

Aus dem Institut für Pharmakologie
der Schering AG Berlin

DISSERTATION

Rolipram und tageszeitliche Rhythmen an Ratten

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Jeannot Andreas Zimmer

aus *Berlin*

Gutachter/in: 1. Prof. Dr. Dr. h.c. G. Stock
 2. Prof. Dr. med. R. Morgenstern
 3. Prof. Dr. med. H. Fink

Datum der Promotion: 23.06.2013

meiner lieben Mutter

Inhaltsverzeichnis:	
Einleitung.....	9
Depression.....	13
Epidemiologie.....	13
Klassifizierung.....	13
Klinik.....	14
Therapie.....	14
Ätiopathogenese.....	15
Genetische Determinanten.....	15
Psychologische Faktoren.....	15
Neurobiologische Aspekte.....	15
Rolipram.....	17
Substanzcharakterisierung.....	17
Pharmakologie in vitro.....	17
Bindungsstelle.....	17
Monoaminstoffwechsel.....	19
Pharmakologie in vivo.....	19
Motorische Effekte.....	20
Körpertemperatur.....	20
Antidepressive Wirkung in Tiermodellen.....	21
Klinik.....	21
Einsatz bei nephrologischen Erkrankungen.....	22
Einsatz bei akuten und chronischen Entzündungen – ein Überblick.....	22
Einsatz bei Multipler Sklerose.....	24
Einsatz bei der Neuroregeneration.....	25
Einsatz bei chronischer Darmentzündung.....	25
Einsatz in der Tumorthherapie.....	26
Rolipram und Gedächtnis, Effekte bei der Alzheimer Erkrankung.....	27
Überblick über die tageszeitlichen Rhythmen und deren Relevanz in der Pharmakotherapie mit Rolipram.....	29
Die neuroendokrine Achse.....	30
Anatomie der Leitungsbahnen.....	30
Regulation.....	31
CRH und Rhythmus.....	32
Untersuchungsregime.....	32
Neuroendokrine Reaktion auf Stress.....	33
Physiologische und pathologische Effekte.....	35
Verhaltenseffekte beim Tier.....	36
CRH und vegetatives Nervensystem.....	38
Zentrale Ebene.....	38
Periphere Ebene.....	38
CRH und Verhalten.....	39
Kategorisierung.....	39
Maintenance-Verhalten.....	39
Physiologisches Verhalten.....	39
Induziertes Verhalten.....	40
Physiologisches Verhalten und ACTH.....	40
Induktion von Verhalten durch ACTH, MSH- und andere Peptide.....	40
Induktion von Verhalten und PDE-Hemmung.....	41
Induktion von Verhalten durch db-cAMP.....	42
Quasi-Morphin-Withdrawal-Syndrom (QMWS).....	43
Noradrenalin und cAMP.....	43
Induktion von Verhalten durch CRH-Antagonisten.....	43
Induktion von Head Twitches.....	44
Melatonin.....	45
Einführung.....	45
Phylogenetische Aspekte.....	46
Genetische Konstanz.....	46
Sympathicus und cAMP.....	47
Synthese von Melatonin.....	48

Molekularbiologische Aspekte.....	50
LD-Zyklus	50
Beleuchtungsfarben	51
Depression und Melatonin	53
Melatonin und AD bei der Ratte	54
Glucose	54
Periphere Wirkung	55
Leber	55
Insulin und PDEn	55
Rhythmus und Glukose	56
Beleuchtungsversuch.....	57
Ablauf.....	57
Zielsetzung des Beleuchtungsversuchs.....	57
Beleuchtung und Parameter.....	57
Fragestellung	59
Methoden	61
Tiere	61
Tierart.....	61
Tierhaltung	61
Tierfutter	61
Eingewöhnung an den Wohnkäfig.....	61
Markierung der Tiere	61
Beleuchtung.....	62
Hauptversuch (Teile 1 und 2).....	62
Beleuchtungsversuch.....	62
Leuchten:.....	62
Verwendete Substanzen und Lösungen	63
Substanzen	63
Vehikel	63
Lösung.....	63
Verabreichungsrouten	63
Dosis	63
Geräte	64
Messgeräte, Laborgeräte	64
Waage	64
Thermometer	64
Zentrifuge	64
Spritzen und Kanülen	64
Probenröhrchen	64
Beobachtungsbox	64
Behandlungsschema	65
Ablauf-Versuchsblöcke	65
Ablauf-Versuchszeitpunkte	65
Prüfparameter	67
Körpertemperatur	67
Prüfschema - I	67
Prüfschema - II.....	67
Gruppierung von Parametern	68
Quantifizierung der Parameter	68
Klinisch-biochemische Parameter	68
Corticosteron.....	68
Melatonin	68
Glukose	69
Probengewinnung	69
Probenlagerung	69
Beobachtungsplatz	69
Räumliche Aufteilung	69
Biometrische Auswertung	70
Ergebnisse	72

1	Beleuchtungsversuch.....	72
1.1	Verhalten.....	72
1.1.1	Head twitches.....	72
1.1.1.1	Kontrollen.....	72
1.1.1.2	Rolipram.....	72
1.1.2	Forepaw shaking.....	74
1.1.2.1	Kontrollen.....	74
1.1.2.2	Rolipram.....	74
1.1.3	Grooming.....	76
1.1.3.1	Kontrollen.....	76
1.1.3.2	Rolipram.....	76
1.1.4	Scratching.....	78
1.1.4.1	Kontrollen.....	78
1.1.4.2	Rolipram.....	78
1.1.5	Genital grooming.....	80
1.1.5.1	Kontrollen.....	80
1.1.5.2	Rolipram.....	80
1.1.6	Pelvic thrust.....	81
1.1.6.1	Kontrollen.....	81
1.1.6.2	Rolipram.....	81
1.1.7	Sniffing.....	82
1.1.7.1	Kontrollen.....	82
1.1.7.2	Rolipram.....	82
1.1.8	Digging.....	84
1.1.8.1	Kontrollen.....	84
1.1.8.2	Rolipram.....	84
1.1.9	Sleeping.....	86
1.1.9.1	Kontrollen.....	86
1.1.9.2	Rolipram.....	86
1.1.10	Yawning.....	88
1.1.10.1	Kontrollen.....	88
1.1.10.2	Rolipram.....	88
1.2	Klinisch - chemische Parameter.....	90
1.2.1	Melatonin.....	90
1.2.2	Corticosteron.....	90
1.2.2.1	Kontrollen.....	90
1.2.2.2	Rolipram.....	90
1.2.3	Glukose.....	92
1.2.3.1	Kontrollen.....	92
1.2.3.2	Rolipram.....	92
1.3	Temperatur - Regulation.....	94
1.3.1	Ausgangstemperaturen.....	94
1.3.2	Temperaturen nach Verhaltensbeobachtung.....	95
2	Hauptversuch Teil 1.....	96
2.1	Verhalten.....	96
2.1.1	Head twitches.....	96
2.1.1.1	Kontrollen.....	96
2.1.1.2	Rolipram.....	96
2.1.2	Forepaw shaking.....	98
2.1.2.1	Kontrollen.....	98
2.1.2.2	Rolipram.....	98
2.1.3	Grooming.....	100
2.1.3.1	Kontrollen.....	100
2.1.3.2	Rolipram.....	100
2.1.4	Scratching.....	102
2.1.4.1	Kontrollen.....	102
2.1.4.2	Rolipram.....	102
2.1.5	Genital grooming.....	104
2.1.5.1	Kontrollen.....	104

2.1.5.2	Rolipram.....	104
2.1.6	Pelvic thrust.....	105
2.1.6.1	Kontrollen	105
2.1.6.2	Rolipram.....	105
2.1.7	Sniffing.....	106
2.1.7.1	Kontrollen	106
2.1.7.2	Rolipram.....	106
2.1.8	Digging.....	108
2.1.8.1	Kontrollen	108
2.1.8.2	Rolipram.....	108
2.1.9	Sleeping.....	110
2.1.9.1	Kontrollen	110
2.1.9.2	Rolipram.....	110
2.1.10	Yawning	112
2.1.10.1	Kontrollen	112
2.1.10.2	Rolipram.....	112
2.2	Klinisch - chemische Parameter	114
2.2.1	Melatonin	114
2.2.2	Corticosteron	114
2.2.2.1	Kontrollen	114
2.2.2.2	Rolipram.....	114
2.2.3	Glukose	116
2.2.3.1	Kontrollen	116
2.2.3.2	Rolipram.....	116
2.3	Temperatur - Regulation	118
2.3.1	Ausgangstemperaturen	118
2.3.2	Temperaturen nach Verhaltensbeobachtung.....	120
3	Hauptversuch Teil 2	122
3.1	Verhalten.....	122
3.1.1	Head twitches	122
3.1.1.1	Kontrollen	122
3.1.1.2	Rolipram.....	122
3.1.2	Forepaw shaking.....	124
3.1.2.1	Kontrollen	124
3.1.2.2	Rolipram.....	124
3.1.3	Grooming	126
3.1.3.1	Kontrollen	126
3.1.3.2	Rolipram.....	126
3.1.4	Scratching.....	128
3.1.4.1	Kontrollen	128
3.1.4.2	Rolipram.....	128
3.1.5	Genital grooming.....	130
3.1.5.1	Kontrollen	130
3.1.5.2	Rolipram.....	130
3.1.6	Pelvic thrust.....	131
3.1.6.1	Kontrollen	131
3.1.6.2	Rolipram.....	131
3.1.7	Sniffing.....	132
3.1.7.1	Kontrollen	132
3.1.7.2	Rolipram.....	132
3.1.8	Digging.....	134
3.1.8.1	Kontrollen	134
3.1.8.2	Rolipram.....	134
3.1.9	Sleeping.....	136
3.1.9.1	Kontrollen	136
3.1.9.2	Rolipram.....	136
3.1.10	Yawning	138
3.1.10.1	Kontrollen	138
3.1.10.2	Rolipram.....	138

3.2	Klinisch - chemische Parameter	140
3.2.1	Melatonin	140
3.2.1.1	Kontrollen	140
3.2.1.2	Rolipram.....	140
3.2.2	Corticosteron	142
3.2.2.1	Kontrollen	142
3.2.2.2	Rolipram.....	142
3.2.3	Glukose	144
3.2.3.1	Kontrollen	144
3.2.3.2	Rolipram.....	144
3.3	Temperatur - Regulation	146
3.3.1	Ausgangstemperaturen	146
3.3.2	Temperaturen nach Verhaltensbeobachtung.....	148
	Diskussion.....	150
	Beleuchtung	150
	Beleuchtungsversuch.....	150
	Corticosteron.....	152
	Hauptversuch Teil 1 und 2	152
	Beleuchtungsversuch und COR.....	153
	Glukose	154
	Hauptversuch Teile 1 und 2	154
	Beleuchtungsversuch.....	155
	Melatonin	156
	Verhalten.....	159
	Regulation der Körpertemperatur.....	162
	Beleuchtungsversuch.....	163
	Resümee	164
	Zusammenfassung	167
	Literatur.....	169
	<u>Abkürzungen</u>	198

Einleitung

Seit Langem ist bekannt, dass in der belebten Welt rhythmische Phänomene auftreten. Dazu zählen auch diejenigen rhythmischen Veränderungen, die spontan oszillieren oder von äußeren Bedingungen beeinflusst werden. Einen starken Antrieb stellt dabei das Sonnenlicht dar. Es synchronisiert eine Vielzahl von biologischen Rhythmen, die ansonsten eine vom (Sonnen-) Tag abweichende Zeitdauer haben, somit freilaufend sind. Von diesen sogenannten circadianen Rhythmen werden einige durch den Lichtwechsel gefördert oder gehemmt, woraus sich Schwankungen, z.B. bei Verhalten, Hormonkonzentrationen oder Körpertemperatur ergeben können. Neben diesen natürlichen Schwankungen treten zusätzlich pathologische Abweichungen auf, die abhängig von Start- oder Stoppsignalen dann auch Krankheitswert besitzen können.

