

Aus der Medizinischen Klinik I
der Universität zu Lübeck
Direktor: Prof. Dr. med. Hendrik Lehnert

**Untersuchungen zur Rolle der zirkadianen Uhr
in der Regulierung der metabolischen Antwort auf
Schlafentzug**

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

vorgelegt von
Sophie Charlotte Hintze
aus Göttingen

Lübeck 2013

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Dr. h.c. Hendrik Lehnert

2. Berichterstatterin: Prof. Dr. rer. nat. Ulrike Krämer

Tag der mündlichen Prüfung: 26.08.2013

Zum Druck genehmigt, Lübeck den 26.08.2013

-Promotionskommission der Sektion Medizin-

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	1
1. Einleitung	3
1.1 Die zirkadiane Uhr	4
1.1.1 Einführung in die innere Uhr	4
1.1.2 Anatomischer Aufbau des zirkadianen Systems	5
1.1.3 Uhren in peripheren Geweben	6
1.1.4 Das zirkadiane Uhrwerk auf molekularer Ebene	8
1.1.5 Mutationen in Uhrengenen	11
1.2 Schlaf	12
1.2.1 Schlafphysiologie und -funktion	12
1.2.2 Schlaf-Wach Regulation	13
1.2.3 Schlafverhalten bei Abwesenheit der zirkadianen Uhr	15
1.2.4 Schlafentzug und seine Auswirkungen auf die zirkadiane Uhr und den Metabolismus	16
1.3 Metabolismus	18
1.3.1 Hunger und Sättigung regulierende Hormone	18
1.3.2 Glukokortikoide	22
1.3.3 Interaktion zwischen Metabolismus und zirkadianer Uhr	23
1.4 Fragestellung	26
2. Material und Methoden	27
2.1 Versuchsaufbau	27
2.2 Tierversuche	28
2.2.1 Tiere und Tierhaltung	28
2.2.2 Schlafentzug	28
2.2.3 Aktivitätsmessung, Überwachung des Gewichts und der Futteraufnahme	29
2.2.4 Präparation der Versuchstiere und Probengewinnung	29
2.3 Immunologische Methoden	30
2.3.1 Radioimmunoassay (RIA)	30
2.3.2 Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)	30
2.4 Molekulargenetische Methoden	31
2.4.1 Genotypisierung (DNA-Isolierung aus Schwanzbiopsien)	31
2.4.2 RNA-Extraktion	33
2.4.3 cDNA-Synthese (Synthese komplementärer DNA)	34
2.4.4 Quantitative <i>real-time</i> PCR	35
2.5 Datenauswertung	36

3.	Ergebnisse	37
3.1	Verlust des Aktivitätsrhythmus in Doppelmutanten nach Schlafentzug.....	37
3.2	Schlafentzug führt zu metabolischen Veränderungen in Wildtypen	39
3.3	Schlafentzug beeinflusst die Kortikosteronsekretion nur in Mutanten.....	42
3.4	Erhöhte Leptinwerte in Wildtyp-Mäusen nach Schlafentzug	43
3.5	Ghrelin-Sekretion.....	45
3.6.	Genexpressions-Rhythmen nach Schlafentzug in Wildtyp-Mäusen und Doppelmutanten.....	47
3.6.1	Lebergewebe	47
3.6.2	Fettgewebe.....	50
4.	Diskussion	54
4.1	Überblick über die Ergebnisse.....	54
4.2	Schlafentzug, ein stärkerer Zeitgeber als der Licht-Dunkel-Rhythmus in..... Doppelmutanten.....	55
4.3	Auswirkungen von Schlafentzug auf das Fressverhalten und die Gewichtsentwicklung	56
4.4	Hormonelle Veränderungen durch Schlafentzug.....	59
4.5	Auswirkungen von Schlafentzug auf molekularer Ebene	62
4.6	Ausblick	64
5.	Zusammenfassung	66
6.	Literaturverzeichnis	67
7.	Danksagung	81
8.	Lebenslauf	81
9.	Erklärungen	84

Abkürzungsverzeichnis

ACTH	Adrenocorticotropin
AIR _g	acute insulin response to glucose
AgRP	agouti-related Protein
ACR	Nucleus arcuatus
<i>Bmal1</i>	<i>Brain and Muscle aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator –like 1</i>
bHLH	basic helix-loop-helix
BMI	Body Mass Index
CCG	clock controlled gene
cDNA	complementary DNA
<i>Clock</i>	<i>Circadian Locomotor Output Cycles Kaput</i>
CKI ϵ	Caseinkinase I epsilon
CRH	Corticotropin-releasing Hormone
<i>Cry1/2</i>	<i>Cryptochrome1/2</i>
DBP	D-site of albumin promotor binding protein
DMH	dorsomedialer Kern des Hypothalamus
DNA	desoxy-ribonucleic acid
DSPS	delayed sleep phase syndrome
EEG	Elektroenzephalographie
<i>Efla</i>	<i>Elongation factor 1 alpha</i>
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
EMG	Elektromyographie
EOG	Elektrookulographie
FASPS	Familial advanced sleep phase syndrome
GABA	γ -Aminobuttersäure
GC	Glukokortikoid
GH	growth hormone
GHRH	GH-releasing hormone
<i>Glut2</i>	<i>Glukosetransporter 2</i>
HPA-Achse	hypothalamus/pituitary/adrenal Achse
Hz	Hertz
Kontrolle	Kontrollgruppe

LD-Zyklus	Licht-Dunkel-Zyklus
LHA	laterales hypothalamisches Areal
MPO	mediale präoptische Region
mRNA	messenger ribonucleid acid
NPAS2	Neuronal PAS Domain Protein 2
Non-REM-Schlaf	non-rapid eye movement-Schlaf
NPY	Neuropeptid-Y
NR	nukleärer Rezeptor
NTS	Nucleus tractus solitarii
<i>Obr</i>	Leptin-Rezeptor
PAS	Period-Arnt-Singleminded
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
Per Mut	<i>mPer1-mPer2</i> -Doppelmutanten
PFA	perifornikales Areal des Hypothalamus
PK-2	Prokineticin-2
<i>Per1/2</i>	<i>Period1/2</i>
POMC	Proopiomelanocortin
PPAR	Peroxisom-Proliferator-aktivierter Rezeptor
PPRE	PPAR-responsives Element
PVN	paraventriculärer Nucleus des Hypothalamus
qPCR	quantitative real time PCR
REM-Schlaf	rapid eye movement-Schlaf
<i>Reverb alpha</i>	<i>Reverse erythroblastic leukemia viral oncogene homolog alpha</i>
RHT	retinohypothalamischer Trakt
RIA	Radioimmunassay
RRE	retinoid response element
ROR α	Retinoic Acid-related Orphan Receptor Alpha
SCN	Nucleus suprachiasmaticus
SE-Gruppe	Schlafentzug-Gruppe
SEM	standard error of the mean
SER-Gruppe	Gruppe mit Schlafentzug + Regeneration
SPZ	subparaventriculären Zone
SWS	slow wave-Schlaf
TGF- α	Transforming growth factor- α

TTL	transcriptional/translational feedback loop
VIP	vasoactive intestinal peptide
VLPO	ventrolateraler präoptischer Nukleus
WT	Wildtyp
ZT	<i>Zeitgeber time</i>

1. Einleitung

1.1 Die zirkadiane Uhr

1.1.1 Einführung in die innere Uhr

Die Rotation der Erde um ihre Achse und die dadurch hervorgerufenen tagesperiodischen Veränderungen der Umweltbedingungen begünstigten im Laufe der Evolution die Ausbildung von inneren Uhren in nahezu allen Organismen. Beispiele für solche wiederkehrenden Veränderungen der Umwelt sind Klimaschwankungen, Rhythmen der Verfügbarkeit von Nahrung oder der An- oder Abwesenheit von Feinden. Die innere Uhr bereitet den Körper auf solche vorhersehbar im Tagesverlauf auftretenden Bedingungen (5). Sie ermöglicht es den Lebewesen, diese zu antizipieren (6,154) und verschafft ihnen damit einen Überlebensvorteil (138,196). Um eine optimale Anpassung zu garantieren, werden also das Verhalten und die physiologische Bereitschaft mit den äußeren Bedingungen abgestimmt. Damit Raubtiere effizient ihre Beute jagen können, müssen die Energie erzeugenden Organe und Muskeln zum Zeitpunkt der Jagd zu Höchstleistungen bereit sein (5). Alle anderen, in diesem Moment nicht benötigten physiologischen Prozesse, wie beispielsweise die Verdauung, sollten in dieser Zeit möglichst wenig Ressourcen verbrauchen, um den Erfolg der Jagd nicht zu gefährden. Für die Synchronisation physiologischer Prozesse miteinander und mit bestimmten Tages- und Nachtzeiten ist die innere Uhr verantwortlich. Auch ohne Informationen von außen über die externe Zeit ist sie in der Lage, einen endogenen Rhythmus mit einer Periode von ungefähr 24 Stunden aufrecht zu erhalten (11). Da ihre Periodenlänge unter solchen "Freilaufbedingungen" nur näherungsweise 24 Stunden beträgt, wurde der Begriff „zirkadiane Uhr“ (von lat. *circa dies* = ungefähr ein Tag) gewählt. Unter konstanten Lichtbedingungen beträgt die Periode dieses Rhythmus beim Menschen zwischen 24 und 26 Stunden, während die Periodenlänge von Mäusen in konstanter Dunkelheit bei etwas weniger als 24 Stunden liegt (11,44,162). Die Abweichung der Periodenlänge der zirkadianen Uhr von exakt 24 Stunden bedeutet, dass die zirkadiane Uhr täglich neu gestellt werden muss, dieses Phänomen wird als *Entrainment* bezeichnet (12). Auf diese Weise ist zum Beispiel auch eine Anpassung an verschiedene Zeitzonen nach interkontinentalen Flügen möglich. Diesen Prozess und die damit verbundenen Symptome nennt man *Jetlag*. Äußere Signale, die in der Lage sind, die Phase der inneren

Uhr mit der Umwelt zu synchronisieren, werden als „*Zeitgeber*“ bezeichnet. Licht ist mit Abstand der wichtigste *Zeitgeber*. Daneben gibt es jedoch eine Reihe weiterer, nicht-photischer Reize, die die innere Uhr beeinflussen können, wie Temperatur (19), Verfügbarkeit von Futter (127), Aktivität und soziale Interaktionen (119).

Der wohl auffälligste zirkadiane Rhythmus des Menschen ist der Schlaf-Wach-Rhythmus. Daneben unterliegen zahlreiche weitere physiologische Prozesse wie die Regulation der Körpertemperatur (149), der Herzfrequenz, des Blutdrucks, des Leber- und Nierenstoffwechsels (118) und die Sekretion von Hormonen wie Glukokortikoiden (GCs) und Melatonin (81,175) einer zirkadianen Rhythmik.

Zirkadiane Uhren sind nicht auf Säugetiere beschränkt. So wurde das Phänomen der inneren Uhr das erste Mal bereits 1792 von dem französischen Astronom Jean Jacques d’Ortous de Mairan beschrieben. Er beobachtete, dass sich die Blätter der *Mimosa pudica* auch in konstanter Dunkelheit periodisch öffnen und schließen und somit keinen rein passiven Vorgang als Antwort auf den Wechsel von Licht zu Dunkelheit darstellen, sondern die Expression eines inneren Mechanismus der Zeitmessung (145).

1.1.2 Anatomischer Aufbau des zirkadianen Systems

Das zirkadiane System in Säugetieren ist hierarchisch strukturiert. Der zentrale Schrittmacher der inneren Uhr hat seinen Hauptsitz im bilateralen *Nucleus suprachiasmaticus* (SCN), eine Kernregion aus ca. 20.000 Neuronen an der Basis des Hypothalamus (151). Interessanterweise zeigt (fast) jede SCN-Zelle einen eigenen zirkadianen Rhythmus. Da aber die Periodenlänge der einzelnen Rhythmen stark variiert (193), sind die SCN-Zellen über verschiedene Signale miteinander gekoppelt. Auf diese Weise bleiben sie untereinander synchronisiert und können einen robusten und einheitlichen zirkadianen Rhythmus ausbilden. Die Kommunikation der Neurone des SCN miteinander resultiert unter anderem aus der Freisetzung von γ -Aminobuttersäure (GABA) (120,193), vasoaktivem intestinalen Peptid (VIP) (13,80) und Kalzium (86). Zusätzlich spielen direkte Verbindungen benachbarter Zellen über Zell-Zell-Kanäle (*gap junctions*) dabei eine Rolle (42).

Die Synchronisation der SCN-Uhr mit dem Tag-Nacht-Rhythmus erfolgt mithilfe von spezialisierten, lichtsensitiven Ganglionzellen der inneren Retina, die das Photopigment

Melanopsin produzieren (78-79,140). Diese Zellen leiten Hell-Dunkel-Informationen über den retinohypothalamischen Trakt (RHT) an den SCN weiter (128,174). Von dort besteht eine weit reichende Vernetzung mit anderen Gehirnregionen sowie mit peripheren Organen. Die efferenten Signalwege des SCN sind zuständig für eine korrekte zeitliche Koordinierung von verschiedenen physiologischen Prozessen. Verbindungen vom SCN zur subparaventriculären Zone (SPZ) werden zur medialen präoptischen Region (MPO) weitergeleitet, um dort die zirkadiane Regulation der Körpertemperatur zu kontrollieren (158). Andere Efferenzen aus der SPZ projizieren in den dorsomedialen Kern des Hypothalamus (DMH) (49) und kontrollieren über den paraventriculären Nukleus (PVN) die Sekretion von Melatonin und des Corticotropin-releasing Hormons (CRH) (57,93-94). Weiterhin wird über efferente Projektionen aus dem DMH in den lateralen Hypothalamus und den ventrolateralen präoptischen Nukleus (VLPO) der Schlaf-Wach-Rhythmus gesteuert (39-40,158). Informationen aus dem SCN, die den PVN erreichen, werden dort in hormonelle und Signale des vegetativen Nervensystems, die für periphere Organe bestimmt sind, umgeschrieben (29). Aber auch indirekt über Steuerung der Aktivität und der Futteraufnahme beeinflusst der zentrale Schrittmacher im SCN den zirkadianen Rhythmus in peripheren Organen (45,152). So erhöht der SCN beispielsweise direkt vor Beginn der Aktivitätsphase die Insulinsensitivität der Muskulatur und bewirkt gleichzeitig eine Steigerung der Glukoseproduktion in der Leber (109-110). Neben neuronalen Signalen werden vom SCN auch diffusionsfähige Neuropeptide sezerniert. Transforming growth factor- α (TGF- α) und Prokineticin-2 (PK-2) werden vom SCN rhythmisch ausgeschüttet und haben einen inhibitorischen Einfluss auf die Regulation der lokomotorischen Aktivität (37,105).

1.1.3 Uhren in peripheren Geweben

Zwar sitzt die Hauptuhr des zirkadianen Systems im SCN, dennoch existieren periphere Schrittmacher in nahezu allen Geweben und Organen (17,45,84,201,206-207). In *Ex vivo*-Experimenten konnte gezeigt werden, dass periphere Gewebe in der Lage sind, einen autonomen zirkadianen Rhythmus für mehrere Zyklen aufrechtzuerhalten (17,194,202). Der SCN scheint eher für die Koordination der verschiedenen Rhythmen

des SCN und der peripheren Gewebe als für den alleinigen Ursprung eines zirkadianen Rhythmus in peripheren Geweben zuständig zu sein.

Ein sehr wichtiger *Zeitgeber* für die zirkadianen Uhren der Peripherie ist die Futteraufnahme. Normalerweise nehmen nachtaktive Nagetiere 80% der täglichen Nahrung während der Dunkelphase zu sich. Wird den Tieren über eine bestimmte Zeit lang Futter nur während der Lichtphase angeboten, kommt es zu einer Entkopplung der Leberuhr vom SCN. Die Phase des SCN dagegen bleibt unbeeinflusst. Neben der Leberuhr werden durch die zeitlich verschobene Futteraufnahme auch die Uhren in Pankreas, Niere und Herz entkoppelt (45). Der zugrundeliegende Mechanismus dieser Entkopplung ist bisher nicht geklärt. Denkbar wäre, dass Stoffwechselprodukte der peripheren Organe zu einer Anpassung der Phasen führen. So kann beispielsweise Dexamethason, ein GC-Analogon, die Phase der zirkadianen Genexpression in Leber, Niere und Herz beeinflussen (16). In einer Studie mit Mäusen, die eine Mutation des Glukokortikoid (GC)-Rezeptors ausschließlich in der Leber trugen, wurde jedoch gezeigt, dass GCs die Anpassung der Phase peripherer Uhren bei Fütterung in der Lichtphase nicht ermöglichen, sondern eher noch antagonisieren (114). Es sind also wahrscheinlich andere Stoffwechselprodukte an der Synchronisation der Uhren in peripheren Organen beteiligt.

Die Leber als das wichtigste Stoffwechselorgan ist entscheidend an der Anpassung der metabolischen Prozesse an den täglichen Rhythmus aus Nahrungsaufnahme und Fasten beteiligt (111). Dies zeigt sich daran, dass viele Gene der Leber, die in verschiedene Prozesse des Glukose-, Fettsäure-, Cholesteroll- und Gallensäurestoffwechsels involviert sind, eine zirkadiane Expression aufweisen (139). Ein Beispiel dafür ist die Glukosehomöostase. Viele Enzyme, die mit der Glukoneogenese, Glykolyse und dem Glykogenstoffwechsel assoziiert sind, sind rhythmisch exprimiert (139). Auch der Glukosetransporter 2 (*Glut2*) zeigt ein rhythmisches Expressionsmuster. Über diesen Glukosetransporter wird bei niedrigem Plasmaglukosespiegel Glukose aus den Hepatozyten in den Blutkreislauf transportiert. In Mäusen, die eine leberspezifische Mutation im *Bmal1*-Gen, einer Hauptkomponente der zirkadianen Uhr, tragen, kommt es zu einem Verlust der rhythmischen *Glut2*-Expression, was vorübergehende Hypoglykämien in der Fastenphase (= Schlafphase) zur Folge hat (111). Dies deutet darauf hin, dass der zirkadiane Glukoseexport über eine lokale zirkadiane Leberuhr reguliert wird (74). Bei Menschen führt eine Mutation im *Glut2*-Gen (*Slc2a2*) zur Ausbildung des Fanconi-Bickel-Syndroms, einer Stoffwechselstörung, die mit einer

durch Glykogenakkumulation bedingten Hepatomegalie und Hypoglykämien während des Fastens assoziiert ist (157).

Auch im Fettgewebe konnten periphere Uhren beschrieben werden (206). Manche der zirkadian exprimierten Gene sind in Prozesse des Fettstoffwechsels, wie zum Beispiel die Adipogenese, eingebunden (35,166). Weiterhin sezerniert das Fettgewebe Hormone wie Leptin und Adiponektin, deren Serumspiegel ein zirkadianes Muster zeigen (75,92). Im Fettgewebe führt eine auf die Lichtphase beschränkte Futteraufnahme, ähnlich wie im Lebergewebe, zu einer Verschiebung der Phase der zirkadianen Expression von Uhrengenen (206).

Zusammenfassend kann formuliert werden, dass periphere Uhren an der Regulation von lokalen Rhythmen wichtiger Stoffwechselprozesse beteiligt sind. Ein hierarchisches System aus verschiedenen Uhren gewährleistet die Stabilität und eine präzise Kontrolle des zeitlichen Ablaufs der diversen metabolischen Vorgänge (152).

1.1.4 Das zirkadiane Uhrwerk auf molekularer Ebene

Auf molekularer Ebene wird das intrazelluläre Uhrwerk aus sich gegenseitig beeinflussenden positiven und negativen transkriptionell-translationellen Rückkopplungsschleifen (*transcriptional/translational feedback loops*, TTLs) gebildet (151). Abbildung 1 zeigt eine vereinfachte Darstellung des molekularen Aufbaus der zirkadianen Uhr. Die Transkriptionsfaktoren Circadian Locomotor Output Cycle Kaput (CLOCK) und Brain and Muscle Arnt-like Protein-1 (BMAL1) bilden die positiven Komponenten der zentralen Rückkopplungsschleife. Diese Transkriptionsfaktoren sind charakterisiert durch eine *basic helix-loop-helix* (bHLH) Domäne, welche eine Bindung an DNA ermöglicht, sowie durch eine *Period-Arnt-Single-minded* (PAS) Domäne, die die Bildung von heterodimeren Komplexen unterstützt (31,76,82). CLOCK/BMAL1-Heterodimere können an bestimmte Abschnitte der DNA, sogenannte E-Box-Enhancer-Sequenzen, binden (31,76). Dies sind regulatorische DNA-Sequenzen, die als Andockstelle für Transkriptionsfaktoren die Transkription von Genen verstärken können (82). Durch die Bindung von CLOCK/BMAL1 an die DNA wird die Transkription von drei *Period*-Genen (*Per1*, *Per2* und *Per3*) und zwei *Cryptochrom*-Genen (*Cry1* und *Cry2*) induziert (76,108,115). Die PER- und CRY-Proteine akkumulieren im Zytoplasma,

wo sie Heteromere bilden. Sobald eine gewisse Schwellenkonzentration erreicht ist, translozieren sie als Komplexe zurück in den Nukleus und können dort den CLOCK/BMAL1-Komplex inhibieren, wodurch sie den negativen Arm der Uhr bilden (108,115,164). PER und CRY unterdrücken so ihre eigene Transkription, was nach und nach zu einer Abnahme der Proteinmenge von PER und CRY führt. Dadurch kommt es wiederum zu einer Aufhebung der Inhibition von CLOCK/BMAL1, und ein neuer Transkriptionszyklus wird aktiviert. Neuronal PAS Domain Protein 2 (NPAS2), welches strukturell eng verwandt ist mit CLOCK, ist ebenfalls in der Lage Heterodimere mit BMAL1 zu bilden, welche die Transkription von *Per*- und *Cry*-Genen induzieren (150).

In einer zweiten Rückkopplungsschleife aktiviert CLOCK/BMAL1 über Bindung an eine E-Box-Enhancer-Sequenz die Transkription von *Rev-erb α* , einem nukleären „orphan“-Rezeptor. Das REV-ERB α -Protein wiederum kann über ein *Retinoid-response* Element (RRE) in der Promotorregion des *Bmal1*-Gens binden und so die Transkription seines eigenen Aktivators inhibieren. Weiterhin wird die *Rev-erb α* -Expression durch PER- und CRY-Proteine gehemmt, wodurch es zu einer erneuten Aktivierung des *Bmal1*-Gens kommt (146). ROR α (Retinoic Acid-related Orphan Receptor Alpha) ist ebenfalls ein nukleärer Rezeptor (NR), welcher im Gegensatz zu REV-ERB α die Transkription von *Bmal1* aktiviert (2).

Posttranslationelle Modifikationen wie Phosphorylierung und proteosomale Proteolyse sind essentiell für die Ausbildung und Aufrechterhaltung der zirkadianen Uhr (108,115). Diese Mechanismen führen zu einer Verzögerung der molekularen Rückkopplung, was notwendig ist, damit überhaupt ein Rhythmus mit einer Periode von 24 Stunden ausgebildet werden kann. Reversible Phosphorylierung reguliert wichtige Prozesse wie die Bildung von Proteinkomplexen, den Eintritt in den Nukleus und den Abbau von Proteinen (73). Ein an diesen Prozessen beteiligtes Enzym ist die Caseinkinase I epsilon (CKI ϵ), welche PER-, CRY-Proteine sowie BMAL1 phosphoryliert (56,187). Die Phosphorylierung von PER1 und PER3 führt zu ihrer Degradation durch den proteosomalen Abbau (3). Daneben ist die CKI ϵ am Übertritt von PER1 in den Kern beteiligt (187). Es konnte außerdem gezeigt werden, dass eine homozygote Mutation im *Ckl ϵ* -Gen von Hamstern eine verkürzte Periode von 20 Stunden zur Folge hat (147).

Die Expression sogenannter Uhren-kontrollierter Gene (*clock controlled genes*, CCG) steht ebenfalls unter der Kontrolle der zirkadianen Uhr. Im Gegensatz zu den Uhrengenen, die Bestandteil der Rückkopplungsschleifen sind, sind die Proteinprodukte der Uhren-kontrollierten Gene nicht essentiell für die Funktion des molekularen

Uhrwerks (151). Der Transkriptionsfaktor Albumin gene D-site binding protein (DBP) ist eines der vielen CCGs. DBP gehört in die Gruppe der PAR-*Leucin-Zipper*-Transkriptionsfaktoren. Die Expression des *Dbp*-Gens wird durch die Bindung von CLOCK/BMAL1 an eine E-Box-*Enhancer*-Sequenz induziert (153). DBP wiederum bindet als Homodimer an eine D-Element-*Enhancer*-Sequenz in der Promotorregion von Zielgenen (151) und reguliert auf diese Weise unter anderem die rhythmische Transkription von Schlüsselenzymen des Leberstoffwechsels (113). Eine rhythmische Expression von DBP ist auch in anderen Organen wie Niere, Pankreas und Herz zu finden (45,62,199). Des Weiteren kann DBP an eine Promoterregion des *Per1*-Gens binden, wodurch die Transkription von *Per1* gesteigert wird (200). DBP ist somit in der Lage direkt auf Uhrgene zurückzukoppeln.

Bis zu 10% der exprimierten Gene im SCN und peripheren Geweben stehen unter dem Einfluss des zirkadianen Systems, wobei es zwischen den verschiedenen Geweben nur wenig Überschneidungen gibt. Die Expression der CCGs ist folglich gewebespezifisch (4,139).

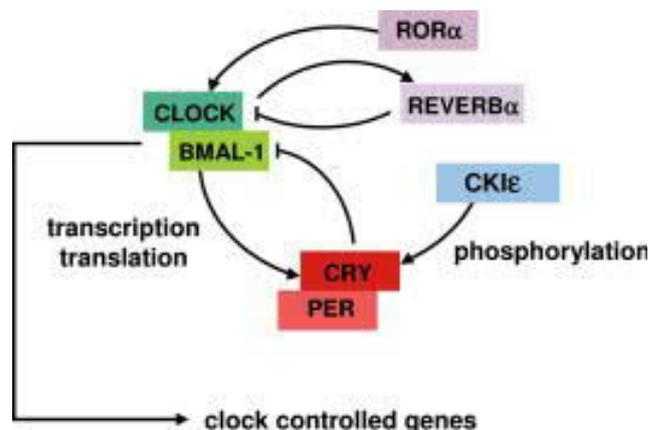


Abb.1: Stark vereinfachte Darstellung der transkriptionell-translationellen Rückkopplungsschleifen des molekularen Uhrwerks in Säugetieren (aus Seron-Ferre, 2007, Abb.2). Erläuterungen siehe Text Seite 9-11. Abkürzungen: Brain and Muscle Arnt-like Protein-1 (BMAL1), Circadian Locomotor Output Cycles Kaput Protein (CLOCK), Cryptochrom-Protein (CRY), Period-Protein (PER), Retinoic Acid-related Orphan Receptor Alpha (ROR α), Caseinkinase I epsilon (CKI ϵ), Reverse erythroblastic leukemia viral oncogene homolog alpha (Reverb alpha)

1.1.5 Mutationen in Uhrengenen

Die spezifische Rolle bestimmter Komponenten der Rückkopplungsschleifen in der Funktionsweise der molekularen Uhr konnte durch gezielte genetische Manipulationen einzelner Uhrengene besonders in der Maus beschrieben werden (122). Mäuse mit einem *Knock-out* des *Clock*-Gen zeigen in konstanter Dunkelheit robuste zirkadiane Verhaltensmuster mit einer Periodenlänge die gegenüber der Periodenlänge von Wildtypmäusen lediglich um 20 Minuten verkürzt ist. Aus dieser Beobachtung wurde geschlossen, dass CLOCK nicht zwingend erforderlich ist, um zirkadiane Verhaltensweisen zu generieren (47). Der Transkriptionsfaktor NPAS2 scheint den Verlust von CLOCK in diesen Tieren zu kompensieren und dadurch in Abwesenheit von CLOCK die zirkadiane Funktion aufrechterhalten zu können. Mäuse, in denen sowohl das *Clock*-Gen als auch das *Npas2*-Gen fehlen, zeigen ein arrhythmisches Verhalten (48). Ein Nullallel im *Bmal1*-Gen führt in konstanter Dunkelheit zu einem sofortigen Verlust der zirkadianen Rhythmik (31). Unter bestimmten Bedingungen kann jedoch die Funktion von BMAL1 durch sein Paralog BMAL2 ersetzt werden. Somit scheint zu einem gewissen Grad auch zwischen diesen beiden Genen eine Redundanz zu bestehen (165).

Mutationen im *Per1*- oder einem der *Cry*-Gene, den negativen Komponenten des Uhrwerks, verändern in konstanter Dunkelheit lediglich die Periode des zirkadianen Rhythmus, die Oszillation der zirkadianen Uhr bleibt jedoch erhalten (186,189,205). *Per1*, *Cry1* und *Cry2* haben also teilweise redundante Funktionen. Dagegen haben Mutationen in zwei *Per*- oder *Cry*-Genen schwerwiegende Auswirkungen. Mäuse mit einer Mutation des *Per1*- und des *Per2*-Gens haben einen ausgeprägten zirkadianen Phänotyp. In einem Licht-Dunkel (LD)-Zyklus, aus 12 Stunden Licht und 12 Stunden Dunkelheit, haben diese Mäuse relativ normale Aktivitätsrhythmen. In konstanter Dunkelheit dagegen kommt es zu einem unmittelbaren Verlust der zirkadianen Rhythmik (205). *Cry1/Cry2*-Doppelmutanten und *Per2/Cry1*-Doppelmutanten zeigen ebenfalls ein arrhythmisches Verhalten in konstanter Dunkelheit (137,186).

