctgggcagta
acggatcccacgaacacctcatgagccagacatcatccagcgacagcaatggcaagagg
agtctcactggaggagatccggaattttaaaccagtggaagagtaaaagcaaaagtc
actttctcctgagtctggaggacaaaaggaagcctctgttcagaaatgcaagtagtc
ctccagctcaggtgaggtctgtcaccacctggaagggacagctcggggggccagcctac
ccaaggctagcttccagaggaactaacctataagagccagcctcctgtcctaccagc
    
```

**B** Bestimmung der optimalen Hybridisierungstemperatur



**C** Spezifitätskontrolle



**D** Nachweis im Nervengewebe

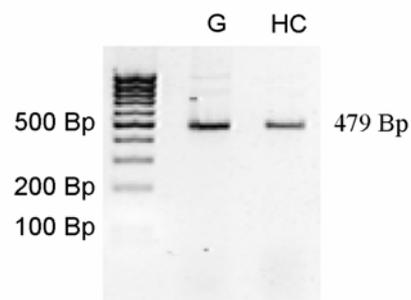


Abbildung 3.4: Nachweis von Gen- Transkripten für Per 2 im Nervengewebe der Ratte. A: Ausschnitt aus der cDNA-Sequenz der Ratte für Per 2 mit Position der Primer (dunkelgrau) und Erkennungsstelle (hellgrauer Kasten) sowie Schnittstelle des gewählten Restriktionsenzym Mse 1 (Balken in Kasten). B: Gelelektrophoretischer Nachweis zur Bestimmung der optimalen Annealingtemperatur. C: Gelelektrophoretischer Nachweis zur Spezifitätskontrolle mit dem Restriktionsenzym Mse 1; der Kontrollansatz (CTRL) ist ohne Enzymbehandlung. D: Gelelektrophoretischer Nachweis von amplifizierter cDNA für Per 2 im Hippokampus (HC) und im Gesamthirn (G) der Ratte. Bp = Basenpaare, Mse 1 = Restriktionsenzym von *Micrococcus species*, L=100-Basenpaar-Standard

### 3.5 Nachweis von Per 3-Gentranskripten

In Abb.3.5A ist ein Ausschnitt aus der „Per 3“-cDNA-Sequenz der Ratte aus der Datenbank des „National Center for Biotechnology Information“ abgebildet. Die gewählten Primer sind grau schraffiert hervorgehoben. Das durch sie erfasste und zu amplifizierende Teilstück ist 295 Basenpaare lang. Der Per3 up-Primer hybridisiert an die Nukleotide der Position 51 bis 72, während der Per3 low-Primer von Position 323 bis 345 bindet. Mit einem Kasten gekennzeichnet ist die Erkennungsstelle, an die das zur Spezifitätskontrolle gewählte Restriktionsenzym Bbv 1 bindet. Die Schnittstelle ist mit einem dicken Balken gekennzeichnet.

In Abb.3.5B ist ein Gel zur Bestimmung der optimalen Hybridisierungstemperatur für das ausgesuchte Primerpaar dargestellt. Wie hieraus ersichtlich, fanden Amplifizierungen über einen weiten Temperaturbereich statt, ohne dass es zum Auftreten unspezifischer Banden kam. Die Hybridisierungstemperatur für die weiteren Experimente wurde mit 58,1°C gewählt.

In Abb.3.5C ist die positive Spezifitätskontrolle mit dem Restriktionsenzym Bbv 1 dargestellt. Es schneidet das durch die Primer erfasste DNA-Stück von 295 Basenpaaren in zwei Teilstücke mit 181 und 114 Basenpaaren. Im Kontrollansatz wurde kein Enzym hinzugegeben und dementsprechend ist nur eine Bande im Bereich von 295 Basenpaaren vorhanden.

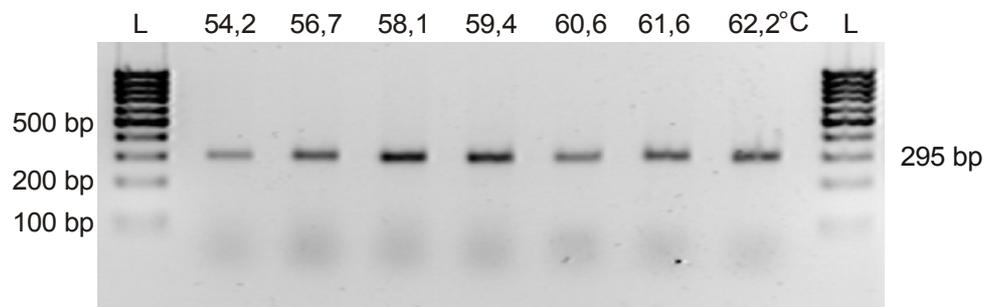
In Abb.3.5D ist der gelelektrophoretische Nachweis von Per 3 im Gesamthirn und im Hippokampus der Ratte mit Hilfe der konstruierten Primer und unter Berücksichtigung der bestimmten Annealingtemperatur dargestellt. Es sind klare Signale im Bereich von 295 Basenpaaren zu erkennen.

### A Per 3-cDNA-Sequenz (Rattus norvegicus)

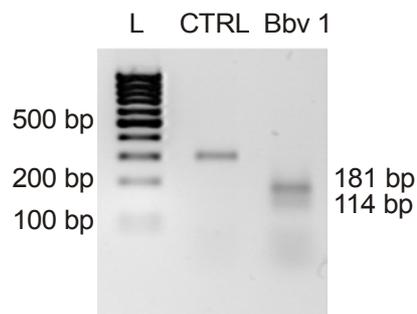
```

acagagagacagagcctttccggggcgggctgaagaatctatctggagaatgatagaacggacgc
cagagtgtgttctcatgacataccangtgccggagaggggtaaanacacgggtgctgaggggaaga
cctggaaaaacttcacagcatggagcggcagcagccccagttcttctgcgcanangaggag
ctggccaaggtgcggtcctggatccacagccgccctgccctgaggaaagacagctccnaagcta
tgtcaccttgaaaacagaagttcagttggtgacactgcagaagcctgtgaacatgtccagcanaa
gacaccagttgaacagctgtgaagatgtcccaccctctccaggtcatgtngaacacanaaacgtgt
gttnctcattaagt
    
```

### B Bestimmung der optimalen Hybridisierungstemperatur



### C Spezifitätskontrolle



### D Nachweis im Nervengewebe

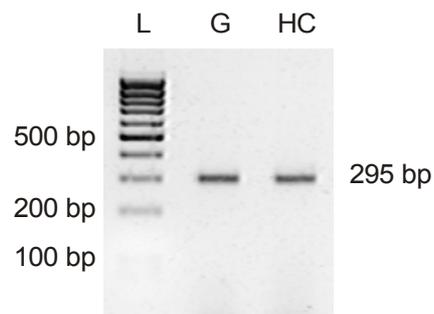


Abbildung 3.5 : Nachweis von Gen-Transkripten für Per 3 im Nervengewebe der Ratte. A: Ausschnitt aus der cDNA-Sequenz der Ratte für Per 3 mit Position der Primer (dunkelgrau) und Erkennungsstelle (hellgrauer Kasten) sowie Schnittstelle des gewählten Restriktionsenzym Bbv 1 (Balken in Kasten). B: Gelelektrophoretischer Nachweis zur Bestimmung der optimalen Annealingtemperatur. C: Gelelektrophoretischer Nachweis zur Spezifitätskontrolle mit dem Restriktionsenzym Bbv 1; der Kontrollansatz (CTRL) ist ohne Enzymbehandlung. D: Gelelektrophoretischer Nachweis von amplifizierter cDNA für Per 3 im Hippokampus (HC) und im Gesamthirn (G) der Ratte. Bp = Basenpaare, Bbv 1 = Restriktionsenzym von *Bacillus brevis*, L=100-Basenpaar-Standard

### 3.6 Nachweis von Cry 1-Gentranskripten

In Abb.3.6A ist ein Ausschnitt aus der „Cry 1“-cDNA-Sequenz der Ratte aus der Datenbank des „National Center for Biotechnology Information“ abgebildet. Die gewählten Primer sind grau schraffiert hervorgehoben. Das durch sie erfasste und zu amplifizierende Teilstück ist 362 Basenpaare lang. Der Cry1 up-Primer hybridisiert an die Nukleotide der Position 118 bis 138, während der Cry1 low-Primer von Position 460 bis 479 bindet. Mit einem Kasten gekennzeichnet ist die Erkennungsstelle, an die das zur Spezifitätskontrolle gewählte Restriktionsenzym Hinf 1 bindet. Die Schnittstelle ist mit einem dicken Balken gekennzeichnet.