Das Erkennen dieser Abweichungen trägt zur Diagnose von Erkrankungen bei, bei denen sich im Verlauf der Behandlung diese pathologisch veränderten Rhythmen wieder normalisieren können. Besonders ausgiebig beschrieben sind diese Veränderungen bei der hormonellen Regulation, da diese als Reaktion auf die Umwelt phasisch reguliert wird. Neben klassischen externen Reizen wie dem Anstieg der Außentemperatur oder internen Reizen wie der Nahrungsaufnahme können aber auch komplexe, psychisch ausgelöste Reaktionen wie beim Fluchtreflex auftreten. Bei allen diesen Reaktionen handelt es sich um eine Antwort auf eine von außen erfolgte Istwert Verstellung eines Regelkreises, die eine ausgleichende Regulation in Richtung Sollwert oder Sollwertbereich bewirkt. Die dazu erforderlichen Stellglieder oder –kreise sind oft mehrgliedrig, so dass an verschiedenen Zwischenschritten ergänzende oder zusätzliche Einflussmöglichkeiten bestehen. Die dadurch komplexen Einflussmöglichkeiten erschweren einerseits die Einstellung eines Zielwerts, erlauben andererseits aber auch eine verfeinerte Regulation. Die Anwendung dieser Kenntnisse bewirkt die Entwicklung vor allem bei der Behandlung Erkrankter eingesetzter medikamentöser Mittel, die dann als Pharmakon diese pathologisch veränderten Zustände beeinflussen und im besten Fall wieder in einen ausgeglichenen Zustand überführen sollen. Die anders als bei den körperlichen Reaktionen schwerer fassbaren psychischen Abweichungen haben zur Entwicklung von modellhaften Annahmen geführt, bei denen über die Beeinflussung einzelner oder mehrerer Regelkreise eine Therapie begründet wird.

In der Psychiatrie hat die medikamentöse Therapie aufgrund von Beobachtungen und daraus resultierender Modelle im Formenkreis der affektiven Störungen eine lange Tradition. Dieser Therapie kommt durch die Entdeckung von Transmittersystemen im Zentralen Nervensystem (ZNS) und deren Lenkung mittels spezifisch entwickelter Substanzen eine große Bedeutung zu. Dabei haben die entwickelten Substanzen durch ihre unterschiedlichen Angriffspunkte Haupt- und Nebenwirkungen.

Eine wesentliche Gruppe von Transmittersubstanzen sind die Monoamine. Zur Erfassung der Wirkung der unterschiedlichen, eingesetzten Substanzgruppen sind umfangreiche Studien erforderlich. Dies hat bei der Weiterentwicklung von Hypothesen zur Beeinflussung einzelner Monoaminstoffwechselsysteme zum Einsatz einer Gruppe von Substanzen geführt, die einen gemeinsamen postsynaptischen Signalweg durch die Hemmung des Abbaus des „second messenger“ cAMP beeinflussen können.

Diese Gruppe von ursprünglich als Psychopharmaka konzipierten Phosphodiesterasehemmer (PDE-Hemmer) hat durch die Entdeckung weiterer Wirkorte und damit verbundener, somit beeinflussbarer Krankheitsbilder zu einer Erweiterung ihrer Anwendungsuntersuchung geführt. So werden diese Substanzen inzwischen auch bei der Behandlung von akuten oder chronischen Entzündungen wie bei chronisch obstruktiven Lungenerkrankungen, an Haut oder Gelenken sowie für Darmerkrankungen (wie der Colitis ulcerosa) untersucht. Ein weiteres getestetes Einsatzge-

biet ist die Regeneration nervaler Gewebe, die im Verlauf einer autoimmunen Hirnentzündung oder nach Rückenmarksverletzungen beschädigt wurden.

Viele der hier angesprochenen Regelkreise im Organismus sind einerseits hierarchisch organisiert und unterliegen andererseits dabei circadianen Rhythmen oder Regelungsvorgängen. Daher erscheint bei der Untersuchung von zentralwirksamen Substanzen die Beachtung der Beeinflussbarkeit von circadianen Rhythmen erforderlich. Aus der klinischen Anwendung ist schon bei anderen Substanzgruppen wie den Analgetika deren circadian abhängige Wirksamkeit beschrieben. Für die Untersuchung von Erkrankungen, denen circadian abhängige zentrale Regelkreise zugrunde liegen, bedarf es 1.) der Kenntnis beteiligter oder vermuteter Transmittersysteme und 2.) der Erkenntnis, ob deren Regulation einer circadianen Rhythmik unterliegt. Wenn dies der Fall ist, bedarf es 3.) der Untersuchung der Fähigkeit der Beeinflussung dieser Systeme durch eine pharmakologisch wirksame Substanz zu vermuteten oder gut definierten Messzeitpunkten, an denen die Wirkung des Pharmakons als besonders effektiv angenommen wird oder nicht. Da aber circadiane Systeme sich zu den unterschiedlichen Phasen verschieden beeinflussen lassen können, kann eine orientierende Untersuchung zu möglichen, verschieden ausfallenden Wirkungen nur über den gesamten Tag erfolgen. Daher stellt die Anwendung von Substanzen mit vermutetem circadianen Hintergrund eine besondere Herausforderung an die Untersuchung ihrer Wirkungen. Um diese Beeinflussung von circadianen Rhythmen aussagekräftig untersuchen zu können, ist daher die Nutzung von Modellen erforderlich, denen eine derartige Rhythmizität zugrunde liegt bzw. bei denen eine derartige Rhythmizität aufgrund der beteiligten Stoffe, wie z.B. bei Hormonen vermutet wird.

In der Depressionsforschung ist neben der generellen Stimmungsschwankung über längere Zeiträume auch die tageszeitlich abhängige Ausprägung von Stimmungen beschrieben worden. Damit besteht die Möglichkeit, dass die zu bestimmten Tageszeiten erfolgte pharmakologische Beeinflussung besonders effektive Zeitpunkte ermittelt, an denen die erwünschte Substanzwirkung am höchsten ist. Daher soll in der nachfolgenden Untersuchung bei einem PDE 4 Hemmer (Rolipram) in einem Depressionsmodell - ausgehend von seinem in der Ratte ausgelösten Verhaltenssyndrom - die Beeinflussbarkeit von Verhalten und zentralen Hormonen zu unterschiedlichen Tageszeitpunkten untersucht werden. Durch die neben den klassischen katecholaminergen Transmittersystemen zusätzlich vorhandenen weiteren Angriffsmöglichkeiten dieser Substanz bei der Stressregulation sollen im Blut Parameter der sogenannten Stressachse wie Kortikosteron (COR) gemessen und davon abhängige periphere Regelkreise (Leber) durch die Messung der Glukosekonzentrationen ergänzend beschrieben werden.

Die hier gewonnenen Ergebnisse sollen dann im Rahmen der durch „Corticotropin releasing hormone“ (CRH) hervorgerufenen Effekte an der übergeordneten „Limbic-System-Hypothalamo-Pituitary-Adrenal-Axis“ (LHPA-Achse) in einem Depressionsmodell beschreiben, ob Rolipram in die Stressregulation eingreifen kann, da deren Beeinflussung in diesen Depressionsmodellen ein hoher Stellenwert eingeräumt wird.

Die in verschiedenen Depressionsformen gefundenen circadianen Rhythmusstörungen betreffen neben Veränderungen in der Schlafarchitektur auch die anderer biologischer und neuroendokriner Rhythmen. Ein besonders gut untersuchtes System ist dabei das LHPA-System, das auch als Stressachse bezeichnet werden kann. Durch die Entdeckung antidepressiv wirksamer Substanzen, die über die Beeinflussung zentraler Monoamin-Stoffwechselwege ihre Wirkung entfalten, sind als gemeinsame postsynaptische Endstrecke „second messenger“ wie zyklisches Adenosin-3',5'-monophosphat (cAMP) bekannt und in ihrer Beeinflussbarkeit untersucht worden. Die Entwicklung von PDE-Hemmern wie Rolipram (als spezifischer PDE 4 Hemmer) führte zur Untersuchung seiner antidepressiven Wirksamkeit in verschiedenen Tiermodellen. Durch seine Wirkung, zentral cAMP-Konzentrationen erhöhen zu können, konnten in autoradiographischen Untersuchungen hohe Anreicherungsraten im Bereich des limbischen Systems gefunden werden.

Weitere beeinflusste Hirnareale sind die noradrenergen (NA-ergen) Neurone im Locus coeruleus. Es besteht eine enge Verbindung von autonomen und neuroendokrinen Fasern der Stressachse und den verschiedenen katecholaminergen und indolaminergen Neurotransmittern. Da durch die Sekretion von CRH eine Modulation der Stressantwort mit Aktivierung motorischen Verhaltens sowie eine Ausschüttung peripher wirksamer Hormone erfolgt, werden dabei auf allen Ebenen NA-erge Neurone stimuliert und cAMP sowohl bei der CRH-Genexpression als auch bei der Ausschüttung von „Adrenocorticotropem Hormon“ (ACTH) als Modulator beschrieben. Da eine Wechselwirkung zwischen Stress und Affekterkrankungen besteht, kann auch in Tiermodellen eine Verbindung zwischen der LHPA-Achse und den entsprechenden (Transmitter)-Systemen hergestellt werden. Eine Störung der peripheren Kortikosteroid-Rückkopplung auf die zentrale CRH-Ausschüttung wird derzeit bereits als diagnostisches Verfahren eingesetzt.