1.2 Schlaf

1.2.1 Schlafphysiologie und -funktion

Schlaf ist ein reversibler, periodisch wiederkehrender Ruhezustand, der durch eine reduzierte Antwortbereitschaft auf externe Stimuli und durch verminderte Interaktionen mit der Umwelt gekennzeichnet ist (141). Lange Zeit wurde Schlaf für einen passiven Vorgang gehalten, hervorgerufen durch das Verschwinden des Wachzustandes. Die Versuche des Schweizer Physiologen Walter Hess lieferten erste Hinweise, die für Schlaf als einen aktiven Zustand sprachen. Mit Entdeckung des EEGs (s.u.) durch Hans Berger 1929 konnte gezeigt werden, dass Schlaf tatsächlich ein Zustand zentralnervöser Aktivität ist (25).

Nach elektroenzephalographischen (EEG), elektromyographischen (EMG) und elektrookulographischen (EOG) Kriterien kann Schlaf in verschiedene Stadien eingeteilt werden, die in ihrer Gesamtheit die Schlafarchitektur darstellen. Man unterscheidet den Non-REM-Schlaf (*non-rapid eye movement*) vom REM-Schlaf (*rapid eye movement*). Der Non-REM-Schlaf wird weiter unterteilt in die Schlafstadien 1-4. Im EEG lassen sich abhängig von den verschiedenen Schlafstadien charakteristische Frequenzmuster erkennen. Im inaktiven Wachzustand bei geschlossenen Augen herrschen im EEG Alphawellen mit einer Frequenz von 8-12 Hertz (Hz) vor. Im Schlafstadium 1 treten unregelmäßige Alphawellen, sowie Thetawellen (4-7 Hz) auf. Das Stadium 2 ist charakterisiert durch spindelförmige Wellen von 7-14 Hz. Langsame Deltawellen (0,5-3 Hz) mit einer hohen Amplitude sind im Schlafstadium 3 und 4 zu finden, weshalb man diese Stadien auch als Langwellen-Schlaf (*slow wave sleep*, SWS) bezeichnet (20,141). Stadium 3 und 4 werden als Tiefschlaf oder Deltaschlaf zusammengefasst. In diesen Phasen überwiegt der Einfluss des parasympathischen Nervensystems mit erniedrigtem Blutdruck, Atem- und Herzfrequenz und Muskeltonus und gesteigerter gastrointestinaler Motorik. Im REM-Schlaf ähnelt das EEG dem des Wachzustandes (141). In diesem Stadium kommt es zu einer Aktivierung zahlreicher Körpervorgänge (25) mit beschleunigter Atmung und Herzfrequenz, gesteigertem Blutdruck und den namensgebenden schnellen Augenbewegungen bei gleichzeitig vollständiger Atonie der Muskulatur (141).

Der Übergang zwischen den Schlafstadien ist fließend. Ein Schlafzyklus besteht aus der Aufeinanderfolge von Non-REM- und REM-Schlaf. In einer Nacht durchläuft der

Mensch 5-7 Schlafzyklen. Die Tiefschlafphasen werden im Verlauf der Nacht kürzer, während der REM-Schlaf mit jedem Zyklus an Länge zunimmt (141). Gegen Ende des Schlafs steigen die Körpertemperatur und die Kortisonausschüttung an (25). Melatonin wird bei Einsetzen der Dunkelheit von der Epiphyse sezerniert. Gesteuert wird die Sekretion vom SCN über den PVN (93). Melatonin werden schlaffördernde Eigenschaften zugeschrieben (141). Ein weiteres Hormon, das mit Schlaf im Zusammenhang steht, ist das Wachstumshormon (*growth hormone*, GH). Vor allem in Phasen des Körperwachstums wird GH während der SWS-Phasen zu Beginn der Nacht ausgeschüttet (20).

Über die Funktion von Schlaf bestehen verschiedene Theorien. Da im Schlaf der Energieverbrauch durch die Herabsetzung des Stoffwechsels und der Wärmeabgabe reduziert ist, wird vermutet, dass er der Erholung und des Energiesparens dient (24). Nach Schlafdeprivation wird zuerst der SWS nachgeholt, weswegen hauptsächlich dem SWS die Energie sparende Funktion zugeschrieben wird (20). Nach dem Standardmodell der Schlaffunktion wird außerdem angenommen, dass Schlaf eine wichtige Rolle in der Konsolidierung des Gedächtnisses und der Förderung der neuronalen Plastizität spielt (26,65,125). So sollen die Schlafstadien 3 und 4 des Non-REM-Schlafs insbesondere das deklarative Gedächtnis fördern, während für das prozedurale Gedächtnis sowie für emotionale Gedächtnisinhalte der REM-Schlaf entscheidend ist (141). Die „synaptic downscaling“- Theorie dagegen besagt, dass Schlaf dazu dient, synaptische Verbindungen zu reduzieren, um auf diese Weise Kapazitäten zur Verschlüsselung neuer Informationen erneut dem Lernprozess zur Verfügung zu stellen (181). Inwieweit sich diese unabhängigen Theorien zu einem Modell vereinen lassen, ist Gegenstand aktueller Forschung.

1.2.2 Schlaf-Wach-Regulation

Das heute gängige Modell der Schlaf-Wach-Regulation wurde in den 1980er Jahren von dem Schweizer Pharmakologen Alexander Borbély aufgestellt. Es umfasst zwei von einander unabhängige regulatorische Prozesse, einen zirkadianen Prozess C und einen homöostatischen Prozess S (23). Prozess S entspricht dem homöostatischen Schlafbedürfnis, das abhängig ist vom Schlaf-Wach-Verhalten. Im Laufe der Wachzeit

steigt das Schlafbedürfnis an und fällt während des Schlafs wieder ab. Prozess C dagegen repräsentiert die zirkadiane Schlafbereitschaft (24), hervorgerufen durch den zirkadianen Schrittmacher im SCN. Prozess C ist selbsterhaltend (67) und unabhängig von der vorausgegangenen Schlaf- oder Wachzeit (24).

In der unten gezeigten Abbildung stellt die obere Kurve Prozess S dar. Die untere Kurve stellt jedoch nicht Prozess C, sondern sein Spiegelbild, dar. Der tiefste Punkt der Kurve c zeigt somit das Maximum der Schlafbereitschaft. Die schwarze Fläche stellt die effektive Schlafbereitschaft dar, die sich aus der Summe von Prozess S und C ergibt. In der Kurve entspricht die effektive Schlafbereitschaft der Differenz der beiden Kurven. (Borbely 1998).

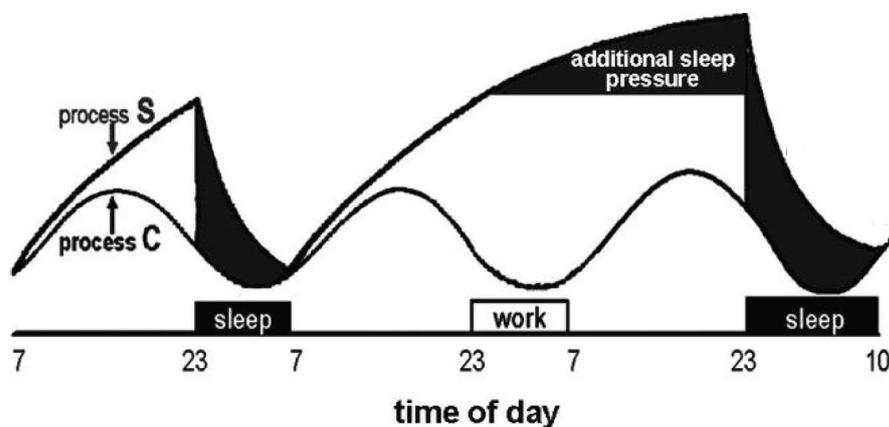


Abb.2: Zwei Prozess Modell nach Borbely (aus Wikipedia, modifiziert nach Borbely, A two process model of sleep regulation, 1982, <http://en.wikipedia.org/wiki/File:2-process.JPG>, Tag des letzten Zugriff 10.05.12). Erläuterungen siehe Text Seite 13-14.

Nach einer Nacht Schlafentzug ist in der darauf folgenden Nacht die Differenz der beiden Kurven größer, der Schlaf ist folglich vertieft. Jedoch ist er nicht wesentlich verlängert (Borbely 1998), da durch den Prozess C die Tagesperiodik beibehalten wird. Aus der Graphik ergeht auch, warum man am Nachmittag trotz ansteigendem Schlafbedürfnis wach bleiben kann. Denn die abnehmende zirkadiane Schlafneigung wirkt dem Anstieg des homöostatischen Schlafbedürfnisses entgegen. Da das homöostatische Schlafbedürfnis nach Schlafbeginn abfällt, verhindert in gleicher Weise der Anstieg der zirkadianen Schlafneigung ein frühes Aufwachen (52). Es ist also das Zusammenspiel zwischen zirkadianem Prozess C und homöostatischem Prozess S, welches über Veränderungen der Schlafneigung und des Schlafbedürfnisses eine etwa 16-stündige Episode der Wachheit und eine etwa 8-stündige Schlafepisode ermöglicht (52-53).

Durch Schlafentzug kommt es wie oben erwähnt zu einem Anstieg von Prozess S. Proportional zum Schlafentzug kommt es auch zu einem Anstieg des Non-REM-Schlafanteils sowie der Deltawellenaktivität im Tiefschlaf der darauf folgenden Nacht (51,178). Da Prozess S und SWS von der zuvor verbrachten Schlaf- bzw. Wachzeit abhängig sind, wird die Deltawellenaktivität im SWS als EEG-Korrelat des schlafhomöostatischen Prozess S angenommen (66-67,69). In Mäusen konnte nach Entfernung des SCN der Anstieg der Deltawellenaktivität nach Schlafentzug weiterhin beobachtet werden (182), was zu der Annahme führte, dass die homöostatische Regulation des Schlafs (Prozess S) und die Erzeugung des zirkadianen Rhythmus (Prozess C) anatomisch und funktionell voneinander unabhängige Prozesse sind (53,67).

1.2.3 Schlafverhalten bei Abwesenheit der zirkadianen Uhr

Neuere Studien zeigen jedoch, dass sich die strikte Trennung von Prozess S und C wahrscheinlich nicht auf die molekulare Ebene ausdehnen lässt. Anhand verschiedener Mausmodelle mit gezielten Mutationen einzelner Uhrgene wurden die Auswirkungen des Verlusts der verschiedenen Genprodukte auf die zirkadianen und schlafhomöostatischen Prozesse untersucht. Besonderes Augenmerk wurde dabei auf den Non-REM-Schlaf, die Deltawellenaktivität im SWS (Stadium 3 und 4 des Non-REM-Schlafs) und die Reaktion auf Schlafentzug gelegt, da diese Parameter Rückschlüsse auf die homöostatische Schlafregulation zulassen (67).

Cry1/Cry2-Doppelmutanten zeigen bereits unter Grundbedingungen einen erhöhten Anteil an Non-REM-Schlaf sowie eine erhöhte Deltawellenaktivität im SWS verglichen mit Wildtypmäusen. Nach einem sechsständigen Schlafentzug kommt es, anders als in Wildtypmäusen, zu keinem weiteren Anstieg des Non-REM-Schlafanteils, was dadurch erklärt wird, dass die Tiere bereits unter Grundbedingungen einem hohen Non-REM-Schlafdruck ausgesetzt sind. Die Ergebnisse lassen vermuten, dass die *Cry*-Gene an der homöostatischen Regulation des Schlafs beteiligt sind (195).

Mäuse mit einer Mutation im *Npas2*-Gen schlafen weniger als Wildtypen, besonders in der zweiten Hälfte der Dunkelphase. Weiterhin zeigen diese Mäuse nach Schlafentzug weniger kompensatorischen Schlaf (68). Auch für Mäuse mit Mutation im *Bmal1*- und *Clock*-Gen sind veränderte Parameter der homöostatischen Schlafregulation sowie

abweichende Reaktionen auf Schlafentzug beschrieben worden (112,135). Die oben beschriebenen Ergebnisse haben zu der Annahme geführt, dass Uhrengene nicht nur an der Erzeugung zirkadianer Rhythmen beteiligt sind, sondern auch an der homöostatischen Regulation des Schlafs.

In Menschen sind mittlerweile zwei Syndrome bekannt, die mit einem veränderten Schlaf-Wach-Verhalten einhergehen und durch Uhrengen-Mutationen verursacht werden. Das autosomal-dominant vererbte Syndrom der frühen Schlafphase (*Familial advanced sleep phase syndrome*, FASPS) wird durch eine Mutation im humanen *Per2*-Gen (*PER2*) verursacht. Die Mutation hat eine veränderte Bindungsstelle der Caseinkinase I epsilon (CKIε) zur Folge, was zu einer Hypophosphorylierung von hPER2 führt (180). Menschen, die an FASPS leiden, zeigen einen um vier Stunden nach vorne verlagerten Schlaf-Wach-Rhythmus, welcher durch einen Schlafeintritt gegen 19.30 Uhr und ein spontanes Aufwachen gegen 4.30 Uhr charakterisiert ist. Im EEG der Patienten zeigt sich, dass der erste SWS und die erste REM-Schlafepisode verglichen mit Kontrollpersonen nahezu vier Stunden früher auftreten (90,180).

Ein struktureller Polymorphismus im humanen *Per3*-Gen ist mit dem verzögerten Schlafsyndrom (*delayed sleep phase syndrome*, DSPS) assoziiert (55). Der Schlaf-Wach-Rhythmus dieser Menschen ist nach hinten verlagert, mit einem Schlafeintritt gegen 2.00 Uhr und einem spontanen Erwachen zwischen 10.00 und 14.00 Uhr (34,192). Daneben hat der *Per3* Polymorphismus auch Einfluss auf Parameter der Schlafhomöostase im EEG (188).

Die Erkenntnisse aus Untersuchungen von Menschen und Mäusen deuten darauf hin, dass Uhrengene in die homöostatische Regulation des Schlafs involviert sind und die zirkadianen und homöostatischen Prozesse der Schlafregulation, zumindest auf molekularer Ebene, nur schwierig gegeneinander abzugrenzen sind (67).

1.2.4 Schlafentzug und seine Auswirkungen auf die zirkadiane Uhr und den Metabolismus

In nahezu allen industrialisierten Ländern kam es in den letzten Jahrzehnten zu Veränderungen der Schlaf- und Ernährungsgewohnheiten, mit zum Teil erheblichen gesundheitlichen und auch ökonomischen Konsequenzen. Die Prävalenz von

Übergewicht (BMI>25) und Adipositas (BMI>30) steigt weltweit, nicht nur unter Erwachsenen, sondern auch unter Kindern, an. Eine neuere Studie schätzt, dass weltweit 205 Millionen Männer und 297 Millionen Frauen über 20 Jahre fettleibig sind (61). In vielen europäischen Ländern sind mehr als 50 % der Erwachsenen übergewichtig oder adipös (58). Übergewicht und Adipositas sind unter anderem mit kardiovaskulären Erkrankungen, *Diabetes Mellitus* und dem metabolischen Syndrom assoziiert (58).

Neben der Änderung der Ernährungs- und Bewegungsgewohnheiten, könnte auch das Schlafverhalten zu dieser Entwicklung beigetragen haben. Mehr als 30% der Männer und Frauen zwischen 30 und 64 Jahren gaben 2004 an, weniger als sechs Stunden pro Nacht zu schlafen (97). 1960 lag die durchschnittliche Schlafdauer noch bei 8-8,9 Stunden/Nacht (106). Die Abnahme der Schlafdauer kann auf eine freiwillige Kürzung sowie auf die Zunahme der Schichtarbeit in unserer 24-Stunden-Gesellschaft zurückgeführt werden. In epidemiologischen Studien konnte gezeigt werden, dass eine durchschnittliche Schlafzeit unter sieben Stunden pro Nacht mit einem höheren BMI-Wert und einem erhöhten Risiko für die Entwicklung von Diabetes Mellitus Typ 2 korreliert (14,143). Ähnliche Ergebnisse ergaben Untersuchungen an Schichtarbeitern, in denen gezeigt werden konnte, dass Schichtarbeit mit einem erhöhten BMI-Wert sowie einer Reihe von Erkrankungen einschließlich des metabolischen Syndroms assoziiert ist (22,50,95). Eine verkürzte Schlafdauer könnte über die Hochregulierung des Appetits, mehr verfügbare Zeit, um zu essen, oder die Abnahme des Energieverbrauchs aufgrund geringerer Bewegung in den Wachphasen zu einer Gewichtszunahme führen (97,185). In Laboruntersuchungen, in denen Versuchspersonen eine begrenzte Zeit lang Schlaf entzogen wurde, kam es durch den Schlafentzug zu Veränderungen des Glukosestoffwechsels mit einer gestörten Glukosetoleranz und einer verminderten akuten Insulinantwort auf Glukose (*acute insulin response to glucose*, AIR_g) (172). In einer anderen Studie konnte gezeigt werden, dass nach Schlafentzug der Plasmaspiegel von Leptin, einem Hormon, das Hungergefühle hemmt, erniedrigt war, während der Plasmaspiegel von Ghrelin, einem Hormon, das Appetit stimuliert, erhöht wurde. Parallel stieg das subjektive Hungergefühl sowie der Appetit der Versuchsteilnehmer, vor allem auf hochkalorische Nahrungsmittel (173). Die durch Schlafentzug hervorgerufenen Veränderungen der Plasmaspiegel stoffwechsellassoziierter Hormone scheinen allerdings stark vom Studiendesign abzuhängen. In einer weiteren Studie blieben die Plasmaspiegel von Leptin und Ghrelin durch Schlafentzug unbeeinflusst. Daneben zeigte sich jedoch, dass Schlafentzug zu einer verringerten körperlichen Tagesaktivität führte, welche

langfristig eine Gewichtszunahme und damit verknüpfte Erkrankungen begünstigen könnte (160).

Zu den Auswirkungen von Schlafentzug in Nagetieren gibt es kontroverse Beobachtungen. In manchen Studien wurde unter Schlafentzug eine gesteigerte Futtermittelaufnahme bei gleichzeitigem Verlust an Körpergewicht festgestellt (59,99-100), während in anderen Studien keine Steigerung der Futtermittelaufnahme beobachtet werden konnte (15,203). Auch die Untersuchungen zum Einfluss von Schlafentzug auf den Plasmaspiegel von Leptin zeigen uneinheitliche Ergebnisse. So wurde in einigen Studien davon berichtet, dass Schlafentzug zu einem erniedrigten Leptinspiegel führt (60,100) in einer anderen wiederum zeigte Schlafentzug keinen Effekt (21). Neben den noch nicht endgültig geklärten Auswirkungen von Schlafentzug auf den tierischen Metabolismus scheint dieser auch den zirkadianen Schrittmacher im SCN zu beeinflussen. In einer Studie mit Hamstern, die in konstanter Dunkelheit gehalten wurden, konnte z.B. gezeigt werden, dass Schlafentzug eine Verschiebung der Phase der inneren Uhr nach vorne bewirkt (8).

1.3 Metabolismus

1.3.1 Hunger und Sättigung regulierende Hormone

Die Regulation des Gleichgewichts zwischen Energieaufnahme und -verbrauch ist ein vielschichtiger Vorgang, an dem zentrale und periphere Prozesse beteiligt sind. Zwei wichtige Signale in diesem System sind die Hormone Leptin und Ghrelin, die im Stoffwechsel entgegengesetzte Aufgaben übernehmen.

Ghrelin ist ein 28-Aminosäure-Peptid, welches vorwiegend aus der Mukosa des Magens sezerniert wird (46,103). Daneben wird es auch in geringeren Mengen im Darm und in der Hypophyse produziert. Nach Translation erfährt Ghrelin eine n-Oktanoylierung und ist nur in dieser Form biologisch aktiv (103). Der Großteil des zirkulierenden Ghrelins liegt jedoch in der nicht-acylierten, inaktiven Form vor (85). Der Ghrelinspiegel ist abhängig von der Nahrungsaufnahme. Die Aufnahme von Zucker führt zu einem erniedrigten Ghrelinspiegel, während Fasten den Ghrelinspiegel erhöht (183). Ghrelin

gehört in die Gruppe der Wachstumshormon-Sekretagoga, die die Freisetzung des Wachstumshormons (GH) fördern, jedoch über einen anderen Rezeptor wirken als das GH-freisetzende Hormon (*GH releasing hormone*, GHRH) aus dem Hypothalamus. Ghrelin bindet an einen G-Protein gekoppelten Rezeptor, der in zahlreichen Organen und Geweben wie beispielsweise der Hypophyse, dem Herz, der Lunge, dem Fettgewebe, der Leber und der Niere nachgewiesen werden konnte (142). Neben der Freisetzung von Wachstumshormon fördert Ghrelin auch die von Prolaktin, Kortisol und Adrenocorticotropin (ACTH) (176). Auf verschiedene Weise ist Ghrelin an der Regulation des Energiehaushalts beteiligt. Primär stimuliert es die Sekretion von Neuropeptid-Y (NPY) aus Neuronen des *Nucleus arcuatus* des Hypothalamus (134). NPY bewirkt eine Appetitsteigerung und fördert dadurch die Nahrungsaufnahme (91). Die subkutane Applikation von Ghrelin führt in Ratten zu einer signifikanten Gewichtszunahme durch eine Zunahme der Fettmasse (183), was die Annahme unterstützt, dass Ghrelin an der Entstehung von Adipositas beteiligt ist. Die Wirkungen von Ghrelin sind in Abbildung 3 schematisch dargestellt.

Leptin besteht aus 146 Aminosäuren und wird hauptsächlich im Fettgewebe synthetisiert, daneben konnte es auch in kleinen Mengen in anderen Geweben wie der Hypophyse und dem Hypothalamus nachgewiesen werden (72,89,129,204). Die im Blut zirkulierende Menge an Leptin ist proportional zu der an Fettgewebe (124). Fasten führt zu einem sinkenden Leptinspiegel, während die Aufnahme von Nahrung dessen Anstieg bewirkt (38). Die Frage, ob der Plasmaspiegel von Leptin einem zirkadianen Rhythmus unterliegt, konnte noch nicht abschließend geklärt werden. In einigen Studien wurde ein zirkadianer Verlauf mit einem Maximalwert während der Dunkelphase beschrieben (21,92,170), der jedoch in anderen Studien nicht bestätigt wurde (206). Leptin überträgt Informationen über die Menge der im Fettgewebe gespeicherten Energie an die regulatorischen Zentren im Hypothalamus (70). Dort existiert ein komplexer Regelkreis der Energiehomöostase an dem neben Leptin auch Insulin beteiligt ist (Abb. 5). In Neuronen des *Nucleus arcuatus* (ARC) hemmen Leptin und Insulin sowohl die Expression und –Sekretion von NPY (1,161) als auch des agouti-related Proteins (AgRP) und antagonisieren auf diese Weise die appetitstimulierende Wirkungen von NPY und AgRP (131). Daneben liegen im Nucleus arcuatus Neurone vor, die Proopiomelanocortin sezernieren, welches eine reduzierte Nahrungsaufnahme bewirkt. Diese Neurone werden durch Leptin und Insulin stimuliert und können durch benachbarte NPY/AgRP-Neurone inhibiert werden (43). Innerhalb dieses Regelkreises sind die Neuronen des Nucleus

arcuatus mit Neuronen der anorexigenen Regionen des PVN und orexigenen Regionen des lateralen Hypothalamus (LHA) verschaltet, von wo aus Projektionen zur Wahrnehmung von Sättigung und Belohnung bestehen (131).

Mutationen im Gen für Leptin oder dessen Rezeptor (*Obr*) führen zu einer erhöhten Nahrungsaufnahme und einem verminderten Energieverbrauch (41,159). In den meisten übergewichtigen Menschen lassen sich erhöhte Leptinspiegel finden (72). Da Leptin in diesen Patienten den Appetit offenbar nicht mehr regulieren kann, wird angenommen, dass ein Resistenz des Organismus gegen die anorexigenen Effekte von Leptin vorliegt (133). Die der Leptinresistenz zugrunde liegenden Mechanismen könnten unter anderem einen fehlerhaften Transport von Leptin über die Bluthirnschranke oder eine reduzierte hypothalamische Signalübertragung beinhalten (72). Neben dem appetithemmenden Effekt hat Leptin noch weitere Wirkungen, zusammenfassend dargestellt in Abbildung 4. Über den Sympathikus hemmt Leptin das Knochenwachstum (54,177). Des Weiteren moduliert es die Immunfunktion der T-Lymphozyten (121) und stimuliert Reifung des reproduktiven Systems (1,36).

Leptin und Ghrelin sind in der Lage, ihre Wirkungen gegenseitig zu antagonisieren. Der durch Leptin hervorgerufene appetithemmende Effekt kann durch Ghrelin unterbunden werden. (167). Andersherum wird der appetitstimulierende Effekt von Ghrelin durch subkutane Leptininjektionen unterdrückt (18).

Neben den Aufgaben von Leptin und Ghrelin in der Regulation des Energiehaushalts, scheinen beide auch die Fähigkeit zu haben, Schlaf zu modulieren (21). Die systemische Gabe von Leptin führt zu einer Abnahme des REM-Schlafs und einer Zunahme des Tiefschlafs (SWS) (171). Nach Ghrelin-Gabe kommt es ebenfalls zu einer Zunahme des SWS (191). Diese Ergebnisse deuten auf eine enge Vernetzung von Prozessen der Schlafregulation und des Energiehaushalts hin.