In Abb.3.6B ist ein Gel zur Bestimmung der optimalen Hybridisierungstemperatur für das ausgesuchte Primerpaar dargestellt. Bei den Temperaturen 52,0°C bis 56,7°C sind neben Hauptbanden auch zahlreiche unspezifische Nebenbanden zu erkennen. Die Hybridisierungstemperatur für die weiteren Experimente wurde mit 60,6°C gewählt.

In Abb.3.6C ist die positive Spezifitätskontrolle mit dem Restriktionsenzym Hinf 1 dargestellt. Es schneidet das durch die Primer erfasste DNA-Stück von 362 Basenpaaren in zwei Teilstücke mit 236 und 126 Basenpaaren. Im Kontrollansatz wurde kein Enzym hinzugegeben und dementsprechend ist nur eine Bande im Bereich von 362 Basenpaaren vorhanden.

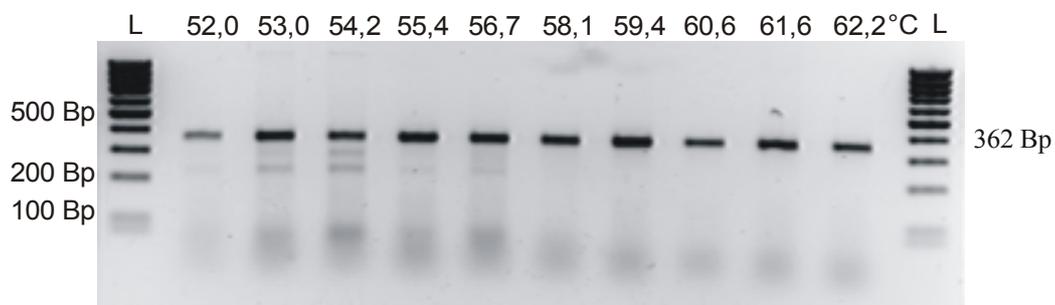
In Abb.3.6D ist der gelelektrophoretische Nachweis von Cry 1 im Gesamthirn und im Hippokampus der Ratte mit Hilfe der konstruierten Primer und unter Berücksichtigung der bestimmten Annealingtemperatur dargestellt. Es sind klare Signale im Bereich von 362 Basenpaaren zu erkennen.

**A** Cry1-cDNA-Sequenz (Mus musculus):

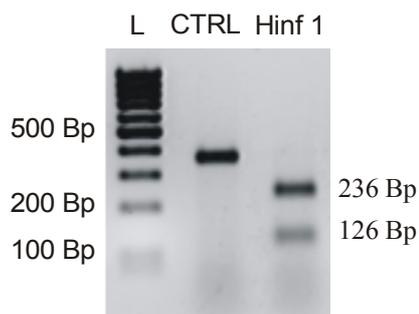
```

gacgctgggcgcgggctcctgaaggacgtcgcgcgtggatcccggcgctcggcagc
ctccattcatctgccagctgcgcgctcgccacctccgcgccccgcctcggcgtcgctcctcc
cgtcccctctctgcagccccttccccactcctcgggtgaggagggtttcttgaagcgca
ggtgtcggttatgagccggcttccctccctgaagctctcggtagaggaagtccggggtg
accgcccgcgccccgagcatgggggtgaacgccgtgcactgggtccgaaagggaactcgg
ctccacgacaaccccgccctgaaggagtgcacccagggcgccgacaccatccgctgcgtc
tatatcctcgaccctgggttcgccggctcttccaaacgtgggcatcaacaggtggcgattt
ttgcttcagtgtcttgaggatcttgatgccaatctacgaaaattaattctcgtctgtt
    
```

**B** Bestimmung der optimalen Hybridisierungstemperatur



**C** Spezifitätskontrolle



**D** Nachweis im Nervengewebe

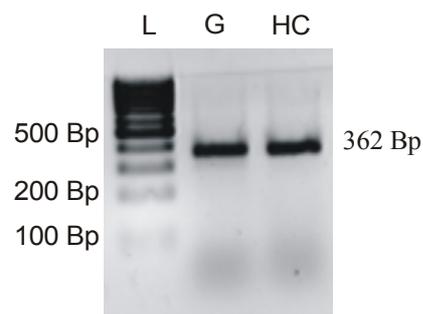


Abbildung 3.6: Nachweis von Gen-Transkripten für Cry 1 im Nervengewebe der Ratte. A: Ausschnitt aus der cDNA-Sequenz der Maus für Cry 1 mit Position der Primer (dunkelgrau) und Erkennungsstelle (hellgrauer Kasten) sowie Schnittstelle des gewählten Restriktionsenzym Hinf 1 (Balken in Kasten). B: Gelelektrophoretischer Nachweis zur Bestimmung der optimalen Annealingtemperatur. C: Gelelektrophoretischer Nachweis zur Spezifitätskontrolle mit dem Restriktionsenzym Hinf 1; der Kontrollansatz (CTRL) ist ohne Enzymbehandlung. D: Gelelektrophoretischer Nachweis von amplifizierter cDNA für Cry 1 im Hippokampus (HC) und im Gesamthirn (G) der Ratte. Bp = Basenpaare, Hinf 1 = Restriktionsenzym von Haemophilus influenzae, L=100-Basenpaar-Standard

### 3.7 Nachweis von Cry 2-Gentranskripten

In Abb.3.7A ist ein Ausschnitt aus der „Cry 2“-cDNA-Sequenz der Ratte aus der Datenbank des „National Center for Biotechnology Information“ abgebildet. Die gewählten Primer sind grau schraffiert hervorgehoben. Das durch sie erfasste und zu amplifizierende Teilstück ist 389 Basenpaare lang. Der Cry2 up-Primer hybridisiert an die Nukleotide der Position 1240 bis 1259, während der Cry2 low-Primer von Position 1610 bis 1628 bindet. Mit einem Kasten gekennzeichnet ist die Erkennungsstelle, an die das zur Spezifitätskontrolle gewählte Restriktionsenzym Bfa 1 bindet. Die Schnittstelle ist mit einem dicken Balken gekennzeichnet.

In Abb.3.7B ist ein Gel zur Bestimmung der optimalen Hybridisierungstemperatur für das ausgesuchte Primerpaar dargestellt. Bei den Temperaturen 52,0°C bis 54,2 °C sind zwei weitere Banden zu erkennen. Die Hybridisierungstemperatur für die weiteren Experimente wurde mit 60,6 °C gewählt.

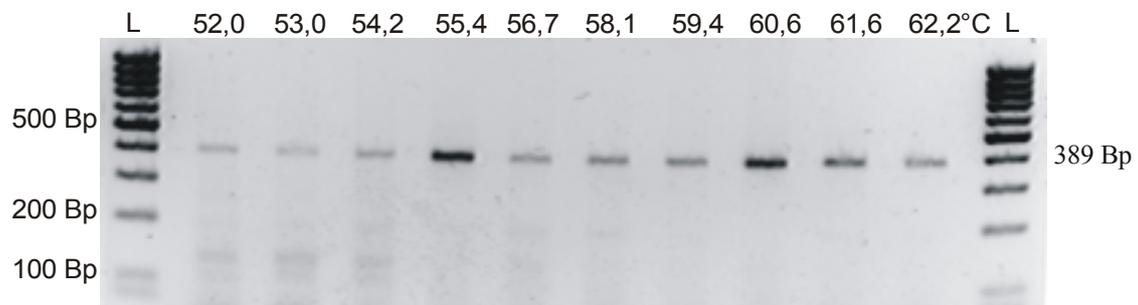
In Abb.3.7C ist die positive Spezifitätskontrolle mit dem Restriktionsenzym Bfa 1 dargestellt. Es schneidet das durch die Primer erfasste DNA-Stück von 389 Basenpaaren in zwei Teilstücke mit 254 und 135 Basenpaaren. Im Kontrollansatz wurde kein Enzym hinzugegeben und dementsprechend ist nur eine Bande im Bereich von 389 Basenpaaren vorhanden.

In Abb.3.7D ist der gelelektrophoretische Nachweis von Cry 2 im Gesamthirn und im Hippokampus der Ratte mit Hilfe der konstruierten Primer und unter Berücksichtigung der bestimmten Annealingtemperatur dargestellt. Es sind klare Signale im Bereich von 389 Basenpaaren zu erkennen.