Neben diesen Aspekten der Verknüpfung von cAMP mit der Stressachse kann über die bei Depressiven zusätzlich beeinträchtigten circadianen Rhythmen eine Verbindung zwischen den dortigen Regelkreisen und der LHPA-Achse beschrieben werden. CRH setzt neben den corticotropen Hormonen auch Vorläufer des Melatonins (MEL) frei. MEL wird über einen lichtabhängigen Regelkreis von der Retina zum Nucleus suprachiasmaticus (SCN) gesteuert von der Epiphyse sezerniert. Zur Etablierung eines Rhythmus' werden auf der Ebene der Genexpression durch verschiedene Periodogene die notwendigen Proteine für die Entstehung der Regelkreise kodiert. Hier sind aber ebenfalls NA-erge Systeme, z.T. mit peripheren Regelkreisen über das obere Halsganglion (SCG) mit nachfolgender cAMP-Freisetzung beteiligt, die für die Expression der MEL-bildenden Enzyme verantwortlich sind. Damit ist MEL sowohl photoperiodisch abhängig, als auch durch NA-erge Systeme direkt beeinflussbar. Die Regelkreise für CRH als auch für MEL weisen bei den beteiligten Proteinen eine hohe genetische Konstanz zwischen Versuchstieren und Menschen auf. Deshalb können entsprechende Ergebnisse von Untersuchungen aus Tiermodellen auf den Menschen übertragbar sein.

Der PDE-Hemmer Rolipram bietet aufgrund seines pharmakologischen Profils die Möglichkeit, bei Durchführung einer Untersuchung zu verschiedenen Tageszeiten dessen unterschiedliche Wirksamkeit zu untersuchen.

In dieser Untersuchung soll erstmals gezeigt werden, ob die Gabe von Rolipram zu unterschiedlichen Zeitpunkten Veränderungen im bisher beschriebenen Verhaltenssyndrom beobachten lässt. Durch die Unterteilung in substanztypisch induziertes oder endogen vorhandenes Verhalten können Hinweise auf mögliche, zugrundeliegende Regelkreise gewonnen werden. Aufgrund des speziellen Verhaltenssyndroms in Ratten kann so ein tageszeitlich abhängiger Effekt eindeutig beschrieben werden. Durch seine weiteren Wirkungen auf die Veränderungen bei cAMP können die eng miteinander verknüpften Systeme Depression, Stress und circadianer Rhythmus durch die summarische Untersuchung von peripher messbaren Hormonen wie COR und MEL unter dem Blickwinkel der Tageszeit neu und erweiternd beschrieben werden. Zur besseren Beschreibung peripherer Effekte werden neben der bereits im Verhaltenssyndrom erfassten Veränderungen der Körpertemperatur (KT) für weitere periphere Effekte von COR die Blutglukosekonzentrationen gemessen.

Zur Durchführung einer Verhaltensbeobachtung zu unterschiedlichen Tageszeiten ist in der Dunkelphase eine die an den Tieren untersuchten Parameter nicht störende Beleuchtung erforderlich. Bisher wurde in solchen Untersuchungen die Farbe „rot“ mit einer geringen Intensität eingesetzt. Um den Effekt der hier eingesetzten Farbe „rot“ besser beschreiben zu können, werden in einem zusätzlichen Versuch neben einem in die Dunkelphase verschobenen Beginn der Hellphase auch verschiedene Beleuchtungsfarben neben „rot“ während der Hellphase benutzt. Damit soll der Einfluss der ausschnittshaften Wellenlängen der Beleuchtungsfarben gegen die weiße Beleuchtung als Mischung der sichtbaren Wellenlängen dargestellt werden, um mögliche farbabhängige Veränderungen sowohl bei Verhalten als auch untersuchten Hormonen erfassen zu können.

Da aus Arbeiten von Holsboer (s. Literaturliste) bekannt ist, dass die gemeinsame Endstrecke in der Regulation der LHPA-Achse bei der Depression eine entscheidende Rolle spielen kann, ist sowohl zentral als auch peripher die Verfügbarkeit des vorhandenen cAMP bei der Sekretion von CRH und seinem peripheren Hormon COR wesentlich. Die dabei zugrundeliegenden Enzyme des cAMP-Stoffwechsels, wie z.B. die durch PDE-Hemmer beeinflussten abbauenden Phosphodiesterasen, weisen eine hohe Homologie zwischen Tierspezies und dem Menschen auf, so dass auch diese Ergebnisse ihrer veränderten Aktivität auf die Anwendung im Menschen übertragbar sein können.

Zur Darstellung der möglicherweise über zentrale Mechanismen induzierten Freisetzung von Kortikoiden sollen auch aufgrund dieser Annahmen deren periphere Effekte ebenfalls durch die Messung der Blutglukose beschrieben werden.

Da über die LHPA-Achse durch CRH die Induktion von Genprodukten für eine lichtabhängige Variable, das Melatonin, auch über einen katecholaminerg vermittelten Einfluss via cAMP erfolgen kann, soll durch diese Untersuchung der Einfluss von Rolipram auf die Sekretion von Melatonin und dessen mögliche zeitliche Abhängigkeit bewertet werden.

Somit können durch die Untersuchung zusätzliche Erkenntnisse über die mögliche Wirksamkeit und Effektivität von Rolipram als Indikatorsubstanz der PDE 4-Hemmer gewonnen werden. Bei der Entdeckung von Wirkmechanismen und ihrer therapeutischen Beeinflussbarkeit in der Behandlung der Depression können diese dann entsprechend der neuen Therapieansätze, z.B. mit CRH-Antagonisten, auf molekularer oder genetischer Ebene berücksichtigt werden.

Zu Beginn der weiteren Ausführungen soll auf die Grundlagen in der Depressionsforschung eingegangen werden.

Depression

Epidemiologie

Die Punktprävalenz von Depressionen als häufigster affektiver Störung in der deutschen Bevölkerung beträgt 8 bis 10%. Weltweit werden bis zu 98,7 Mio. Menschen davon betroffen (WHO, The Global Burden of Disease: 2004, Update 2008). Für die „Major Depression“ liegt die Prävalenz in Deutschland bei 1,5 bis 5%. Auf etwa 1% wird das Morbiditätsrisiko affektiver Psychosen geschätzt (Riederer, Laux: Definition, Einteilung, Chemie in Riederer, Laux, Pöldinger (Hrsg.): Neuro-Psychopharmaka 1993 und Möller, Laux, Deister: Psychiatrie und Psychotherapie 2001). Für die Beleuchtung ihrer sozioökonomischen Relevanz ist wesentlich zu wissen, dass bei affektiven Störungen die Suizidrate als bis zu 20fach höher als in der übrigen Bevölkerung beschrieben wird (Pompili et al. 2009).

Klassifizierung

Nach traditionellen nosologischen Kriterien wurden psychogene, exogene und endogene Psychosen unterschieden (entsprechend dem sogenannten „Triadischen System der psychiatrischen Nosologie“) (Hole: Diagnostik und Diagnosewandel bei der Depression in Faust, Hole (Hrsg.): Depressionen 1982). Ergänzt worden ist diese Einteilung durch das Konzept der multifaktoriellen Ätiologie, da auch psychogene Erkrankungen einen gewissen genetischen Hintergrund haben können (Möller, Laux, Deister: Psychiatrie und Psychotherapie 2001). Zur Bewertung einzelner Erkrankungen ist heute die jeweilige Relevanz der Faktoren zu berücksichtigen. Das Nebeneinander verschiedener Klassifikationssysteme wie ICD (International Classification of Diseases) und DSM (Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders) erhält die überkommenen Syndrombegriffe und erweitert sie um die Ergebnisse der neueren Forschung (Möller, Laux, Deister: Psychiatrie und Psychotherapie 2001). Bei den psychogenen Störungen sind äußere Ereignisse bzw. eine neurotische Persönlichkeitsstruktur oft krankheitsdeterminierend. Die exogenen Störungen sind oft Folge von Erkrankungen des Gehirns oder körperlicher Funktionsstörungen. Bei endogenen Störungen wie den manisch-depressiven Erkrankungen sollen biologische Anlagefaktoren eine zentrale Bedeutung haben.

Bei den manisch-depressiven Erkrankungen, bei denen situative Einflüsse, psychopathisch-neurotische Persönlichkeitsveränderungen oder somatische Faktoren als Anteile des jeweiligen Syndroms vorhanden sind, handelt es sich um die am längsten in der Medizingeschichte zurückverfolgbare Form der affektiven Störung. Sie wurde als Melancholie bereits im Corpus hippocraticum im 5. Jh. v. Chr. erwähnt.

Nach der ICD 10 wird bei den affektiven Störungen zwischen rein manischen oder depressiven Episoden unterschieden. Bei den bipolaren Störungen wird der jeweilig vorherrschende Anteil als führendes Syndrom beschrieben. Die weitere Einteilung erfolgt nach Verlauf (rezidivierende depressive Störung) oder als anhaltende oder andere affektive Störung (Möller, Laux, Deister: Psychiatrie und Psychotherapie 2001).

Klinik

Für die Diagnostik gliedern sich die Symptome in die Bereiche psychisch, psychomotorisch und psychosomatisch-vegetativ. Als psychische Kernsymptome werden dabei die depressive Verstimmung, Schlafstörungen, Unfähigkeit zum Denken und Handeln mit Entschlusslosigkeit bis hin zur Apathie, aber auch innere Unruhe, beschleunigtes Denken, Selbstüberschätzung, Angst, Hoffnungslosigkeit und Generation von suizidalen Gedanken beobachtet. Psychomotorisch kann entweder eine sogenannte Plus-Symptomatik mit äußerer Unruhe oder innerem Antriebssein oder eine Minus-Symptomatik mit gehemmtem Antrieb bis hin zum Stupor auftreten. Im psychosomatischen Bereich sind eine Vielzahl von Störungen der vegetativen Funktionen (Appetitlosigkeit, Libidoverlust), Befindlichkeitsstörungen und Veränderungen des Schlaf-Wach-Gefüges möglich (Möller, Laux, Deister: Psychiatrie und Psychotherapie 2001).

Therapie

Grundlegender Teil der Behandlung ist eine Gesprächsbegleitung, die jeweils um eine medikamentöse, psychotherapeutische oder weitere Komponente ergänzt wird. Bei den biologischen Therapien stehen heute Antidepressiva im Vordergrund. Die Elektrokampftherapie steht bei schweren Verläufen, die chronobiologisch begründeten Therapieansätze wie die Schlaf-Entzugstherapie oder Lichttherapie bei endogenen Rhythmusstörungen zur Verfügung. Antidepressiva (AD) können symptombezogen nach ihrer psychomotorischen Wirkung in psychomotorisch aktivierend bis sedierend eingeteilt werden. Entsprechend der Symptome werden sie allein oder in Kombination mit Neuroleptika oder Benzodiazepin-Tranquilizern verwendet. Dabei werden trizyklische AD aufgrund ihrer cholinergen Nebenwirkungen einschleichend dosiert. Stattdessen können auch selektive Serotonin-Wiederaufnahme-Hemmer, Monoaminoxidase-A-Hemmstoffe oder selektiv serotonerg/ noradrenerg wirkende AD verwendet werden. Nach mehreren Episoden einer depressiven Erkrankung ist eine Langzeitbehandlung erforderlich, eine Rezidivprophylaxe bei bipolar affektiven Psychosen und rezidivierenden manischen Episoden kann mit Lithium oder Carbamazepin durchgeführt werden (Möller, Laux, Deister: Psychiatrie und Psychotherapie 2001).

Ätiopathogenese

Zur Ätiopathogenese haben sich drei grundlegende Aspekte herausgehoben.