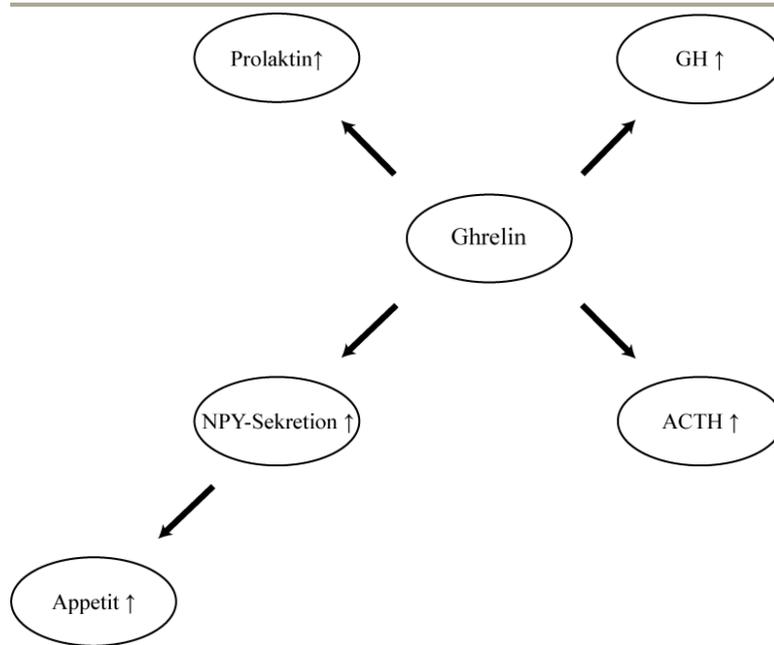


Abb.3: schematische Darstellung der Wirkungen von Ghrelin

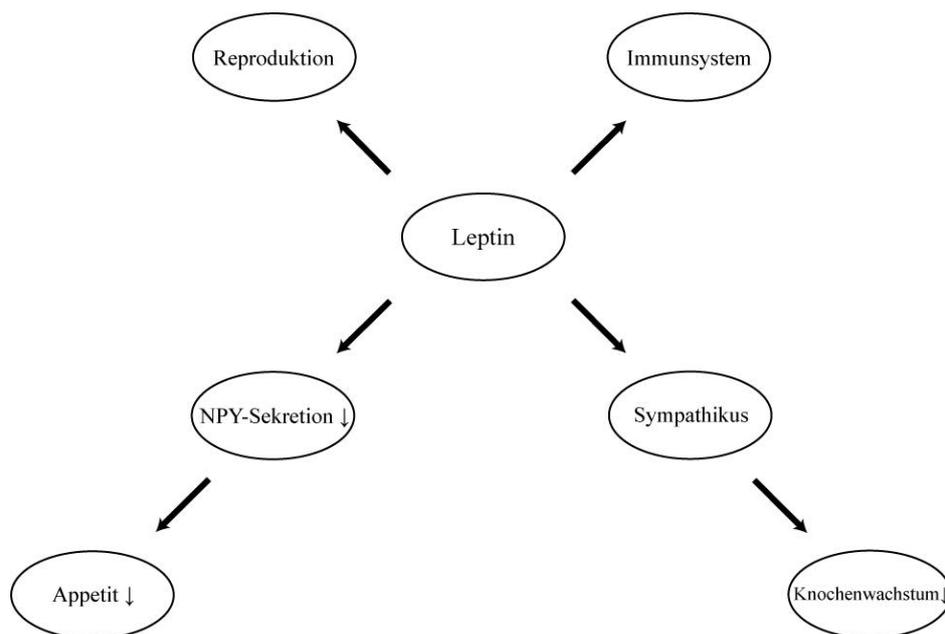


Abb.4: schematische Darstellung der Wirkungen von Leptin

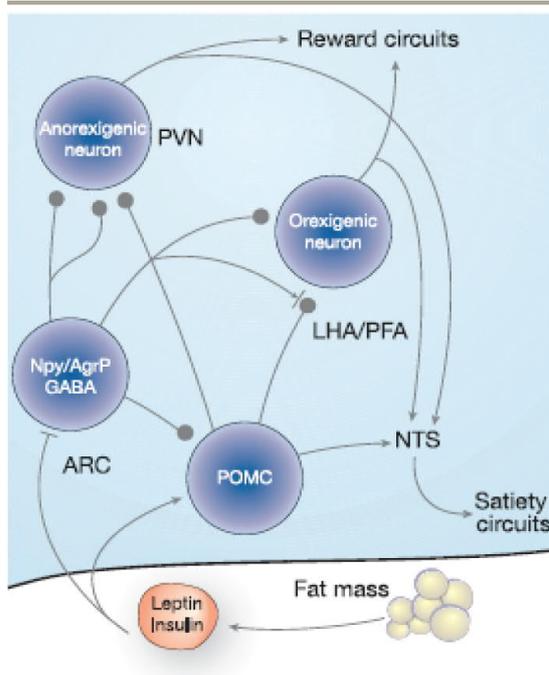


Abb.5: Hypothalamischer Regelkreis der Energiehomöostase (aus Morton, 2006, Abb.4a)
 Erläuterungen siehe Text Seite 19. Abkürzungen: Nucleus arcuatus (ARC), Agouti-related Protein (AgRP), Neuropeptid Y (NPY), Proopiomelanocortin (POMC), γ -Aminobuttersäure (GABA), laterales hypothalamisches Areal (LHA), perifornikales Areal (PFA), Nucleus tractus solitarii (NTS), Nucleus paraventricularis (PVN)

1.3.2 Glukokortikoide

Zu den Hormonen, die einen zirkadianen Rhythmus des Plasmaspiegels zeigen, gehört auch die Gruppe der Glukokortikoide. Während das wichtigste Glukokortikoid (GC) des Menschen Kortisol ist, ist das dominante Glukokortikoid in Nagetieren Kortikosteron (126). Produziert werden GCs in der *Zona fasciculata* der Nebennierenrinde. Als Ausgangssubstanz dient Cholesterin, das über den Blutweg zur Nebenniere transportiert wird. In nachtaktiven Tieren erreicht der Plasmaspiegel von Kortikosteron seinen Maximalwert mit Beginn der Dunkelphase, seinen Tiefpunkt am Morgen (94). Die rhythmische Freisetzung von GCs wird durch den SCN kontrolliert. Entlang der HPA-Achse (*hypothalamus/pituitary/adrenal axis*) wird zunächst CRH aus Zellen des PVN ausgeschüttet (94). CRH stimuliert in der Hypophyse die Sekretion von ACTH, welches wiederum in der Nebennierenrinde die Produktion von GCs bewirkt (94,169). Über einen negativen Rückkopplungsmechanismus hemmen diese die CRH-Sekretion und die ACTH-Biosynthese (101). Neben diesem neuroendokrinen Signalweg werden Zeitsignale

vom SCN zum Rückenmark und von dort aus über den *Nervus splanchnicus* als Teil des autonomen Nervensystems zur Nebennierenrinde weitergeleitet. Über diesen Mechanismus wird die Sensitivität der Nebennierenrinde für ACTH reguliert (30,88). Weiterhin leitet der neuronale Signalweg Informationen über Licht vom SCN zur Nebenniere, was unabhängig von der HPA-Achse zu Veränderungen der Kortikosteronfreisetzung führt (30,87). Der SCN gewährleistet also über zwei verschiedene Mechanismen eine optimale Sekretion von Kortikosteron (29). Im Plasma sind GCs an Transkortin gebunden (101). Da sie lipophile Substanzen sind, können sie durch die Zellmembran der Zielzelle diffundieren. Durch Bindung an den Glukokortikoidrezeptor entsteht ein Komplex, der als Transkriptionsfaktor an spezifischen Promotorregionen wirkt (83). Metabolisch haben GCs eine primär katabole Wirkung. In der Leber fördern sie die Glukoneogenese und Glykogenolyse sowie die Freisetzung von Glukose und antagonisieren so das Insulin. Eine vermehrte Freisetzung von Aminosäuren wird durch die Hemmung der Proteinbiosynthese und die Stimulierung der Proteolyse in Muskeln und Fettgewebe hervorgerufen (101).

1.3.3 Interaktion zwischen Metabolismus und zirkadianer Uhr

Eine wichtige Aufgabe des zirkadianen Systems ist die Synchronisierung des Stoffwechsels mit den Anforderungen der Umgebung und den Schwankungen des vorhandenen Nahrungsangebots. Diese Beziehung scheint jedoch nicht einseitig zu sein. Neuere Ergebnisse deuten auf eine enge Verflechtung zwischen dem zirkadianen System und den Prozessen des Stoffwechsels hin (zusammengefasst in (104)).

Durch Untersuchungen von Mäusen mit Mutationen in den einzelnen Uhrengenen konnte gezeigt werden, dass wichtige Komponenten des Stoffwechsels unter der Kontrolle der zirkadianen Uhr stehen. Mäuse, die eine Mutation im *Clock*-Gen tragen, zeigen einen stark veränderten Rhythmus der täglichen Futteraufnahme mit Hyperphagie. Daneben sind diese Mäuse übergewichtig und entwickeln unter Hochfett-diät ein metabolisches Syndrom mit Hyperlipidämie, Hyperleptinämie, Hyperglykämie und Hypoinsulinämie (184). Eine gestörte Glukoneogenese und Glukosetoleranz zeigen sowohl Mäuse mit einer Mutation im *Clock*-Gen, als auch Mäuse mit einer Deletion des *Bmal1*-Gens (156). Auch bei Menschen korrelieren genetische Variationen der zirkadianen Uhr mit

metabolischen Erkrankungen. Menschen mit einem bestimmten Haplotyp des *Clock*-Gens entwickeln signifikant häufiger das metabolische Syndrom im Vergleich zu anderen Haplotypen (163). Bestimmte *Bmal1*-Haplotypen sind dagegen mit Diabetes Mellitus Typ 2 und Hypertonus assoziiert (197). Wie weiter oben beschrieben lassen sich auch in peripheren Geweben lokale Uhren finden. Viele der Hauptkomponenten der zirkadianen Uhr beteiligen sich an der Regulierung verschiedener Stoffwechselfvorgänge. In Adipozyten reguliert BMAL1 die Adipo- und Lipogenese (166). Ein funktionierendes *Bmal1*-Gen ist in der Leber Voraussetzung für eine rhythmische Expression von Genen, die in die Glukosemobilisierung involviert sind (111). *Rev-erb α* wird ebenfalls für die Differenzierung der Adipozyten benötigt (190) und ist des Weiteren in den Triglyceridstoffwechsel involviert (148). Auch über die Steuerung von Uhrenkontrollierten Genen (*clock controlled genes*, CCG) greift die zirkadiane Uhr in die Regulation metabolischer Prozesse ein. So reguliert beispielsweise *Dbp* Enzyme des Steroidhormonstoffwechsels in der Leber (113).

Dass die zirkadiane Uhr umgekehrt auch selber einer metabolischen Kontrolle unterliegt, konnte in Versuchen gezeigt werden, in denen Mäuse auf eine Hochfettdiät gesetzt wurden, wodurch Übergewicht induziert wurde. Dadurch kommt es in diesen Mäusen zu einer Verlängerung der zirkadianen Periode, einer Abschwächung des täglichen Fressrhythmus und Veränderungen der rhythmischen Expression von Uhrengenen in Leber und Fettgewebe. Darüber hinaus zeigen die Mäuse auch Veränderungen der zirkadianen Rhythmen der Plasmaspiegel von Leptin, Insulin und Kortikosteron (102). Mäuse, die genetisch bedingt Übergewicht und Diabetes Mellitus entwickeln, zeigen ebenfalls veränderte Expressionsmuster der Uhrengene in Leber und Fettgewebe (7). Über den Mechanismus, wie metabolische Prozesse die zirkadiane Uhr beeinflussen können, ist allerdings noch wenig bekannt. Ein Mechanismus könnte die nukleären Rezeptoren (NR) einbeziehen. Diese Protein-Superfamilie umfasst Transkriptionsfaktoren, die im Lipid- und Kohlenhydratstoffwechsel, bei Entzündungsprozessen und in der Zelldifferenzierung eine wichtige Rolle spielen (64). Dazu gehören auch die Peroxisom-Proliferator-aktivierten Rezeptoren (PPARs). PPAR α reguliert die Expression von Genen, die mit dem Lipidstoffwechsel assoziiert sind (136). Es wird daher in besonderem Maße in Geweben exprimiert, die große Mengen an Fettsäuren abbauen, beispielsweise im Leber- und Fettgewebe (116). Die Expression von PPAR α folgt ebenfalls einem zirkadianen Rhythmus (117). Zielgene von PPAR α sind unter anderem die Uhrengene *Rev-erb α* (77) und *Bmal1*, deren Expression PPAR α über

die Bindung an ein PPAR responsives Element (PPRE) in deren Promotorregion reguliert (33). Interessanterweise ist PPAR α Zielstruktur von Fibraten, die als PPAR α Agonisten zur Behandlung von Hyperlipidämien eingesetzt werden (33). PPAR γ wird unter anderem im Fettgewebe exprimiert und reguliert die Differenzierung von Adipozyten sowie die Lipogenese (27-28,116). Die Substanzklasse der Glitazone wirkt als PPARgamma-Agonist. Diese Medikamente werden bei Patienten mit Diabetes 2 eingesetzt und bewirken eine Erhöhung der Insulinsensitivität des Fettgewebes und eine vermehrte Expression des Glukosetransportproteins Glut4, welches die Aufnahme von Glukose aus dem Blut in Leber- und Fettgewebe fördert (123). Als eines der Zielgene von PPAR γ konnte *Rev-erb α* identifiziert werden (63). Nukleäre Rezeptoren können folglich direkt verschiedene Komponenten der Rückkopplungsschleifen der zirkadianen Uhr beeinflussen.

Die Ergebnisse zeigen, dass metabolische und zirkadiane Prozesse auf verschiedenen Ebenen interagieren und werfen die Möglichkeit auf, dass eine gestörte zirkadiane Uhr metabolische Erkrankungen mitbegründen könnte. Im Gegenzug könnten Veränderungen der Stoffwechsellage Einflüsse auf zirkadian gesteuerte Vorgänge wie das Schlafverhalten haben. Eine weitere Aufklärung der zugrunde liegenden Mechanismen dieser Interaktion führt möglicherweise zu einem besseren Verständnis der Pathogenese von Stoffwechsel assoziierten Erkrankungen und zur der Entwicklung neuer therapeutischer Ansätze.

1.4 Fragestellung

Aus den vorangegangenen Kapiteln geht hervor, dass weitreichende wechselseitige Beziehungen zwischen der Regulation von Schlaf, der metabolischen Homöostase und der zirkadianen Uhr bestehen. Es ist sehr gut belegt, dass Schlafentzug erhebliche Auswirkungen auf die metabolische Homöostase besitzt. Wenig ist jedoch bekannt, wie die Effekte von Schlafentzug auf die metabolische Ebene übertragen werden. Hier setzt die vorliegende Arbeit an. Die zirkadiane Uhr ist sowohl an der Steuerung des Schlaf-Wach-Rhythmus als auch an der Kontrolle vieler Stoffwechselprozesse beteiligt. Es erscheint nahe liegend, dass die zirkadiane Uhr an der Vermittlung der Effekte von Schlafentzug auf die metabolische Ebene beteiligt ist. Das Hauptziel der Arbeit ist es, den Einfluss der Uhrgene *Per1* und *Per2* auf die Interaktion zwischen partiellem Schlafentzug und Metabolismus zu untersuchen. Folgende Fragen können formuliert werden:

1. Ist die zirkadiane Uhr an der Regulierung der metabolischen Antwort auf Schlafentzug beteiligt?
2. Wie zeigt sich diese Beteiligung auf hormoneller und Verhaltensebene?
3. Welche Auswirkungen hat Schlafentzug auf zirkadiane Rhythmen in stoffwechselrelevanten Geweben wie Leber und Fett?

2. Material und Methoden

2.1 Versuchsaufbau

Es wurden *mPer1-mPer2* Doppelmutanten in einem C57/BL6J Hintergrund (205) und C57/BL6J Wildtyp-Mäuse als Vergleichsgruppe untersucht. Beide Stämme wurden in drei Gruppen mit gleichem mittleren Ausgangsgewicht unterteilt. Die Kontrollgruppe (abgekürzt Kontrolle) wurde nach einer Woche unter 12h Licht: 12h Dunkelheit (LD) Bedingungen getötet. ZT 0 ist definiert als Zeitpunkt, an dem das Licht angeschaltet wurde, ZT 12 als Zeitpunkt an dem das Licht ausgeschaltet wurde. Die Schlafentzug-Gruppe (abgekürzt SE-Gruppe) wurde nach fünf Tagen Schlafentzug (ZT 0 bis ZT 6) getötet. Die Gruppe mit Schlafentzug + Regeneration (abgekürzt SER-Gruppe) wurde parallel auf die gleiche Art schlafentzogen, jedoch schloss sich eine Woche an, in der sich die Mäuse regenerieren konnten. Jede Gruppe bestand aus 16-17 Tieren. 4-5 Tiere wurden an den Zeitpunkten ZT 0, ZT 6, ZT 12 und ZT 18 getötet. Während der drei Wochen wurden die Futteraufnahme, das Körpergewicht und die Aktivität (mittels passiven Infrarot-Detektoren) registriert.

Nach Dekapitation der Tiere wurden das Blut gesammelt und das Gehirn und der *Lobus quadratus* der Leber für nachfolgende histologische Untersuchungen in Optimal Cutting Temperature (O.C.T.) Medium (Tissue Tek) eingebettet. Das inguinale Fettgewebe und der rechte Leberlappen wurden für molekulargenetische Untersuchungen sichergestellt und in RNAlater (Ambion) aufbewahrt.

Mittels ELISA bzw. RIA wurde das Blut auf folgende Parameter hin untersucht: Leptin, Ghrelin und Kortikosteron.

Aus dem Fett- und Lebergewebe wurde total RNA isoliert und daraus cDNA hergestellt. Diese wurde im Anschluss mittels qPCR auf die Konzentration bestimmter mRNAs hin untersucht. Im Fettgewebe wurden Leptin (*Lep*), Peroxisom-Proliferator-aktivierter Rezeptor γ (*Ppar γ*), D-site of albumin promoter binding protein (*Dbp*) und Rev-erb α (*Nr1d1*) untersucht. Im Lebergewebe wurden auf die gleiche Weise *Dbp*, Peroxisom-Proliferator-aktivierter Rezeptor α (*Ppar α*), Rev-erb α und Glukosetransporter 2 (*Glut2* bzw. *Slc2a2*) untersucht.

2.2 Tierversuche

2.2.1 Tiere und Tierhaltung

Für die Versuche wurden 50 männliche Wildtyp C57BL/6J Mäuse und 49 männliche *mPer1-mPer2* Doppelmutanten verwendet (205). Die C57BL/6J Mäuse wurden von Janvier (Frankreich) bezogen. Die *mPer1-mPer2* Doppelmutanten mit dem genetischen Hintergrund C57BL/6J wurden in institutseigener Tierhaltung gezüchtet.

Zwei bis sechs Tiere waren in Käfigen (Eurostandard TypII L 265x207x140 mm) der Firma Tecniplast mit freiem Zugang zu Wasser und Standardfutter (Ssniff V1126, Soest, Germany) untergebracht. Die Tiere wurden in klimatisierten Tierställen bei konstanter Temperatur ($20 \pm 0,5^\circ\text{C}$) und Luftfeuchtigkeit (50-60%) mit einem Hell-Dunkel-Rhythmus von 12:12 Stunden gehalten, mit „Licht an“ definiert als ZT 0. Die Beleuchtungsstärke war auf 50 Lux beschränkt. Vor Beginn des Versuchs wurden alle Mäuse mindestens zwei Wochen lang an die Bedingungen gewöhnt. Die Tiere waren zu Versuchsbeginn zwischen acht und elf Wochen alt. Eine Identifikation der Tiere wurde durch Lochmarkierung der Ohren garantiert.

Alle Tierversuche wurden in Übereinstimmung mit den Vorschriften des Deutschen Tierschutzgesetzes durchgeführt und waren durch das Niedersächsische Landesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit genehmigt (AZ 33.11.42502-04-010/09).

2.2.2 Schlafentzug

Der Schlafentzug fand in der zweiten Woche des Versuchs von Montag bis Freitag täglich von ZT 0 bis ZT 6 statt. Der Schlafentzug wurde nach der *Gentle handling*-Methode durchgeführt (179). Die Tiere wurden durchgehend beobachtet. Schlaf wurde durch Zugabe von verschiedenen Objekten, mit denen die Mäuse spielen konnten, oder durch sanfte Berührungen verhindert.

2.2.3 Aktivitätsmessung, Überwachung des Gewichts und der Futtermengeaufnahme

Die Aktivität der Tiere wurde mittels passiver Infrarotdetektoren, die an den Abdeckgittern der Käfige befestigt waren, über die gesamte Versuchsdauer hinweg registriert und mittels ClockLab Software (Actimetrics, Evanston, IL) analysiert. Pro Käfig wurde ein Infrarotmelder installiert.

Um die Gewichtsveränderungen zu überwachen, wurden die Tiere einmal wöchentlich an ZT 12 gewogen.

Um die täglich aufgenommene Futtermenge registrieren zu können, wurde die Futtermenge wöchentlich an drei Zeitpunkten (ZT 0, ZT 12 und ZT 0 des darauf folgenden Tages) gewogen.

2.2.4 Präparation der Versuchstiere und Probengewinnung

Die Tiere wurden an vier Zeitpunkten getötet: ZT 0, ZT 6, ZT 12 und ZT 18. Um einen Lichtpuls während der Dunkelphase zu verhindern, wurde an den Zeitpunkten ZT 0 und ZT 18 bei Rotlicht gearbeitet. Die Tiere wurden zu den angegebenen Zeitpunkten durch Genickbruch getötet und zügig dekapitiert. Im Anschluss an die Dekapitation wurde das Blut aus dem Rumpf in Petrischalen aufgefangen und in Microvette CB300 Kapillaren (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland) pipettiert. Zur Extraktion des Plasmas wurden die Kapillaren für fünf Minuten bei 9.000 rpm zentrifugiert. Anschließend wurde das überstehende Plasma abgenommen und bei -80°C gelagert.

Die Schwanzspitzen der *mPer1-mPer2* Doppelmutanten wurden für eine anschließende Genotypisierung bei -20°C aufbewahrt.

Zur Gewinnung der Leberproben wurde die Leber freipräpariert und der gesamte *Lobus dexter* der Leber in ~ 20 mg große Stücke geteilt. Die Fettgewebsproben wurden aus dem inguinalen Fettgewebe entnommen. Die Gewebeproben wurden in RNAlater (Ambion) zunächst für 12 Stunden bei 4°C und anschließend bis zur RNA-Extraktion bei -80°C aufbewahrt.

Für nachfolgende histologische Untersuchungen wurden das Gehirn und der *Lobus quadratus* der Leber freipräpariert, in O.C.T. (Tissue Tek) eingebettet und bei -80°C gelagert.

2.3 Immunologische Methoden

2.3.1 Radioimmunoassay (RIA)

Zur Quantifikation von Kortikosteron wurde das *ImmuChem™ Double Antibody ¹²⁵Iod-Radioimmunoassay Kit* (MP Biomedicals, LLC) verwendet. Es wurde entsprechend der Anleitung des Herstellers verfahren. Jede Probe wurde als Duplikat gemessen und der Mittelwert der Doppelbestimmungen berechnet. Der Mittelwert der Leerwerte wurde von den Proben und Standards subtrahiert. Zur Ermittlung der Standardkurve wurden in einem halblogarithmischen Diagramm die so ermittelten Werte (lineare Y-Achse) gegen die Kortikosteron-Konzentration (logarithmische X-Achse) aufgetragen.

2.3.2 Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

2.3.2.1 Leptin

Der Plasma-Leptinspiegel wurde mittels des *Mouse Leptin ELISA Kit* (Crystal Chem Inc.) quantitativ ermittelt. Es wurde nach den Anweisungen des Herstellers vorgegangen. Jede Probe wurde als Duplikat gemessen und der Mittelwert der Doppelbestimmungen berechnet. Zur Ermittlung der Standardkurve wurde in einem halblogarithmischen Diagramm die mittlere Absorption jeder Standardprobe (lineare Y-Achse) gegen die eingesetzte Leptin-Konzentration (logarithmische X-Achse) aufgetragen.

2.3.2.2 Ghrelin

Die Quantifikation von Ghrelin im Plasma erfolgte mithilfe des *Ghrelin EIA Kit* (Catalog # EK-031-31, Phoenix Pharmaceuticals, Inc.). Es wurde nach Protokoll des Herstellers verfahren. Aufgrund der begrenzten Plasmamenge wurden statt 50 µl Plasma 1:5 (10 µl Plasma + 40 µl 1 x Testpuffer) verdünntes Plasma eingesetzt. Jede Probe wurde als Duplikat gemessen und der Mittelwert der Doppelbestimmungen berechnet. Zur Ermittlung der Standardkurve wurde in einem halblogarithmischen Diagramm die mittlere Absorption jeder Standardprobe (lineare Y-Achse) gegen die Ghrelin Konzentration (logarithmische X-Achse) aufgetragen.

2.4 Molekulargenetische Methoden

2.4.1 Genotypisierung (DNA-Isolierung aus Schwanzbiopsien)

Schwanzbiopsien der *mPer1-mPer2* Mutanten wurden über Nacht bei 55°C in 400 µl *Tail extraction* Puffer (200 mM Tris/HCl, 50 mM EDTA, 100 mM NaCl, 1% SDS, H₂O) und 10 µl Proteinase K (10 mg/ml) verdaut. Am nachfolgenden Tag wurde die Lösung, nachdem sie durchmischt wurde, für zehn Minuten bei Raumtemperatur auf 14000 rpm zentrifugiert. Zu 350 µl des Überstandes wurden 400 µl Isopropanol hinzugefügt. Durch mehrfaches Invertieren des 1,5 ml Eppendorf-Gefäßes formte sich ein DNA-Niederschlag. Nach 10-minütiger Zentrifugation bei Raumtemperatur und 14.000 rpm wurde der Überstand verworfen, der verbleibende Niederschlag mit 70% Ethanol gewaschen und an der Luft getrocknet.

Die extrahierte DNA wurde nach Verflüchtigung des Ethanols in 100 µl *Tail extraction* Puffer bei 55°C gelöst.

DNA-Amplifikation mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR):

Per1 :

- 2,5 µl 10x Ammonium Puffer
 - 1 µl dNTPs [10mM]
 - 1 µl Primer [10pmol/µl]: gPer1_wt_rev
 - 1 µl Primer [10pmol/µl]: gPer1_fw
 - 1 µl Primer [10pmol/µl]: gPer1_mut_rev
 - 1 µl MgCl₂
 - 0,5 µl DMSO [Endkonzentration 2%]
 - 15 µl ddH₂O
 - 0,5 µl Ampliqon Taq
 - 1 µl DNA (80-100 ng)
- 25 µl

Program:

- 94°C 3 min
- 94°C 30 sec
- 65°C 30 sec
- 72°C 1 min → zurück zu Schritt zwei für 33 Zyklen
- 72°C 10 min
- 4°C Lagerung

Primer Sequenzen:

gPer1_wt_rev: 5'-AGAACTGAGGACCCAAGCTG-3'

gPer1_fw: 5'-TTGCCTACAGCCTCCTGAGT-3'

gPer1_mut_rev: 5'-GGGGAACTTCCTGACTAGGG-3'

wt +/+ 550-600 bp, Primer: *gPer1_fw* und *gPer1_wt_rev*

mut -/- 350-400 bp, Primer: *gPer1_fw* und *gPer1_mut_rev*

Per2 :

- 2,5 µl 10x Ammonium Puffer
 - 1 µl dNTPs [10mM]
 - 1 µl Primer [10pmol/µl]: *gPer2f2*
 - 1 µl Primer [10pmol/µl]: *gPer2_Neo*
 - 1 µl Primer [10pmol/µl]: *gPer2r2*
 - 1 µl MgCl₂
 - 15 µl ddH₂O
 - 0,5 µl Ampliqon Taq
 - 1 µl DNA (80-100 ng)
- 25 µl

Program:

- 94°C 3 min
- 94°C 30 sec
- 61°C 30 sec
- 72°C 1 min → zurück zu Schritt zwei für 38 Zyklen
- 72°C 10 min
- 4°C Lagerung

Primer Sequenzen:

gPer2f2: 5'-GAACACATCCTCATTCAAAGG-3'

gPer2_Neo: 5'-CGCATGCTCCAGACTGCCTTG-3'

gPer2r2: 5'-GCTGGTCCAGCTTCATCAACC-3'

wt +/- 381 bp, Primer: *gPer2f2* und *gPer2r2*

mut -/- 120 bp, Primer: *gPer2r2* und *gPer2_Neo*

2.4.2 RNA-Extraktion

Die gefrorenen Gewebeproben wurden auf Raumtemperatur gebracht. Etwa 20 mg Leber- und 70 mg Fettgewebe wurden entnommen. Die zum Homogenisieren verwendeten Reaktionsröhrchen waren mit Keramik-Kügelchen (Durchmesser 1,8 mm) befüllt (Precellys Keramik-Kit 2.8 mm, Peqlab). Die Homogenisierung erfolgte mithilfe des Precellys 24 Homogenisators (Peqlab) bei 6.000 rpm für 30 Sekunden.

Für die RNA-Extraktion aus Lebergewebe wurde das *RNeasy Mini Kit* (Quiagen) benutzt. Es wurde nach Protokoll des Herstellers vorgegangen. Die isolierte RNA wurde in 30 µl RNase freiem Wasser gelöst. Der optionale DNase-Verdau wurde durchgeführt.

Für die RNA-Extraktion aus Fettgewebe wurde das *RNeasy Lipid Tissue Mini Kit* (Quiagen) verwendet. Es wurde nach Protokoll des Herstellers verfahren. Die isolierte RNA wurde in 20µl RNase-freiem Wasser gelöst. Der optionale DNase-Verdau wurde ebenfalls durchgeführt.

Mittels des NanoDrop ND 1000 Spectrophotometers wurde die RNA Quantität ermittelt. Durch Gelelektrophorese wurde die isolierte RNA in Abhängigkeit ihrer Ladung und Größe aufgetrennt, um die Qualität der RNA zu überprüfen. Eine ausreichende RNA-Qualität wurde angenommen, wenn zwei klare Banden bei circa 750 bp und 250 bp sichtbar waren.

2.4.3 cDNA Synthese (Synthese komplementärer DNA)

Zur Synthese von cDNA aus den RNA Proben wurde das *TermoScript RT-PCR System* (Invitrogen) verwendet.

Protokoll:

1) RNA Denaturierung:

- 1 μ l Oligo (dT) Primer (50 μ M)
- 1-3 μ l RNA (~1 μ g/ μ l) je nach Konzentration der RNA in der NanoDrop-Auswertung
- 6-8 μ l Depc H₂O
10 μ l

Denaturierung für fünf Minuten bei 65°C, Zwischenlagerung bei 4°C.

2) *Master Mix* für die reverse Transkription:

- 4 μ l 5x cDNA Synthese-Puffer
- 1 μ l DTT (0.1 M)
- 2 μ l dNTPs (10 mM/ μ l)
- 1 μ l DEPC H₂O
- 1 μ l RNase OUT
- 1 μ l Termoscript RT
10 μ l

10 μ l des *Master Mix* wurden in die Reaktionsgefäße hinzugefügt und für eine Stunde bei 50°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Inkubation für fünf Minuten bei 85°C beendet.

3) Verdau der RNA-Vorlage:

1 μ l RNase H wurde in jedes Reaktionsgefäß hinzugegeben und bei 37°C für 20 Minuten inkubiert. Die cDNA wurde auf -20°C gelagert.

2.4.4 Quantitative *real-time* PCR

Die Quantifizierung der mRNA-Expression ausgesuchter Gene wurde mittels spezifischer Primerpaare unter Verwendung des BIO-RAD iCycler durchgeführt. Als fluoreszierender Farbstoff wurde SYBR Green benutzt. Für die relative Quantifizierung wurde das konstitutiv exprimierte Gen Elongation factor 1 alpha (*Ef1a*) als Referenzgen gewählt.

Die Amplifikationseffizienz der Primerpaare wurde mithilfe einer Standardkurve verschiedener Verdünnungen (1:10, 1:40, 1:160, 1:640, 1:2.560) durch lineare Regression ermittelt.

Jedes Loch der 96 Loch-Platte wurde wie folgt befüllt:

- 10 µl Master SYBR Green I mix (Biorad)
- 5 µl Primer Mix
- 5 µl 1:40 bzw. 1:50 verdünnter cDNA

Der Primer Mix bestand aus: 14 µl Primer reverse, 14 µl Primer forward, 972 µl ddH₂O.

Die cDNA des Lebergewebes und des Fettgewebes der *mPer1-mPer2* Mutanten wurde 1:40, die cDNA des Fettgewebes der Wildtypen 1:50 verdünnt. Jede Probe wurde als Triplikat untersucht.

Programm des iCycler:

- 94°C für 3 Minuten
- 94°C für 15 Sekunden (Denaturierung)
- 60°C für 25 Sekunden (Primer-*Annealing*)
- 72°C für 20 Sekunden (Elongation); zurück zu Schritt zwei für 50 Zyklen

Durch Erhitzen mit 0,5°C/s auf 90°C wurden die Schmelzkurvenprofile bestimmt, um die Spezifität der Primer zu überprüfen. Die optimale *Annealing*temperatur der Primer wurde vorher durch eine Gradienten-PCR getestet.