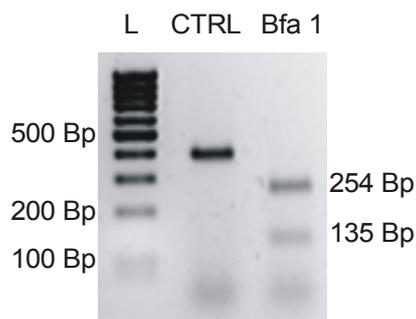
### A Cry2-cDNA-Sequenz (Mus musculus):

```
tccgggtatttgacgagctgctcctggatgccgatttcagtgtgaatgcaggcagctgga
tggtgctgtcctgcagtgctttctccaacaattctccactgctactgccctgtgggct
tcggccgacgtacagaccccagtgaggactacatccggcgggtacctgcccactgaag
gcttcccctctcgatacatctatgagccctggaatgccccgagtcagttcagaaggctg
ccaagtgcattggcgtggactaccacggccatcgtcaatcatgcagagac tagtc
ggctcaacattgaacgaatgaagcagatctaccaacagctgtcgagataccggggactct
gtctattggcatctgtcccttctgtgtggaagacctcagtcaccctgtggcagagcctg
gttcaagccaagctgggagcatcagcaacacaggccccagagcactatccagtggcccag
```

### B Bestimmung der optimalen Hybridisierungstemperatur



### C Spezifitätskontrolle



### D Nachweis im Nervengewebe

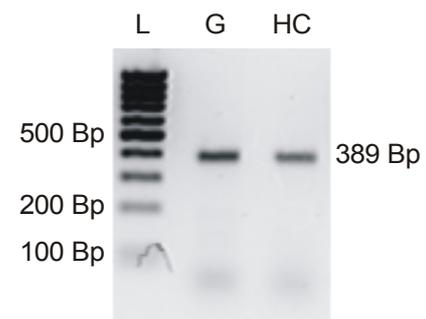


Abbildung 3.7: Nachweis von Gen-Transkripten für Cry 2 im Nervengewebe der Ratte. A: Ausschnitt aus der cDNA-Sequenz der Maus für Cry 2 mit Position der Primer (dunkelgrau) und Erkennungsstelle (hellgrauer Kasten) sowie Schnittstelle des gewählten Restriktionsenzym Bfa 1 (Balken in Kasten). B: Gelelektrophoretischer Nachweis zur Bestimmung der optimalen Annealingtemperatur. C: Gelelektrophoretischer Nachweis zur Spezifitätskontrolle mit dem Restriktionsenzym Bfa 1; der Kontrollansatz (CTRL) ist ohne Enzymbehandlung. D: Gelelektrophoretischer Nachweis von amplifizierter cDNA für Cry 2 im Hippokampus (HC) und im Gesamthirn (G) der Ratte. Bp = Basenpaare, Bfa 1 = Restriktionsenzym von *Bacteroides fragilis*, L=100-Basenpaar-Standard

### 3.8 Nachweis von Timeless-Gentranskripten

In Abb.3.8A ist ein Ausschnitt aus der „Timeless“-cDNA-Sequenz der Ratte aus der Datenbank des „National Center for Biotechnology Information“ abgebildet. Die gewählten Primer sind grau schraffiert hervorgehoben. Das durch sie erfasste und zu amplifizierende Teilstück ist 458 Basenpaare lang. Der up-Primer hybridisiert an die Nukleotide der Position 1303 bis 1324, während der low-Primer von Position 1742 bis 1760 bindet. Mit einem Kasten gekennzeichnet ist die Erkennungsstelle, an die das zur Spezifitätskontrolle gewählte Restriktionsenzym Hga 1 bindet. Die Schnittstelle ist mit einem dicken Balken gekennzeichnet.

In Abb.3.8B ist ein Gel zur Bestimmung der optimalen Hybridisierungstemperatur für das ausgesuchte Primerpaar dargestellt. Bei den Temperaturen 52,0°C bis 61,6°C sind weitere Banden zu erkennen. Die Hybridisierungstemperatur für die weiteren Experimente wurde mit 60,6°C gewählt.

In Abb.3.8C ist die positive Spezifitätskontrolle mit dem Restriktionsenzym Hga 1 dargestellt. Es schneidet das durch die Primer erfasste DNA-Stück von 458 Basenpaaren in zwei Teilstücke mit 276 und 186 Basenpaaren. Außerdem ist eine Bande bei 458 Basenpaaren zu erkennen, die durch das Enzym nicht geschnittene DNA zeigt. Im Kontrollansatz wurde kein Enzym hinzugegeben und dementsprechend ist nur eine Bande im Bereich von 458 Basenpaaren vorhanden.

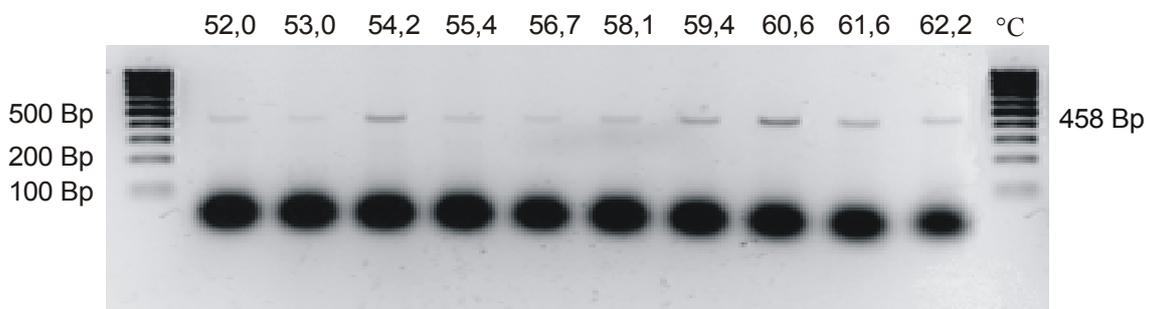
In Abb.3.8D ist der gelelektrophoretische Nachweis von Timeless im Gesamthirn und im Hippokampus der Ratte mit Hilfe der konstruierten Primer und unter Berücksichtigung der bestimmten Annealingtemperatur dargestellt. Es ist ein klares Signal für den Hippokampus im Bereich von 458 Basenpaaren zu erkennen, während für das Gesamthirn zwei weitere Banden zu sehen sind.

**A** Timeless-cDNA-Sequenz (Rattus norvegicus):

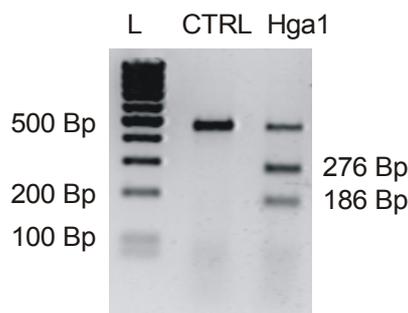
```

atggccttcaaccgagctgctgccttccgccttggcttctctgagaccctcagtatccgga
cctttcactttgtggagcagaacctcaccactactatgagatgatgctgacagac
cgcaaggaggccgctcctgggcacgcaggatgcacctggctctgaaggcctatcaggag
ctgctggccacagtgaatgagatggacatgtgccagacgacgc|gtcagggagagcagt
cgcatcatcaaaaacaacattttctacatgatggagtaccgagaactatttctggcactc
tttcgaaaattcgatgagagataccatccacgttcattcctttgtgacctggaggacc
actcacctcttctcaaaatgttgagcgttctgtcggagccgaggggaacctgatggtg
cagaacaaaagaaagaagagaaaaaagaaaaagaaggcccaggagcaggggtgtgctttc
tcacgtagccctgaggagctgcaggccatgtggtcagcgctggcagagcggctgctgcag
    
```

**B** Bestimmung der optimalen Hybridisierungstemperatur



**C** Spezifitätskontrolle



**D** Nachweis im Nervengewebe

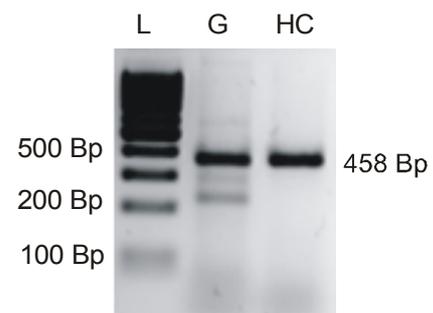


Abbildung 3.8 : Nachweis von Transkripten für Timeless im Nervengewebe der Ratte. A: Ausschnitt aus der cDNA-Sequenz der Ratte für Timeless mit Position der Primer (dunkelgrau) und Erkennungsstelle (hellgrauer Kasten) sowie Schnittstelle des gewählten Restriktionsenzym Hga 1 (Balken in Kasten). B: Gelelektrophoretischer Nachweis zur Bestimmung der optimalen Annealingtemperatur. C: Gelelektrophoretischer Nachweis zur Spezifitätskontrolle mit dem Restriktionsenzym Hga 1; der Kontrollansatz (CTRL) ist ohne Enzymbehandlung. D: Gelelektrophoretischer Nachweis von amplifizierter cDNA für Timeless im Hippokampus (HC) und im Gesamthirn (G) der Ratte. Bp = Basenpaare, Hga 1 = Restriktionsenzym von Haemophilus gallinarum, L=100-Basenpaar-Standard

## 4. Diskussion

Im Rahmen der vorliegenden Untersuchung wurde m-RNA für die aktuell bekannten molekularen Proteinkomponenten der inneren Uhr, also Per 1, Per 2, Per 3, Bmal 1, Clock, Cry 1, Cry 2 und Timeless im Hippokampus der Ratte mittels RT-PCR nachgewiesen. Dazu wurden spezifische Primer anhand der vorliegenden cDNA-Sequenzen für die Ratte bzw. die Maus konstruiert und die PCR-Parameter so optimiert, dass ein eindeutiger Nachweis geführt werden konnte.