Genetische Determinanten

An den affektiven Psychosen sind Erbfaktoren beteiligt, die besonders bei bipolaren affektiven Psychosen durch Familien- und Zwillingsstudien belegt werden konnten. Weil bis heute Erbgang und -substrat nicht eindeutig bekannt sind, wird von weiteren Faktoren in der Entstehung von affektiven Erkrankungen ausgegangen (Möller, Laux, Deister: Psychiatrie und Psychotherapie 2001).

Psychologische Faktoren

Die psychoreaktive Auslösung durch kritische Lebensereignisse oder die Modellvorstellung einer „Trauerarbeit“ auf den Verlust eines geliebten Objekts stellen Mechanismen in der Entstehung von Depressionen dar. Hinzu kommen kognitions- und lerntheoretische Ansätze einer einseitigen Wahrnehmung und Interpretation sowie das Konzept der „gelernten Hilflosigkeit“ (Möller, Laux, Deister: Psychiatrie und Psychotherapie 2001).

Neurobiologische Aspekte

Bei verschiedenen Formen der Depression (saisonal, endogen) zeigen sich circadiane Rhythmusstörungen als Ausdruck chronobiologisch wirksamer Faktoren mit mehr oberflächlichen Schlafstadien, Auftreten einer verkürzten REM-Latenz und Desynchronisierung biologischer Rhythmen wie der Verschiebung von Schlaf-Wach-Phasen und neuroendokrinen Rhythmen (adrenocorticotropes System).

Da bei der endogenen Depression keine organischen Befunde, speziell keine neuropathomorphologischen gefunden werden konnten, konzentrierte sich die weitere Suche nach Erklärungsansätzen auf den Bereich der funktionellen Störungen der Neurotransmission. Die damit verbundene Geschichte der Entdeckung der AD ist auch die Geschichte von Zufällen. Aus Indien waren schon lange Berichte bekannt, dass Abkochungen des Strauches *Rauvolfia serpentina* zur Beruhigung von Geisteskranken eingesetzt wurden. Gesamtalkaloide waren als Hypotensivum eingesetzt worden, bis Reserpin als Reinsubstanz eines Alkaloids dieses Strauches 1952 isoliert wurde, das bei Hypertoniepatienten depressionsauslösend wirken konnte.

Kuhn erkannte 1957 die antidepressive Wirkung von Imipramin, dem ersten trizyklischen Antidepressivum. Aus theoretischer Sicht entwickelte sich durch Nachweis der depressionsfördernden Wirkung von Reserpin die Hypothese des Monoamin-Mangels in der Depression. Schildkraut bezog dies 1965 auf das noradrenerge (NA-erge) System, Coppen formulierte 1967 seine Hypothese der Dysfunktion des zentralen Serotonin -(5-HT)-Systems. 1969 wurde durch Lapin und Oxenkrug diese Mangel-Hypothese mit der Einbeziehung von 5-HT erweitert.

Van Praag beschrieb 1974 und 1982 bei depressiv erkrankten Patienten eine selektive Störung

eines der Neurotransmitter 5-HT oder Noradrenalin (NA); Birkmayer publizierte 1977 seine Hypothese einer Balancestörung von 5-HT und NA. Janowsky et al. hatten dazu bereits 1972 eine Dysbalance zwischen cholinergem und NA-ergem System angenommen. Matussek publizierte 1978 und 1980 Ergebnisse zu einer verringerten postsynaptischen Empfindlichkeit NA-erger Rezeptoren bei Depressiven. Sulser erklärte dies 1978 mit einer „ β -Adrenoceptor-downregulation“ und einer Verminderung des „Second messengers“ cAMP im zentralen NA-ergen System nach chronischer Applikation von AD. Maj, Przegalinski und Mogilnicka zeigten 1984 im Tierexperiment nach chronischer Behandlung mit trizyklischen AD die Herabsetzung der Dichte von β -Rezeptoren, deren „Down-regulation“ an eine intakte 5-HT-Funktion gebunden ist (Racagni, Brunello 1984).

Mit diesen Hypothesen sollten die Wirkprinzipien der klinisch eingesetzten AD und ihr verzögerter Wirkungseintritt erklärt werden.

1990 wurde die „Second-messenger-dysbalance“-Hypothese von Wachtel veröffentlicht, die die bisherigen Ansätze in der Transmitterforschung integrierte und die Wirkungsweisen klinisch eingesetzter AD auf der Ebene der Signaltransduktion bündelte. Ausgangspunkt dieses Konzepts für die Ätiologie affektiver Erkrankungen war der antidepressive Mechanismus von Risperidon.

Rolipram

Substanzcharakterisierung

Rolipram ist ein Racemat des 4RS-(3-Cyclopentyloxy-4-methoxyphenyl)-pyrrolidon. Seine pharmakologische Wirkung erzielt Rolipram über die selektive Hemmung einer cAMP-spezifischen Phosphodiesterase (PDE) (Schneider 1984). Da diese physiologischerweise den Abbau des zyklischen Nukleotids cAMP hemmt, erhöht Rolipram in vivo deshalb die cAMP-Konzentration im Gehirn (Schneider 1984).

Nach der jetzt üblichen molekularbiologischen Klassifikation wird die Rolipram-sensitive PDE als PDE Typ 4 (PDE 4) bezeichnet (Beavo 1995, Miro et al. 2002).

Pharmakologie in vitro

PDEn werden durch 21 Gene kodiert (Bender, Beavo 2006) und zurzeit in die Genfamilien 1 bis 11 eingeteilt (Hetman et al. 2000, Miro et al. 2002, Matsumo, Kobayashi, Kamata 2003), die über 50 Enzyme kodieren (Lugnier 2006). Von diesen können acht Genfamilien über 30 Isoformen generieren, die cAMP metabolisieren können (Beavo, Brunton 2002, Conti et al. 2003, Houslay, Adams 2003). Diese Genprodukte weisen jeweils 65 oder mehr Prozent an Sequenzhomologien auf. Die gebildeten m-RNA „Splice“-Varianten dieser Subtypen kodieren für gewebe- und zelltypische PDE-Isoformen. Durch posttranskriptionale und posttranslationale Modifikationen können weitere funktionelle Varianten entstehen.

Die PDE 4-Familie wird durch vier Gene kodiert, die durch verschiedene Promoter und m-RNA splice-Varianten für mindestens 25 Subgruppen kodieren, die mit A bis D benannt werden (Chandrasekaran et al. 2008, Zhang 2009). Die Isoformen werden durch unterschiedliche UCR (upstream conserved regions) (lang, kurz, superkurz) in die verschiedenen Gruppen eingeteilt (Conti et al. 2003, Houslay, Adams 2003). Die Langformen sind am wichtigsten für die cAMP-Hydrolyse (Baillie et al. 2000).

Bindungsstelle

Die hochaffine Bindungsstelle im Gehirn in vivo und in vitro für Rolipram ist die PDE 4 (Schneider et al. 1986, Nemoz et al. 1985). Diese Calcium- und CaM-unabhängige PDE (Picq et al. 1989) hat eine dominante Rolle in der Kontrolle der cAMP-Hydrolyse im Rattenkortex ex vivo und in vitro (Whalin et al. 1988, Challiss, Nicholson 1990). Sie stellt dabei etwa 10-25% der gesamten cerebralen cAMP-spezifischen PDE-Aktivität dar (Kincaid et al. 1984, Schultz, Schmidt 1986, Nemoz et al. 1989). Die Bindung an den Subtyp 4 B (Cherry, Davis 1999, Zhu, Mix, Winblad 2001) ist beim Menschen eher verknüpft mit Schizophrenie (Millar et al. 2005). Eine weitere Verknüpfung von PDE Typ und psychiatrischen Erkrankungen besteht über die Auswirkung von Mutationen des „Disrupted-in-schizophrenia 1“ Proteins (DISK 1). PDE4 B knockout Mäuse entwickeln ein Angst- (Zhang et al. 2008), aber auch ein antidepressiv-ähnliches Verhalten (O'Donnell, Zhang 2004), das der Hemmung der PDE4 durch Rolipram entspricht. Rolipram

kann in einem Huntington-Modell die Verhaltens- und kognitiven Defizite verringern (R6/2 Mausmodell, DeMarch et al. 2008, Giampa et al. 2009). Mäuse mit DISC1 Q31L Mutation zeigen depressives Verhalten, bei LP100 Mutation (PDE4 B Mutation mit Bindungsstellenverlust in Exon 2) schizophrenes Verhalten. Q31L Mutanten haben in diesem Schizophreniemodell eine verringerte PDE4 B, wodurch Rolipram keine antidepressive Wirkung zeigt (Clapcote et al. 2007). Damit kann eine Verbindung hergestellt werden zwischen den Mutationen von Huntingtin und DISC1 und der Symptomatologie der Huntington Erkrankung und den schweren psychiatrischen Erkrankungen Schizophrenie und Depression (Boxall, Porteous, Thomson 2011). Die antidepressive Wirkung ist verknüpft mit dem Subtyp 4 D (Zhang et al. 2002). PDE4 D ist zusätzlich als der im Hippocampus dominante Subtyp vorherrschend für die Vermittlung von Gedächtnis verantwortlich (Pérez-Torres et al. 2000), das durch eine Überexpression der PDE4 D beeinträchtigt wird (Giorgi et al. 2004).

Die Wechselwirkung von Rolipram auf die PDE4 kann in vier Bereiche aufgeteilt werden (Atkins et al. 2007):

- 1) die Bindung von Rolipram an seine Bindungsstelle mit niedriger Affinität, die katalytische Stelle mit Hemmung der cAMP-Hydrolyse,
- 2) die Bindung an eine Bindungsstelle mit hoher Affinität, ohne Einfluss auf die cAMP-Hydrolyse, mit cAMP-unabhängiger Wirkung auf die PDE, unter Einbeziehung des Mitogen-activated protein kinase (MAP-Kinase-) Signalwegs (Martin et al. 2002, Zhao, Zhang, O'Donnell 2003),
- 3) die Hemmung der cAMP-Hydrolyse und Erzielen von antientzündlichen Effekten über den cAMP-Rezeptor „Exchange protein directly activated by cAMP 1“ (Epac1), das Ras Guanosintriphosphatasen (GTPasen) aktiviert und
- 4) über aktivierte Rezeptoren der c Kinase1 mit nachfolgender Proteinkinase C (PKC) Aktivierung (Houslay, Adams 2003).

Rolipram bindet an seine zerebrale Bindungsstelle in vitro hochaffin mit einer Dissoziationskonstanten K_d zwischen 1,2 und 2,4 nM (Membran vs. Zytosol) (Schneider et al. 1986). Mit einer IC_{50} von 1 μ M zeigt Rolipram in vitro eine spezifische Hemmung an, die in dieser Zeit nur von anderen spezifischen PDE 4-Hemmern wie ICI 63.197 und Ro 20-1724 erreicht wird (Davis 1984). Eine Dosis von 0,3 mg/kg bei Ratten i.v. reicht zur signifikanten Steigerung der Hirn-cAMP-Konzentration aus (Schneider 1984). Die stereospezifische Bindung in vivo charakterisieren die Dissoziationskonstanten K_d von 0,9 nM für das (-)- Enantiomer und 4,3 nM für das (+)- Enantiomer. Eine Bindung in peripheren Organen ist nicht oder nur in geringer Spezifität vorhanden. Innerhalb des Gehirns zeigt Rolipram kaum Unterschiede zwischen verschiedenen Säurespezies in vitro (Schneider et al. 1986).