Die folgenden Primerpaare wurden verwendet:

Gene	DNA-Sequenz	Produktlänge [Bp]	GenBank ID
<i>Efla</i> rev <i>Efla</i> fw	5'-AATTCACCAACACCAGCAGCAA-3' 5'-TGCCCCAGGACACAGAGACTTCA-3'	96	NM_010106
<i>Dbp</i> RT rev <i>Dbp</i> RT fw	5'-GCTCCAGTACTTCTCATCCTTCTGT-3' 5'-AATGACCTTTGAACCTGATCCCCGCT-3'	175	NM_016974
<i>Rev-α</i> RT rev <i>Rev-α</i> RT fw	5'-CTTCTCGGAATGCATGTTGTTC-3' 5'-AGCTCAACTCCCTGGCACTTAC-3'	148	NM_145434
<i>PPAR α</i> RT rev <i>PPAR α</i> RT fw	5'-ACTGGTAGTCTGCAAAACCAAA-3' 5'-AGAGCCCCATCTGTCCTCTC-3'	153	NM_011144
<i>PPAR γ</i> RT rev <i>PPAR γ</i> RT fw	5'-TCGCACTTTGGTATTCTTGGAG-3' 5'-GGAAGACCACTCGCATTCCTT-3'	158	NM_011146
<i>Glut2</i> RT rev <i>Glut2</i> RT fw	5'-GCTGGTGTGACTGTAAGTGGG-3' 5'-TCAGAAGACAAGATCACCGGA-3'	215	NM_031197
<i>Leptin</i> RT rev <i>Leptin</i> RT fw	5'-CTGCGTGTGTGAAATGTCATTG-3' 5'-GAGACCCCTGTGTCGGTTC-3'	139	NM_008493

RT = real time, fw = forward, rev = reverse

Die Daten wurden mit dem iCycler iQ Version 3.1 Programm von BIO-RAD analysiert. Die iCycler Software berechnet automatisch die Detektionsschwellenwerte (CT-Werte). Die relative Quantifizierung wurde mittels der $\Delta\Delta\text{CT}$ Methode bestimmt (144).

2.5 Datenauswertung

Da nicht alle Daten eine Normalverteilung zeigten, erfolgte die Auswertung der Daten für einfache Vergleiche mittels nichtparametrischer Testverfahren. Zur statistischen Berechnung wurde der Mann-Whitney-U-Test angewandt. Zur Testung von Haupteffekten und Interaktion bei mehreren Variablen wurde die statistische Auswertung mittels einer 2-Way-ANOVA und Bonferroni-Posttests durchgeführt (Abschnitte 3.1 und 3.6). Alle Ergebnisse werden als Mittelwerte mit Standardfehler (SEM, *standard error of the mean*) angegeben. P-Werte ≤ 0.05 wurden als statistisch signifikant angesehen.

Die statistische Auswertung erfolgte mit GraphPad Prism-Software (GraphPad, La Jolla, CA, USA).

3. Ergebnisse

3.1 Verlust des Aktivitätsrhythmus in Doppelmutanten nach Schlafentzug

Die Aktivität der Versuchstiere wurde während der gesamten Versuchszeit mittels Infrarotmeldern registriert, um auf diese Weise Informationen über den Einfluss des Schlafentzugs auf die Aktivitätsrhythmen der Mäuse zu erhalten. Die Registrierung und Auswertung der Aktivität erfolgte in Zusammenarbeit mit Dr. Jana Husse.

Die Wildtyp-Mäuse zeigten unter LD-Bedingungen (12h Licht: 12h Dunkelheit) einen stabilen Tag-Nacht-Aktivitäts-Rhythmus mit einer Periode von 24 Stunden, der unter Schlafentzug erhalten blieb. Erwartungsgemäß kam es zu einer Zunahme der Aktivität während des Schlafentzugs (ZT0-ZT6) in der SE-Gruppe. In der zweiten Hälfte der Aktivitätsphase (ZT18-ZT24) zeigten die Tiere unter Kontrollbedingungen eine verminderte Aktivität ($p < 0,0001$ für die Variable Zeit), was bereits in anderen Studien beschrieben wurde (68). Dieser Aktivitätseinbruch war unter Schlafentzug verlängert und vertieft. Auch in der Woche nach dem Schlafentzug war dieser Effekt noch sichtbar, und das Ausgangsniveau wurde nicht wieder erreicht; das Signifikanzniveau wurde jedoch knapp verpasst (Abb. 1). Bei den *mPer1-mPer2* Doppelmutanten war der Tag-Nacht-Rhythmus unter Kontrollbedingungen ebenfalls rhythmisch ($p < 0,0001$ für die Variable Zeit), allerdings mit einer um ca. zwei Stunden nach vorne verschobenen Phase. Verglichen mit dem Aktivitätsprofil der Wildtypen zeigten die Mutanten ein verändertes Aktivitätsprofil ohne Plateau in der ersten Hälfte der Dunkelphase und mit einem nach vorne verschobenen Beginn des Aktivitätseinbruchs. Der Schlafentzug führte bei diesen Tieren zu einer Desynchronisation dieses Aktivitätsrhythmus. Die Mutanten zeigten keine klare Aktivitäts- bzw. Ruhephase mehr und waren unabhängig von den Lichtverhältnissen aktiv bzw. inaktiv. Stattdessen erfolgte eine Synchronisation des Aktivitätsrhythmus mit dem durch den Schlafentzug vorgegebenen Rhythmus. Dies war jedoch kein langfristiger Effekt, da nach Ende des Schlafentzugs die Tiere innerhalb von zwei Tagen in den ursprünglichen Rhythmus zurückkehrten (Variable Intervention für Mut Kontrolle vs. Mut SER-Gruppe $p > 0,05$) (Abb. 1).

Zur Testung der Interaktion wurde eine 2-Way-ANOVA durchgeführt, welche vor allem einen Haupteffekt für die Zeit ergab. Dennoch konnte auch eine Interaktion zwischen Zeit und Genotyp gezeigt werden, woraus man auf einen Genotyp-spezifischen Interventions-Effekt schließen kann (Vergleiche Tabelle 1). Nur in den Mutanten zeigte

sich unter Schlafentzug ein Verlust des Aktivitätsrhythmus, während in den Wildtyp-Mäusen Schlafentzug lediglich zu einer verlängerten Ruhephase in der zweiten Hälfte der Aktivitätsphase führte. Die Mutanten reagierten demnach empfindlicher als die Wildtyp-Mäuse auf den Schlafentzug, welcher für den Schlaf-Wach-Rhythmus der Mutanten offenbar einen stärkeren Aktivitätsregulator als der Licht-Dunkel-Rhythmus darstellte. Allerdings hielt dieser Effekt nach Ende der Intervention nicht an.

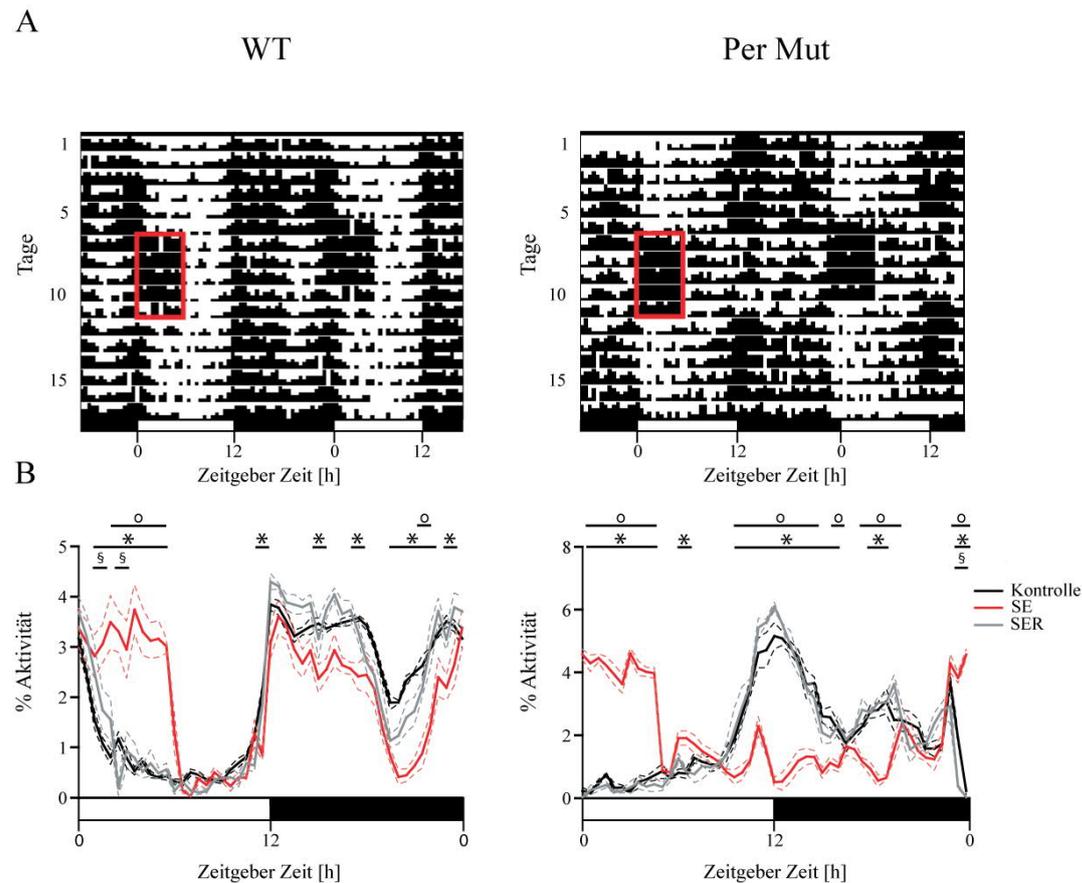


Abb. 1

A: Repräsentatives doppelgeplottetes Aktogram für Wildtypen und Mutanten vor (Kontrolle), während (SE-Gruppe) und eine Woche nach (SER-Gruppe) Schlafentzug. Jede horizontale Linie stellt zwei Tage dar. Die nebeneinander aufgetragenen, schwarzen vertikalen Linien stellen die kumulative Aktivität in 5 Minuten-Intervallen dar. Der rote Rahmen markiert die Zeit des Schlafentzugs.

B: Mittlere Aktivitätsprofile unter LD-Bedingungen (12h Licht: 12h Dunkelheit) über ein 24 Stunden-Zeitintervall. Die Aktivität ist als prozentualer Anteil der 24 Stunden-Gesamtaktivität gezeigt. Alle Werte sind als Mittelwerte \pm Standardfehler (SEM) angegeben (WT: Kontrolle: $n=16$, SE: $n=17$, SER: $n=17$, Per Mut: Kontrolle: $n=17$, SE: $n=16$, SER: $n=16$). *: $p < 0,05$ Kontroll- vs SE-Gruppe, o: $p < 0,05$ SE- vs SER-Gruppe, §: $p < 0,05$ Kontroll- vs SER-Gruppe. Statistische Auswertung mittels 2-Way-ANOVA mit Bonferroni-Posttest. Die weißen Balken stellen die Lichtphase, die dunklen Balken die Dunkelfase dar. Daten erstellt in Zusammenarbeit mit Dr. Jana Husse.

	2-Way-ANOVA Haupteffekte		
	Zeit (p)	Genotyp (p)	Interaktion(p)
Aktivität WT Kontrolle vs Per Mut Kontrolle	< 0,0001	0,9974	< 0,0001
Aktivität WT SE vs Per Mut SE	< 0,0001	0,998	< 0,0001
Aktivität WT SER vs Per Mut SER	< 0,0001	0,8944	< 0,0001
	Zeit (p)	Intervention (p)	Interaktion(p)
Aktivität WT Kontrolle vs WT SE	< 0,0001	0,9964	< 0,0001
Aktivität WT Kontrolle vs WT SER	< 0,0001	0,9951	< 0,0001
Aktivität WT SE vs WT SER	< 0,0001	1	< 0,0001
	Zeit (p)	Intervention (p)	Interaktion(p)
Aktivität Per Mut Kontrolle vs SE	< 0,0001	0,9989	< 0,0001
Aktivität Per Mut Kontrolle vs SER	< 0,0001	0,9031	0,0119
Aktivität Per Mut SE vs SER	< 0,0001	0,9028	< 0,0001

Tabelle 1: 2-Way-ANOVA zum Vergleich der Aktivität zwischen Wildtypen und Mutanten sowie innerhalb der einzelnen Gruppen.

3.2 Schlafentzug führt zu metabolischen Veränderungen in Wildtypen

Über die Steuerung des Schlaf-Wach-Rhythmus unterliegt auch das Fressverhalten indirekt einer zirkadianen Kontrolle. Sowohl die Futtermittelaufnahme als auch das Körpergewicht wurden während des Versuchs registriert, um die Auswirkungen des Schlafentzugs auf beide Parameter zu untersuchen.

Unter Kontrollbedingungen nahmen die Wildtypen und die Mutanten etwa ein Gramm pro Woche an Gewicht zu. In beiden Genotypen bewirkte Schlafentzug eine reduzierte Gewichtszunahme (Gewicht WT Kontrolle vs. Gewicht WT SE-Gruppe $p < 0,0001$, Gewicht Mut Kontrolle vs. Gewicht Mut SE-Gruppe $p < 0,0001$). Gleichzeitig war die Futtermittelaufnahme pro Woche bei den Wildtypen während des Schlafentzugs signifikant im Vergleich zur Kontrollwoche erhöht ($p = 0,0016$), während sie in der Gruppe der Mutanten auf dem Niveau der Vorwoche verblieb. Demzufolge zeigten nur die Wildtypen während des Schlafentzugs eine signifikant erhöhte Futtermittelaufnahme trotz gleicher Körpergewichtsveränderung in beiden Gruppen (Abb. 2).

In der Woche nach dem Schlafentzug nahmen die Tiere beider Genotypen wieder an Gewicht zu. Die Mutanten zeigten eine signifikant geringere Gewichtszunahme

verglichen mit der Kontrollwoche ($p=0,0004$), während die Wildtyp-Mäuse knapp signifikant mehr an Gewicht zunahmten als in der Kontrollwoche ($p=0,0452$). Obwohl eine vergleichbare Menge an Futter aufgenommen wurde, zeigten nur die Wildtyp-Mäuse in der Woche nach Schlafentzug eine erhöhte Gewichtszunahme (Abb. 2). Der Schlafentzug bewirkte demnach ausschließlich in den Wildtypen eine kompensatorische Gewichtszunahme in der Woche nach Schlafentzug. In den Mutanten waren vergleichbare Veränderungen nicht zu beobachten.

Bei genauerer Betrachtung des Fressrhythmus der Wildtypen in der Woche des Schlafentzugs zeigte sich, dass die Futteraufnahme verglichen mit der Kontrollwoche während der Lichtphase signifikant erhöht war ($p=0,0016$), während sie in der Dunkelphase unverändert blieb ($p=0,8518$). Die zusätzliche Menge an Futter wurde folglich von den Wildtyp-Mäusen während des Schlafentzugs ausschließlich in der Lichtphase aufgenommen (Abb.3 A). In der Woche nach Schlafentzug war die Futteraufnahme der Wildtypen verglichen mit der Kontrollwoche ausschließlich während der Dunkelphase signifikant erhöht ($p=0,0242$). Zusammenfassend zeigte sich, dass in der Woche des Schlafentzugs die Amplitude des Fressrhythmus der Wildtypen im Vergleich zur Kontrollwoche abgeschwächt war. 14% der gesamten Futtermenge wurden in der Kontrollwoche während der Lichtphase aufgenommen, 86% in der Dunkelphase. Während des Schlafentzugs näherte sich dieses Verhältnis auf 28% zu 72% an. Diese Abflachung des Fressrhythmus hielt jedoch in der Woche nach dem Schlafentzug nicht an. Im Gegensatz zu den Wildtypen, die unter jeder Bedingung einen ausgeprägten Fressrhythmus beibehielten, zeigten die Mutanten schon unter Kontrollbedingungen keine diurnale Varianz im Fressverhalten. Der Schlafentzug blieb ebenfalls ohne Auswirkungen (Abb.3 B), was darauf hindeutet, dass der Metabolismus der Mutanten durch Schlafentzug nicht beeinträchtigt wurde.

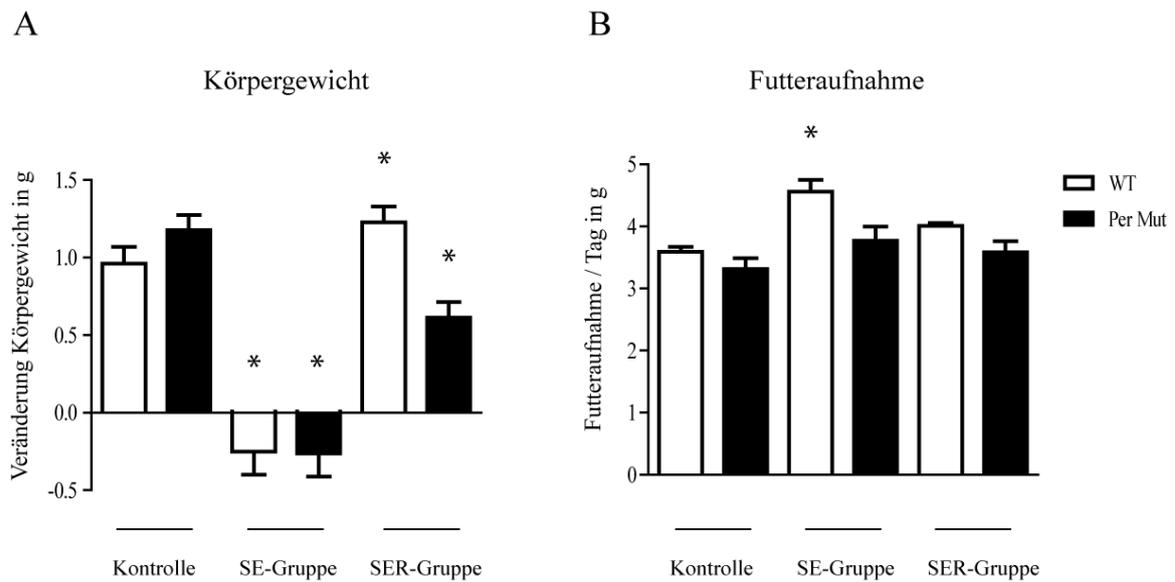


Abb. 2

A: Wöchentliche Veränderung des Körpergewichts von Wildtypen und Mutanten vor (Kontrolle), während (SE Gruppe) und nach (SER Gruppe) Schlafentzug. B: Futteraufnahme pro Tag in Gramm pro Maus aus A. Alle Werte sind als Mittelwerte \pm Standardfehler (SEM) angegeben (WT: Kontrolle: $n=16$, SE: $n=17$, SER: $n=17$, Per Mut: Kontrolle: $n=17$, SE: $n=16$, SER: $n=16$). *: $p < 0,05$ verglichen mit der Kontrollgruppe.

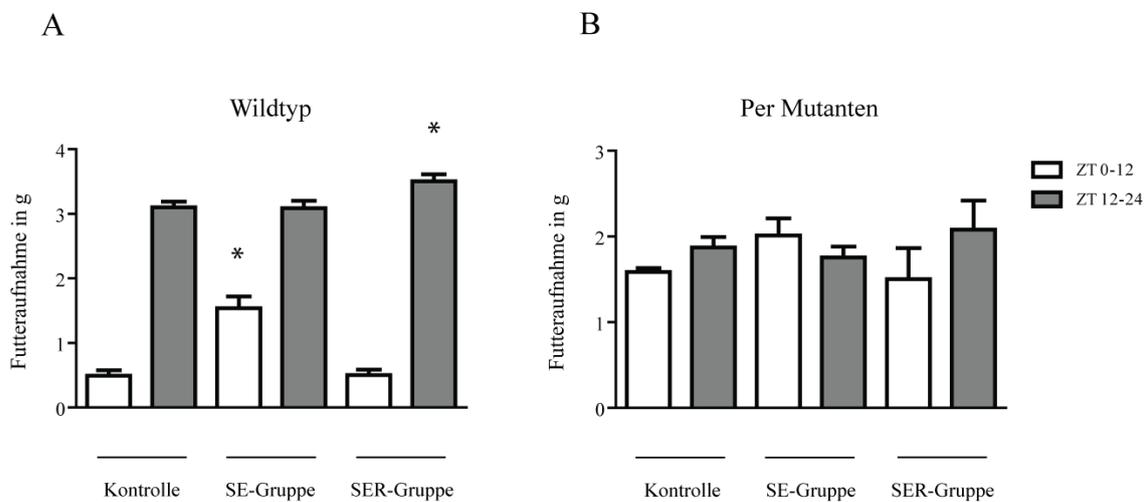


Abb. 3

Futteraufnahme gemessen während der Lichtphase (ZT 0-12) und Dunkelphase (ZT 12-24). Die Ergebnisse zeigen die durchschnittliche Futteraufnahme pro Maus während der Lichtphase und Dunkelphase eines Tages in Gramm. Alle Werte sind als Mittelwerte \pm Standardfehler (SEM) angegeben (WT: Kontrolle: $n=16$, SE: $n=17$, SER: $n=17$, Per Mut: Kontrolle: $n=17$, SE: $n=16$, SER: $n=16$). *: $p < 0,05$ verglichen mit der Kontrollgruppe.

3.3 Schlafentzug beeinflusst die Kortikosteronsekretion nur in Mutanten

Stress führt zu einer erhöhten Kortikosteronausschüttung (132). Um zu testen, inwieweit die Methode des Schlafentzugs eine Stress-Situation für die Mäuse darstellt, wurde der Kortikosterongehalt im Plasma an vier Zeitpunkten über den Tag hinweg mittels Radioimmunoassay (RIA) im Duplikat bestimmt.

Die Wildtyp-Kohorte zeigte unter Kontrollbedingungen einen Kortikosteronrhythmus mit einem Maximum bei ZT 12, entsprechend den publizierten Werten (206). Durch den Schlafentzug kam es zu einer leichten, jedoch nicht signifikanten Erhöhung des Basalniveaus. Die Phasenlage der Kortikosteronsekretion wurde durch partiellen Schlafentzug dagegen nicht beeinträchtigt (Abb. 4). Dieses Ergebnis zeigt, dass durch den Schlafentzug keine akute Stresssituation hervorgerufen wurde und die im Versuch verwendete *Gentle handling*- Methode ein geeignetes Verfahren des stressfreien Schlafentzugs ist.

Die Kortikosteronwerte der *mPer1-mPer2* Doppelmutanten zeigten vor und nach Schlafentzug keine rhythmische Sekretion und waren im Vergleich mit den Wildtypen konstant niedrig. Der Schlafentzug bewirkte eine schwach signifikante Erhöhung der Konzentration zu ZT 6 verglichen mit der Kontrollwoche (ZT 6 Mut Kontrolle vs. ZT 6 Mut SE-Gruppe $p=0,0421$), während die Kortikosteronsekretion zu allen anderen Zeitpunkten unbeeinflusst blieb (Abb. 4). Während des Versuchs fiel auf, dass die Mutanten mehr Eingriffe durch den Experimentator für die konsequente Durchsetzung des Schlafentzugs benötigten als die Wildtypen. Um dies zu quantifizieren, wurde die Anzahl der Eingriffe während der ersten und letzten Stunde registriert. Die Aufzeichnungen belegen, dass an beiden Zeitpunkten jeweils mehr Eingriffe nötig waren, um die Mutanten wach zu halten, als für die Wildtypen. Besonders deutlich wurde dies während der letzten Stunde des Schlafentzugs (6.Stunde Schlafentzug WT vs. 6.Stunde Schlafentzug Mut $p=0,0003$) (Abb. 5). Die Mutanten zeigten demnach ein erhöhtes Schlafbedürfnis während des Schlafentzugs. Die in der letzten Stunde des Schlafentzugs stark erhöhte Anzahl der benötigten Eingriffe könnte zudem zur ausschließlich an ZT 6 (= Ende des Schlafentzugs) gesteigerten Kortikosteronsekretion in den Mutanten beigetragen haben.

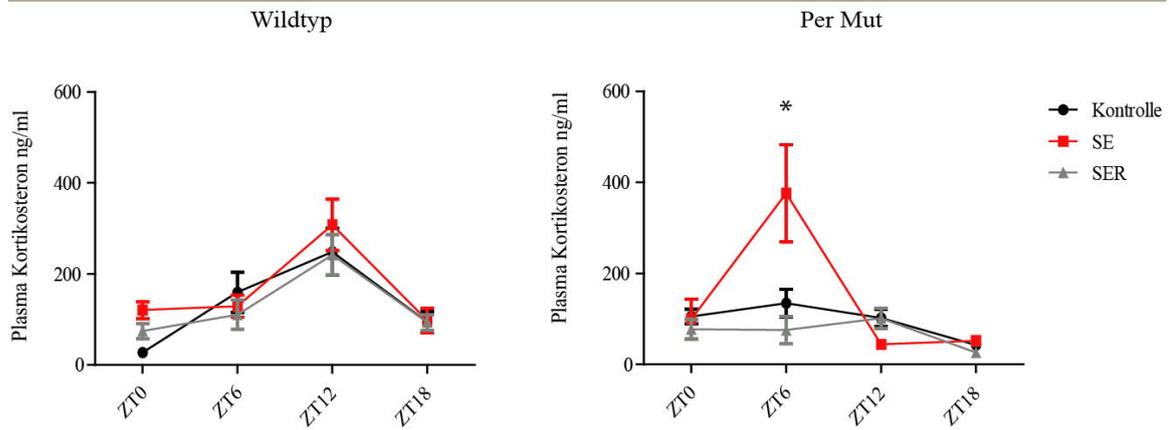


Abb. 4
Plasma-Kortikosteron-Profil von Wildtypen und Mutanten vor (Kontrolle), während (SE Gruppe) und nach (SER Gruppe) Schlafentzug. Alle Werte sind als Mittelwerte \pm Standardfehler (SEM) angegeben (WT: Kontrolle: $n=16$, SE: $n=17$, SER: $n=17$, Per Mut: Kontrolle: $n=17$, SE: $n=16$, SER: $n=16$). *: $p < 0,05$ verglichen mit der Kontrollgruppe.

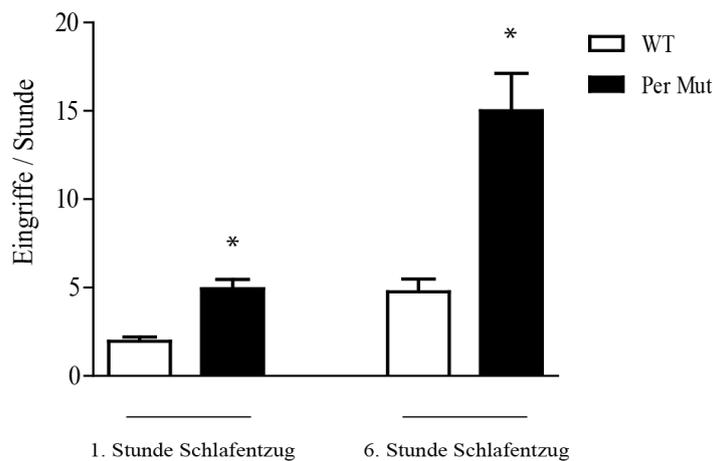


Abb. 5
Anzahl der für den Schlafentzug von Wildtypen und Mutanten benötigten Eingriffe während der ersten und letzten Stunde des Schlafentzugs. Alle Werte sind als Mittelwerte \pm Standardfehler (SEM) angegeben (WT $n=50$, Per Mut $n=49$). *: $p < 0,05$ verglichen mit den Wildtypen.

3.4 Erhöhte Leptinwerte in Wildtyp-Mäusen nach Schlafentzug

Das Hormon Leptin übernimmt vielfältige Aufgaben im Fettstoffwechsel. Es wird hauptsächlich in Adipozyten synthetisiert (72) und vermittelt unter anderem

Sättigungsgefühle. Um den Einfluss von Schlafentzug auf die Leptinsekretion zu untersuchen, wurde Leptin im Plasma zu zwei Zeitpunkten bestimmt.

Die Werte zu ZT 6, als ein Tagwert, und ZT 18, als ein Nachtwert, wurden separat betrachtet, um den Vergleich der Daten zu vereinfachen (Abb. 6). Die Wildtyp-Mäuse hatten in der Kontrollwoche nahezu konstante Leptinspiegel. Durch den Schlafentzug war insbesondere der Nachtwert (ZT 18) signifikant gestiegen (ZT 18 WT Kontrolle vs. ZT 18 WT SE-Gruppe $p=0,0159$) und blieb in der Woche nach dem Schlafentzug signifikant erhöht (ZT 18 WT Kontrolle vs. ZT 18 WT SER-Gruppe $p=0,0159$). Auch der Tagwert (ZT 6) zeigte in der Woche nach dem Schlafentzug eine Tendenz zu erhöhten Leptinspiegeln, verfehlte jedoch knapp das Signifikanzniveau ($p=0,0546$) (Abb. 6).

Die Mutanten hatten schon in der Kontrollwoche deutlich höhere Leptinspiegel verglichen mit den Wildtypen, trotz ähnlichen Fressverhaltens. Ein Anstieg des Leptins während und nach Schlafentzug wie in den Wildtypen wurde bei den Mutanten nicht gesehen (Abb. 6). Wie schon bei der Futteraufnahme und der Gewichtsentwicklung kam es durch Schlafentzug nur zu Veränderungen der Leptinsekretion in Wildtypen, die nicht in den Mutanten gesehen wurden.