### 4.1 Methodenkritische Reflexion

Die aus dem Hippokampusgewebe der Ratte extrahierte m-RNA für die oben genannten Uhrenkomponenten wurde mit einer RT-Reaktion in c-DNA umgeschrieben. Mit der anschließenden Polymerasekettenreaktion wurden cDNA-Sequenzen amplifiziert, die den konstruierten Primern entsprechen. Es ließen sich elektrophoretisch positive Signale für die Gentranskripte der bekannten Uhrenkomponenten im Hippokampus nachweisen.

Allerdings ist nicht auszuschließen, dass falsch-positive Signale möglich sind. So können verbliebene Reste genomischer DNA im RNA-Pellet Ansatzstellen für die ausgewählten Primer sein. Außerdem sind die Exon-Intron-Grenzen nicht immer bekannt, so dass durch die eingeschränkte Primerwahl daher keine eindeutigen Aussagen zu treffen sind.

Um mögliche falsch-positiven Aussagen zu verhindern, wurden verschiedene Vorsichtsmaßnahmen ergriffen:

- Das nach der Extraktion gewonnene RNA-Pellet wurde einer DNase-Behandlung unterzogen, um dadurch eine Kontamination durch genomische DNA zu verhindern.
- Es ließ sich mit Hilfe der Spezifitätskontrolle in Form einer Restriktionsanalyse für jedes Amplifikationsprodukt sicherstellen, dass die analysierten Schnittprodukte den gesuchten PCR-Produkten entsprachen. Es konnten dadurch eventuelle Fehlbestimmungen durch „falsche“ PCR-Produkte gleicher Laufweite im Elektrophoresegel vermieden werden.
- Es wurde für jede molekulare Uhrenkomponente eine Gradienten-PCR durchgeführt, um abzusichern, dass eine Hybridisierung an die DNA für die jeweiligen Primer bei optimalen Temperaturen erfolgt. Mit den so bestimmten

optimalen Annealingtemperaturen wurden dann die weiteren PCR-Schritte zum Nachweis der Uhrenkomponenten im Gesamthirn und im Hippokampus der Ratte durchgeführt.

- Für die molekularen Uhrenkomponenten Per 1, Cry 1 und Cry 2 wurde aus der Datenbank des „National Center for Biotechnology Information“ anstelle der Gensequenz für die Ratte die jeweilige Sequenz der Maus für die Primerkonstruktion zugrunde gelegt, da die entsprechenden Sequenzen der Ratte nicht vorlagen. Es ist aber eine hohe Homologie zwischen den Maussequenzen und denen der Ratte zu erwarten. Sequenzanalysen würden eine genaue Bestimmung der Rattensequenzen ermöglichen.

Abschließend lässt sich sagen, dass mit hoher Wahrscheinlichkeit keine falsch-positiven Aussagen vorlagen, so dass der Nachweis von Gentranskripten bzw. m-RNA für die bisher bekannten molekularen Uhrenkomponenten im Hippokampus der Ratte geglückt ist. Es kann allerdings aufgrund der methodischen Vorgehensweise keine definitive Aussage darüber gemacht werden, ob diese Genprodukte auch in entsprechende Proteine umgewandelt werden.

#### **4.2 Nachweis im Hippokampusgewebe**

In den Ergebnissen zum Nachweis von Gentranskripten im Gesamthirn und im Hippokampus der Ratte sind unterschiedlich starke Banden zu erkennen. Es ist bei der vorliegenden Vorgehensweise allerdings keine quantitative Aussage über das Vorhandensein der Transkripte möglich. Da mehr Gewebe von Gesamthirn vorliegt, sind hierfür stärkere Banden zu erwarten.

Es wurde in der vorliegenden Untersuchung mit einem RNA-Extrakt des Gesamthippokampus gearbeitet. Eine Zuordnung der gefundenen Gentranskripte zu den vier Regionen CA1-CA4 im Hippokampus ist somit nicht möglich. Außerdem kann weder eine zellspezifische Aussage darüber getroffen werden, ob die Transkripte in Gliazellen oder in neuronalen Zellen vorkommen, noch etwas über die räumliche Verteilung der Transkripte im Hippokampus ausgesagt werden. Neueste Forschungen von Prolo et al. [2004] über circadiane Rhythmen in Gliazellen von Säugetieren deuten allerdings daraufhin, dass Astrozyten als circadiane Oszillatoren funktionieren, deren annähernd 24-stündige Rhythmik durch den SCN über bisher unbekannte Faktoren aufrechterhalten werden konnte.

Auch eine Häufung der Genexpression in verschiedenen Zelltypen kann aus den bisherigen Daten nicht entnommen werden. Eine Ausnahme stellt Per 1 dar. Mit Hilfe

der Einzelzell-PCR wurde der Nachweis erbracht, dass Per 1 in den CA1-Pyramidenzellen vorkommt [MUBHOFF et al. 2004]. Weitere Studien in dieser Richtung stehen allerdings noch aus.

### 4.3 Tageszeitliche Rhythmen im Hippokampus

#### 4.3.1 Hippokampus und Lernen und Gedächtnis

Die Forschung in den letzten Jahrzehnten hat vor allem in Verhaltensstudien und elektrophysiologischen Untersuchungen gezeigt, dass der Hippokampus von zentraler Bedeutung für kognitive Vorgänge ist, die mit Lernen und Gedächtnisbildung im Zusammenhang stehen [KNIGHT 1996, SQUIRE 1992].

##### *Verhaltensstudien*

Beim Menschen wurde festgestellt, dass Patienten mit bilateralen Läsionen des Hippokampus zwar Gedächtnisinhalte aus dem Langzeitgedächtnis abrufen können, es ihnen aber nicht mehr möglich ist, neue Inhalte aus dem Kurzzeitgedächtnis in das deklarative Langzeitgedächtnis zu überführen [MILNER 1966]. Die Hippokampusformation spielt bei Ratten eine ähnlich wichtige Rolle bei der Gedächtniskonsolidierung. Funktionelle oder strukturelle Läsionen führen bei diesen Tieren dabei zu einer starken Beeinträchtigung in der räumlichen Orientierung [BROWN und ZADOR 1990].

Obwohl noch nicht ausreichend untersucht, gibt es Hinweise, dass Lern- und Gedächtnisprozesse generell tägliche Rhythmik als Merkmal aufweisen. Tiere können Assoziationen formen zwischen der Tageszeit und der Nahrungsverfügbarkeit. In einer frühen Studie von Beling wurde gezeigt, dass Bienen, denen Zuckerwasser zu einer bestimmten Zeit gegeben wurde, schnell lernten zur Fütterung zu diesem Zeitpunkt zu kommen. Wenn das Zuckerwasser weggelassen wurde, kamen die so trainierten Bienen zur Fütterung immer noch zur korrekten Zeit [BELING 1929, zit. nach CHAUDHURY und COLWELL 2002]. Diese Art von Zeit-Ort-Assoziation ist für viele Spezies wie Vögel, Insekten, Fische und Säugetiere beschrieben worden [BIEBACH et al. 1991, REEBS 1996, CARR et al. 1997, WAKAMATSU et al. 2001]. Chaudhury und Colwell [2002] untersuchten die mögliche circadiane Regulation von Lernen und Gedächtnis anhand von Mäusen die einem Angst-konditionierenden Training nachts und tagsüber unterzogen worden waren. Die Mäuse zeigten tägliche Rhythmen in der Erinnerung von bestimmten Tönen und Kontexten. Die besten Gedächtnisleistungen zeigten die

Mäuse, wenn sie tagsüber getestet wurden. Diese täglichen Rhythmen blieben auch bestehen, wenn die Tiere in konstanter Dunkelheit gehalten wurden. Damit wurde gezeigt, dass die circadianen Rhythmen endogener Natur sind.