Bei der Ratte ergeben sich im Hirn ex vivo die höchsten Anreicherungsraten als Ausdruck spezifischer Bindungsstellen von 3 H-Rolipram bei der Autoradiografie in limbischen Arealen (Bulbus olfactorius, Hippocampus, Gyrus cinguli, Nucleus amygdaloideus und septalis und die perirrhinalen und präfrontalen Regionen). Hohe Raten werden im Neocortex, Cerebellum, Hippocampus, der Neurohypophyse und den Nuclei laterodorsalis und lateralis posterior des Thalamus gemessen (Kaulen et al. 1989).

Für die Spezifizierung von Bindungsstellen von PDE 4-Isoenzymen konnte bei der *in vivo* Untersuchung mittels Positronen-Emissions-Spektrometrie (PET) an Ratten das Verteilungsmuster bestätigt werden (Lourenco et al. 1999). Mit PET konnten pharmakologische Konstanten bei Ratten im Hirn *in vivo* von wachen und anästhesierten Tieren erfolgreich gemessen werden (Itoh et al. 2009), wodurch funktionelle Studien an wachen Tieren möglich erscheinen. Die intrazelluläre Verteilung der Bindungsstellen im Gehirn ist zwischen Zytosol - und Membrananteilen *in vitro* etwa gleich (Whalin et al. 1988). Mit den Liganden diverser Rezeptoren einschließlich klassischer Neurotransmitter konkurriert Rolipram nicht um deren Bindungsstellen (Schneider et al. 1986).

Monoaminstoffwechsel

Rolipram hat prä- und postsynaptische Angriffspunkte. Präsynaptisch wird über einen cAMP-vermittelten Mechanismus die Tyrosinhydroxylase (TH) als geschwindigkeitsbestimmendes Enzym in der Synthese von Katecholaminen aktiviert und so die Konzentration von NA und Dopamin (DA) gesteigert. Gleichzeitig wird die Freisetzung von NA, nicht aber DA erhöht. Der 5-HT-Stoffwechsel wird durch Rolipram nicht beeinflusst (Kehr et al. 1985). Diese neurobiochemischen Ergebnisse in der WISTAR-Ratte gehen einher mit elektrophysiologischen Befunden in derselben Spezies: Die Entladungsrate der NA-ergen Neurone des Locus coeruleus (LC) wird erhöht, die der DA-ergen Neurone im ventralen Tegmentum erniedrigt und die der serotonergen Neuronen der dorsalen Raphe bleibt unverändert (Scuvée-Moreau, Giesbers, Dresse 1987). Rolipram besitzt im Gegensatz zu klassischen AD keine „Reuptake“- oder Monoaminoxidase (MAO)-inhibitorische Wirkung (Wachtel, Schneider 1985). Postsynaptisch verstärkt Rolipram durch die PDE 4-Hemmung das cAMP-Signal von Neurotransmittern, die positiv verstärkend mit der Adenylatcyclase (AC) gekoppelt sind. Dieses schließt neben den katecholaminergen noch weitere Neurotransmitter ein (Donaldson, Brown, Hill 1988, Whalin et al. 1988). In genetischen Modellen mit embryonalen Mäusefibroblasten kann die PDE4D als das entscheidende Isoenzym bei der Aktivierung von β -Adrenozeptoren gefunden werden (Bruss et al. 2008).

Pharmakologie *in vivo*

Rolipram hat bei der Ratte Einfluss auf das Spontanverhalten und löst ein typisches Syndrom aus. Dieses beinhaltet die Kombination aus Verhaltenseffekten wie der Abnahme der motorischen Aktivität (Hypokinese), der Induktion von schnellen Kopfwendungen (head twitches - HTW), Vorderpfötchenschütteln (forepaw shaking - FPS), vermehrtem Pflegeverhalten (grooming - GR) und der Verringerung der Körpertemperatur (KT) (Hypothermie) (Wachtel 1982). Die Anzahl der HTW in Ratten ist ab der minimal effektiven Dosis von 0,1 mg/kg *i.p.* signifikant gegenüber unbehandelten Kontrolltieren erhöht (Schmiechen et al. 1990). Die Induktion von HTW bei Nagern wird üblicherweise mit der Stimulation serotonerger Rezeptoren im Gehirn assoziiert. Die so in Maus, Ratte und Meerschwein ausgelösten HTW sind durch entsprechende Antagonisten zu hemmen (Tricklebank 1985, Heal et al. 1986). Rolipram zeigt dagegen speziesspezifische Unterschiede. HTW sind in der Maus nicht auslösbar, bei der Ratte assoziiert mit GR und Hypokinese, beim Meerschwein gekoppelt mit GR und Hyperkinese, die allerdings erst unter höheren Dosierungen zu beobachten ist (Wachtel 1983a).

Durch 5-HT-Antagonisten sind diese HTW nicht zu unterdrücken (Przegalinski, Bigajska, Lewandowska 1981, Wachtel 1983c), so dass eine Induktion von HTW durch 5-HT nicht wahrscheinlich ist (Kehr et al. 1985).

Die Initiierung von HTW erfolgt auch durch cAMP-Analoga und andere spezifische PDE 4-Hemmer wie Ro 20-1724 und ICI 63.197 (Wachtel 1982); Forskolin, ein Aktivator der katalytischen Untereinheit der AC, löst das Verhaltenssyndrom ebenfalls durch die Steigerung der cerebralen Verfügbarkeit von cAMP aus (Wachtel, Löschmann 1986, Wachtel et al. 1987, Schmiechen, Schneider, Wachtel 1990).

Motorische Effekte

Die Stimulation von postsynaptischen DA-ergen Rezeptoren im Nucleus accumbens bei Ratten erzielt eine Steigerung der motorischen Aktivität, die durch eine Erniedrigung der Entladungsrate der DA-ergen Neurone im ventralen Tegmentum wieder aufgehoben werden kann, deren Terminale zum Nucleus accumbens projizieren (Scuvée, Giesbers, Dresse 1987).

Durch die i.p. Gabe von Rolipram kann eine Potenzierung der Wirkung des DA-Agonisten Lisurid nach Injektion in den Nucleus accumbens bei Ratten in vivo bewirkt werden, die auf einer Aktivierung von postsynaptischen Rezeptoren beruht. Die vorausgehende i.p. Gabe von Haloperidol als DA-Rezeptorantagonisten hebt den stimulierenden Effekt von Lisurid (intra-accumbens) auf die Motorik auf und schwächt den potenzierenden Effekt von zusätzlich intra-accumbens gegebenem Rolipram ab. Die Wirkungen von Lisurid und Rolipram auf die motorische Aktivität bleiben auch nach Katecholamindepletion mit Reserpin und Katecholaminsynthesehemmung durch α -Methyl-p-Tyrosin erhalten (Wachtel, Schlangen, Seltz 1980).

Das durch die Gabe von Rolipram ausgelöste „First messenger“-Signal wird postsynaptisch auf der Ebene der cAMP-Signaltransduktion verstärkt. Die Aufhebung der Hypokinese erfolgt damit durch die hinter der postsynaptischen Ebene gelegene Hemmung des cAMP-Abbaus (Wachtel, Schneider 1986, Wachtel, Löschmann 1986).

Körpertemperatur

Rolipram senkt die Körpertemperatur (KT) nach i.p.-Gabe bei Maus, Ratte und Meerschweinchen um maximal 3 bis 4 Grad Celsius unter die KT der Kontrolltiere ab (Wachtel 1983a). Bei Ratten sind ähnliche Resultate durch andere PDE 4-Hemmer (Wachtel 1983a), bei Ratten und Mäusen durch Forskolin, sowie bei Mäusen durch die membran-penetrierenden cAMP-Analoga 8-Bromo-cAMP (8-Br-cAMP) und Dibutyryl-cAMP (db-cAMP) bei i.p.-Gabe beschrieben worden (Wachtel, Löschmann 1986, Wachtel et al. 1987).

Antidepressive Wirkung in Tiermodellen

Für den Wirknachweis von AD im Tiermodell werden Tests mit der Induktion und durch Prüfsubstanzen hervorgerufenen Änderungen von Verhalten durchgeführt. Rolipram zeigt seine antidepressive Wirkung in einer Reihe von Tests, die einen unterschiedlich hohen prädiktiven Wert für das antidepressive Potential einer Prüfsubstanz besitzen. In Verhaltenstests wie dem „Behavioural despair“ bei Mäusen (Przegalinski, Bigajska 1983) und dem „Differential reinforcement of low rate“ (DRL)- Schema ähnlich der „Learned helplessness“ mit Ratten (O'Donnell 1993, O'Donnell, Frith 1999) ist Rolipram wirksam. Der Wirkmechanismus von Rolipram schließt anders als bei klassischen AD eine präsynaptische Komponente ein. Diese umfasst bei Rolipram die Steigerung der Synthese von Katecholaminen und die Freisetzung von NA. Unabhängig von der Verfügbarkeit endogener Amine entwickelt Rolipram seine postsynaptische Wirkung. Damit unterscheidet es sich wesentlich von klassischen AD. Die in den Tests zur antidepressiven Wirksamkeit erforderlichen Dosen liegen deutlich niedriger im Vergleich zu klassischen AD (Wachtel, Schneider 1986).

An katecholamindepletierten Mäusen wird eine Hypothermie und Akinesie durch Rolipram aufgehoben, was klassische AD wie Imipramin und Pargylin nicht vermögen (Wachtel 1983b, Wachtel, Schneider 1986). Diese Befunde unterstreichen die Bedeutung der postsynaptischen Komponente bei der antidepressiven Wirkung von Rolipram. Postsynaptisch können Effekte durch „Down-regulation“ zerebraler β -Adrenozeptoren bei chronischer oraler Gabe von Rolipram wie bei klassischen AD beobachtet werden (Przegalinski et al. 1988). Eine Abschwächung der „Downregulation“ nach Denervierung durch 6-Hydroxy-Dopamin (6-OHDA) intracerebroventrikulär (i.c.v.) zeigt eindrucksvoll die postsynaptische Wirkung von Rolipram. Bei der Salbutamol-induzierten Unterdrückung von „Open field“- Verhalten durch β -Adrenozeptor-Aktivierung wird durch wiederholte Gabe von Rolipram p.o. die verminderte explorative Aktivität wieder auf Normalniveau gesteigert (Przegalinski et al. 1985).