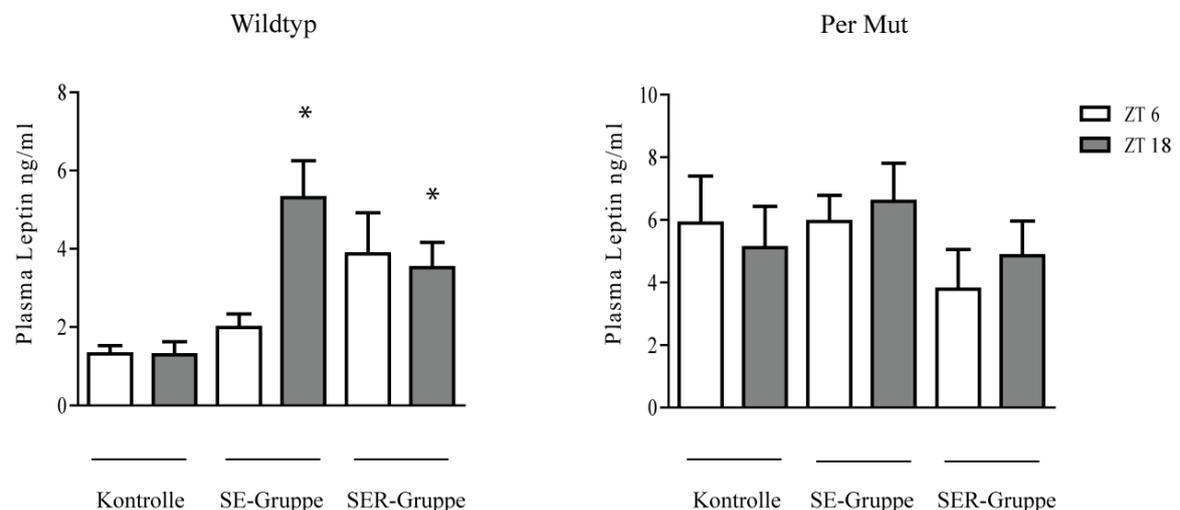


Abb. 6

Plasma-Leptinspiegel gemessen an ZT 6 (Mittag) und ZT 18 (Mitternacht) von Wildtypen und Mutanten vor (Kontrolle), während (SE Gruppe) und nach (SER Gruppe) Schlafentzug. Alle Werte sind als Mittelwerte \pm Standardfehler (SEM) angegeben. Alle Werte sind als Mittelwerte \pm Standardfehler (SEM) angegeben (WT: Kontrolle: $n=16$, SE: $n=17$, SER: $n=17$, Per Mut: Kontrolle: $n=17$, SE: $n=16$, SER: $n=16$). *: $p < 0,05$ verglichen mit der Kontrollgruppe.

3.5 Ghrelin-Sekretion

Das Hormon Ghrelin nimmt in der Regulation des Stoffwechsels die Rolle des Gegenspielers von Leptin ein. Ghrelin wird vorwiegend aus der Mukosa des Magens sezerniert (46,103). Es löst unter anderem Hungergefühle aus und bewirkt die Freisetzung des Wachstumshormons. Es wurde daher untersucht, in welchem Umfang die Sekretion von Ghrelin durch Schlafentzug beeinflusst wird.

Unter Kontrollbedingungen wurde Ghrelin auf einem konstanten Niveau ohne zirkadianen Rhythmus sezerniert. In der Woche des Schlafentzugs zeigte sich eine erhöhte Ghrelinsekretion insbesondere an ZT 12 und ZT 18. Dagegen kam es in der Woche nach dem Schlafentzug zu einem Anstieg der Sekretion an ZT 0 und ZT 12 (Abb. 7). Die Veränderungen der Ghrelinsekretion während und nach Schlafentzug waren jedoch, verglichen mit den entsprechenden Werten in der Kontrollwoche, nicht signifikant. Während in der Literatur ein deutlich zirkadianes Sekretionsprofil von Ghrelin beschrieben wurde (21), konnte dies in der vorliegenden Arbeit nicht beobachtet werden. Aus diesem Grund wurde Ghrelin nur in den Wildtypen bestimmt und auf die Bestimmung der Ghrelinspiegel in den Mutanten sowie auf weiterführende statistische Auswertungen verzichtet.

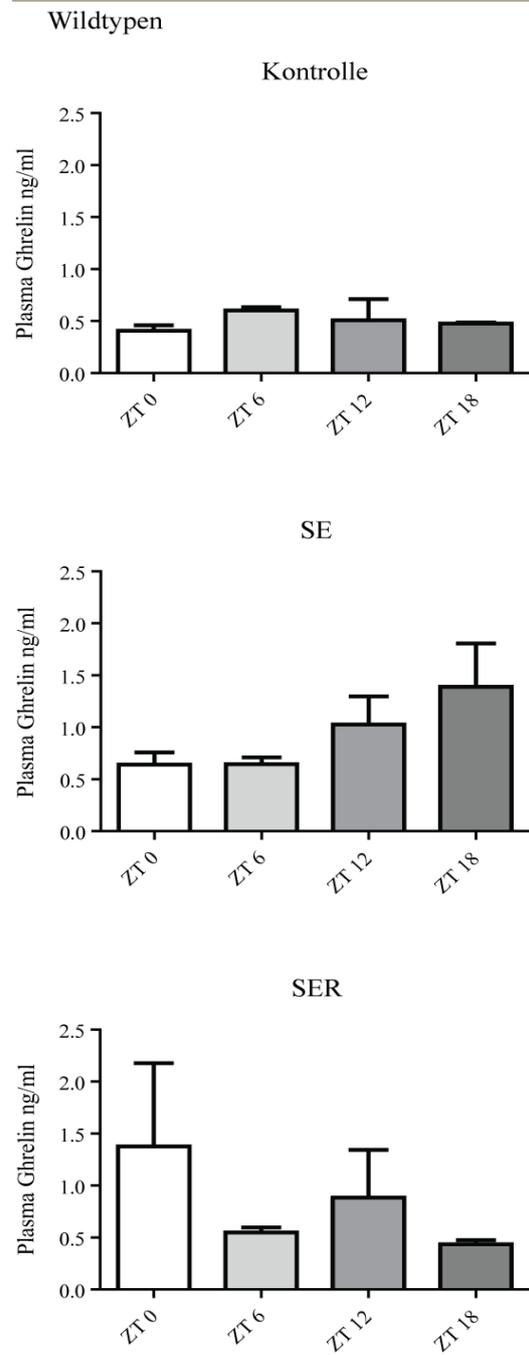


Abb. 7
Plasma-Ghrelin Spiegel von Wildtypen gemessen vor (Kontrolle), während (SE Gruppe) und nach (SER Gruppe) Schlafentzug. Alle Werte sind als Mittelwerte \pm Standardfehler (SEM) angegeben (Kontrolle: $n=16$, SE: $n=17$, SER: $n=17$). Die Auswertung mittels Mann-Whitney-U-Test ergab keine statistisch signifikanten Effekte.

3.6. Genexpressions-Rhythmen nach Schlafentzug in Wildtyp-Mäusen und Doppelmutanten

3.6.1 Lebergewebe

Die Expressionen zweier in verschiedene Stoffwechselfvorgänge involvierte Gene (*Glut2* und *Ppar α*), sowie zweier Uhren-Gene (*Dbp* und *Rev-erb α*) im Lebergewebe wurden mittels quantitativer *Real-time*-PCR analysiert, um die Auswirkungen von Schlafentzug auf molekulare Rhythmen zu untersuchen.

Dbp und *Rev-erb α* wurden unter Kontrollbedingungen im Lebergewebe der Wildtypen rhythmisch exprimiert mit Maximalwerten, die mit denen in der Literatur übereinstimmen (102,107) (Abb. 8 A). Der Schlafentzug führte zum Teil zu Veränderungen in den Amplituden dieser Rhythmen, während die Phase zumeist unverändert blieb. Signifikante Unterschiede ergaben sich in der Genexpression von *Rev-erb α* an ZT6. Weiterhin ergaben sich Interaktionen für die Faktoren Zeit und Intervention (WT Kontrolle vs. WT SER-Gruppe $p < 0,001$ und WT SE-Gruppe vs. SER-Gruppe $p < 0,001$). Die Expression des Glukosetransporters *Glut2* zeigte in der Kontrollwoche eine deutliche zirkadiane Rhythmik mit einem Maximalwert bei ZT 12. Interessanterweise kam es durch Schlafentzug zu einem Verlust der rhythmischen Expression von *Glut2* (ZT12 WT Kontrolle vs. ZT 12 WT SE-Gruppe $p < 0,05$). Auch in der Woche nach Schlafentzug blieb die *Glut2*-Expression arrhythmisch (ZT12 WT Kontrolle vs. WT SER-Gruppe $p < 0,001$). Peroxisom-Proliferator-aktivierter Rezeptor α (*Ppar α*) gehört zur Superfamilie der nukleären Rezeptoren und reguliert die Expression von Genen, die mit dem Lipidstoffwechsel assoziiert sind (136). *Ppar α* zeigte in der Kontrollwoche einen schwachen zirkadianen Rhythmus. Der Maximalwert der Expression lag bei ZT 12, in Übereinstimmung mit den in der Literatur angegebenen Maximalwerten (102). Während dieser Rhythmus in der Woche des Schlafentzugs prinzipiell erhalten blieb, erschien er jedoch nach dem Schlafentzug stark gedämpft (ZT12 WT Kontrolle vs. WT SER-Gruppe $p < 0,05$) (Abb. 8 A).

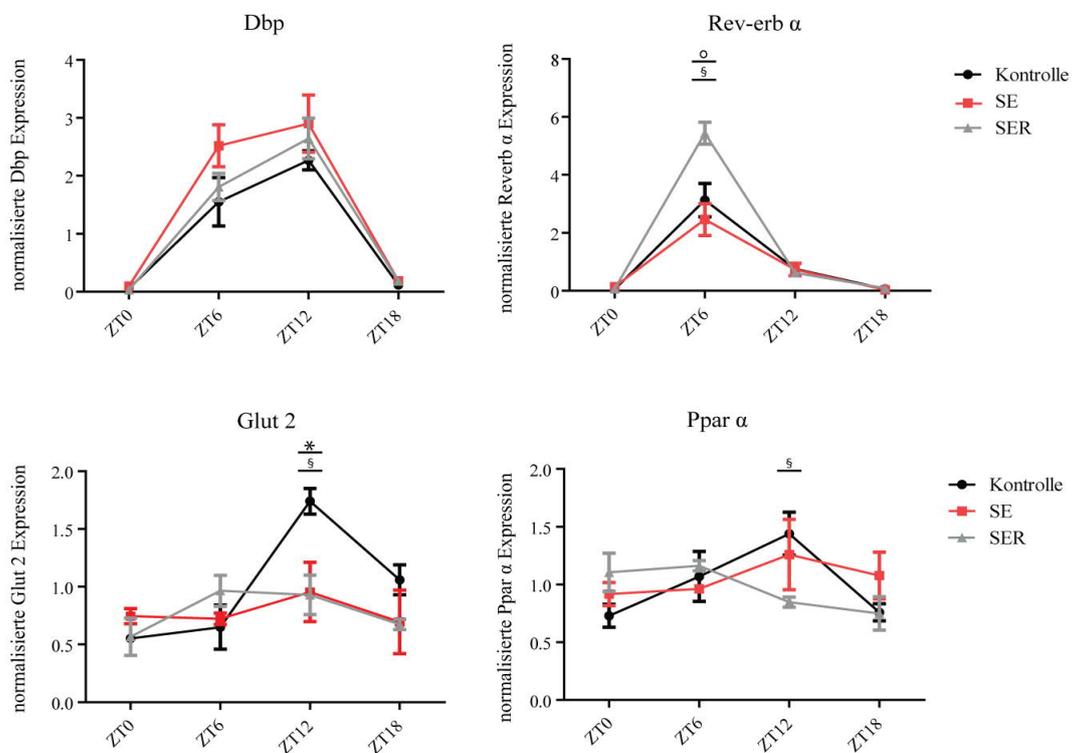
In den Mutanten zeigte die Expression von *Dbp* und *Rev-erb α* in der Kontrollwoche keinen Rhythmus. Durch Schlafentzug wurde allerdings ein Rhythmus in der Expression beider Gene induziert mit Maximalwerten bei ZT 18; die Hochregulation bei ZT18 verfehlte jedoch verglichen mit der Kontrollgruppe knapp das Signifikanzniveau. *Glut2* wurde unter Kontrollbedingungen mit einem Rhythmus exprimiert, der unter Schlafentzug eine Tendenz zur Umkehr der Phase zeigte. Die *Ppar α* Expression in den

Mutanten zeigte unter Kontrollbedingungen – vergleichbar zu den Wildtypen - einen schwachen Rhythmus (Abb. 8 B). Während und nach Schlafentzug wurde *Ppar α* dagegen ohne signifikanten Rhythmus mit erniedrigter Amplitude und veränderte Phase exprimiert (ZT12 Mut Kontrolle vs. SE-Gruppe $p < 0,001$ und ZT12 Mut Kontrolle vs. SER-Gruppe $p < 0,001$).

Zur Testung des Interaktionseffektes zwischen Zeit und Genotyp wurde auch hier 2-Way-ANOVAs durchgeführt (Vergleiche Tabelle 2). Insgesamt zeigten Untersuchungen der Genexpressionen von *Dbp* und *Rev-erb α* sowie für die Kontrollen von *Glut 2* Interaktionseffekte zwischen der Zeit und dem Genotyp, was auf einen unterschiedlichen Effekt von Schlafentzug auf die Wildtypen und Mutanten hindeutet. Keine signifikanten Interaktionseffekte zeigten sich bezüglich der SE- und SER-Gruppen von *Glut 2* und *Ppar α*.

Zusammenfassend führte Schlafentzug in den Wildtypen zu einer allgemeinen Dämpfung der Genexpression in der Leber. In den Mutanten dagegen führte Schlafentzug tendenziell eher zu einer Rhythmusinduktion der Expression unter teils starker Verschiebung der Phasenlage.

A) Wildtypen Leber



B) Per Mutanten Leber

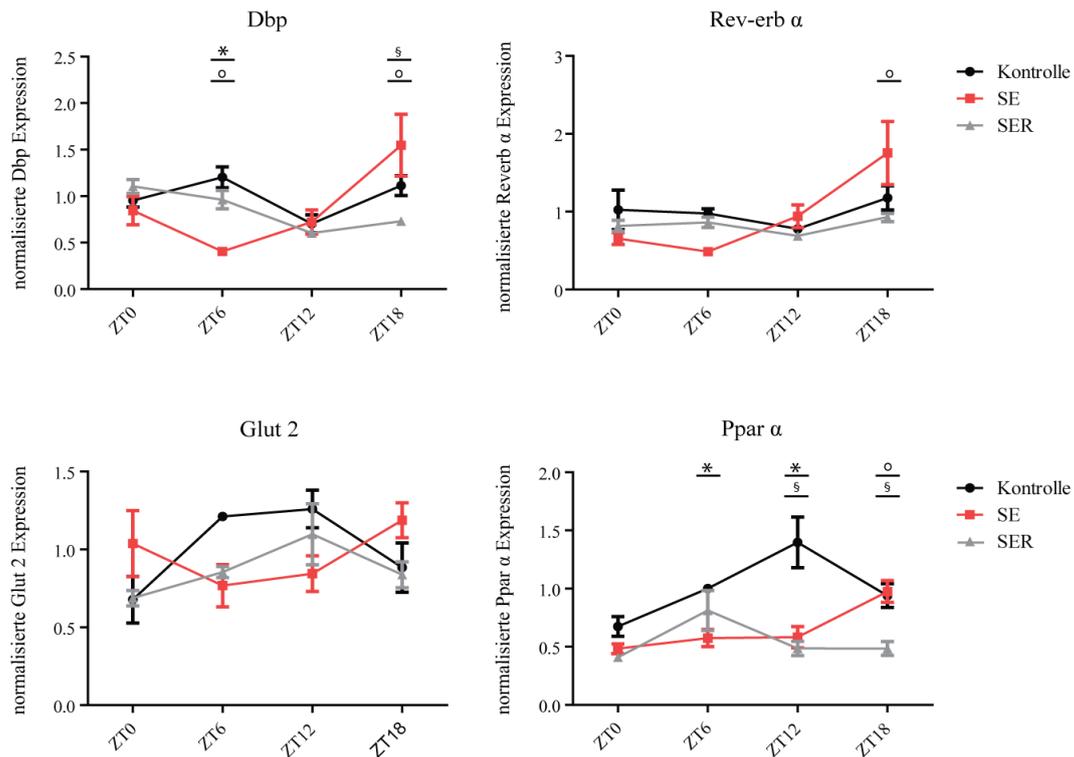


Abb. 8

Tagesprofile der Expressionen von Dbp, Rev-erb α, Glut 2 und Ppar α in Lebergewebe von Wildtypen (A) und Mutanten (B) vor (Kontrolle), während (SE Gruppe) und nach (SER Gruppe) Schlafentzug. Alle Werte sind als Mittelwerte ± Standardfehler (SEM) angegeben (WT: Kontrolle: n=16, SE: n=17, SER: n=17, Per Mut: Kontrolle: n=17, SE: n=16, SER: n=16). *: p < 0,05 Kontroll- vs SE-Gruppe, o: p < 0,05 SE- vs SER-Gruppe, §: p < 0,05 Kontroll- vs SER-Gruppe. Statistische Auswertung mittels 2-Way-ANOVA, mit Bonferroni-Posttest

Leber	2-Way-ANOVA Haupteffekte		
	Zeit (p)	Genotyp (p)	Interaktion(p)
WT vs Per Mut Dbp Kontrolle	< 0,0001	0,9573	< 0,0001
WT vs Per Mut Dbp SE	< 0,0001	0,0047	< 0,0001
WT vs Per Mut Dbp SER	< 0,0001	0,0065	< 0,0001
WT vs Per Mut Rev-erb α Kontrolle	< 0,0001	0,9433	< 0,0001
WT vs Per Mut Rev-erb α SE	0,0034	0,5321	< 0,0001
WT vs Per Mut Rev-erb α SER	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001
WT vs Per Mut Glut2 Kontrolle	< 0,0001	0,9327	0,0041
WT vs Per Mut Glut2 SE	0,7272	0,1778	0,3772
WT vs Per Mut Glut2 SER	0,0212	0,3287	0,6294
WT vs Per Mut Ppar α Kontrolle	0,0002	0,9752	0,7727
WT vs Per Mut Ppar α SE	0,1495	0,0010	0,3123
WT vs Per Mut Ppar α SER	0,0120	< 0,0001	0,2418
Leber	Zeit (p)	Intervention (p)	Interaktion(p)

WT Dbp Kontrolle vs SE	< 0,0001	0,0289	0,2389
WT Dbp Kontrolle vs SER	< 0,0001	0,2681	0,7777
WT Dbp SE vs SER	< 0,0001	0,1521	0,4888
WT Rev-erb α Kontrolle vs SE	0,4476	0,4476	0,5464
WT Rev-erb α Kontrolle vs SER	< 0,0001	0,0031	< 0,0001
WT Rev-erb α SE vs SER	< 0,0001	0,0002	< 0,0001
WT Glut2 Kontrolle vs SE	0,0021	0,0882	0,0435
WT Glut2 Kontrolle vs SER	< 0,0001	0,0260	0,0014
WT Glut2 SE vs SER	0,3297	0,9710	0,6982
WT Ppar α Kontrolle vs SE	0,0368	0,6667	0,4484
WT Ppar α Kontrolle vs SER	0,0272	0,7322	0,0150
WT Ppar α SE vs SER	0,7602	0,4460	0,1327
Leber			
	Zeit (p)	Intervention (p)	Interaktion(p)
Per Dbp Kontrolle vs SE	0,0016	0,3023	0,0038
Per Dbp Kontrolle vs SER	0,0002	0,0259	0,0264
Per Dbp SE vs SER	0,0071	0,7722	0,0005
Per Rev-erb α Kontrolle vs SE	0,0020	0,8219	0,0288
Per Rev-erb α Kontrolle vs SER	0,0883	0,0657	0,8980
Per Rev-erb α SE vs SER	0,0014	0,2556	0,0058
Per Glut2 Kontrolle vs SE	0,5133	0,6242	0,0079
Per Glut2 Kontrolle vs SER	0,0031	0,1201	0,4700
Per Glut2 SE vs SER	0,4038	0,3417	0,0649
Per Ppar α Kontrolle vs SE	0,0027	< 0,0001	0,0035
Per Ppar α Kontrolle vs SER	0,0060	< 0,0001	0,0183
Per Ppar α SE vs SER	0,0105	0,0982	0,0039

Tabelle 2: 2-Way-ANOVA zum Vergleich der Genexpressionen zwischen Wildtypen und Mutanten sowie innerhalb der einzelnen Gruppen.

3.6.2 Fettgewebe

Analog zum Lebergewebe wurden im weißen Fettgewebe Uhren-Gene (*Dbp* und *Rev-erb α*) und an Stoffwechselfvorgängen beteiligte Gene (*Leptin* und *Ppar γ*) mittels quantitativer *Real-time*-PCR untersucht.

Die Expression von *Dbp* und *Rev-erb α* zeigte in den Wildtypen unter Kontrollbedingungen einen zirkadianen Rhythmus mit Maximalwerten entsprechend der Literatur (102,206) (Abb. 9 A). Der Schlafentzug hatte lediglich Einfluss auf die Höhe

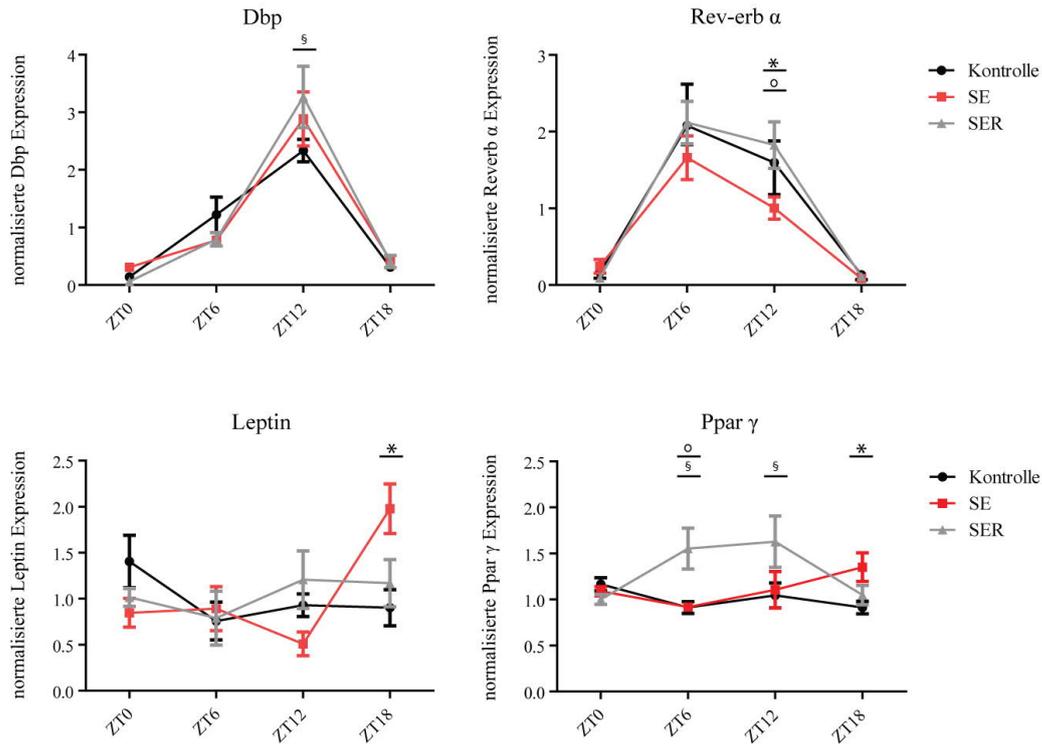
der Amplitude (ZT12 *Dbp* WT Kontrolle vs. *Dbp* WT SER-Gruppe $p < 0,05$, ZT12 *Rev-erb α* WT Kontrolle vs. *Rev-erb α* WT SER-Gruppe $p < 0,05$, ZT12 *Rev-erb α* WT SE-Gruppe vs. *Rev-erb α* WT SER-Gruppe $p < 0,05$), die Phasenlage blieb jedoch weitestgehend erhalten. Die Expression von *Leptin* zeigte in der Kontrollwoche keinen deutlichen zirkadianen Rhythmus. Während des Schlafentzugs kam es insbesondere zu einer Erhöhung der Expression zu ZT 18 (*Leptin* WT Kontrolle vs. *Leptin* WT SE-Gruppe $p < 0,05$). *Ppar γ* wurde in der Kontrollwoche in Wildtyp-Adipozyten ebenfalls ohne einen klar erkennbaren zirkadianen Rhythmus exprimiert. Unter Schlafentzug zeigte sich an ZT18 eine signifikante Induktion der Genexpression (*Ppar γ* WT Kontrolle vs. *Ppar γ* WT SE-Gruppe $p < 0,05$). Induktion von *Ppar γ* in der Woche nach Schlafentzug waren an ZT6 und ZT12 nachweisbar (ZT6 *Ppar γ* WT Kontrolle vs. *Ppar γ* WT SER-Gruppe $p < 0,05$ und ZT12 *Ppar γ* WT Kontrolle vs. *Ppar γ* WT SER-Gruppe $p < 0,05$).

In den Mutanten wurden *Dbp* und *Rev-erb α* unter Kontrollbedingungen wie erwartet nicht rhythmisch exprimiert. Der Schlafentzug blieb ohne größere Auswirkungen auf die Expression der beiden Gene. Lediglich die Genexpression von *Dbp* an ZT12 war in der SE-Gruppe knapp signifikant erniedrigt (ZT12 *Dbp* Mut Kontrolle vs. *Dbp* Mut SE-Gruppe $p < 0,05$). Auch *Leptin* wurde in der Kontrollwoche nicht rhythmisch exprimiert. Schlafentzug rief keine signifikanten Änderungen der Expression von *Leptin* hervor. Die Expression von *Ppar γ* wies unter Kontrollbedingungen ebenfalls keinen ausgeprägten zirkadianen Rhythmus auf. Durch den Schlafentzug wurde ein zirkadianer Rhythmus induziert mit einer signifikanten Erhöhung der Expression zu ZT0 (ZT0 *Ppar γ* Mut Kontrolle vs. *Ppar γ* Mut SE-Gruppe $p < 0,001$). In der Woche nach dem Schlafentzug kehrte die *Ppar γ* Expression allerdings auf das Ausgangsniveau zurück (Abb. 9 B).

Interaktionseffekte zwischen Schlafentzug und Genotyp, welche mittels einer 2-Way-Anova getestet wurden, fanden sich zwischen den SE-Gruppen von Wildtypen und Mutanten bezüglich der Genexpression von *Leptin* und *Ppar γ* (Vergleiche Tabelle 3). Bezüglich der Genexpression von *Dbp* und *Rev-erb α* zeigten sich Interaktionseffekte bei allen drei Gruppen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass in den Wildtypen die Genexpression-Rhythmen im Fettgewebe durch Schlafentzug, ähnlich wie in der Leber, primär gedämpft wurden. Im Vergleich zu den Wildtypen führte Schlafentzug in den Mutanten – auch im Vergleich zum Lebergewebe - zu eher geringfügigen Veränderungen der Genexpressionsmuster. Allenfalls für *Ppar γ* konnte eine Schlafentzug-vermittelte Rhythmus-Induktion nachgewiesen werden.

A) Wildtypen Fett



B) Per Mutanten Fett

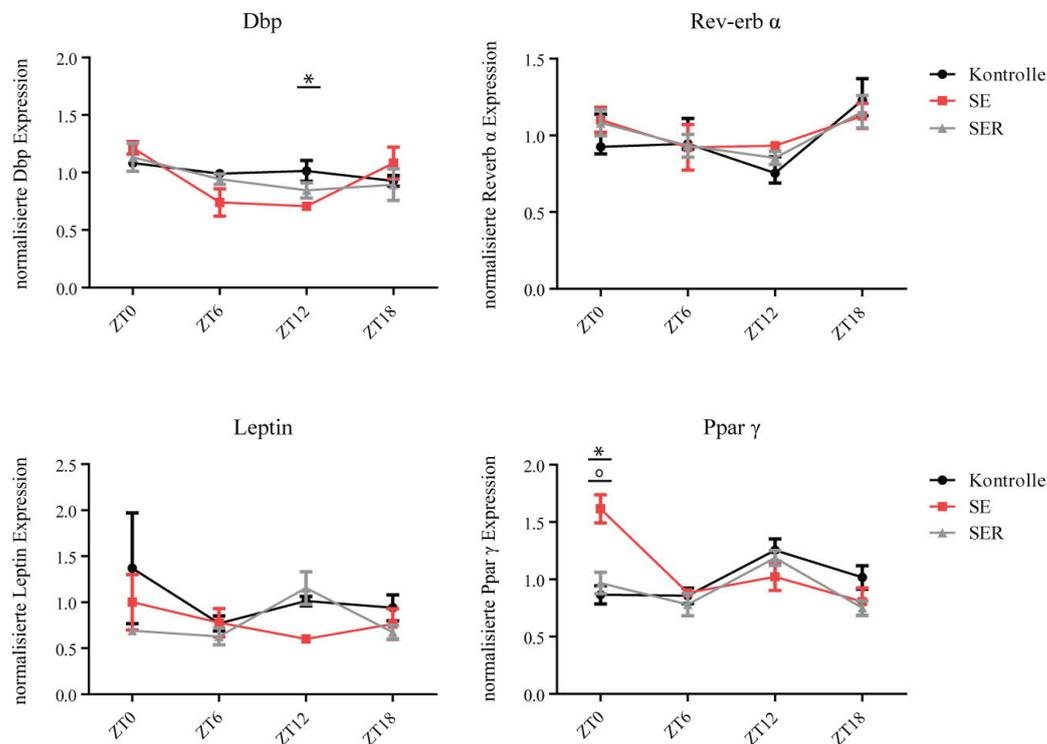


Abb. 9

Tagesprofile der Expressionen von Dbp, Rev-erb α , Leptin und Ppar γ in Lebergewebe von Wildtypen (A) und Mutanten (B) vor (Kontrolle), während (SE Gruppe) und nach (SER Gruppe) Schlafentzug. Alle Werte sind als Mittelwerte \pm Standardfehler (SEM) angegeben (WT: Kontrolle: n=16, SE: n=17, SER: n=17, Per Mut: Kontrolle: n=17, SE: n=16, SER: n=16). *: p < 0,05 Kontroll- vs SE-Gruppe, o: p < 0,05 SE- vs SER-Gruppe, §: p < 0,05 Kontroll- vs SER-Gruppe. Statistische Auswertung mittels 2-Way-ANOVA mit Bonferroni-Posttest.