#### *Elektrophysiologische Studien*

Zusätzlich zu Verhaltensstudien sind elektrophysiologische Studien gemacht worden, die mit „long term potentiation“ (LTP) als elektrophysiologischem Korrelat für Lernen und Gedächtnis gearbeitet haben. Auch hier wurden circadiane Rhythmen nachgewiesen. Barnes et al. [1977] zeigten, dass synaptische Antworten in hippokampalen Granularzellen nach Stimulation der afferenten Fasern vom entorhinalen Kortex in einem 24-Sunden Rhythmus fluktuierten. In einer anderen Studie wurde demonstriert, dass die Größe der LTP in CA1-Zellen und im Gyrus dentatus von Hippokampuschnitten der Ratte je nach Tag oder Nachtzeit variierte [HARRIS und TEYLER 1983]. Weiterhin wurden nicht nur Veränderungen der LTP abhängig von dem Tageszeitpunkt gefunden, sondern es konnte zusätzlich nach verschiedenen Regionen des Hippokampus differenziert werden [HARRIS und TEYLER 1983]. Zellen aus der CA1-Region entwickelten stärkere LTP am Tag, während Körnerzellen aus dem Gyrus dentatus stärkere LTP in der Nacht zeigten. Auch Raghavan et al. [1999] fanden circadiane Variationen in der Größe der LTP in CA1-Regionen des Hippokampus. Schnitte von Hamstern, die während des Tages entnommen wurden, wiesen stärkere LTP auf als solche während der Nacht gewonnen. Nishikawa et al. [1995] fanden Unterschiede in der Entwicklung der LTP zwischen dem SCN und dem Hippokampus der Ratte. In der CA1-Region des Hippokampus führte hochfrequente Stimulation nach 5 Minuten zu einer Verstärkung der synaptischen Übertragung über 60 Minuten. Diese aktivitätsabhängige Verstärkung trat im SCN langsam nach 60 Minuten auf und blieb dann über 120 Minuten bestehen. Eine Erklärung für die Unterschiede zwischen dem SCN und der hippokampalen CA1-Region steht noch aus.

Die so gewonnen Erkenntnisse zeigen, dass verschiedene Formen der Aktivität des Hippokampus im engen Zusammenhang mit circadianer Rhythmik stehen und damit möglicherweise durch die nachgewiesenen molekularen Uhrenkomponenten fundiert sind.

### **4.3.2 Hippokampus und circadiane Rhythmik**

Wie schon in der Einleitung ausgeführt, setzt sich das molekulare Uhrwerk im SCN der Ratte aus den drei Period-Genen Per 1, Per 2, Per 3, zwei Cryptochrome-Genen Cry 1, Cry 2, und Clock, Bmal 1 und Timeless zusammen. Diese einzelnen Komponenten der inneren Uhr wurden in der vorliegenden Dissertation auch im Hippokampus nachgewiesen. Im SCN ist bekannt, dass die einzelnen Komponenten über positive und negative Rückkopplungsschleifen miteinander verbunden sind und so den Kern der circadianen Säugetieruhr darstellen [vgl. YOUNG 2000, REPPERT und WEAVER 2001, CHANG und REPPERT 2001]. Die Genexpression der molekularen Uhrenkomponenten der drei Period-Gene, der zwei Cryptochrome-Gene und von Bmal 1 unterliegt einer circadianen Rhythmik im SCN der Ratte. Die circadiane Expression der Uhrengene ist nicht nur limitiert auf Zellen des SCN, sondern ist auch in vielen peripheren Geweben wie z.B. Leber, Skelettmuskel und Lunge gefunden worden [SHEARMAN et al. 2000, REPPERT und WEAVER 2001]. Auch im Herz, der Milz, der Niere und in der Retina sind circadiane Rhythmen der Genexpression von den Period-Genen entdeckt worden [vgl. SAKAMATO et al. 1998, ZYLKA et al. 1998, SAKAMATO und ISHIDA 2000, WEAVER 2000, HASTINGS und MAYWOOD 2000, YOUNG et al. 2001]. Studien haben gezeigt, dass die zentralen und peripheren Oszillatormechanismen in Säugetieren verschieden sind. Die BMAL 1 negative Rückkopplungsschleife im SCN ist anders reguliert als die in peripheren Geweben [vgl. GLOSSOP und HARDIN 2002].

Um im Bild der Uhr zu bleiben, hat die vorliegende Arbeit zwar die einzelnen Zahnrädchen im Hippokampus nachgewiesen, es gibt derzeit allerdings noch keinen dementsprechenden Nachweis eines funktionierenden Gesamtuhrwerks, wie im SCN und in Ansätzen schon in anderen peripheren Geweben gezeigt. Weitere Forschungsarbeiten müssen zeigen, ob der Hippokampus auch ein eigene circadiane Uhr besitzt und wie hier mögliche Rückkopplungsschleifen aussehen.

## **4.4 Ist der Hippokampus ein peripherer Oszillator?**

### **4.4.1 Vorhandener Nachweis für Oszillation in peripheren Geweben**

Man hat Hinweise darauf gefunden, dass die circadianen Uhren in peripheren Geweben durch den SCN synchronisiert werden [vgl. BALSALOBRE et al. 1998, SAKAMATO et al. 1998, ZYLKA et al. 1998]. Allerdings wurde eine Verspätung der Rhythmik relativ zu der Expression im SCN festgestellt [SHEARMAN et al. 2000, REPPERT und WEAVER 2001, von GALL et al. 2002]. In diesen Geweben ist die Phase der RNA-Oszillation der

einzelnen Period-Gene um drei bis neun Stunden relativ zur Oszillation im SCN verzögert [REPPERT und WEAVER 2000]. Die Zeitverzögerung der Expression relativ zum SCN legt die Vermutung nahe, dass die peripheren Oszillatoren durch den SCN beeinflusst oder zumindest auf noch unbekanntem Art zeitlich gesteuert werden [WHITMORE et al. 2000]. Ein wichtiger Unterschied zwischen dem zentralen und den peripheren Oszillatoren besteht darin, dass während Gewebe des SCN in Kultur 24-Stunden Oszillationen der Genexpression über Wochen und Monate generieren kann, die circadianen Uhren in peripheren Geweben nach wenigen Tagen nachlassen [BALSALOBRE et al. 1998, BALSALOBRE et al. 2000, YAMAZAKI et al. 2000]. Bei der Fruchtfliege und dem Zebrafisch werden die peripheren Uhren direkt durch Licht beeinflusst [WHITMORE et al. 2000]. Periphere Säugetierzellen in der Leber, der Niere und dem Herzen besitzen auch funktionelle circadiane Oszillatoren, die aber nicht auf Hell-Dunkel-Zyklen ansprechen [SCHIBLER und SASSONE-CORSI 2002]. Es wird angenommen, dass diese circadianen Oszillatoren durch verschiedene chemische Botenstoffe wie z.B. Glukokortikoide, Serotonin, Noradrenalin oder Azetylcholin beeinflusst werden [BRUNEL und MONTIGNY 1987, BALSALOBRE et al. 2000].

Eingeschränkte Fütterung kann periphere Oszillatoren vom SCN als zentralen Schrittmacher abkoppeln [RIPPERGER und SCHIBLER 2001, DAMIOLA et al. 2000]. Minh et al. [2001] fanden heraus, dass Glukokortikoide diese Entkopplung verhindern und damit ein wichtiger Mittler zwischen dem SCN und peripheren Oszillatoren darstellen.

#### **4.4.2 Hinweise für periphere Oszillation im Hippokampus**

Ob der Hippokampus auch ein peripherer Oszillator mit einer eigenständigen circadianen Rhythmik ist und inwieweit er in Beziehung zu dem SCN steht, ist noch unklar. Es gibt aber bereits Hinweise, die eine solche Vermutung stützen.