Im Gegensatz dazu ist Rolipram bei Mäusen ohne Einfluss auf die DA-erg vermittelten Effekte. Es verändert nach i.p. Gabe nicht die Apomorphin-induzierte Hypothermie (Przegalinski, Bigajska 1983). Die Steigerung von explorativem Verhalten nach Apomorphin im „Open field“ bei der Ratte wird durch akute oder chronische Gabe von Rolipram nicht beeinflusst (Przegalinski et al. 1985).

Diese in Tierexperimenten erworbenen Kenntnisse zur antidepressiven Wirkung von Rolipram lassen sich in der Klinik bestätigen.

Klinik

Rolipram zeigt in offenen Studien an therapieresistenten depressiv Erkrankten einen schnellen Eintritt der antidepressiven Wirkung innerhalb von zwei bis zwölf Tagen (Zeller et al. 1984, Laemmel, Sastre 1983, Horowski et al. 1985, Laux et al. 1988).

Seine Wirksamkeit liegt in kontrollierten Studien gegenüber trizyklischen AD auf einem ähnlichen oder niedrigeren Niveau (Guiot-Goffioul et al. 1987, Bobon et al. 1988, Bertolino et al. 1988), eine Verbesserung diesen gegenüber wurde nicht erreicht (Hebenstreit et al. 1989, Meya, Fichte 1991, Scott et al. 1991).

Bei neueren Entwicklungen von Rolipram-Nachfolgern wird versucht, die emetische Wirkung abzuschwächen oder aufzuheben, um eine bessere Compliance bei möglichen Patienten zu erreichen (GEBR-7b, Bruno et al. 2011). Nach Aufklärung der Struktur der PDEn kann durch kleinmolekulare allosterische Modulatoren der PDE4 mit verminderter emetischer Potenz ein Einsatz bei ZNS-Erkrankungen verbessert werden (Burgin et al. 2010).

Einsatz bei nephrologischen Erkrankungen

In tierexperimentellen Untersuchungen kann Rolipram bei Mäusen zur Abschwächung eines renalen Diabetes insipidus eingesetzt werden. Die Steigerung eines cAMP/ Proteinkinase A (PKA)-Signalsystems verstärkt die Wirkung von Vasopressin (AVP) durch das Einfügen von Aquaporin-Shuttle-Vesikeln in Zellen des Sammelrohrs mit Erhöhung der osmotischen Permeabilität, so dass die Reabsorption von Wasser erleichtert wird. Der Effekt könnte daher beim angeborenen X-chromosomalen renalen Diabetes insipidus therapeutisch eingesetzt werden (Stefan et al. 2007).

Einsatz bei akuten und chronischen Entzündungen – ein Überblick

Die Regulation von Entzündungsvorgängen mit ihrer Antwort von immunkompetenten Zellen und der Freisetzung von Botenstoffen ist erforderlich zur vollständigen Wiederherstellung eines Organismus. Es kommt bei nicht kontrollierten Abwehrvorgängen zu dauernden Schäden durch verschiedene Formen der chronischen Immunfehlregulierung zusammen mit intensiver Infiltration von Entzündungszellen in das betroffene Gewebe. Bei den betroffenen immunkompetenten und antiinflammatorisch wirksamen Zellen ist das PDE Isoenzym 4 (neben Typ 3 und 7) dominierend in der Regulation des intrazellulären cAMP-Gehaltes (Makrophagen, Lymphozyten, neutrophile Granulozyten - Barber et al. 2004). Rolipram konnte seine entzündungshemmende Wirkung bei Krankheiten wie Asthma, septischer Schock, rheumatoide Arthritis und entzündlichen Darmerkrankungen sowie bei der Multiplen Sklerose zeigen (Castro et al. 2005). Durch in vitro Untersuchungen ist bekannt, dass PDE 4-Hemmer funktionelle Antworten von Zellen in unterschiedlichem Maße unterdrücken können (Suttrop et al. 1993 und 1996, Ortiz et al. 1993, Teixeira 1997, Houslay 2010): Bei Neutrophilen, Eosinophilen und Monozyten/ Makrophagen durch die Abschwächung des „Respiratory burst“, der Produktion von Zytokinen und der Steigerung des freien intrazellulären Calciums; bei Mastzellen und Basophilen durch die Freisetzung von Mediatoren; bei Lymphozyten bei Proliferation, Zytokinproduktion und Zytotoxizität; bei mesangialen Zellen durch die Proliferation und den „Respiratory burst“; bei endothelialen Zellen durch die Permeabilität und Expression von Zell-Adhäsions-Molekülen und durch den Schutz der endothelialen Barriere (Castro et al. 2005).

PDE 4-Hemmer unterdrücken in vitro bei Entzündungsmodellen von Asthma und Dermatitis die Aktivierung von eosinophilen Zellen (Torphy et al. 1992, Teixeira et al. 1994, Elwood et al. 1995) und haben therapeutisches Potential durch die Verringerung der Immunantwort von Makrophagen bei der Behandlung der chronisch obstruktiven Lungenerkrankung (COPD) (Houslay, Shafer, Zhang 2005, Serezani et al. 2008, Jin et al. 2005). Ihre Wirksamkeit konnte bislang nur in speziellen Gruppen von Patienten mit COPD nachgewiesen werden, da ansonsten durch Nebenwirkungen oder unzureichende Wirkungen der maximal möglichen Dosen der Einsatz begrenzt ist (Giembycz, Newton 2011). Hochpotente Nachfolgesubstanzen von Rolipram, GSK256066, können topisch eingesetzt werden und verringern in vitro in humanen Monozyten und in vivo bei Ratten die Bildung von Tumor-Nekrose-Faktor α (TNF- α) nach Lipopoly-

saccharid (LPS)-Induktion (Tralau-Stewart et al. 2011). Die Suche nach effektiven PDE4-Hemmern führt auch zur Charakterisierung von pflanzlichen Substanzen wie Biochanin, einem Isoflavon von *Trifolium pratense* (Ko et al. 2011). Folge einer COPD kann die pulmonale Hypertension sein. An Rattenlungen kann experimentell ihre Entstehung durch eine Nachfolgesubstanz von Rolipram, Rofluminast, durch die Wachstumshemmung der glatten Muskelzellen und die Hemmung einer Entzündungsreaktion verringert und rückgängig gemacht werden (Izikki et al. 2009). Für den Einsatz von Glukokortikoiden und β -Agonisten in Zellkulturmodellen zur Wirkung dieser Substanzen auf eine induzierte Entzündung durch Rhinoviren zeigt sich, dass nur bei der gemeinsamen Gabe beider Substanzgruppen die Induktion von IL-6 als proinflammatorischem Zytokin durch β -Agonisten begrenzt werden kann. Die IL6-Induktion kann durch Steigerung der cAMP-Konzentrationen mit Rolipram über spezifische Bindungsstellen im IL-6 Promotorgen erfolgen (Edwards et al. 2007). Bei gleichzeitiger Gabe von PDE3 und 4-Hemmern kann die Glukokortikoidresistenz im Modell mit humanen Atemwegsmakrophagen überwunden werden, woraus ein neuer Ansatz zur Therapie der Entzündungsreaktion bei chronischen Atemwegserkrankungen entsteht (Milara et al. 2011). Die Induktion von Chemokinen über ein Epac durch Rolipram ist auch an einem Anstieg ihrer m-RNA im humanen Zellkulturmodell von Monozyten/ Makrophagen durch Induktion verschiedener Transkriptionsmechanismen nachzuweisen (Hertz et al. 2009). IL-6 ist in vivo auch an der Pathogenese von rheumatoider Arthritis und entzündlichen Darmerkrankungen (Morbus Crohn) beteiligt (Edwards et al. 2007). In der Hautkrebsforschung werden Rolipram und andere PDE 4-Hemmer als Tool zur Blockade eines zentralen Signalweges vom MSH zum Melanozyten verwendet, indem Regulatoren der Transkription über einen cAMP/CREB- (cAMP Response Element Binding (Bindungs-) Protein) Signalweg verlängert stimuliert werden und damit eine verstärkte Pigmentierung bei Versuchstieren beobachtet werden kann (Khaled, Levy, Fisher 2010). Bei der rheumatoiden Arthritis wurde bereits 1995 durch PDE 4-Hemmung von TNF- α die Verringerung der klinischen Zeichen der Entzündung beschrieben (Sekut et al. 1995). Bei TNF- α -vermittelten Entzündungsvorgängen in der Synovia bei rheumatoider Arthritis können PDE4-H in vitro in Zellkultursystemen dessen Freisetzung vermindern und die Freisetzung von proinflammatorischen Chemokinen hemmen (Crilly et al. 2011). Auch Nachfolgesubstanzen wie das als orale Darreichungsform verfügbare Apremilast können ohne die Nebenwirkungen von Rolipram ihre Wirksamkeit bislang in der Humanzellkultur mit der effektiven Hemmung von TNF- α und im experimentellen Tiermodell beweisen (McCann et al. 2010). In gleicher Weise kann bei neuentwickelten entzündungshemmenden Substanzen (Phosphoceramid-Analogen-1 (PCERA-1)) ein Synergismus bei der Hemmung von TNF- α und der Verstärkung seines Gegenspielers IL-10 in Zellkulturmodellen beobachtet werden. Rolipram steigert dabei die CREB-Phosphorylierung und die Aktivierung via PKA durch PCERA-1 (Avni et al. 2009). Durch Injektionen von LPS bei Modellen zum septischen Schock wird eine Hemmung der Bildung von TNF α in Monozyten/Makrophagen bewirkt, die in Zellkulturen durch PDE 4-Hemmer auch noch nach erfolgter Gabe des LPS wirksam ist (Prabhakar et al. 1994, Witkamp, Monshouwer 2000). Im septischen Zustand kann die β -adrenerge Hemmung der Freisetzung von TNF- α durch endogen freigesetzte Katecholamine und die Verringerung der β_2 -Rezeptorempfindlichkeit nicht aufrecht erhalten werden (Lin, Yeh 2005, Silverman et al. 1993). In CD14+ Monozyten von Patienten mit septischem Schock sowie ex vivo von Monozyten Freiwilliger kann die geringere Rezeptorempfindlichkeit bestätigt werden. Deren Wirkung einer erhöhten TNF- α Konzentration kann durch Rolipram in Monozyten aufgehoben werden, so dass damit ein neuer medikamentöser Ansatz zur Therapie des septischen Schocks ermöglicht wird (Link et al. 2008). Nachfolgesubstanzen von Rolipram wie Rofluminast können die Mikrogefäßpermeabilität im Rattenmodell in vivo und die TNF- α vermittelte Anheftung von Neutrophilen in vitro besser

verhindern (Sanz et al. 2007).