	2-Way-ANOVA Haupteffekte		
Fett	Zeit (p)	Genotyp (p)	Interaktion(p)
WT vs Per Mut Dbp Kontrolle	< 0,0001	0,9777	< 0,0001
WT vs Per Mut Dbp SE	< 0,0001	0,2063	< 0,0001
WT vs Per Mut Dbp SER	< 0,0001	0,2238	< 0,0001
WT vs Per Mut Rev-erb α Kontrolle	< 0,0001	0,8196	< 0,0001
WT vs Per Mut Rev-erb α SE	< 0,0001	0,0067	< 0,0001
WT vs Per Mut Rev-erb α SER	< 0,0001	0,7730	< 0,0001
WT vs Per Mut Leptin Kontrolle	0,1341	0,8959	0,9968
WT vs Per Mut Leptin SE	0,0044	0,0731	0,0069
WT vs Per Mut Leptin SER	0,1611	0,0823	0,7064
WT vs Per Mut Ppar γ Kontrolle	0,0509	0,8782	0,0506
WT vs Per Mut Ppar γ SE	0,0105	0,6892	0,0019
WT vs Per Mut Ppar γ SER	0,0076	0,0008	0,1058
Fett	Zeit (p)	Intervention (p)	Interaktion(p)
WT Dbp Kontrolle vs SE	< 0,0001	0,5078	0,1606
WT Dbp Kontrolle vs SER	< 0,0001	0,4224	0,0463
WT Dbp SE vs SER	< 0,0001	0,8501	0,6652
WT Rev-erb α Kontrolle vs SE	< 0,0001	0,0163	0,0649
WT Rev-erb α Kontrolle vs SER	< 0,0001	0,7450	0,7313
WT Rev-erb α SE vs SER	< 0,0001	0,0279	0,0458
WT Leptin Kontrolle vs SE	0,0099	0,7050	0,0027
WT Leptin Kontrolle vs SER	0,3480	0,7819	0,4730
WT Leptin SE vs SER	0,0085	0,9468	0,0247
WT Ppar γ Kontrolle vs SE	0,2309	0,2012	0,1336
WT Ppar γ Kontrolle vs SER	0,0922	0,0077	0,0337
WT Ppar γ SE vs SER	0,2920	0,1017	0,0136
Fett	Zeit (p)	Intervention (p)	Interaktion(p)
Per Dbp Kontrolle vs SE	0,0023	0,2179	0,0059
Per Dbp Kontrolle vs SER	0,0792	0,3755	0,5897
Per Dbp SE vs SER	0,0022	0,8019	0,1812
Per Rev-erb α Kontrolle vs SE	0,0009	0,4952	0,1838
Per Rev-erb α Kontrolle vs SER	< 0,0001	0,6648	0,3719
Per Rev-erb α SE vs SER	0,0213	0,8026	0,9315
Per Leptin Kontrolle vs SE	0,3667	0,1952	0,8359
Per Leptin Kontrolle vs SER	0,3164	0,1583	0,3766
Per Leptin SE vs SER	0,5879	0,9864	0,0483
Per Ppar γ Kontrolle vs SE	0,0020	0,2460	< 0,0001

Per Ppar γ Kontrolle vs SER	0,0005	0,2162	0,2195
Per Ppar γ SE vs SER	< 0,0001	0,0249	0,0020

Tabelle 3: 2-Way-ANOVA zum Vergleich der Genexpressionen zwischen Wildtypen und Mutanten sowie innerhalb der einzelnen Gruppen.

4. Diskussion

4.1 Überblick über die Ergebnisse

Vor dem Hintergrund der weltweit steigenden Prävalenz von Übergewicht und Diabetes Mellitus bei parallel dazu abnehmender durchschnittlicher Schlafdauer pro Nacht, wurden in der vorliegenden Arbeit die Auswirkungen von Schlafentzug auf metabolische Parameter in Wildtypmäusen und Mäusen ohne funktionierende innere Uhr untersucht (*mPer1-mPer2*-Doppelmutanten). Ausgangspunkt war die Hypothese, dass die zirkadiane Uhr eine vermittelnde Rolle zwischen Schlafentzug und den daraus resultierenden metabolischen Veränderungen einnimmt. In dieser Studie konnten deutliche Unterschiede zwischen den Auswirkungen von Schlafentzug in Wildtypmäusen und Mutanten gezeigt werden. Schlafentzug führte zu einer gesteigerten Futteraufnahme, sowie zu einer kompensatorischen Gewichtszunahme in den Wildtypmäusen. Beides wurde in der Gruppe der Mutanten nicht gesehen. Schlafentzug stellte für beide Mausstämmen keine dauerhafte Stresssituation dar, jedoch zeigten die Mutanten eine akute Stressantwort auf Schlafentzug. Auf hormoneller Ebene führte Schlafentzug ausschließlich in den Wildtypen zu Veränderungen der Leptinspiegel. Analysen der Genexpression zeigten, dass der Glukose-Transporter *Glut 2* nach Schlafentzug in den Wildtypmäusen stark gedämpft exprimiert wurde, während es in den Mutanten zu einer tendenziellen Umkehr des Expressionsrhythmus kam. Zusammengefasst konnten zwischen den beiden Mausstämmen unterschiedliche Effekte von Schlafentzug auf die untersuchten metabolischen Parameter gezeigt werden, was auf eine wichtige Funktion der *Per*-Uhrengene in der metabolischen Antwort auf Schlafentzug hindeutet.

4.2 Schlafentzug, ein stärkerer Zeitgeber als der Licht-Dunkel-Rhythmus in Doppelmutanten

Der Schlaf-Wach-Rhythmus ist der wohl auffälligste zirkadiane Rhythmus. Der Zeitpunkt von Schlaf und Wachheit wird von der zirkadianen Zentraluhr im SCN reguliert. Ein wichtiger *Zeitgeber* für den SCN ist der tägliche Wechsel von Licht und Dunkelheit. Dass auch Schlafentzug als *Zeitgeber* wirken kann, konnte in einer Studie mit Hamstern, die in konstanter Dunkelheit gehalten wurden, gezeigt werden. Akuter Schlafentzug führt bei konstanter Dunkelheit zu einer Verschiebung der Phase der zirkadianen Uhr nach vorne (8).

In der vorliegenden Studie wurden die Mäuse in einem Licht-Dunkel-Rhythmus von 12:12 Stunden gehalten. In den Wildtypmäusen kam es durch Schlafentzug zu keiner Verschiebung der Phase des Schlaf-Wach-Rhythmus. Die Mäuse zeigten jedoch in der auf den Schlafentzug folgenden Dunkelphase eine Verlängerung des auch unter physiologischen Umständen auftretenden Zeitintervalls der Aktivitätsminderung. Die nach Schlafentzug verbliebenen sechs Stunden der Lichtphase, die den Mäusen zum Schlafen zur Verfügung standen, reichten offenbar nicht aus, das durch Schlafentzug hervorgerufene Schlafdefizit auszugleichen. Anstatt mit einer Verlängerung der Ruhephase und einem späteren Einsetzen der Aktivität zu reagieren, wurden die Mäuse zum gewohnten Zeitpunkt, mit dem Ausschalten des Lichtes, aktiv. Das verbliebene Schlafdefizit wurde durch eine verlängerte Ruhephase in der zweiten Hälfte der Dunkelphase kompensiert. Zwar bewirkt Schlafentzug demnach in den Wildtypen eine Veränderung des Schlaf-Wach-Rhythmus, dennoch bleibt das Aktivitätsverhalten der Wildtypmäuse an die Licht-Dunkel-Verhältnisse gekoppelt.

Schlafentzug bewirkte in den *mPer1-mPer2*-Doppelmutanten dagegen eine Desynchronisation zwischen dem Aktivitätsrhythmus und dem Licht-Dunkel-Zyklus. Der Hauptanteil der Aktivität lag nun am Morgen (ZT 0-6), der Zeit des Schlafentzugs. Außerhalb dieser Zeit waren die Mäuse unabhängig von den Lichtverhältnissen inaktiv. Daraus lässt sich schließen, dass Schlafentzug in den Mutanten scheinbar ein stärkerer Aktivitätsregulator als der Licht-Dunkel-Rhythmus war. Da diese Tiere aber nicht über ein funktionelles Uhrwerk verfügen, kann streng genommen nicht von einem echten *Zeitgeber* gesprochen werden. Bei Vorhandensein einer funktionellen zirkadianen Uhr bleibt der Licht-Dunkel-Rhythmus der stärkere *Zeitgeber*. In konstanter Dunkelheit, bei

Wegfall des Licht-Dunkel-Rhythmus, ist Schlafentzug dann wieder in der Lage die Phase der zirkadianen Uhr zu verschieben (8).

Im Vergleich zu den Wildtypen war in den *mPer1-mPer2* Doppelmutanten zudem die Phase des Schlaf-Wach-Rhythmus unter Kontrollbedingungen nach vorne verschoben. Schon rund zwei Stunden vor Ausschalten des Lichts zeigten die Mutanten einen Anstieg der Aktivität, während die Wildtypen erst kurz vor Ausschalten des Lichtes zu ZT 12 aktiv wurden. Diese Beobachtung ist übereinstimmend mit Ergebnissen aus einer Studie von Shiromani und Kollegen aus dem Jahr 2004. Dort wurde gezeigt, dass der Maximalwert der Körperkerntemperatur von *mPer1-mPer2* Doppelmutanten und *mPer2*-Mutanten ebenfalls mehr als zwei Stunden früher auftrat als der von Wildtypmäusen und dass beide Mausstämme signifikant häufiger wach waren in den letzten Zweidritteln der Lichtphase als Wildtypmäuse. Die Beobachtung von Shiromani und Kollegen unterstützt die Annahme, dass vor allem das *mPer2*-Gen die Phase des Schlaf-Wach- sowie des Temperaturrehythmus beeinflusst (168). Die Tatsache, dass das Syndrom der frühen Schlafphase (Familial advanced sleep phase syndrome, FASPS) auf einer Mutation des *hPer2*-Gens beruht (180), unterstützt diese Hypothese.

4.3 Auswirkungen von Schlafentzug auf das Fressverhalten und die Gewichtsentwicklung

Eine Vielzahl an Studien zeigt einen Zusammenhang zwischen der Regulation von Schlaf und Stoffwechsel. Epidemiologische Daten lassen vermuten, dass chronischer partieller Schlafentzug in Menschen zu einem erhöhten Körpergewicht führt (zusammengefasst in (97)). In dieser Arbeit bewirkte Schlafentzug kurzfristig eine signifikant reduzierte Gewichtsabnahme in beiden Genotypen. Das Ergebnis scheint auf den ersten Blick im Widerspruch mit den Beobachtungen, die in Menschen gemacht wurden, zu stehen. Bei genauerer Betrachtung der Versuchsanordnungen lässt sich jedoch eine Erklärung finden. Schlafentzug bei Menschen wird normalerweise in entspannter sitzender oder liegender Position durchgeführt, so dass die Behandlung nicht zu einer Steigerung der Aktivität, verglichen mit den Kontrollpersonen, führt (173). Die Mäuse in dieser Arbeit wurden nach der *Gentle handling*-Methode schlafentzogen. Zwar ist dies die schonendste

Methode des Schlafentzugs bei Nagern, dennoch geht sie mit einer gesteigerten Aktivität und damit Energieverbrauch in dem Zeitraum des Schlafentzugs einher.

Des Weiteren müssen die Mäuse aufgrund der verlängerten Aktivitätsphase ihre Körpertemperatur über einen längeren Zeitraum hinweg aufrechterhalten. Dies geschieht durch Thermogenese im braunen Fettgewebe, ein Vorgang, der Energie verbraucht. Dass Schlafentzug zu einer gesteigerten Thermogenese führt, konnte bereits in einer früheren Studie gezeigt werden (100). Der vermehrte Energieverbrauch der Mäuse durch Steigerung der Aktivität sowie durch gesteigerte Thermogenese im Zeitraum des Schlafentzugs sind die nächstliegenden Erklärungen für reduzierte Gewichtszunahme während dieser Versuchsbedingung.

Schlafentzug führte in beiden Mausstämmen in gleicher Weise zu einer reduzierten Gewichtszunahme, obwohl das Fressverhalten stark voneinander abwich. Während die Wildtypen in der Woche des Schlafentzugs signifikant mehr Futter aufnahmen als in der Kontrollwoche, nahmen die Mutanten eine vergleichbare Menge an Futter auf, entsprechend der Kontrollwoche. Daraus lässt sich schließen, dass die Wildtypmäuse eine höhere metabolische Rate als die Mutanten während des Schlafentzugs aufwiesen. In der Kontrollwoche nahmen beide Genotypen eine vergleichbare Menge an Futter auf und zeigten eine entsprechende Gewichtszunahme, was darauf hindeutet, dass beide Mausstämme unter Kontrollbedingungen normalerweise eine ähnliche metabolische Rate aufweisen. Eine Steigerung der metabolischen Rate während des Schlafentzuges wurde auch in einer Studie mit Ratten gesehen, in der gezielt der REM-Schlaf unterdrückt wurde (100). Dass Schlafentzug in den Mutanten eine geringere Steigerung der metabolischen Rate bewirkt, lässt vermuten, dass in Mäusen ohne funktionierende zirkadiane Uhr die Signale des Schlafentzugs auf andere Art umgesetzt werden als in Wildtypen.

Eine erhöhte Nahrungsaufnahme (Hyperphagie) während des Schlafentzuges bei gleichzeitig fehlender Gewichtszunahme wurde auch in anderen Studien mit Nagetieren beobachtet (59,99-100). Studien am Menschen zeigten, dass Schlafentzug zu einem Anstieg des subjektiven Hungergefühls, sowie des Appetits der Versuchsteilnehmer führte (173). Da auch in der Woche nach Schlafentzug die Futteraufnahme der Wildtypen gesteigert war, handelt es sich scheinbar um einen längerfristigen Effekt. Aufgrund der beobachteten gesteigerten Futteraufnahme in der Woche nach dem Schlafentzug ist es nicht verwunderlich, dass die Wildtypen eine signifikant stärkere Gewichtszunahme zeigten als unter Kontrollbedingungen. Diese kann als kompensatorische

Gewichtszunahme nach vorangegangenem Gewichtsverlust gewertet werden. Dadurch wird die Annahme unterstützt, dass Schlafentzug langfristig zu Übergewicht führt. Auch in Menschen zeigt sich oftmals eine kompensatorische Gewichtszunahme nach vorangegangenem Gewichtsverlust, was als Jojo-Effekt beschrieben ist. Dabei kommt es am Ende einer Reduktionsdiät zu einer gesteigerten Gewichtszunahme, wodurch schnell ein höheres Gewicht als das Ausgangsgewicht erreicht wird. Zu einer kompensatorischen Gewichtszunahme sind die Mutanten offenbar nicht in der Lage zu sein, da es in der Woche nach Schlafentzug zu einer signifikant geringeren Gewichtszunahme kam als in der Kontrollwoche. Die Effekte des Schlafentzugs scheinen in den Mutanten in der Woche nach Schlafentzug noch nachzuwirken. Das Vorhandensein der PER1- und PER2-Proteine scheint folglich eine Voraussetzung für eine kompensatorische Gewichtszunahme nach Schlafentzug zu sein. Es konnten somit auch auf Ebene des Fressverhaltens und der Gewichtsentwicklung verschiedenartige Auswirkungen von Schlafentzug in den beiden Mausstämmen gefunden werden.

Bei genauerer Betrachtung des Fressrhythmus zeigte sich, dass die Wildtypen die zusätzliche Menge an Futter während des Schlafentzuges primär in der Lichtphase aufnahmen. Schlafentzug bewirkte demnach eine Abschwächung des Tag/Nacht-Fressrhythmus der Wildtypmäuse. Verglichen mit der Kontrollwoche wird während des Schlafentzugs ein größerer Teil der gesamten Futtermenge in der Lichtphase aufgenommen und damit zu einem Zeitpunkt, an dem normalerweise nur eine geringe Futteraufnahme erfolgt. Eine Futteraufnahme von Mäusen während der Lichtphase ist vergleichbar mit nächtlichem Essen beim Menschen, wie es häufig bei Schichtarbeitern beobachtet wird. Abendliche oder nächtliche Nahrungsaufnahme scheint eher eine Gewichtszunahme zu verursachen als morgens oder nachmittags konsumierte Nahrung (9,155). In Untersuchungen bei Schichtarbeitern konnte gezeigt werden, dass Schichtarbeit deutlich mit Übergewicht assoziiert ist (50). In Übereinstimmung dazu, konnte auch in Tierstudien beobachtet werden, dass eine Futteraufnahme zu einem unphysiologischen Zeitpunkt eine gesteigerte Gewichtszunahme bewirkt. Mäuse, die nur während der Lichtphase Zugang zu Futter hatten, nahmen signifikant mehr an Gewicht zu verglichen mit Kontrolltieren, die nur während der Dunkelphase Futter aufnehmen konnten (10). Die Umverteilung der Nahrungsaufnahme von Tag zu Nacht ist eine Möglichkeit, wie chronischer Schlafentzug in Menschen zu Übergewicht führen könnte. Die Mutanten zeigten bereits unter Kontrollbedingungen keinen ausgeprägten Fressrhythmus. Die Interpretation des Fressrhythmus ist jedoch schwierig, wenn man

berücksichtigt, dass die Futtermittelaufnahme natürlich abhängig von dem Aktivitätsverhalten ist. Da die Mutanten bereits etwa zwei Stunden früher aktiv wurden als die Wildtypen, müssten die Messungen der Futtermittelaufnahme an diese Aktivitäts-Verschiebung relativ zum Licht-Dunkel-Rhythmus angepasst werden. Aussagen über das Fressverhalten sind unter diesen Umständen nicht zuverlässig zu machen. Es wird jedoch sehr deutlich, dass Schlafentzug zu keinen signifikanten Änderungen des Fressrhythmus führte, obwohl sich das Aktivitätsverhalten der Mutanten unter Schlafentzug drastisch veränderte.

Schlussfolgernd zeigen sich beträchtliche Unterschiede in der Auswirkung von Schlafentzug auf das Fressverhalten und die Gewichtsentwicklung zwischen den beiden Genotypen, wodurch die Hypothese gestärkt wird, dass die innere Uhr daran beteiligt ist, die Signale des Schlafentzugs auf die metabolische Ebene zu vermitteln.

4.4 Hormonelle Veränderungen durch Schlafentzug

Kortikosteron übernimmt sehr vielseitige Aufgaben im Stoffwechsel, unter anderem wird es in Stresssituationen ausgeschüttet (132). Um ausschließen zu können, dass die beobachteten Veränderungen nach Schlafentzug auf Schwankungen des Kortikosteronspiegels zurückzuführen sind, wurde Kortikosteron im Plasma bestimmt. In den Wildtypen bewirkte Schlafentzug eine leichte, jedoch nicht signifikante Erhöhung des Grund-Niveaus. Daraus kann geschlossen werden, dass durch Schlafentzug weder eine akute noch eine chronische Stresssituation hervorgerufen wurde. Die während und nach Schlafentzug auf verschiedenen Ebenen gesehenen Veränderungen lassen sich folglich nicht durch Änderungen des Kortikosteronspiegels erklären und können demnach nur durch von Kortikosteron unabhängige Effekte des Schlafentzugs bedingt sein. Das Ergebnis zeigt weiterhin, dass die von uns durchgeführte *Gentle handling*-Methode ein geeignetes Verfahren des stressfreien Schlafentzugs ist.

In den Mutanten führte Schlafentzug lediglich zu einer schwach signifikanten Erhöhung des Kortikosteronwertes an ZT 6. An allen anderen Zeitpunkten war der Kortikosteronspiegel vergleichbar mit den Kortikosteronwerten in der Kontrollwoche. Somit stellte Schlafentzug für die Mutanten nur an ZT 6 eine akute Stresssituation dar. Dass der Anstieg der Kortikosteronkonzentration an ZT 6 keinen Einfluss auf die gesehenen Veränderungen nach Schlafentzug hatte, ist nicht auszuschließen. Jedoch

erscheint es unwahrscheinlich, dass Kortikosteron die beobachteten Effekte bedingt, da es lediglich an einem einzelnen Zeitpunkt zu einer Erhöhung des Kortikosteronspiegels kam, was sich zudem als kurzfristiger Effekt darstellte.

Sowohl in der ersten als auch in der letzten Stunde des Schlafentzugs waren für die konsequente Durchsetzung des Schlafentzugs mehr Eingriffe nötig, um die Mutanten wach zu halten, als für die Wildtypen. Die in der letzten Stunde des Schlafentzugs besonders stark erhöhte Anzahl der erforderlichen Eingriffe könnte eine Erklärung für die gesteigerte Kortikosteronausschüttung an ZT 6 sein. Dass die Mutanten schwieriger wach zu halten waren, ist nicht überraschend. In einer Studie mit *Bmal1*-Mutanten wurde ebenfalls beobachtet, dass *Bmal1*-Mutanten für einen konsequenten Schlafentzug mehr Eingriffe benötigten als die entsprechenden Wildtypen, woraus geschlossen wurde, dass die Mutanten chronisch unter einem erhöhten Schlafdruck leiden (112). In einer weiteren Arbeit, in der die Deltaaktivität mittels EEG registriert wurde, konnte gezeigt werden, dass *mPer1-mPer2*-Doppelmutanten empfindlicher auf Schlafentzug reagieren. Zwar wurde dies von den Autoren nicht erwähnt, jedoch ist anhand der veröffentlichten Daten zu sehen, dass *mPer1-mPer2*-Doppelmutanten im Anschluss an einen sechsstündigen Schlafentzug eine deutlich länger anhaltende Erhöhung der Deltaaktivität im EEG zeigten als die Wildtypen. Das Ergebnis deutet daraufhin, dass die Mutanten einen höheren Schlafdruck aufbauen als die Wildtypen (168).

Neben Kortikosteron wurden auch die Auswirkungen von Schlafentzug auf die Leptinkonzentration im Plasma untersucht. Durch den Schlafentzug kam es in den Wildtypmäusen zu einer signifikanten Erhöhung des Tagwertes, welche auch in der Woche nach Schlafentzug anhielt. Nach Schlafentzug zeigte der Nachtwert ebenfalls eine tendenzielle Erhöhung. Leptin vermittelt Sättigungsgefühle und erhöht den Energieumsatz (96). Erhöhte Leptinspiegel müssten demnach zu einem stärkeren Sättigungsgefühl führen und eine verminderte Aufnahme von Nahrung bedingen. Die in dieser Arbeit beobachtete erhöhte Plasmakonzentration von Leptin während und nach Schlafentzug ging in den Wildtypen jedoch mit einer gesteigerten Futteraufnahme einher. Daraus lässt sich schließen, dass Leptin in den Wildtypen unter Schlafentzug den Appetit nicht in wirksamer Weise supprimieren kann. Eine vergleichbare Stoffwechsellage besteht in vielen übergewichtigen Menschen, in denen zwar erhöhte Leptinspiegel vorliegen, Leptin jedoch seine appetitdämpfende Wirkung scheinbar nicht entfalten kann, da es nicht zu einer reduzierten Nahrungsaufnahme kommt (133). Diese Situation der Leptinresistenz ist Zeichen einer gestörten Energiehomöostase und ein Risikofaktor für

die Entwicklung von Übergewicht (130). Dass in den Wildtypmäusen ebenfalls eine Leptinresistenz vorgelegen haben könnte, lässt möglich erscheinen, dass Schlafentzug unter anderem über die Entstehung einer Leptinresistenz zu Übergewicht führen könnte. In einigen Studien wurden nach Schlafentzug, abweichend von den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit, erniedrigte Leptinspiegel beobachtet (60,100). Hier wurden jedoch die Auswirkungen von totalem Schlafentzug in Ratten untersucht, während in der vorliegenden Arbeit die Effekte von partiellem Schlafentzug in Mäusen analysiert wurden. Des Weiteren wurden Methoden des Schlafentzugs angewandt, die weitaus stressvoller sind als die *Gentle-handling*-Methode, so dass sich die unterschiedlichen Ergebnisse möglicherweise auf die unterschiedlichen Studiendesigns zurückführen lassen.

In den Mutanten lagen bereits unter Kontrollbedingungen höhere Leptinspiegel als in den Wildtypen vor, was bereits in anderen Studien beschrieben wurde (71). Während und nach Schlafentzug kam es zu keinen signifikant veränderten Leptinkonzentrationen. Unter Umständen sind die Leptinkonzentrationen in den Mutanten im Vergleich zu denen in den Wildtypen während der Kontrollbedingungen schon so stark erhöht, dass keine weitere Steigerung des Leptinspiegels durch Schlafentzug möglich ist. Da in der Kontrollwoche beide Genotypen eine vergleichbare Menge an Futter aufnahmen, die Mutanten jedoch dreimal so hohe Leptinwerte aufwiesen wie die Wildtypen, ließe sich schlussfolgern, dass Leptin den Appetit in den Mutanten nicht ausreichend dämpft. Die Mutanten weisen demnach bereits unter Kontrollbedingungen eine Stoffwechsellage auf, wie man sie bei Bestehen einer Leptinresistenz erwartet. Das Vorliegen von funktionierenden *Per1*- und *Per2*-Genen könnte sowohl eine Voraussetzung für die durch Schlafentzug induzierte Erhöhung des Leptinspiegels als auch für die Wirksamkeit von Leptin sein.

Ghrelin stellt in der Regulation des Körpergewichts einen Gegenspieler von Leptin dar, indem es Appetit stimuliert (198). Wie bereits im Ergebnissteil beschrieben, ergab die Analyse der Sekretion von Ghrelin von den publizierten Daten deutlich abweichende Ergebnisse. Aus diesem Grund wurde Ghrelin nur in den Wildtypen bestimmt. Mögliche Fehlerquellen sind darin zu sehen, dass aufgrund einer begrenzt vorhandenen Plasmamenge 1:5 verdünntes Plasma eingesetzt werden musste und dies zu einer Verfälschung der Ergebnisse führte. Mittels ELISA wird das acetylierte und damit biologisch aktive Ghrelin nachgewiesen. Da das Plasma nach der Entnahme nicht angesäuert wurde, könnte dies zu einer teilweisen Degradation des acetylierten Ghrelins

geführt haben, wodurch die biologisch aktive Form nicht mehr zuverlässig bestimmt werden konnte.

Alles in allem lassen sich auch auf Hormonebene deutlich von einander abweichende Reaktionen auf Schlafentzug in den Wildtypmäusen und Mutanten beobachten, so dass geschlussfolgert werden kann, dass die zirkadiane Uhr bzw. zumindest die PER1- und PER2-Proteine an der Übertragung der Effekte von Schlafentzug auf hormoneller Ebene beteiligt sind. Offen bleibt, über welche Mechanismen diese Effekte vermittelt werden.

4.5 Auswirkungen von Schlafentzug auf molekularer Ebene

Anhand der quantitativen *Real-time*-PCR wurden die Effekte von Schlafentzug auf molekularer Ebene näher analysiert. Da sowohl das Leber- als auch das Fettgewebe an der Regulation des Stoffwechsels sowie des Körpergewichtes beteiligt sind, wurde die Transkription ausgesuchter Gene in diesen Geweben untersucht.