Die oben genannten Glukokortikoide könnten eine wichtige Rolle spielen, da sie zum einen in täglichen Rhythmen seziiert werden und zum anderen im Hippokampus Glukokortikoidrezeptoren vorkommen. Im SCN dagegen sind keine Glukokortikoidrezeptoren vorhanden [vgl. BALSALOBRE et al. 2000]. Im Hippokampus aktivieren Glukokortikoide zwei verschiedene Rezeptortypen: die eigentlichen Glukokortikoidrezeptoren (GR) und Mineralokortikoidrezeptoren (MR) [HOLMES et al. 1997, DE KLOET 1991]. Die Mineralokortikoidrezeptoren haben im Hippokampus ihre Selektivität für Mineralokortikoide wie Aldosteron verloren. Sie binden sogar zehn Mal stärker Glukokortikoide als die GRs [DE KLOET et al. 1998]. Der Hippokampus besitzt

die größte Dichte an GRs und MRs im Gehirn [HOLMES et al. 1995]. Die Gentranskripte für diese beiden Rezeptortypen werden in einem tageszeitlichen Rhythmus im Hippokampus exprimiert [HERMAN et al. 1993, HOLMES et al. 1995]. Neurone in den Regionen CA1, CA2 und im Gyrus dentatus exprimieren beide Rezeptorgene in großen Mengen. In allen Pyramidalzellen (CA1-CA4) der Hippokampusformation und in den Granularzellen des Gyrus dentatus wurde m-RNA für die MR gefunden, wohingegen m-RNA für die GR auf die Regionen CA1 und CA2 und den Gyrus dentatus beschränkt waren [van EEKELEN et al. 1988].

Neben den Glukokortikoiden kommt Melatonin in diesem Zusammenhang eine wesentliche Bedeutung zu. Vom SCN gehen efferente neuronale Projektionen zu verschiedenen Gebieten des Gehirns. Eine Projektion verläuft zum Pinealorgan, über die der tagesperiodische Rhythmus der Melatoninsynthese gesteuert wird. Der SCN ist zugleich auch Zielgebiet für das Melatonin. So ist Melatonin in der Lage, die neuronale Aktivität im SCN zu blockieren und darüber eine Synchronisierung als auch Phasenverschiebung im circadianen System zu bewirken [STEHLE et al. 1989]. Im Hippokampus sind beim Säugetier die bekannten Transkripte für die Melatonin-Rezeptortypen MT1 und MT2 exprimiert worden [MUBHOFF et al. 2002]. Melatonin spielt eine wichtige Rolle bei der zeitabhängigen Modulation neuronaler Funktionen wie epileptischer Aktivität in der CA1-Region des Hippokampus [MUBHOFF und SPECKMANN 2003]. Collins und Davies [1997] fanden heraus, dass Melatonin die Induktion von LTPs in der CA1-Region des Hippokampus von Ratten blockiert. Melatonin kann somit bioelektrische Eigenschaften im Hippokampus zeitabhängig verändern und steht möglicherweise in engem Zusammenhang mit den auf molekularer Ebene gefundenen Gentranskripten der Uhrenkomponenten.

Der Nachweis der Gentranskripte für die aktuell bekannten Komponenten der inneren Uhr ist mit den vorgelegten Ergebnissen dieser Arbeit erfolgt. Ob diese Gene in ihrer Expression einer oben beschriebenen Rhythmik unterliegen, das ist noch weitestgehend unklar. Allerdings gibt es auch hier schon Hinweise. Es wurde eine circadiane Rhythmik für Per 1 in CA1-Pyramidenzellen im Hippokampus gefunden [MUBHOFF et al. 2004]. Per 1 zeigt einen kontinuierlichen Anstieg der Genexpression von ca. 10% der CA1-Zellen zum Zeitpunkt ZT 4 bis zu ca. 80% zum Zeitpunkt ZT 24. Der nächste circadiane Tag beginnt dann wieder mit dem niedrigsten Wert bei ZT 4. Es liegt nun nahe, eine rhythmische Expression auch für andere Uhrenkomponenten im Hippokampus zu vermuten. Weitere Untersuchungen müssen klären, ob die anderen

molekularen Uhrenkomponenten ebenfalls rhythmisch transkribiert werden, und in welchem Zeitgang dies erfolgt. So ein Nachweis müsste über weitergehende kinetische Untersuchungen erbracht werden.

#### **4.5 Ausblick**

Die gefundenen Gentranskripte für die molekularen Uhrenkomponenten sind ein Hinweis darauf, dass im Hippokampus ähnlich wie in anderen peripheren Geweben eine circadiane Uhr vorhanden ist. Ob der Hippokampus so ein peripherer Oszillator mit eigenständigem Rhythmus darstellt, ist abschließend noch nicht geklärt. Verschiedene chemische Botenstoffe wie Melatonin und Glukokortikoide scheinen eine Schlüsselrolle bei der Übertragung von Informationen der biologischen Uhr (SCN) in den Hippokampus zu spielen.

Die Forschung beginnt erst langsam die der circadianen Rhythmik zugrunde liegenden Mechanismen zu verstehen. Wissen über die Vorgänge der inneren Uhr auf molekularer Ebene, kann dabei helfen Störungen im Gesamtorganismus zu behandeln. Die kognitiven Prozesse Lernen und Gedächtnis, sowie auch neurologische Erkrankungen wie Epilepsie und Alzheimer stehen in engem Zusammenhang mit der Hippokampusformation beim Menschen. Wie nun mögliche Verbindungen der Hippokampusfunktionen und einer peripheren Uhr auf molekularer Ebene aussehen, muss das Ziel weiterer Forschung sein.

**Literaturverzeichnis**

- Albrecht U, Eichele G (2003)  
The mammalian circadian clock  
Current Opinion in Genetics & Development 13: 271-277
- Allada R, Emery P, Takahashi JS, Rosbach M (2001)  
Stopping time: The genetics of fly and mouse circadian clocks  
Annu Rev Neurosci 24: 1091-1119
- Bae K, Jin X, Maywood ES, Hastings MH, Reppert SM, Weaver DR (2001)  
Differential functions of mPer1, mPer2 and mPer3 in the SCN circadian clock  
Neuron 30: 525-536
- Balsalobre A, Damiola F, Schibler U (1998)  
A serum shock induces circadian gene expression in mammalian tissue culture cells  
Cell 93: 929-937
- Balsalobre A, Brown SA, Marcacci L, Tronche F, Kellendonk C, Reichardt HM, Schütz G, Schibler U (2000)  
Resetting of circadian time in peripheral tissues by glucocorticoid signaling  
Science 289: 2344-2347
- Barnes CA, McNaughton BL, Goddard GV, Douglas RM, Adamec K (1977)  
Circadian rhythms of synaptic excitability in rat and monkey CNS  
Science 197: 91-92
- Beling I (1929)  
Über das Zeitgedächtnis der Bienen  
Zeitschrift für vergleichende Physiologie 9:259-338
- Biebach H, Falk H, Krebs JR (1991)  
The effect of constant light and phase shifts on a learned time-place association in garden warblers (*Sylvia borin*): hourglass or circadian clock?  
J Biol Rhythms 6: 353-365
- Birbaumer N, Schmidt RF (1997)  
Lernen und Gedächtnis.  
In: Schmidt RF/Thews G (Hrsg) Physiologie des Menschen  
Springer, Berlin Heidelberg New York, 27. Auflage: 154-166
- Bliss TVO, Collingridge GL (1993)  
A synaptic model of memory-long-term potentiation in the hippocampus  
Nature 361: 31-39
- Brown TH, Zador AM (1990)  
Hippocampus  
In: The synaptic organization of the brain (ed. by G.M. Shepherd),  
Oxford University Press, New York, Oxford, pp. 346-388

- Brunel S, de Montigny C (1987)  
Diurnal rhythms in the responsiveness of hippocampal pyramidal neurons to serotonin, norepinephrine,  $\gamma$ -aminobutyric acid and acetylcholine  
Brain Research 18: 205-212
- Carr JA, Wilkie DM (1997)  
Rats use an ordinal timer in a daily time-place learning  
J Exp Psychol: Anim Behav Processes 23: 232-247
- Cermakian N, Boivin DB (2003)  
A molecular perspective of human circadian rhythm disorders  
Brain Research Reviews 42: 204-220
- Chang DC, Reppert SM (2001)  
The circadian clocks of mice and men  
Neuron 29: 555-558
- Chaudhury D, Colwell CS (2001)  
Circadian modulation of learning and memory in fear-conditioned mice  
Behavioural Brain Research 133: 95-108
- Chomczynski P, Sacchi N (1987)  
Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction  
Anal biochem 162: 156-159
- Chou Q, Russel M, Birch DE, Raymond J, Bloch W (1992)  
Nucl Acids Res 19: 4008
- Colliens DR, Davies SN (1997)  
Melatonin blocks the induction of long-term potentiation in an N-methyl-D-aspartate independent manner  
Brain Research 767: 162-165
- Damiola F, Le Minh N, Preitner N, Kornmann B, Fleury-Olela F, Schibler U (2000)  
Restricted feeding uncouples circadian oscillators in peripheral tissues from the central pacemaker in the suprachiasmatic nucleus  
Genes and Development 14: 2950-2961
- De Kloet ER (1991)  
Brain corticosteroid receptor balance and homeostatic control  
Front Neuroendocrinol 12: 95-164
- De Kloet ER, Vreugdenhil E, Melly SO (1998)  
Brain corticoidsteroid receptor balance in health and disease  
Endocrine reviews 19: 269-301

- De Vries MJ, Meijer JH (1993)  
Glutamate immunoreactivity in terminals of the retinohypothalamic tract of the brown Norwegian rat  
Brain Research 642: 206-212
- Dudel J (1997)  
Erregungsübertragung von Zelle zu Zelle.  