Rolipram entfaltet seine antiinflammatorischen Wirkungen im Mäusetiermodell *in vivo* nach LPS durch die pro-apoptotische Wirkung auf neutrophile Granulozyten durch eine Caspase-abhängige Apoptose über einen PKA-abhängigen Weg (Souza et al. 2010). Bei humanen Chorionzellen kann in der Zellkultur nach LPS ebenfalls durch Rolipram die TNF- α Induktion unterdrückt und die intrauterine Entzündung verringert werden, die zu Frühgeburten führen kann (Hervé et al. 2008). Bei einer Entzündungsreaktion kommt es zu einer Einschränkung der endothelialen Barrierefunktion, durch die Räume zwischen diesen Endothelzellen entstehen, die zu einem Gefäßleck, zellulärem Ödem und Behinderung der Mikrozirkulation führen. Die Aufrechterhaltung der Barriere wird über Rho GTPasen der Subfamilie „Rac“ durch die Modulation der Aktindynamik (Ausbildung von sog. Stressfasern) entscheidend gesteuert, die zu ihrer Aktivierung ein Vasodilator-aktiviertes Phosphoprotein (VASP) benötigt. In myokardialen Endothelzellen kann „Rac“ über eine PKA durch cAMP-Steigerung durch Forskolin/Rolipram aktiviert werden, um so der entzündungsvermittelten Destabilisierung entgegen zu wirken (Schlegel, Waschke 2009). In postkapillären Venulen kann bei Ratten *in vivo* und *in vitro* durch β -adrenerge Stimulation von cAMP die endotheliale Barriere aufrechterhalten werden, ohne dass PDE-Hemmung den Effekt aufhebt (Spindler, Waschke 2011).

In einer weiteren Signalkaskade, dem p38-MAP Kinase (Mitogen-aktivierte Proteinkinase) -Weg für die Vermittlung von Signalen der zellulären Immunität, Entzündung und exogenem Stress (UV-Strahlung, ionisierende Strahlung, oxidativer Stress), kann durch Phosphorylierung die nachfolgenden Kinase MK2 stimuliert, sowie ihr Gegenspieler MK3 gehemmt werden. Die PDE4A5 kann als Substrat der MAPK an ihrer UCR1 phosphoryliert werden, wodurch die Aktivierung durch PKA verringert wird und in Folge eine Verringerung der cAMP-Akkumulation erfolgt. Durch eine Rolipram-spezifische Hemmung der PDE4 kann auch dieser Signalweg beeinflusst werden, so dass die cAMP-Konzentration erhöht bleibt und der Trigger für die Entzündungsreaktion blockiert wird (MacKenzie et al. 2011). Die gleiche Signalkaskade führt am Auge in einem Modell mit Rinderendothelzellen zu einer Hemmung einer TNF- α induzierten Reaktion, durch die die Integrität des Corneaendothels erhalten bleibt, was sonst zu einem Verlust der Durchsichtigkeit führen kann (Shivanna, Srinivas 2010).

Im Rahmen der Immunantwort kann Rolipram als Tool zur Darstellung von cAMP/PDE4 Signalwegen benutzt werden. In aktivierten T-Zellen kann bei einem Modell mit Jurkat T-Zellen und humanen Monozyten durch Galectin8 mit der Aktivierung eines PDE/cAMP/PKA Systems die Apoptose in den aktivierten T-Zellen induziert werden. Autoantikörper gegen Galectin8 wie beim Systemischen Lupus Erythematodes (SLE) stoppen diesen Effekt. Mit der PDE4 Hemmung durch Rolipram kann diese T-Zellapoptose verhindert werden (Norambuena et al. 2009).

Einsatz bei Multipler Sklerose

Für die therapeutisch bislang nicht wesentlich beeinflussbare autoimmune Encephalitis (Multiple Sklerose) sind sowohl in präklinischen, als auch klinischen Studien pathologische Veränderungen positiv beeinflussbar. Rolipram ist in Kombination mit Lovastatin in präklinischen Studien durch Verringerung von ZNS-Zellinfiltraten, Verhinderung der Demyelinisierung und des Verlustes von Axonen erfolgreich getestet worden (Mangas, Coveñas, Geffard 2010). Die Verringerung der Ausprägung pathologischer Zeichen einer Th1/Th17 T-Zell-vermittelten autoimmunen Encephalitis wird durch Rolipram *in vitro* und *in vivo* durch Unterdrückung der Bildung von TNF α , Lymphotoxin α und Interferon γ in autoreaktiven T-Zellen von Mensch und Ratte bewirkt (Sommer et al. 1995, Martinez et al. 1999, Bielekova et al. 2000). Die Kombination mit Lovastatin verstärkt *in vivo* im Tiermodell die T-Zell-Antwort durch Induktion

von regulierenden T-Zellen (Paintlia et al. 2008). Klinische Phase I/II Studien wurden durch fehlende Wirksamkeit und Nebenwirkungen wie Erbrechen, Schwindel, Schlaflosigkeit vorzeitig beendet (Bielekova et al. 2009), da möglicherweise die Hemmung von Entzündungsvorgängen anders als im Encephalitis-Tiermodell nicht eintritt. Die Frage der Übertragbarkeit von in vitro und Tiermodellen auf die klinische Anwendung kann derzeit noch nicht vollständig beantwortet werden.

Einsatz bei der Neuroregeneration

Bei der erfolgreichen Regeneration zentraler Neurone nach Rückenmarksverletzungen in vivo bei Ratten wird durch Rolipram der Abfall lokaler cAMP-Konzentrationen verhindert (Hannila, Filbin 2008), so dass auch bei funktionell wesentlichen Nerven wie dem Nervus phrenicus nach Trauma eine weitgehende Wiederherstellung möglich ist (Kajana, Goshgarian 2008). Bei zusätzlichem Einsatz von Schwann-Zell-Transplantaten führt dies zum erneuten Aussprossen und zur Myelinisierung der supraspinalen und propriozeptiven Neurone in vivo und in vitro (Pearse et al. 2004, Nikulina et al. 2004). Rolipram führt bei Ratten in vivo zu einem verbesserten Überleben der Oligodendrozyten des Funiculus ventrolateralis, der für die Fortbewegungsfähigkeit verantwortlich ist (Whitaker et al. 2008) und zur wiederhergestellten Weiterleitung von Nervensignalen des Funiculus dorsolateralis in beiden Richtungen (Beaumont et al. 2009).

Bei traumatischen Hirnverletzungen werden Effekte von Rolipram über ähnliche Mechanismen beschrieben. Im Rattentiermodell kann über eine gesteigerte CREB-Phosphorylierung in Hippocampus und parietalem Cortex das Überleben von Neuronen verbessert werden und die Wirkung des Traumas begrenzt werden, da auch die durch vermindertes cAMP ausgelöste zusätzliche Entzündungsreaktion abgeschwächt wird (Lee et al. 2004, Atkins et al. 2007).

Die Verbindung von gesteigerter Neurogenese und antidepressiver und anxiolytischer Wirkung von Rolipram konnte bei in vivo Untersuchungen an Mäusen durch Li et al. 2009 belegt werden. Die Neubildung von Nervenfasern im Mausmodell im Hippocampus, der Anstieg von phosphoryliertem CREB in Hippocampus und präfrontalem Kortex (Sasaki et al. 2007) sind dabei entscheidende Nachweise bei der Ausbildung typischer Verhaltenseffekte von Antidepressiva im Tiermodell, da durch Santarelli et al. 2003 bereits als wesentliches Element der antidepressiven Wirkung die Steigerung der hippocampalen Neurogenese beschrieben wurde. Die Induktion von neurotrophen Faktoren wie brain-derived neurotrophic factor (BDNF) durch Rolipram gehört dabei wie P-CREB zur Regulation des assoziierten Verhaltens (Nibuya et al. 1996, Fujimaki, Morinobu, Duman 2000).

Bei der Suche nach Faktoren, die mit Schlaganfällen assoziiert sind, konnte bei der isländischen und indischen Bevölkerung durch Genomuntersuchungen das PDE4 D Gen als einer der wesentlichen Faktoren identifiziert werden (Gretarsdottir et al. 2003, Munshi, Kaul 2010).

Einsatz bei chronischer Darmentzündung

In Tiermodellen chronischer Darmentzündungen wie Colitis ulcerosa oder Morbus Crohn wird vornehmlich durch Hemmung von TNF α die Colitis verhindert oder therapiert (Hartmann et al. 2000). Studien mit Phase-III-Untersuchungen weiterer PDE 4-Hemmer wie OPC-6535 in den USA und Australien zeigen das mögliche Potential in der Behandlung von Patienten mit Colitis ulcerosa (Digestive Disease Week 2004, New Orleans, USA, Presentation OPC-6535 Phase III Trials).

Einsatz in der Tumorthherapie

Die meisten untersuchten Tumorzelllinien haben als vorherrschende PDE den Subtyp 4 (Marko et al. 2000), so dass Rolipram bereits 1993 starke Anti-Tumor Effekte zeigen konnte (Drees, Zimmermann, Eisenbrand 1993). In der Hirntumorforschung kann Rolipram als neues adjuvantes Mittel eingesetzt werden, um zusammen mit der regulären Chemotherapie und Bestrahlung nicht nur eine Hemmung des Wachstums, sondern auch eine Verkleinerung der Tumoren erreichen zu können. In einem Mausmodell konnte von Goldhoff et al. 2008 in vivo dargestellt werden, dass die Kombination von Chemotherapie und Rolipram gleichwertig zur Standardtherapie war und somit einen weiteren Angriffspunkt zur Behandlung liefern kann.

Bei der Untersuchung von Ursachen bei Patienten mit Neurofibromatose kann an genetisch veränderten Mäusen durch die Gabe von Rolipram in vitro und in vivo sowohl das Wachstum von retinalen Gliomzellen, als auch der Untergang retinaler Ganglionzellen verringert werden (Brown, Gianino, Gutmann 2010, Sengupta et al. 2011).

Auch in der Leukämieforschung wird Rolipram als Tool eingesetzt, um den Einfluss der PDE4 Hemmung auf die Reifung von leukämischen Zellen (hier U937 Zellen) durch den Anstieg von cAMP nutzen zu können (Copsel et al. 2011). Bei B-CLL-Zellen kann durch Rolipram über einen PKA-Signalweg mit Steigerung der Glukokortikoidrezeptor (GR) - α -Transkripte im Kulturmodell die Glukokortikoidempfindlichkeit der lymphoiden Zellen verstärkt werden, so dass proapoptotische Effekte durch adjuvanten Einsatz von Rolipram und Kortikoiden neben der Chemotherapie auf diese leukämischen Zellen sichtbar werden und als therapeutisches Prinzip genutzt werden könnten (Meyers et al. 2007).

Daraus ergibt sich für PDE 4-Hemmer wie Rolipram eine potentielle antiinflammatorische bzw. immunsuppressive Wirksamkeit, was den Einsatz dieser Substanzgruppe in weiteren klinischen Bereichen als sinnvoll und effektiv erscheinen lässt.