Im Lebergewebe der Wildtypen wurden die Uhren- bzw. Uhrenkontrollierten Gene *Dbp* und *Rev-erb α* rhythmisch exprimiert. Die ermittelten Maximalwerte der Expression der beiden Gene stimmen mit denen, die in der Literatur angegeben sind, überein (102,107). Dies zeigt, dass die Methode der quantitativen *Realtime*-PCR beherrscht wurde. Der Schlafentzug führte primär zu Amplitudenänderungen in der Expression von *Dbp* und *Rev-erb α* in den Wildtypen, während die Phasenlage unberührt blieb. Die zirkadiane Uhr in der Leber scheint demnach weitgehend unbeeinflusst durch den Schlafentzug gewesen zu sein. Jedoch wurden in der vorliegenden Arbeit nur *Dbp* und *Rev-erb α* als Uhrengene untersucht. Wie die anderen Uhrengene in der Leber auf Schlafentzug reagieren bedarf weiterer Forschung. Es ist jedoch nicht erstaunlich, dass die Expressionen von *Dbp* und *Rev-erb α* keine signifikanten Veränderungen der Phase unter Schlafentzug aufwiesen, bedenkt man, dass es durch Schlafentzug ebenfalls zu keiner Änderung des prinzipiellen Aktivitätsrhythmus der Wildtypen kam, was darauf hindeutet, dass auch die zirkadiane Zentraluhr im SCN vom Schlafentzug unbeeinträchtigt blieb. Deutliche Auswirkungen hatte Schlafentzug jedoch auf die *Glut2*-Expression im Lebergewebe der Wildtypmäuse. Unter Kontrollbedingungen lag der Maximalwert der Expression bei ZT 12. Die Aufgabe des Glukosetransporters 2, für den das *Glut2*-Gen (*Slc2a2*) kodiert, ist der Transport von Glukose aus den Hepatozyten in den Blutkreislauf bei einem niedrigen

zirkulierenden Plasmaglukosespiegel (111). Da ZT 12 am Ende der Ruhephase liegt, zu einem Zeitpunkt, an dem die Mäuse längere Zeit keine bzw. nur wenig Futter aufgenommen hatten, erscheint ein Maximalwert zu diesem Zeitpunkt physiologisch sinnvoll. Durch Schlafentzug kam es interessanterweise zu einem Verlust der rhythmischen Expression von *Glut2*, der auch in der Woche nach Schlafentzug anhielt und damit einen längerfristigen Effekt darstellt. Besonders an ZT 12 war die *Glut2*-Expression auf ein erniedrigtes Niveau herunterreguliert. Eine verminderte Anzahl an Glukosetransportern bewirkt einen reduzierten Transport von Glukose aus den Hepatozyten und führt dadurch vermutlich zu einer erschwerten Sicherstellung eines adäquaten Glukosespiegels. Eine vermehrte Nahrungsaufnahme, wie in den Stunden des Schlafentzuges gesehen, könnte ein zu starkes Absinken des Blutglukosespiegels in den nachfolgenden Stunden verhindert haben und somit eine kompensatorische Maßnahme darstellen. Welche Auswirkungen eine verminderte *Glut2*-Expression tatsächlich auf den Glukosespiegel hat bzw. welche kompensatorischen Maßnahmen ergriffen werden, kann anhand der hier erfassten Daten nicht abschließend geklärt werden. Hinweise, inwiefern eine verminderte Expression von *Glut2* die Glukosehomöostase beeinträchtigt, lassen sich in einer Studie finden, in der Mäuse mit einer leberspezifischen Deletion von *Bmal1* untersucht wurden. In diesen Mäusen kommt es ebenfalls zu einem Verlust der zirkadianen Expression von *Glut2*, was zu Hypoglykämien in der Fastenphase, sowie zu einer schnelleren Normalisierung des Blutglukosespiegels nach Gabe eines Glukosebolus bei unbeeinträchtigter Insulinproduktion und -sensitivität führte (111). Eine gestörte *Glut2*-Expression hat somit dramatische Auswirkungen auf die Glukosehomöostase. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen deutlich, dass die Leber ein Zielgewebe von Schlafentzug ist und dieser den Glukosestoffwechsel der Wildtypmäuse in erheblichem Maße beeinflusst. Sollte Schlafentzug dauerhaft das Gleichgewicht der Glukosehomöostase stören, könnte dies langfristig zu Beeinträchtigungen der Gewichtsregulation führen.

In den Mutanten wurden *Dbp* und *Rev-erb a* im Lebergewebe vor und nach Schlafentzug nicht rhythmisch exprimiert. In der Woche des Schlafentzugs wurde ein Rhythmus in der Expression beider Gene mit Maximalwerten bei ZT 18 detektiert. Inwieweit die Induktion eines Rhythmus der Uhren- bzw. Uhrenkontrollierten Gene in der Leber mit der Änderung des Aktivitätsrhythmus zusammenhängt, kann an dieser Stelle nicht endgültig geklärt werden. Im Gegensatz zu der *Glut2*-Expression in Wildtypen, zeigte die *Glut2*-Expression keine signifikanten Veränderungen durch Schlafentzug, lediglich eine

Tendenz zur Umkehr des Rhythmus wurde beobachtet. An dieser Stelle zeigt sich einmal mehr, wie deutlich die Auswirkungen von Schlafentzug in den verschiedenen Genotypen voneinander abweichen. Ähnlich wie die zirkadiane Uhr im Lebergewebe wurde die zirkadiane Uhr im Fettgewebe durch den Schlafentzug spezifisch moduliert. Signifikante Veränderungen zeigten sich v.a. in Veränderungen der Amplitude.

In Übereinstimmung mit den weiter oben beschriebenen Auswirkungen von Schlafentzug auf den Leptinspiegel im Serum ergab die Analyse der Genexpression von *Leptin* in den Wildtypen einen signifikanten Anstieg der Expression an ZT18 durch Schlafentzug, wodurch sich ein Einfluss von Schlafentzug auf den Leptinhaushalt weiter bestätigte. Daneben konnte eine Induktion der Genexpression von *Ppar γ* wie an ZT6 und ZT12 in der Woche nach Schlafentzug in den Wildtypen beobachtet werden. In Reaktion auf den Schlafentzug kam es dagegen in den Mutanten zu einer signifikanten Erhöhung des ZT 0-Wertes von *Ppar γ* . Eine vermehrte Aktivität von *Ppar γ* führt zu einer erhöhten Proliferation der Adipozyten, sowie einer Steigerung der Insulinsensitivität des Fettgewebes (28,32,123). Eine Gewichtszunahme der Mutanten in der Woche des Schlafentzuges resultierte daraus aber nicht. In den Mutanten hatte Schlafentzug wie in den Wildtypen keinen deutlichen Einfluss auf die Expression von *Dbp* und *Rev-erb α* im Fettgewebe.

Beim Vergleich der PCR-Daten der beiden Genotypen zeigen sich demnach klar voneinander abweichende Ergebnisse, woraus folgt, dass Schlafentzug auch auf molekularer Ebene abhängig vom Genotyp unterschiedliche Auswirkungen hat. Diese Ergebnisse sind im Einklang mit der dieser Arbeit zugrundeliegenden Hypothese, dass die *Per1*- und *Per2*-Gene (und damit die zirkadiane Uhr) Teil des Mechanismus sind, über den Schlafentzug die Expression von metabolisch relevanten Genen in peripheren Geweben beeinflusst.

4.6 Ausblick

In der vorliegenden Arbeit wurden die Einflüsse von Schlafentzug auf verschiedene Metabolismus-assoziierte Parameter abhängig vom zirkadianen Genotyp untersucht, angefangen mit den Auswirkungen von Schlafentzug auf das Verhalten bis hin zu den Expressionsmustern einzelner Gene. Die meisten Auswertungen in dieser Arbeit

erfolgten mittels eines unifaktoriellen Tests. Die in den unifaktoriellen Tests gesehenen Effekte von Schlafentzug wurden mittels 2-Way-ANOVAs bestätigt, was in der zu dieser Arbeit gehörenden Veröffentlichung in PlosOne nachgelesen werden kann. Zusammenfassend führte Schlafentzug auf allen Ebenen zu deutlich voneinander abweichenden Ergebnissen zwischen den beiden Genotypen. Es konnten sich somit viele Hinweise finden lassen, die die zuvor aufgestellte Hypothese stärken und die Beteiligung der *Per1*- und *Per2*-Gene an der Vermittlung der metabolischen Antwort auf Schlafentzug sehr wahrscheinlich erscheinen lassen. Die Ergebnisse dieser Arbeit werfen jedoch auch eine Reihe von Fragen auf. Es ist noch nicht ausreichend geklärt, über welche Mechanismen und Signalwege Schlafentzug die metabolischen Veränderungen bewirkt. Sowohl durch Untersuchungen an Mäusen mit Mutationen anderer Uhrgene, als auch mit gewebspezifischen Deletionen der zirkadianen Uhr, könnte die Rolle der zentralen und peripheren Uhren in der wechselseitigen Beziehung von Schlaf und Metabolismus näher beleuchtet werden. In nachfolgenden Studien sollte zudem Schlafentzug länger als fünf Tage durchgeführt werden, um zu prüfen, ob länger andauernder Schlafentzug eventuell zu noch deutlicheren Effekten führt, z.B. im Fettgewebe oder in der Glukosehomöostase.

Natürlich sind Ergebnisse, die in Nagetieren gewonnen wurden, oft nur begrenzt auf den Menschen zu übertragen. Zum einen könnte diese Tatsache in Bezug auf Schlafentzug an den verschiedenen Versuchsprotokollen liegen (siehe Abschnitt 4.3), zum anderen möglicherweise an der unterschiedlichen Ausstattung mit braunem Fettgewebe. Braunes Fettgewebe ist in Nagetieren am Energiestoffwechsel beteiligt, liegt jedoch in ausgewachsenen Menschen nur in geringer Menge vor (98) und hat somit in Menschen keinen wesentlichen Anteil am Energiestoffwechsel. Es bedarf folglich einer anschließenden Validierung der in Nagetieren gewonnenen Ergebnisse in Menschen. Die Untersuchungen der Zusammenhänge zwischen der Regulation von Schlaf und des Metabolismus sowie die Rolle der zirkadianen Uhr in diesem Wechselspiel zielen darauf ab, bisher unbekannte Signalwege zwischen Schlafdauer, Gewichtszunahme und inneren Uhr aufzuzeigen. Hintergrund ist die Hoffnung, neue Therapieverfahren zu finden, die in diese Signalwege modulierend eingreifen, um auf diese Weise stoffwechselassoziierte Pathologien wie Übergewicht und Diabetes Mellitus, Erkrankungen, die voraussichtlich innerhalb der nächsten Jahrzehnte weiter an Prävalenz zunehmen werden, zu therapieren.

5. Zusammenfassung

Die weltweite Prävalenz von Übergewicht und den damit assoziierten Erkrankungen steigt seit Jahren in beunruhigendem Ausmaß. Neuere Studien belegen, dass bereits eine halbe Milliarde Menschen weltweit an Fettleibigkeit leiden. Zeitgleich zu der steigenden Prävalenz von Übergewicht veränderte sich das Schlafverhalten vieler Menschen deutlich. So kam es in den letzten Dekaden zu einer signifikanten Abnahme der durchschnittlichen Schlafdauer pro Nacht. Eine Vielzahl an Studien liegt bereits vor, die auf einen Zusammenhang zwischen der Regulation von Schlaf und Stoffwechsel hindeuten. Epidemiologische Daten lassen vermuten, dass chronischer partieller Schlafentzug in Menschen zu einem erhöhten Körpergewicht führt. Der Schlaf-Wach-Rhythmus ist der wohl deutlichste Verhaltensrhythmus des Menschen. Er wird genau wie viele Stoffwechselprozesse von der inneren oder auch zirkadianen Uhr (von lat. *circa dies* = ungefähr ein Tag) gesteuert. Die zirkadiane Uhr ist hierarchisch strukturiert. Sie besteht aus einem zentralen Schrittmacher, der seinen Sitz im *Nucleus suprachiasmaticus* (SCN) im Hypothalamus hat, und einem Netzwerk aus Uhren in peripheren Geweben und Organen. Die zirkadiane Uhr synchronisiert innere Vorgänge mit den wechselnden äußeren Anforderungen des 24-stündigen Tag-Nacht-Rhythmus. Auf molekularer Ebene besteht die zirkadiane Uhr aus so genannten Uhrengenen, zu denen auch die *Period*-Gene gehören. Die Uhrengene bilden sich gegenseitig beeinflussende transkriptionell-translationalle Rückkopplungsschleifen, wodurch sie den ~24-Stunden-Takt der zirkadianen Uhr generieren.

Ausgangspunkt der vorliegenden Arbeit war die Annahme, dass die innere Uhr an der Regulierung der metabolischen Antwort auf Schlafentzug beteiligt ist. Um die Beteiligung der zirkadianen Uhr an der Interaktion zwischen Schlafentzug und Metabolismus zu testen, wurden die Auswirkungen von partiellem Schlafentzug auf metabolische Parameter in Wildtypenmäusen und *mPer1-mPer2*-Doppelmutanten, die über keine funktionierende innere Uhr verfügen, untersucht. Anhand von Analysen des Fressverhaltens, der Gewichtsentwicklung, der Hormonsekretion, sowie molekulargenetischer Untersuchungen ließen sich deutliche Unterschiede zwischen den verschiedenen Genotypen in der metabolischen Antwort auf Schlafentzug auf allen untersuchten Ebenen finden. Die gewonnenen Daten deuten daraufhin, dass die zirkadiane Uhr in Form der *Period*-Gene an der Regulierung der metabolischen Antwort auf Schlafentzug beteiligt ist.

6. Literaturverzeichnis

1. Ahima RS, Prabakaran D, Mantzoros C, Qu D, Lowell B, et al.: Role of leptin in the neuroendocrine response to fasting. *Nature* 382, 250-252 (1996)
2. Akashi M, Takumi T: The orphan nuclear receptor RORalpha regulates circadian transcription of the mammalian core-clock Bmal1. *Nat Struct Mol Biol* 12, 441-448 (2005)
3. Akashi M, Tsuchiya Y, Yoshino T, Nishida E: Control of intracellular dynamics of mammalian period proteins by casein kinase I epsilon (CKIepsilon) and CKIdelta in cultured cells. *Mol Cell Biol* 22, 1693-1703 (2002)
4. Akhtar RA, Reddy AB, Maywood ES, Clayton JD, King VM, et al.: Circadian cycling of the mouse liver transcriptome, as revealed by cDNA microarray, is driven by the suprachiasmatic nucleus. *Curr Biol* 12, 540-550 (2002)
5. Albrecht U, Eichele G: The mammalian circadian clock. *Curr Opin Genet Dev* 13, 271-277 (2003)
6. Allada R, Emery P, Takahashi JS, Rosbash M: Stopping time: the genetics of fly and mouse circadian clocks. *Annu Rev Neurosci* 24, 1091-1119 (2001)
7. Ando H, Yanagihara H, Hayashi Y, Obi Y, Tsuruoka S, et al.: Rhythmic messenger ribonucleic acid expression of clock genes and adipocytokines in mouse visceral adipose tissue. *Endocrinology* 146, 5631-5636 (2005)
8. Antle MC, Mistlberger RE: Circadian clock resetting by sleep deprivation without exercise in the Syrian hamster. *J Neurosci* 20, 9326-9332 (2000)
9. Antunes LC, Levandovski R, Dantas G, Caumo W, Hidalgo MP: Obesity and shift work: chronobiological aspects. *Nutr Res Rev* 23, 155-168 (2010)
10. Arble DM, Bass J, Laposky AD, Vitaterna MH, Turek FW: Circadian timing of food intake contributes to weight gain. *Obesity (Silver Spring)* 17, 2100-2102 (2009)
11. Aschoff J: Circadian Rhythms in Man. *Science* 148, 1427-1432 (1965)
12. Aschoff J, Pohl H: Phase relations between a circadian rhythm and its zeitgeber within the range of entrainment. *Naturwissenschaften* 65, 80-84 (1978)
13. Aton SJ, Colwell CS, Harmar AJ, Waschek J, Herzog ED: Vasoactive intestinal polypeptide mediates circadian rhythmicity and synchrony in mammalian clock neurons. *Nat Neurosci* 8, 476-483 (2005)
14. Ayas NT, White DP, Al-Delaimy WK, Manson JE, Stampfer MJ, et al.: A prospective study of self-reported sleep duration and incident diabetes in women. *Diabetes Care* 26, 380-384 (2003)
15. Balestrieri S, D'Onofrio G, Giuditta A: Deprivation of paradoxical sleep. Effect on weight and nucleic acid content of liver and brain. *Neurochem Res* 5, 1251-1264 (1980)

16. Balsalobre A, Brown SA, Marcacci L, Tronche F, Kellendonk C, et al.: Resetting of circadian time in peripheral tissues by glucocorticoid signaling. *Science* 289, 2344-2347 (2000)
17. Balsalobre A, Damiola F, Schibler U: A serum shock induces circadian gene expression in mammalian tissue culture cells. *Cell* 93, 929-937 (1998)
18. Barazzoni R, Zanetti M, Stebel M, Biolo G, Cattin L, et al.: Hyperleptinemia prevents increased plasma ghrelin concentration during short-term moderate caloric restriction in rats. *Gastroenterology* 124, 1188-1192 (2003)
19. Barrett RK, Takahashi JS: Temperature compensation and temperature entrainment of the chick pineal cell circadian clock. *J Neurosci* 15, 5681-5692 (1995)
20. Birbaumer N, Schmidt RF: Wachen, Aufmerksamkeit und Schlafen. In: Schmidt RF, Lang F, Thews G: *Physiologie des Menschen*. 29. Auflage, 9. Kapitel, 204-223, Springer, Heidelberg (2005)
21. Bodosi B, Gardi J, Hajdu I, Szentirmai E, Obal F, Jr., et al.: Rhythms of ghrelin, leptin, and sleep in rats: effects of the normal diurnal cycle, restricted feeding, and sleep deprivation. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 287, R1071-1079 (2004)
22. Boivin DB, Tremblay GM, James FO: Working on atypical schedules. *Sleep Med* 8, 578-589 (2007)
23. Borbély AA: A two process model of sleep regulation. *Hum Neurobiol* 1, 195-204 (1982)
24. Borbély AA: Wozu dient der Schlaf? Versuch einer Synthese. In: *Das Geheimnis des Schlafs: neue Wege und Erkenntnisse der Forschung*. Ausgabe für das Internet, 12. Kapitel, 114-123 (1998) (www.pharma.uzh.ch/static/schlafbuch/TITEL.htm, Tag des letzten Zugriffs: 01.12.2011)
25. Borbély AA: Wissenschaftler untersuchen den Schlaf: Die verschiedenen Schlafstadien. In: *Das Geheimnis des Schlafs: neue Wege und Erkenntnisse der Forschung*. Ausgabe für das Internet, 2.Kapitel, 14-21, (1998) (www.pharma.uzh.ch/static/schlafbuch/TITEL.htm, Tag des letzten Zugriffs: 01.12.2011)
26. Born J, Wilhelm I: System consolidation of memory during sleep. *Psychol Res* 76, 192-203 (2012)
27. Brun RP, Kim JB, Hu E, Spiegelman BM: Peroxisome proliferator-activated receptor gamma and the control of adipogenesis. *Curr Opin Lipidol* 8, 212-218 (1997)
28. Brun RP, Tontonoz P, Forman BM, Ellis R, Chen J, et al.: Differential activation of adipogenesis by multiple PPAR isoforms. *Genes Dev* 10, 974-984 (1996)
29. Buijs RM, Kalsbeek A: Hypothalamic integration of central and peripheral clocks. *Nat Rev Neurosci* 2, 521-526 (2001)
30. Buijs RM, Wortel J, Van Heerikhuizen JJ, Feenstra MG, Ter Horst GJ, et al.: Anatomical and functional demonstration of a multisynaptic suprachiasmatic nucleus adrenal (cortex) pathway. *Eur J Neurosci* 11, 1535-1544 (1999)

31. Bunger MK, Wilsbacher LD, Moran SM, Clendenin C, Radcliffe LA, et al.: Mop3 is an essential component of the master circadian pacemaker in mammals. *Cell* 103, 1009-1017 (2000)
32. Buzzetti R, Petrone A, Ribaud MC, Alemanno I, Zavarella S, et al.: The common PPAR-gamma2 Pro12Ala variant is associated with greater insulin sensitivity. *Eur J Hum Genet* 12, 1050-1054 (2004)
33. Canaple L, Rambaud J, Dkhissi-Benyahya O, Rayet B, Tan NS, et al.: Reciprocal regulation of brain and muscle Arnt-like protein 1 and peroxisome proliferator-activated receptor alpha defines a novel positive feedback loop in the rodent liver circadian clock. *Mol Endocrinol* 20, 1715-1727 (2006)
34. Chang AM, Reid KJ, Gourineni R, Zee PC: Sleep timing and circadian phase in delayed sleep phase syndrome. *J Biol Rhythms* 24, 313-321 (2009)
35. Chawla A, Lazar MA: Induction of Rev-ErbA alpha, an orphan receptor encoded on the opposite strand of the alpha-thyroid hormone receptor gene, during adipocyte differentiation. *J Biol Chem* 268, 16265-16269 (1993)
36. Chehab FF, Mounzih K, Lu R, Lim ME: Early onset of reproductive function in normal female mice treated with leptin. *Science* 275, 88-90 (1997)
37. Cheng MY, Bullock CM, Li C, Lee AG, Bermak JC, et al.: Prokineticin 2 transmits the behavioural circadian rhythm of the suprachiasmatic nucleus. *Nature* 417, 405-410 (2002)
38. Chin-Chance C, Polonsky KS, Schoeller DA: Twenty-four-hour leptin levels respond to cumulative short-term energy imbalance and predict subsequent intake. *J Clin Endocrinol Metab* 85, 2685-2691 (2000)
39. Chou TC, Bjorkum AA, Gaus SE, Lu J, Scammell TE, et al.: Afferents to the ventrolateral preoptic nucleus. *J Neurosci* 22, 977-990 (2002)
40. Chou TC, Scammell TE, Gooley JJ, Gaus SE, Saper CB, et al.: Critical role of dorsomedial hypothalamic nucleus in a wide range of behavioral circadian rhythms. *J Neurosci* 23, 10691-10702 (2003)
41. Clement K, Vaisse C, Lahlou N, Cabrol S, Pelloux V, et al.: A mutation in the human leptin receptor gene causes obesity and pituitary dysfunction. *Nature* 392, 398-401 (1998)
42. Colwell CS: Rhythmic coupling among cells in the suprachiasmatic nucleus. *J Neurobiol* 43, 379-388 (2000)
43. Cowley MA, Smart JL, Rubinstein M, Cerdan MG, Diano S, et al.: Leptin activates anorexigenic POMC neurons through a neural network in the arcuate nucleus. *Nature* 411, 480-484 (2001)
44. Daan S, Pittendrigh CS: A functional analysis of circadian pacemakers in nocturnal rodents. *Journal of Comparative Physiology* 106, 223-355 (1976)

45. Damiola F, Le Minh N, Preitner N, Kornmann B, Fleury-Olela F, et al.: Restricted feeding uncouples circadian oscillators in peripheral tissues from the central pacemaker in the suprachiasmatic nucleus. *Genes Dev* 14, 2950-2961 (2000)
46. Date Y, Kojima M, Hosoda H, Sawaguchi A, Mondal MS, et al.: Ghrelin, a novel growth hormone-releasing acylated peptide, is synthesized in a distinct endocrine cell type in the gastrointestinal tracts of rats and humans. *Endocrinology* 141, 4255-4261 (2000)
47. DeBruyne JP, Noton E, Lambert CM, Maywood ES, Weaver DR, et al.: A clock shock: mouse CLOCK is not required for circadian oscillator function. *Neuron* 50, 465-477 (2006)
48. DeBruyne JP, Weaver DR, Reppert SM: CLOCK and NPAS2 have overlapping roles in the suprachiasmatic circadian clock. *Nat Neurosci* 10, 543-545 (2007)
49. Deurveilher S, Semba K: Indirect projections from the suprachiasmatic nucleus to major arousal-promoting cell groups in rat: implications for the circadian control of behavioural state. *Neuroscience* 130, 165-183 (2005)
50. Di Milia L, Mummery K: The association between job related factors, short sleep and obesity. *Ind Health* 47, 363-368 (2009)
51. Dijk DJ, Beersma DG, Daan S: EEG power density during nap sleep: reflection of an hourglass measuring the duration of prior wakefulness. *J Biol Rhythms* 2, 207-219 (1987)
52. Dijk DJ, Czeisler CA: Contribution of the circadian pacemaker and the sleep homeostat to sleep propensity, sleep structure, electroencephalographic slow waves, and sleep spindle activity in humans. *J Neurosci* 15, 3526-3538 (1995)
53. Dijk DJ, von Schantz M: Timing and consolidation of human sleep, wakefulness, and performance by a symphony of oscillators. *J Biol Rhythms* 20, 279-290 (2005)
54. Ducy P, Amling M, Takeda S, Priemel M, Schilling AF, et al.: Leptin inhibits bone formation through a hypothalamic relay: a central control of bone mass. *Cell* 100, 197-207 (2000)
55. Ebisawa T, Uchiyama M, Kajimura N, Mishima K, Kamei Y, et al.: Association of structural polymorphisms in the human period3 gene with delayed sleep phase syndrome. *EMBO Rep* 2, 342-346 (2001)
56. Eide EJ, Vielhaber EL, Hinz WA, Virshup DM: The circadian regulatory proteins BMAL1 and cryptochromes are substrates of casein kinase Iepsilon. *J Biol Chem* 277, 17248-17254 (2002)
57. Engeland WC, Arnhold MM: Neural circuitry in the regulation of adrenal corticosterone rhythmicity. *Endocrine* 28, 325-332 (2005)
58. EU Platform on Diet, Physical Activity and Health: International Obesity Task Force Briefing Paper 2005
http://ec.europa.eu/health/ph_determinants/life_style/nutrition/documents/iotf_en.pdf
(Tag des letzten Zugriffs: 01.12.2011)

59. Everson CA, Bergmann BM, Rechtschaffen A: Sleep deprivation in the rat: III. Total sleep deprivation. *Sleep* 12, 13-21 (1989)
60. Everson CA, Crowley WR: Reductions in circulating anabolic hormones induced by sustained sleep deprivation in rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 286, E1060-1070 (2004)
61. Finucane MM, Stevens GA, Cowan MJ, Danaei G, Lin JK, et al.: National, regional, and global trends in body-mass index since 1980: systematic analysis of health examination surveys and epidemiological studies with 960 country-years and 9.1 million participants. *Lancet* 377, 557-567 (2011)
62. Fonjallaz P, Ossipow V, Wanner G, Schibler U: The two PAR leucine zipper proteins, TEF and DBP, display similar circadian and tissue-specific expression, but have different target promoter preferences. *EMBO J* 15, 351-362 (1996)
63. Fontaine C, Dubois G, Duguay Y, Helledie T, Vu-Dac N, et al.: The orphan nuclear receptor Rev-Erbalpha is a peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) gamma target gene and promotes PPARgamma-induced adipocyte differentiation. *J Biol Chem* 278, 37672-37680 (2003)
64. Fontaine C, Staels B: The orphan nuclear receptor Rev-erbalpha: a transcriptional link between circadian rhythmicity and cardiometabolic disease. *Curr Opin Lipidol* 18, 141-146 (2007)
65. Frank MG, Benington JH: The role of sleep in memory consolidation and brain plasticity: dream or reality? *Neuroscientist* 12, 477-488 (2006)
66. Franken P, Chollet D, Tafti M: The homeostatic regulation of sleep need is under genetic control. *J Neurosci* 21, 2610-2621 (2001)
67. Franken P, Dijk DJ: Circadian clock genes and sleep homeostasis. *Eur J Neurosci* 29, 1820-1829 (2009)
68. Franken P, Dudley CA, Estill SJ, Barakat M, Thomason R, et al.: NPAS2 as a transcriptional regulator of non-rapid eye movement sleep: genotype and sex interactions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 7118-7123 (2006)
69. Franken P, Tobler I, Borbely AA: Sleep homeostasis in the rat: simulation of the time course of EEG slow-wave activity. *Neurosci Lett* 130, 141-144 (1991)
70. Friedman JM, Halaas JL: Leptin and the regulation of body weight in mammals. *Nature* 395, 763-770 (1998)
71. Fu L, Patel MS, Bradley A, Wagner EF, Karsenty G: The molecular clock mediates leptin-regulated bone formation. *Cell* 122, 803-815 (2005)
72. Gale SM, Castracane VD, Mantzoros CS: Energy homeostasis, obesity and eating disorders: recent advances in endocrinology. *J Nutr* 134, 295-298 (2004)
73. Gallego M, Virshup DM: Post-translational modifications regulate the ticking of the circadian clock. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8, 139-148 (2007)

74. Gatfield D, Schibler U: Circadian glucose homeostasis requires compensatory interference between brain and liver clocks. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 14753-14754 (2008)
75. Gavrilu A, Peng CK, Chan JL, Mietus JE, Goldberger AL, et al.: Diurnal and ultradian dynamics of serum adiponectin in healthy men: comparison with leptin, circulating soluble leptin receptor, and cortisol patterns. *J Clin Endocrinol Metab* 88, 2838-2843 (2003)
76. Gekakis N, Staknis D, Nguyen HB, Davis FC, Wilsbacher LD, et al.: Role of the CLOCK protein in the mammalian circadian mechanism. *Science* 280, 1564-1569 (1998)
77. Gervois P, Chopin-Delannoy S, Fadel A, Dubois G, Kosykh V, et al.: Fibrates increase human REV-ERB α expression in liver via a novel peroxisome proliferator-activated receptor response element. *Mol Endocrinol* 13, 400-409 (1999)
78. Gooley JJ, Lu J, Chou TC, Scammell TE, Saper CB: Melanopsin in cells of origin of the retinohypothalamic tract. *Nat Neurosci* 4, 1165 (2001)
79. Guler AD, Ecker JL, Lall GS, Haq S, Altimus CM, et al.: Melanopsin cells are the principal conduits for rod-cone input to non-image-forming vision. *Nature* 453, 102-105 (2008)
80. Harmar AJ, Marston HM, Shen S, Spratt C, West KM, et al.: The VPAC(2) receptor is essential for circadian function in the mouse suprachiasmatic nuclei. *Cell* 109, 497-508 (2002)
81. Hastings MH: Neuroendocrine rhythms. *Pharmacol Ther* 50, 35-71 (1991)
82. Hastings MH, Reddy AB, Maywood ES: A clockwork web: circadian timing in brain and periphery, in health and disease. *Nat Rev Neurosci* 4, 649-661 (2003)
83. Heinrich P, Haan S, Hermanns H, Löffler G, Müller-Newen G, Schaper F: Kommunikation zwischen Zellen: Extrazelluläre Signalmoleküle, Rezeptoren und Signaltransduktion. In: Löffler G, Petrides P, Heinrich P: *Biochemie und Pathobiochemie*. 8.Auflage, 25. Kapitel, 755-808, Springer, Heidelberg (2007)
84. Herzog ED, Tosini G: The mammalian circadian clock shop. *Semin Cell Dev Biol* 12, 295-303 (2001)
85. Hosoda H, Kojima M, Matsuo H, Kangawa K: Ghrelin and des-acyl ghrelin: two major forms of rat ghrelin peptide in gastrointestinal tissue. *Biochem Biophys Res Commun* 279, 909-913 (2000)
86. Ikeda M, Sugiyama T, Wallace CS, Gompf HS, Yoshioka T, et al.: Circadian dynamics of cytosolic and nuclear Ca²⁺ in single suprachiasmatic nucleus neurons. *Neuron* 38, 253-263 (2003)
87. Ishida A, Mutoh T, Ueyama T, Bando H, Masubuchi S, et al.: Light activates the adrenal gland: timing of gene expression and glucocorticoid release. *Cell Metab* 2, 297-307 (2005)