In: Schmidt RF/Thews G (Hrsg) Physiologie des Menschen.  
Springer, Berlin Heidelberg New York, 27. Auflage: 43-66
- Gassen HG, Sachse GE, Schulte A (1994)  
PCR: Grundlagen und Anwendungen der Polymerase-Kettenreaktion  
Gustav Fischer Verlag, Stuttgart
- Glossop NRJ, Hardin PE (2002)  
Central and peripheral circadian oscillator mechanisms in flies and mammals  
Journal of Cell Science 115: 3369-3377
- Groß M (2000)  
Dezentrale biologische Uhren  
Spektrum der Wissenschaft 8: 24-26
- Harris KM, Teyler TJ (1983)  
Age differences in a circadian influence on hippocampal LTP  
Brain Res 261: 69-73
- Hastings M, Maywood ES (2000)  
Circadian clocks in the mammalian brain  
Bio Essays 22: 23-31
- Herman JP, Watson SJ, Chao HM, Coirini H, McEwen BS (1993)  
Diurnal regulation of glucocorticoid receptor and mineralocorticoid receptor mRNAs in rat hippocampus  
Mol Cell Neurosci 4: 181-190
- Holmes MC, French KL, Seckl JR (1995)  
Modulation of serotonin and corticosteroid receptor gene expression in the rat hippocampus with circadian rhythm and stress  
Molecular Brain Research 28: 186-192
- Holmes MC, French KL, Seckl JR (1997)  
Dysregulation of diurnal rhythms of serotonin 5-HT<sub>2c</sub> and corticosteroid receptor gene expression in the hippocampus with food restriction and glucocorticoids  
The Journal of Neuroscience 17(11): 4056-4065
- Kafka MS, Benedito MA, Roth RH, Steele LK, Wolfe WW, Catravas GN (1986)  
Circadian rhythms in catecholamine metabolites cyclic nucleotide production  
Chronobiology International 3: 101-115

- Knight R (1996)  
Contribution of human hippocampal region to novelty detection  
*Nature* 383: 256-259
- Kononen J, Koistinaho J, Alho Hannu (1990)  
Circadian rhythm in c-fos-like immunoreactivity in the rat brain  
*Neuroscience Letters* 120: 105-108
- Le Minh N, Damiola F, Tronche F, Schütz G, Schibler U (2001)  
Glucocorticoid hormones inhibit food-induced phase-shifting of peripheral circadian oscillators  
*The EMBO Journal* 20: 7128-7136
- Mantiatis T, Fritsch EF, Sambrook J (1982)  
Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York
- Meyer LL, Steinmann CML (2000)  
Molecular mechanisms involved in circadian clocks  
*South African Journal of Science* 96: 484-486
- Milner B (1966)  
Amnesia following operation on the temporal lobes  
In: *Amnesia: Clinical, psychological and medicolegal aspects* (ed. by Wiitty CWM, Zangwill OL), Butterworth
- Mußhoff U, Riewenherm D, Berger E, Fauteck J-D, Speckmann E-J (2002)  
Melatonin receptors in rat hippocampus: Molecular and functional investigations  
*Hippocampus* 12: 165-173
- Mußhoff U, Speckmann E-J (2003)  
Diurnal actions of melatonin on epileptic activity in hippocampal slices of rats  
*Life Sciences* 73: 2603-2610
- Mußhoff U, Berger E, Kühn T, Koch UR, Speckmann E-J (2004)  
Circadian rhythms in the hippocampus of rats: Molecular investigations  
*Pflügers Arch* 447, Suppl.1: 146
- Newton CR, Graham A (1994)  
PCR 2.Auflage, Spektrum Akademischer Verlag, 41-45
- Nishikawa Y, Shibata S, Watanabe S (1995)  
Circadian changes in long-term potentiation of rat suprachiasmatic field potentials elicited by optic nerve stimulation in vitro  
*Brain Research* 695: 158-162
- Okamura H, Yamaguchi S, Yagita R (2002)  
Molecular machinery of the circadian clock in mammals  
*Cell Tissue Res* 309: 47-56

- Pieschulla B, Roenneberg T (1999)  
Chronobiologie-Wie tickt unsere biologische Uhr?  
Biologen heute 4: o.S.
- Prolo LM, Takahashi JS, Herzog ED (2004)  
Circadian rhythms in mammalian glia  
Program No.894.7. 2004 Abstract Viewer/Itinerary Planner. Washington, DC:  
Society for Neuroscience
- Raghavan AV, Horowitz JM, Fuller CA (1999)  
Diurnal modulation of long-term potentiation in the hamster hippocampal slice  
Brain Research 833: 311-314
- Reebs S (1996)  
Time place learning in golden shiners (Pisces: Cyprinidae)  
Behav Processes 253: 253-262
- Reppert SM, Weaver DR (2000)  
Comparing clockworks: Mouse versus fly  
Journal of Biological Rhythms 15: 357-364
- Reppert SM, Weaver DR (2001)  
Molecular analysis of mammalian circadian rhythms  
Annu Rev Physiol 63: 647-676
- Reppert SM, Weaver DR (2002)  
Coordination of circadian timing in mammals  
Nature 418: 935-941
- Rensing L (1995)  
Der molekulare Mechanismus der circadianen Uhr  
Biologie in unserer Zeit 2: 101-106
- Ripperger JA, Schibler U (2001)  
Circadian regulation of gene expression in animals  
Current Opinion in Cell Biology 13: 357-362
- Sakamoto K, Nagase T, Fukui H, Horikawa K, Okada T, Tanaka H, Sato K,  
Miyake Y, Ohara O, Kako K, Ishida N (1998)  
Multitissue circadian expression of rat period homolog (rPer2) mRNA is  
governed by the mammalian circadian clock, the suprachiasmatic nucleus in  
the brain  
J Biol Chem 273: 27039-27042
- Sakamoto K, Ishida N (2000)  
Light-induced phase-shifts in the circadian expression rhythm of mammalian  
Period genes in the mouse heart  
European Journal of Neuroscience 12: 4003-4006

- Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Ehrlich HA, Arnheim N (1988)  
Enzymatic amplification of  $\beta$ -globulin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia  
Science 230: 1350-1354
- Scheinert P (1997)  
Primerdesign und Wahl stringenter Reaktionsbedingungen  
BioTec Labortechnik 4: 52-55
- Schibler U, Sassone-Corsi P (2002)  
A web of circadian pacemakers  
Cell 111: 919-922
- Shearman LP, Sriram S, Weaver DR, Maywood ES, Claves I, Zhang B, Kume K, Lee CC, van der horst GTJ, Hastings MH, Reppert SM (2000)  
Interacting molecular loops in the mammalian circadian clock  
Science 288: 1013-1019
- Squire LR (1992)  
Memory and the hippocampus: A synthesis from findings with rats, monkeys and humans  
Psychological Rev 99: 195-231
- Stehle J, Vanecek J, Vollrath L (1989)  
Effects of melatonin on spontaneous electrical activity of neurons in rat suprachiasmatic nuclei: an in vitro iontophoretic study  
J Neural Transm 78: 173-177
- Van Eekelen, Jiang W, De Kloet ER, Bohn MC (1988)  
Distribution of the mineralocorticoid and the glucocorticoid receptor mRNAs in the rat hippocampus  
Journal of neuroscience 21: 88-94
- Von Gall C, Garabette ML, Kell CA, Frenzel S, Dehghami F, Schumm -Draeger P-M, Weaver DR, Korf H-W, Hastings MH, Stehle JH (2002)  
Rhythmic gene expression in pituitary depends on heterologous sensitization by the neurohormone melatonin  
Nature Neuroscience 5: 234-238
- Wakamatsu H, Yoshinobu Y, Aida R, Moriya T, Akiyama M, Shibata S (2001)  
Restricted-feeding-induced anticipatory activity rhythm is associated with a phase-shift of the expression of mPer1 and mPer2 mRNA in the cerebral cortex and hippocampus but not in the suprachiasmatic nucleus of mice  
Eur J Neurosci 13: 1190-1196
- Weaver DR (2000)  
A clockwork green: timely reporting on circadian clock function  
NeuroReport 11: 9-10

- Whitmore D, Crosio C, Foulkes NS, Pando MP, Travnikova Z, Sassone-Corsi P (2000)  
A clockwork organ  
Biol Chem 381: 793-800
- Wollnik F (1995)  
Die innere Uhr der Säugetiere. *Biologie in unserer Zeit* 1: 37-43
- Yamazaki S, Numano R, Abe M, Hida A, Takahashi R, Ueda M, Block GD, Sakaki Y, Menaker M, Tei H (2000)  
Resetting central and peripheral circadian oscillators in transgenic rats  
Science 288:582-685
- Yannielli P, Harrington ME (2004)  
Let there be "more" light: enhancement of light actions on the circadian system through non-photoc pathways  
Progress in Neurobiology 74: 59-76
- Young ME, Razeghi P, Taegtmeier H (2001)  
Clock genes in the heart: characterization and attenuation with hypertrophy  
Circ Res 88:1142-1150.
- Young MW (2000)  
Life's 24-hour clock: molecular control of circadian rhythms in animal cells  
Tibs 25: 601-606
- Zylka MJ, Shearman LP, Levine JD, Jin X, Weaver DR, Reppert SM (1998)  
Molecular analysis of mammalian timeless  
Neuron 21: 1115-1122
- Zylka MJ, Shearman LP, Weaver DR, Reppert SM (1998)  
Three period homologs in mammals: differential light responses in the suprachiasmatic circadian clock and oscillating transcripts outside of brain  
Neuron 20: 1103-1110

## Danksagung

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. rer. nat. U. Mußhoff für die langjährige Betreuung dieser Arbeit. Er hat durch seine Hilfsbereitschaft und immerwährende Unterstützung sehr zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Mein Dank gilt ebenso Herrn Prof. Dr. med. E.-J. Speckmann für die freundliche Unterstützung und die gegebenen Arbeitsmöglichkeiten im Physiologischen Institut, Abteilung Neurophysiologie.

Danken möchte ich auch allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Physiologischen Instituts für die Unterstützung und die freundliche Arbeitsatmosphäre.

Besonders hervorheben möchte ich Frau Dr. rer. nat. E. Berger und A. Zirpens für ihre Hilfsbereitschaft. Ingrid Winkelhues, Jan Dübbers und Georg Kaspar möchte ich für ihre Unterstützung bei Problemen mit Anwendungsprogrammen danken.

Außerdem möchte ich mich noch bei meinen Eltern bedanken, die mir diese Arbeit erst ermöglicht haben.

## Tabellarischer Lebenslauf:

- 10.02.1974: Geboren in Braunschweig
- 1980-1984: Besuch der Grundschule in Braunschweig und Rheine
- 1984-1993: Besuch des Emsland-Gymnasiums in Rheine
- 1993: Abitur am Emsland-Gymnasium
- 1993-1994: 15-monatiger Zivildienst in Rheine ( Dienst im Altenheim )
- WS 1994/1995: Beginn des Studiums der Psychologie an der Universität Münster
- März 1997: Vordiplom in Psychologie an der Universität Münster
- 1997/1998: Wechsel zum Studium der Zahnmedizin in Münster
- August 1999: Naturwissenschaftliche Vorprüfung an der Universität Münster
- März 2001: Zahnärztliche Vorprüfung an der Universität Münster
- WS 2002/2003: Wechsel des Studienortes von Münster nach Rostock,
- Oktober 2004: Staatsexamen Zahnmedizin in Rostock

## ERKLÄRUNG

Ich gebe hiermit die Erklärung ab, dass ich die Dissertation mit dem Titel:  
Genexpression molekularer Komponenten der biologischen Uhr  
im Hippokampus der Ratte

im Institut für Physiologie des Universitätsklinikums Münster unter Anleitung von:  
Prof. Dr. rer. nat. U. Mußhoff

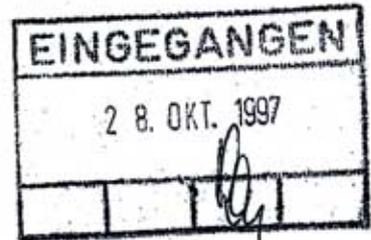
1. selbständig angefertigt,
2. nur unter Benutzung der im Literaturverzeichnis angegebenen Arbeiten angefertigt und sonst kein anderes gedrucktes oder ungedrucktes Material verwendet,
3. keine unerlaubte fremde Hilfe in Anspruch genommen,
4. sie weder in der gegenwärtigen noch in einer anderen Fassung einer in- oder ausländischen Fakultät als Dissertation, Semesterarbeit, Prüfungsarbeit, oder zur Erlangung eines akademischen Grades, vorgelegt habe.

Münster, den 20. Dezember 2004

## ERKLÄRUNG

Ich gebe hiermit die Erklärung ab, dass mir die Promotionsordnung des Fachbereichs 5 der medizinischen Fakultät der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster, in der Fassung vom 3. Februar 2003 schriftlich vorliegt und mir der Inhalt bekannt ist.

Münster, den 20. Dezember 2004



## Bezirksregierung Münster

Bezirksregierung Münster, 48128 Münster  
Gegen Empfangsbekanntnis

Westfälische Wilhelms-Universität Münster  
Institut für Physiologie und  
Institut für Experimentelle Epilepsieforschung  
Herrn Prof. Dr. med. E.-J. Speckmann  
Robert-Koch-Str. 27 a

Dienstgebäude  
Alter Steinweg 22-24  
Telefon: (0251) 411-0  
Durchwahl: 2110  
Zimmer: G 106  
Frau Möllers

Aktenzeichen  
23.0835.1.0 (G 32/97)

48149 Münster

23 . Oktober 1997

Betr.: Tierschutz;  
hier: Durchführung von Versuchen an Wirbeltieren

Bezug: Ihr Antrag vom 08.08.1997

### G e n e h m i g u n g s b e s c h e i d :

Sehr geehrter Herr Prof. Dr. Speckmann,

gemäß § 8 Tierschutzgesetz (TierSchG) in der Neufassung vom 17. Februar 1993 (BGBl. I S. 254) in geltender Fassung wird Ihnen die Genehmigung zur Durchführung nachstehenden Versuchsvorhabens erteilt:

#### **Experimentelle Epilepsieforschung.**

Leiter des Versuchsvorhabens ist:

Herr Prof. Dr. med. Erwin-Josef Speckmann  
Institut für Physiologie und  
Institut für Experimentelle Epilepsieforschung  
der Universität Münster  
Robert-Koch-Str. 27 a

48149 Münster



## Bezirksregierung Münster

EINGEGANGEN			
12. SEP. 2000			

Bezirksregierung Münster · 48128 Münster

Herrn

Prof. Dr. med. E.-J. Speckmann  
Institut für Physiologie der  
Westf. Wilhelms-Universität Münster  
Robert-Koch-Str. 27 a

48149 Münster

Dienstgebäude  
Domplatz 1-3  
Telefon: (0251) 411-0  
Durchwahl: 2110  
Zimmer: 431  
Frau Möllers  
Aktenzeichen  
23.0835.1.0 ( G 32/97 )

7. September 2000

Betr.: Tierschutz;  
hier: Durchführung von Versuchen an Wirbeltieren  
Verlängerung des Tierversuchs G 32/97:  
" Experimentelle Epilepsieforschung "

Bezug: Antrag vom 24.08.2000  
Mein Genehmigungsbescheid vom 23.10.1997 - Az.: w. o. -

Sehr geehrter Herr Prof. Dr. Speckmann,

gemäß § 8 Tierschutzgesetz (TierSchG) in der Fassung der Bekanntmachung vom 25. Mai 1998 (BGBl. I S. 1105) verlängere ich auf Ihren Antrag hin die Genehmigungsdauer für die Durchführung des o.a. Versuchsvorhabens bis zum 31.10.2001.

Mit freundlichen Grüßen

Im Auftrag

Dr. Piontkowski