88. Jasper MS, Engeland WC: Splanchnicotomy increases adrenal sensitivity to ACTH in nonstressed rats. *Am J Physiol* 273, E363-368 (1997)
89. Jin L, Zhang S, Burguera BG, Couce ME, Osamura RY, et al.: Leptin and leptin receptor expression in rat and mouse pituitary cells. *Endocrinology* 141, 333-339 (2000)
90. Jones CR, Campbell SS, Zone SE, Cooper F, DeSano A, et al.: Familial advanced sleep-phase syndrome: A short-period circadian rhythm variant in humans. *Nat Med* 5, 1062-1065 (1999)
91. Kalra SP, Dube MG, Sahu A, Phelps CP, Kalra PS: Neuropeptide Y secretion increases in the paraventricular nucleus in association with increased appetite for food. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 10931-10935 (1991)
92. Kalsbeek A, Fliers E, Romijn JA, La Fleur SE, Wortel J, et al.: The suprachiasmatic nucleus generates the diurnal changes in plasma leptin levels. *Endocrinology* 142, 2677-2685 (2001)
93. Kalsbeek A, Garidou ML, Palm IF, Van Der Vliet J, Simonneaux V, et al.: Melatonin sees the light: blocking GABA-ergic transmission in the paraventricular nucleus induces daytime secretion of melatonin. *Eur J Neurosci* 12, 3146-3154 (2000)
94. Kalsbeek A, van Heerikhuize JJ, Wortel J, Buijs RM: A diurnal rhythm of stimulatory input to the hypothalamo-pituitary-adrenal system as revealed by timed intrahypothalamic administration of the vasopressin V1 antagonist. *J Neurosci* 16, 5555-5565 (1996)
95. Karlsson B, Knutsson A, Lindahl B: Is there an association between shift work and having a metabolic syndrome? Results from a population based study of 27,485 people. *Occup Environ Med* 58, 747-752 (2001)
96. Knight ZA, Hannan KS, Greenberg ML, Friedman JM: Hyperleptinemia is required for the development of leptin resistance. *PLoS One* 5, e11376 (2010)
97. Knutson KL, Spiegel K, Penev P, Van Cauter E: The metabolic consequences of sleep deprivation. *Sleep Med Rev* 11, 163-178 (2007)
98. Knutson KL, Van Cauter E: Associations between sleep loss and increased risk of obesity and diabetes. *Ann N Y Acad Sci* 1129, 287-304 (2008)
99. Koban M, Sita LV, Le WW, Hoffman GE: Sleep deprivation of rats: the hyperphagic response is real. *Sleep* 31, 927-933 (2008)
100. Koban M, Swinson KL: Chronic REM-sleep deprivation of rats elevates metabolic rate and increases UCP1 gene expression in brown adipose tissue. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 289, E68-74 (2005)
101. Köhrle J, Petrides P: Hypothalamisch-hypophysäres System und Zielgewebe. In: Löffler G, Petrides P, Heinrich P: *Biochemie und Pathobiochemie*. 8. Auflage, 27. Kapitel, 841-892, Springer, Heidelberg (2007)

102. Kohsaka A, Laposky AD, Ramsey KM, Estrada C, Joshu C, et al.: High-fat diet disrupts behavioral and molecular circadian rhythms in mice. *Cell Metab* 6, 414-421 (2007)
103. Kojima M, Hosoda H, Date Y, Nakazato M, Matsuo H, et al.: Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. *Nature* 402, 656-660 (1999)
104. Kovac J, Husse J, Oster H: A time to fast, a time to feast: the crosstalk between metabolism and the circadian clock. *Mol Cells* 28, 75-80 (2009)
105. Kramer A, Yang FC, Snodgrass P, Li X, Scammell TE, et al.: Regulation of daily locomotor activity and sleep by hypothalamic EGF receptor signaling. *Science* 294, 2511-2515 (2001)
106. Kripke DF, Simons RN, Garfinkel L, Hammond EC: Short and long sleep and sleeping pills. Is increased mortality associated? *Arch Gen Psychiatry* 36, 103-116 (1979)
107. Kudo T, Tamagawa T, Shibata S: Effect of chronic ethanol exposure on the liver of Clock-mutant mice. *J Circadian Rhythms* 7, 4 (2009)
108. Kume K, Zylka MJ, Sriram S, Shearman LP, Weaver DR, et al.: mCRY1 and mCRY2 are essential components of the negative limb of the circadian clock feedback loop. *Cell* 98, 193-205 (1999)
109. La Fleur SE, Kalsbeek A, Wortel J, Buijs RM: A suprachiasmatic nucleus generated rhythm in basal glucose concentrations. *J Neuroendocrinol* 11, 643-652 (1999)
110. La Fleur SE, Kalsbeek A, Wortel J, Fekkes ML, Buijs RM: A daily rhythm in glucose tolerance: a role for the suprachiasmatic nucleus. *Diabetes* 50, 1237-1243 (2001)
111. Lamia KA, Storch KF, Weitz CJ: Physiological significance of a peripheral tissue circadian clock. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 15172-15177 (2008)
112. Laposky A, Easton A, Dugovic C, Walisser J, Bradfield C, et al.: Deletion of the mammalian circadian clock gene BMAL1/Mop3 alters baseline sleep architecture and the response to sleep deprivation. *Sleep* 28, 395-409 (2005)
113. Lavery DJ, Lopez-Molina L, Margueron R, Fleury-Olela F, Conquet F, et al.: Circadian expression of the steroid 15 alpha-hydroxylase (Cyp2a4) and coumarin 7-hydroxylase (Cyp2a5) genes in mouse liver is regulated by the PAR leucine zipper transcription factor DBP. *Mol Cell Biol* 19, 6488-6499 (1999)
114. Le Minh N, Damiola F, Tronche F, Schutz G, Schibler U: Glucocorticoid hormones inhibit food-induced phase-shifting of peripheral circadian oscillators. *EMBO J* 20, 7128-7136 (2001)
115. Lee C, Etchegaray JP, Cagampang FR, Loudon AS, Reppert SM: Posttranslational mechanisms regulate the mammalian circadian clock. *Cell* 107, 855-867 (2001)
116. Lemberger T, Braissant O, Juge-Aubry C, Keller H, Saladin R, et al.: PPAR tissue distribution and interactions with other hormone-signaling pathways. *Ann N Y Acad Sci* 804, 231-251 (1996)

117. Lemberger T, Saladin R, Vazquez M, Assimacopoulos F, Staels B, et al.: Expression of the peroxisome proliferator-activated receptor alpha gene is stimulated by stress and follows a diurnal rhythm. *J Biol Chem* 271, 1764-1769 (1996)
118. Levi F, Schibler U: Circadian rhythms: mechanisms and therapeutic implications. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 47, 593-628 (2007)
119. Levine JD, Funes P, Dowse HB, Hall JC: Resetting the circadian clock by social experience in *Drosophila melanogaster*. *Science* 298, 2010-2012 (2002)
120. Liu C, Reppert SM: GABA synchronizes clock cells within the suprachiasmatic circadian clock. *Neuron* 25, 123-128 (2000)
121. Lord GM, Matarese G, Howard JK, Baker RJ, Bloom SR, et al.: Leptin modulates the T-cell immune response and reverses starvation-induced immunosuppression. *Nature* 394, 897-901 (1998)
122. Lowrey PL, Takahashi JS: Mammalian circadian biology: elucidating genome-wide levels of temporal organization. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 5, 407-441 (2004)
123. Lüllmann H, Mohr K, Hein L: Hormonsystem. In: *Pharmakologie und Toxikologie*. 16.Auflage, 23. Kapitel, 362-415, Thieme, Stuttgart (2006)
124. Maffei M, Halaas J, Ravussin E, Pratley RE, Lee GH, et al.: Leptin levels in human and rodent: measurement of plasma leptin and ob RNA in obese and weight-reduced subjects. *Nat Med* 1, 1155-1161 (1995)
125. Maquet P: Sleep on it! *Nat Neurosci* 3, 1235-1236 (2000)
126. Marandici A, Monder C: The fate of corticosterone and 11-deoxycorticosterone in C57BL/6 and BALB/c strains of mice: distribution and oxidative metabolism. *J Steroid Biochem* 21, 579-583 (1984)
127. Mistlberger RE: Circadian food-anticipatory activity: formal models and physiological mechanisms. *Neurosci Biobehav Rev* 18, 171-195 (1994)
128. Moore RY, Lenn NJ: A retinohypothalamic projection in the rat. *J Comp Neurol* 146, 1-14 (1972)
129. Morash B, Li A, Murphy PR, Wilkinson M, Ur E: Leptin gene expression in the brain and pituitary gland. *Endocrinology* 140, 5995-5998 (1999)
130. Morris DL, Rui L: Recent advances in understanding leptin signaling and leptin resistance. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 297, E1247-1259 (2009)
131. Morton GJ, Cummings DE, Baskin DG, Barsh GS, Schwartz MW: Central nervous system control of food intake and body weight. *Nature* 443, 289-295 (2006)
132. Munck A, Guyre PM, Holbrook NJ: Physiological functions of glucocorticoids in stress and their relation to pharmacological actions. *Endocr Rev* 5, 25-44 (1984)
133. Myers MG, Cowley MA, Munzberg H: Mechanisms of leptin action and leptin resistance. *Annu Rev Physiol* 70, 537-556 (2008)

134. Nakazato M, Murakami N, Date Y, Kojima M, Matsuo H, et al.: A role for ghrelin in the central regulation of feeding. *Nature* 409, 194-198 (2001)
135. Naylor E, Bergmann BM, Krauski K, Zee PC, Takahashi JS, et al.: The circadian clock mutation alters sleep homeostasis in the mouse. *J Neurosci* 20, 8138-8143 (2000)
136. Oishi K, Shirai H, Ishida N: CLOCK is involved in the circadian transactivation of peroxisome-proliferator-activated receptor alpha (PPARalpha) in mice. *Biochem J* 386, 575-581 (2005)
137. Oster H, Yasui A, van der Horst GT, Albrecht U: Disruption of mCry2 restores circadian rhythmicity in mPer2 mutant mice. *Genes Dev* 16, 2633-2638 (2002)
138. Ouyang Y, Andersson CR, Kondo T, Golden SS, Johnson CH: Resonating circadian clocks enhance fitness in cyanobacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 8660-8664 (1998)
139. Panda S, Antoch MP, Miller BH, Su AI, Schook AB, et al.: Coordinated transcription of key pathways in the mouse by the circadian clock. *Cell* 109, 307-320 (2002)
140. Panda S, Sato TK, Castrucci AM, Rollag MD, DeGrip WJ, et al.: Melanopsin (Opn4) requirement for normal light-induced circadian phase shifting. *Science* 298, 2213-2216 (2002)
141. Pape HC: Wachheit und Schlaf: Rhythmen des Gehirns im Muster des Elektroenzephalogramms. In: Klinke R, Pape HC, Silbernagl S: *Physiologie*. 6. Auflage, 26. Kapitel, 850-865, Thieme, Stuttgart (2009)
142. Papotti M, Ghe C, Cassoni P, Catapano F, Deghenghi R, et al.: Growth hormone secretagogue binding sites in peripheral human tissues. *J Clin Endocrinol Metab* 85, 3803-3807 (2000)
143. Patel SR, Blackwell T, Redline S, Ancoli-Israel S, Cauley JA, et al.: The association between sleep duration and obesity in older adults. *Int J Obes (Lond)* 32, 1825-1834 (2008)
144. Pfaffl MW: A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 29, e45 (2001)
145. Pittendrigh CS: Temporal organization: reflections of a Darwinian clock-watcher. *Annu Rev Physiol* 55, 16-54 (1993)
146. Preitner N, Damiola F, Lopez-Molina L, Zakany J, Duboule D, et al.: The orphan nuclear receptor REV-ERBalpha controls circadian transcription within the positive limb of the mammalian circadian oscillator. *Cell* 110, 251-260 (2002)
147. Ralph MR, Menaker M: A mutation of the circadian system in golden hamsters. *Science* 241, 1225-1227 (1988)
148. Raspe E, Duez H, Mansen A, Fontaine C, Fievet C, et al.: Identification of Rev-erbalpha as a physiological repressor of apoC-III gene transcription. *J Lipid Res* 43, 2172-2179 (2002)

149. Refinetti R, Menaker M: The circadian rhythm of body temperature. *Physiol Behav* 51, 613-637 (1992)
150. Reick M, Garcia JA, Dudley C, McKnight SL: NPAS2: an analog of clock operative in the mammalian forebrain. *Science* 293, 506-509 (2001)
151. Reppert SM, Weaver DR: Molecular analysis of mammalian circadian rhythms. *Annu Rev Physiol* 63, 647-676 (2001)
152. Reppert SM, Weaver DR: Coordination of circadian timing in mammals. *Nature* 418, 935-941 (2002)
153. Ripperger JA, Shearman LP, Reppert SM, Schibler U: CLOCK, an essential pacemaker component, controls expression of the circadian transcription factor DBP. *Genes Dev* 14, 679-689 (2000)
154. Roenneberg T, Mrosovsky M: "What watch?...such much!" Complexity and evolution of circadian clocks. *Cell Tissue Res* 309, 3-9 (2002)
155. Romon M, Edme JL, Boulenguez C, Lescroart JL, Frimat P: Circadian variation of diet-induced thermogenesis. *Am J Clin Nutr* 57, 476-480 (1993)
156. Rudic RD, McNamara P, Curtis AM, Boston RC, Panda S, et al.: BMAL1 and CLOCK, two essential components of the circadian clock, are involved in glucose homeostasis. *PLoS Biol* 2, e377 (2004)
157. Santer R, Schneppenheimer R, Dombrowski A, Gotze H, Steinmann B, et al.: Mutations in GLUT2, the gene for the liver-type glucose transporter, in patients with Fanconi-Bickel syndrome. *Nat Genet* 17, 324-326 (1997)
158. Saper CB, Lu J, Chou TC, Gooley J: The hypothalamic integrator for circadian rhythms. *Trends Neurosci* 28, 152-157 (2005)
159. Scarpace PJ, Matheny M, Pollock BH, Tumer N: Leptin increases uncoupling protein expression and energy expenditure. *Am J Physiol* 273, E226-230 (1997)
160. Schmid SM, Hallschmid M, Jauch-Chara K, Wilms B, Benedict C, et al.: Short-term sleep loss decreases physical activity under free-living conditions but does not increase food intake under time-deprived laboratory conditions in healthy men. *Am J Clin Nutr* 90, 1476-1482 (2009)
161. Schwartz MW, Seeley RJ, Campfield LA, Burn P, Baskin DG: Identification of targets of leptin action in rat hypothalamus. *J Clin Invest* 98, 1101-1106 (1996)
162. Schwartz WJ, Zimmerman P: Circadian timekeeping in BALB/c and C57BL/6 inbred mouse strains. *J Neurosci* 10, 3685-3694 (1990)
163. Scott EM, Carter AM, Grant PJ: Association between polymorphisms in the Clock gene, obesity and the metabolic syndrome in man. *Int J Obes (Lond)* 32, 658-662 (2008)
164. Shearman LP, Sriram S, Weaver DR, Maywood ES, Chaves I, et al.: Interacting molecular loops in the mammalian circadian clock. *Science* 288, 1013-1019 (2000)

165. Shi S, Hida A, McGuinness OP, Wasserman DH, Yamazaki S, et al.: Circadian clock gene *Bmal1* is not essential; functional replacement with its paralog, *Bmal2*. *Curr Biol* 20, 316-321 (2010)
166. Shimba S, Ishii N, Ohta Y, Ohno T, Watabe Y, et al.: Brain and muscle Arnt-like protein-1 (BMAL1), a component of the molecular clock, regulates adipogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 12071-12076 (2005)
167. Shintani M, Ogawa Y, Ebihara K, Aizawa-Abe M, Miyanaga F, et al.: Ghrelin, an endogenous growth hormone secretagogue, is a novel orexigenic peptide that antagonizes leptin action through the activation of hypothalamic neuropeptide Y/Y1 receptor pathway. *Diabetes* 50, 227-232 (2001)
168. Shiromani PJ, Xu M, Winston EM, Shiromani SN, Gerashchenko D, et al.: Sleep rhythmicity and homeostasis in mice with targeted disruption of *mPeriod* genes. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 287, R47-57 (2004)
169. Simpson ER, Waterman MR: Regulation of the synthesis of steroidogenic enzymes in adrenal cortical cells by ACTH. *Annu Rev Physiol* 50, 427-440 (1988)
170. Sinha MK, Ohannesian JP, Heiman ML, Kriauciunas A, Stephens TW, et al.: Nocturnal rise of leptin in lean, obese, and non-insulin-dependent diabetes mellitus subjects. *J Clin Invest* 97, 1344-1347 (1996)
171. Sinton CM, Fitch TE, Gershenfeld HK: The effects of leptin on REM sleep and slow wave delta in rats are reversed by food deprivation. *J Sleep Res* 8, 197-203 (1999)
172. Spiegel K, Leproult R, Van Cauter E: Impact of sleep debt on metabolic and endocrine function. *Lancet* 354, 1435-1439 (1999)
173. Spiegel K, Tasali E, Penev P, Cauter EV: Brief Communication: Sleep Curtailment in Healthy Young Men Is Associated with Decreased Leptin Levels, Elevated Ghrelin Levels, and Increased Hunger and Appetite. *Ann Intern Med* 141, 846-850 (2004)
174. Stephan FK, Zucker I: Circadian rhythms in drinking behavior and locomotor activity of rats are eliminated by hypothalamic lesions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 69, 1583-1586 (1972)
175. Szafarczyk A, Hery M, Laplante E, Ixart G, Assenmacher I, et al.: Temporal relationships between the circadian rhythmicity in plasma levels of pituitary hormones and in hypothalamic concentrations of releasing factors. *Neuroendocrinology* 30, 369-376 (1980)
176. Takaya K, Ariyasu H, Kanamoto N, Iwakura H, Yoshimoto A, et al.: Ghrelin strongly stimulates growth hormone release in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 85, 4908-4911 (2000)
177. Takeda S, Eleftheriou F, Levasseur R, Liu X, Zhao L, et al.: Leptin regulates bone formation via the sympathetic nervous system. *Cell* 111, 305-317 (2002)
178. Tobler I, Borbely AA: Sleep EEG in the rat as a function of prior waking. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 64, 74-76 (1986)

179. Tobler I, Jaggi K: Sleep and EEG spectra in the Syrian hamster (*Mesocricetus auratus*) under baseline conditions and following sleep deprivation. *J Comp Physiol [A]* 161, 449-459 (1987)
180. Toh KL, Jones CR, He Y, Eide EJ, Hinz WA, et al.: An hPer2 phosphorylation site mutation in familial advanced sleep phase syndrome. *Science* 291, 1040-1043 (2001)
181. Tononi G, Cirelli C: Sleep function and synaptic homeostasis. *Sleep Med Rev* 10, 49-62 (2006)
182. Trachsel L, Edgar DM, Seidel WF, Heller HC, Dement WC: Sleep homeostasis in suprachiasmatic nuclei-lesioned rats: effects of sleep deprivation and triazolam administration. *Brain Res* 589, 253-261 (1992)
183. Tschöp M, Smiley DL, Heiman ML: Ghrelin induces adiposity in rodents. *Nature* 407, 908-913 (2000)
184. Turek FW, Joshu C, Kohsaka A, Lin E, Ivanova G, et al.: Obesity and metabolic syndrome in circadian Clock mutant mice. *Science* 308, 1043-1045 (2005)
185. Van Cauter E, Knutson KL: Sleep and the epidemic of obesity in children and adults. *Eur J Endocrinol* 159 Suppl 1, S59-66 (2008)
186. van der Horst GT, Muijtjens M, Kobayashi K, Takano R, Kanno S, et al.: Mammalian Cry1 and Cry2 are essential for maintenance of circadian rhythms. *Nature* 398, 627-630 (1999)
187. Vielhaber E, Eide E, Rivers A, Gao ZH, Virshup DM: Nuclear entry of the circadian regulator mPER1 is controlled by mammalian casein kinase I epsilon. *Mol Cell Biol* 20, 4888-4899 (2000)
188. Viola AU, Archer SN, James LM, Groeger JA, Lo JC, et al.: PER3 polymorphism predicts sleep structure and waking performance. *Curr Biol* 17, 613-618 (2007)
189. Vitaterna MH, Selby CP, Todo T, Niwa H, Thompson C, et al.: Differential regulation of mammalian period genes and circadian rhythmicity by cryptochromes 1 and 2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 12114-12119 (1999)
190. Wang J, Lazar MA: Bifunctional role of Rev-erbalpha in adipocyte differentiation. *Mol Cell Biol* 28, 2213-2220 (2008)
191. Weikel JC, Wichniak A, Ising M, Brunner H, Friess E, et al.: Ghrelin promotes slow-wave sleep in humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 284, E407-415 (2003)
192. Weitzman ED, Czeisler CA, Coleman RM, Spielman AJ, Zimmerman JC, et al.: Delayed sleep phase syndrome. A chronobiological disorder with sleep-onset insomnia. *Arch Gen Psychiatry* 38, 737-746 (1981)
193. Welsh DK, Logothetis DE, Meister M, Reppert SM: Individual neurons dissociated from rat suprachiasmatic nucleus express independently phased circadian firing rhythms. *Neuron* 14, 697-706 (1995)

194. Whitmore D, Foulkes NS, Strahle U, Sassone-Corsi P: Zebrafish Clock rhythmic expression reveals independent peripheral circadian oscillators. *Nat Neurosci* 1, 701-707 (1998)
195. Wisor JP, O'Hara BF, Terao A, Selby CP, Kilduff TS, et al.: A role for cryptochromes in sleep regulation. *BMC Neurosci* 3, 20 (2002)
196. Woelfle MA, Ouyang Y, Phanvijhitsiri K, Johnson CH: The adaptive value of circadian clocks: an experimental assessment in cyanobacteria. *Curr Biol* 14, 1481-1486 (2004)
197. Woon PY, Kaisaki PJ, Bragança J, Bihoreau M-Trs, Levy JC, et al.: Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator-like (BMAL1) is associated with susceptibility to hypertension and type 2 diabetes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104, 14412-14417 (2007)
198. Wren AM, Seal LJ, Cohen MA, Brynes AE, Frost GS, et al.: Ghrelin enhances appetite and increases food intake in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 86, 5992 (2001)
199. Wuarin J, Falvey E, Lavery D, Talbot D, Schmidt E, et al.: The role of the transcriptional activator protein DBP in circadian liver gene expression. *J Cell Sci Suppl* 16, 123-127 (1992)
200. Yamaguchi S, Mitsui S, Yan L, Yagita K, Miyake S, et al.: Role of DBP in the circadian oscillatory mechanism. *Mol Cell Biol* 20, 4773-4781 (2000)
201. Yamazaki S, Numano R, Abe M, Hida A, Takahashi R, et al.: Resetting central and peripheral circadian oscillators in transgenic rats. *Science* 288, 682-685 (2000)
202. Yoo SH, Yamazaki S, Lowrey PL, Shimomura K, Ko CH, et al.: PERIOD2::LUCIFERASE real-time reporting of circadian dynamics reveals persistent circadian oscillations in mouse peripheral tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 5339-5346 (2004)
203. Youngblood BD, Smagin GN, Elkins PD, Ryan DH, Harris RB: The effects of paradoxical sleep deprivation and valine on spatial learning and brain 5-HT metabolism. *Physiol Behav* 67, 643-649 (1999)
204. Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, et al.: Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* 372, 425-432 (1994)
205. Zheng B, Albrecht U, Kaasik K, Sage M, Lu W, et al.: Nonredundant roles of the mPer1 and mPer2 genes in the mammalian circadian clock. *Cell* 105, 683-694 (2001)
206. Zvonic S, Ptitsyn AA, Conrad SA, Scott LK, Floyd ZE, et al.: Characterization of peripheral circadian clocks in adipose tissues. *Diabetes* 55, 962-970 (2006)
207. Zylka MJ, Shearman LP, Weaver DR, Reppert SM: Three period homologs in mammals: differential light responses in the suprachiasmatic circadian clock and oscillating transcripts outside of brain. *Neuron* 20, 1103-1110 (1998)

7. Danksagung

Herzlich bedanken möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. med. Lehnert für die Überlassung des Dissertationsthemas und die gute Betreuung über die Entfernung hinweg.

Herrn Prof. Eichele danke ich vielmals für die Bereitstellung der zur Durchführung der Experimente benötigten wissenschaftlichen Einrichtungen.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Oster für die exzellente Betreuung und die konstruktiven Anmerkungen und Korrekturvorschläge bei der Verfassung der Dissertationsschrift. Besonders danke ich ihm aber dafür, mein Interesse an der wissenschaftlichen Arbeit ausgereift haben zu lassen.

In besonderem Ausmaße danke ich Jana Husse ohne die diese Arbeit niemals zustande gekommen wäre. Vielen Dank für die vielen Nächte, die sie opfern musste, für das Anlernen der Techniken, die Geduld, mit der sie alle meine Fragen beantwortet hat, sowie für die Organisations- und Strukturierungshilfe. Besonders dankbar bin ich für die Freundschaft, die aus der Zusammenarbeit entstanden ist.

Der Arbeitsgruppe für zirkadiane Rhythmen danke ich sehr herzlich für die gute Aufnahme in das Team, was in erheblichem Ausmaß dazu beigetragen hat, dass ich mich in der Arbeitsgruppe wohlfühlt habe. Insbesondere sei herzlichst Brid Bode, Judith Kovac, Nadine Naujokat, Silke Kiessling und Dominic Landgraf gedankt.

Nicht zuletzt danke ich meiner Familie, meinem Freund und meinen Freunden für die großartige, bedingungslose Unterstützung auf allen Ebenen und für die vielen aufmunternden und Kraft gebenden Worte und Taten während meines gesamten Studiums.

8. Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Sophie Charlotte Hintze
Staatsangehörigkeit: Deutsch
Familienstand: ledig

Schulische Ausbildung

1992 - 1994 ev. Grundschule Nützenbergerstraße, Wuppertal
1994 - 1996 Stadtschule Bad Oldesloe
1996 - 2005 Theodor-Mommsen-Gymnasium Bad Oldesloe,
Abschluss Abitur

Studium

10.2005 - 08.2007 Studium der Medizin, Georg-August-Universität Göttingen,
Vorklinischer Studienabschnitt, Abschluß des ersten
Abschnittes der ärztlichen Prüfung
10.2007-11.2011 Studium der Medizin, Georg-August-Universität Göttingen,
Klinischer Studienabschnitt, Abschluß des zweiten
Abschnittes der ärztlichen Prüfung
12.2011 Approbation

Praktisches Jahr

08.-10.2010 1. Abschnitt 1.Tertial, Neurologie, St.Bernward
Krankenhaus Hildesheim
10.-12.2010 2. Abschnitt 1.Tertial, Neurologie, Nepean Hospital,
Sydney, Australien
12.2010-03.2011 2.Tertial, Chirurgie, Spital Thun, Schweiz

04.-07.2011 3. Terial, Innere Medizin St.Bernward Krankenhaus
Hildesheim

Beruflicher Werdegang

seit Juni 2012 Assistenzärztin in der Abteilung für Gastroenterologie,
Hepatologie und Endokrinologie an der Medizinischen
Hochschule Hannover

Promotion

03.2009-03.2010 Durchführung des experimentellen Teils
Arbeitsgruppe für zirkadiane Rhythmen, Prof. Oster, Max-
Planck-Institut für biophysikalische Chemie Göttingen

9. Erklärungen

Hiermit versichere ich, Sophie Charlotte Hintze, dass ich die Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe angefertigt und andere als die in der Arbeit genannten personellen, technischen und sachlichen Hilfen oder Hilfsmittel nicht benutzt habe. Die Dissertation habe ich andernorts weder vorgelegt noch einen Zulassungsantrag gestellt, noch habe ich mich bereits einem anderen Promotionsverfahren unterzogen. Zuhörer sind willkommen. Alle Tierversuche wurden in Übereinstimmung mit den Vorschriften des Deutschen Tierschutzgesetzes durchgeführt und waren durch das Niedersächsische Landesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit genehmigt, (Datum des Genehmigungsschreibens: 05.03.2009, Aktenzeichen: 33.11.42502-04-010/09).