Rolipram und Gedächtnis, Effekte bei der Alzheimer Erkrankung

Als einer der Hauptwege zur Steigerung der Gedächtnisleistung fungiert der cAMP/ PKA/ CREB Signalweg, dessen Beeinflussung ein Hauptziel bei Patienten mit verminderter Gedächtnisleistung darstellt (Arnsten et al. 2005). Die Aktivierung der PKA durch steigende cAMP Konzentrationen führt zur Rekrutierung der MAPK, die nach Translokation im Zellkern CREB aktiviert, der als Transkriptionsfaktor die Produktion der Zielgene unter Aktivierung von neurotrophen Faktoren wie BDNF steigert (Gordon 2009). Rolipram hat dieses im Hippocampus bei Mäusen in vivo durch Steigerung der sog. „Long-term Potentiation“ (LTP) als Ausdruck der Verbesserung einer Gedächtnisfunktion gezeigt (Barad 1998). Genauso gelang dies in Amnesiemodellen bei Nagern in vivo durch das Aufheben der Effekte von Amyloid β (A β) als Amyloid precursor protein (APP) -Abkömmling im Hippocampus mit Aufheben der Hemmung der hippocampalen LTP und des cAMP/ PKA/ CREB Signalwegs. Damit wird der nachfolgende Gedächtnisverlust und Zelluntergang im Hippocampus verringert (Gong et al. 2004, Zhang et al. 2004, Smith et al. 2009). Dieses wird unterstützt durch Verbesserung der Konsolidierung durch adrenerge Stimulation (Roesler, Schröder 2011), die bei Rolipram durch seine postsynaptische Wirkung beschrieben ist. Eine weitere Ergänzung ist die Stimulation des cAMP/PKA Weges durch Glukokortikoidagonisten (Roesler, Schröder 2011), durch die mit Wechselwirkung mit β -Adrenozeptoren im Nagerhirn eine Verbesserung des Konsolidierungsprozesses in der Hippocampusregion erreicht wird (Rozendaal 2000).

Ein weiterer Weg, durch den Gedächtnis negativ beeinflusst wird, ist die Provokation durch Schlafentzug. Bestimmte Formen der cAMP/PKA abhängigen synaptischen Plastizität (LTP) werden im Hippocampus bei der Maus in vivo durch geringere CREB-Phosphorylierung abgeschwächt, die CREB-vermittelte Signalleistung damit verringert und die PDE 4A5 Aktivität durch gesteigerte Genexpression erhöht, so dass die mit cAMP verknüpfte hippocampale Gedächtnisleistung abnimmt. Durch Rolipram konnten diese Defizite deutlich abgeschwächt werden (Vecsey et al. 2009). Circadiane Variationen von cAMP im Hippocampus werden zusätzlich verknüpft mit der Verringerung der Dauerhaftigkeit von Gedächtnis, die bei Störungen im circadianen Rhythmus auftreten können (Eckel-Mahan et al. 2008, Vecsey et al. 2009). Durch die PDE4 vermittelte cAMP/ CREB-Aktivierung wird außerdem die Neurogenese in ausgewachsenen Tieren reguliert (Li et al. 2009), die mit Lernen und Gedächtnis verknüpft ist (Shors et al. 2001, van Praag et al. 2002). Rolipram steigert die Gedächtnisleistung für Objekte und Orte des episodischen Gedächtnisses (Rutten 2009), das als erstes bei Alzheimer Patienten gestört wird (Small et al. 2003).

Im Hippocampus verstärkt ein PDE 4D Mangel die für das Gedächtnis erforderliche Neurogenese über die Vermehrung sich aus neuralen Stammzellen differenzierender Zellen, sog. amplifying neural progenitors (ANP) und Transkriptionsfaktoren wie SRY (sex determining region Y)-box 2 (SOX2) (Graham et al. 2003, Episkopou 2005, Li et al. 2009). Direkte Stimulation eines GIR Rezeptors durch Antidepressiva führt über eine sog. „Transaktivierung“, also eine Translokation des GIR in den Zellkern mit nachfolgender Gentranskription über eine cAMP/ PKA-Signalkaskade, zu einer erhöhten Transkription und hippocampaler Neurogenese. Rolipram kann somit über seine PKA-Aktivierung diese Wirkung der AD verstärken (Anacker et al. 2011), da für die der PKA nachfolgenden Signalkaskade mit Rap1, B-Raf und ERK bei Mangel infolge fehlender PKA-Aktivierung Verluste beim Lernen und Erinnern gefunden werden. Dies wurde im Mausmodell durch Morozov et al. 2003 und bei depressiven Suizidalen durch Dwivedi et al.

2001 beschrieben. Mäuse mit PDE4 Mangel zeigen eine gesteigerte hippocampale Neurogenese und gesteigerte CREB Phosphorylierung sowie eine gesteigerte Gedächtnisleistung in klassischen Verhaltenstests, die durch Rolipram nachgeahmt wird (Li et al. 2011a). Als möglicher Wirkort wird bei Ratten dafür die hochaffine Bindungsstelle für Rolipram (HARBS) und weitere PDE4 Inhibitoren identifiziert, über die die Steigerung der cAMP/ CREB-Signalwirkungen, die hippocampale Zellproliferation und antidepressive Verhaltenseffekte bewirkt werden (Jakobitz et al. 1996, Xiao et al. 2011). Die Modulation einzelner Untergruppen der PDE4 ist über die molekulargenetische Ausschaltung einzelner PDE4 Langformen im Hippocampus in einem Surrogatmodell möglich, mit dem die bisher störenden emetischen Effekte von Rolipram ausgeschaltet werden können (Li et al. 2011a), um so Gedächtnis und Neurogenese im Hippocampus wie bei der Alzheimer Erkrankung zu verbessern. Gleiche Effekte der PDE4 Hemmung können in Folge einer zerebralen Ischämie beobachtet werden, bei der bei Ratten nach Rolipram in vivo Gedächtnisverluste und hippocampale Nervenschädigung verringert werden (Li et al. 2011b). Auch ohne molekulargenetische Konstruktion von Rolipram-Nachfolgern kann mit strukturverwandten Substanzen wie GEBR-7b das hippocampale cAMP erhöht werden, ohne Beeinflussung der A β -Konzentrationen die Gedächtnisleistung verbessert und ohne emetische Nebenwirkungen pharmakologisch wirksam beeinflusst werden (Bruno et al. 2011).

Überblick über die tageszeitlichen Rhythmen und deren Relevanz in der Pharmakotherapie mit Rolipram

In modernen Konzepten zur Chronobiologie wird angenommen, dass tageszeitliche biologische Rhythmen das Ergebnis der Anpassung endogener Rhythmen an periodische Umgebungsfaktoren sind. Biologische Uhren triggern endogene Oszillatoren, die rhythmische Prozesse in Organismen auslösen. Beide Ebenen dieser Rhythmogenese können dabei gegenüber Zeitgebern aus der Umwelt abhängig sein, deren Periodendauern unterschiedlich von ihren jeweils bestehenden sind. Einerseits können die Rhythmen der Zeitgeber von einer vorhandenen, endogen bestehenden Periodizität, als auch von der etwa 24-stündigen Periodizität in der natürlichen Umgebung abweichen. Eine mögliche Anpassung endogener Oszillatoren hängt davon ab, welche Anpassungsmechanismen verfügbar sind. Der Licht-Dunkel-Rhythmus fungiert als einer der großen Zeitgeber, somit können Beobachtungen von Verhalten in Bezug zu bekannten tageszeitlichen Rhythmen nur in einem künstlichen 24-Stunden-Tag untersucht werden. Für eine Beobachtung zu anderen Zeiten (Labortag) kann dafür ein Wechsel von Beleuchtungsphasen vorgenommen werden.

Dabei muss bei nachtaktiven Tieren wie der Ratte berücksichtigt werden, dass deren Rhythmen im Vergleich zum Menschen um 12 Stunden versetzt sind. Für die motorische Aktivität der Ratte werden zwei getrennte Oszillatoren zu Beginn und Ende der Dunkelphase vermutet (Pittendrigh, Daan 1976). Die Regulationen anderer Parameter wie KT und Verhalten via CRH hängen ebenfalls von diesen äußeren Bedingungen ab. Mit einer Untersuchung der Wirkung von Rolipram auf diese Systeme kann eine Aussage zur zeitlichen Abhängigkeit der Pharmakodynamik dieser Substanz getroffen werden, da sich diese Ergebnisse dann von denen der üblichen Laborzeiten unterscheiden müssten.

MEL ist einer der besten Parameter, der die Phasenlage von tageszeitlichen Schrittmachern darstellen kann (Lewy, Sack 1989). Die neurale Regulation des Produktionsortes für MEL verläuft einerseits über einen Weg via Retina, erfolgt aber andererseits über die neuronalen adrenergen Transmittersysteme. Es ergibt sich daraus ein Stellglied, dessen Beeinflussbarkeit durch Rolipram möglich erscheint, da Rolipram die Rhythmusgeber der MEL-Produktion (CRH, cAMP) beeinflussen kann. Es verhält sich wie eine Schnittstelle, die durch Substanzen wie Rolipram in Abhängigkeit von der Tageszeit (und damit auch vom Beleuchtungszustand) beeinflusst werden könnte. Die Wirkung von Rolipram läuft über die Beeinflussung adrenerger Systeme, die selber circadianen Schwankungen unterliegen (de Boer, van der Gugten 1987). Die Wirkung von CRH erstreckt sich aber auch auf die Veränderung explorativen Verhaltens (Spadaro et al. 1990), worin eine weitere enge Verbindung zu tageszeitlich abhängigen Parametern besteht. Durch das corticotrophe System werden sowohl die adrenergen Transmittersysteme als auch die Vorläufermoleküle von tageszeitlich abhängigen Parametern wie MEL beeinflusst. So kann mit Rolipram durch die Beeinflussung des corticotrophen Systems hier eine Abhängigkeit von der Tageszeit untersucht werden, da die übergeordnet wirksamen Genprodukte dieses Systems von Vorläufermolekülen des MEL-Systems (Genprodukte des Proopiomelanocortins (POMC)) gesteuert werden. Weitergehende Schlüsse zur Wirkung bei andern Spezies sind möglich, weil die Expression dieser Genprodukte einer hohen genetischen Konstanz unterliegen (Livi et al. 1990), die durch nahezu identische homologe Genprodukte bei Säugern und *Drosophila* dokumentiert wird (Matsuzaki, Takamatsu, Moroji 1989).

Die hier über einen 24-Stunden-Tag durchgeführten Untersuchungen beschränken sich somit auf Parameter, die a) aus den bisherigen Ergebnissen der Forschung zur antidepressiven Wirksamkeit von Rolipram bekannt sind und b) ergänzt werden durch Parameter, die aufgrund der bekannte

zeitlich rhythmischen Abhängigkeit der Rhythmusgeber mit beeinflusst werden könnten. Weitere Verhaltensparameter ergeben sich aus der Auswahl für das bereits beschriebene Depressionsmodell.

Die neuroendokrine Achse

Anatomie der Leitungsbahnen

Die Regulation der Hypophysen-Hypothalamus-Nebennieren(HHN) - Achse erfolgt durch die zentrale Steuerung durch CRH. Dessen Sekretion erfolgt in den parvozellulären Zellen des Nucleus paraventricularis (PVN) des Hypothalamus (Dunn, Berridge 1990). Bei Mammaliern (Ratte) projizieren diese Zellen hauptsächlich zur Eminentia mediana des Hypothalamus. Von limbischen Strukturen wie Nucleus amygdaloideus, Hippocampus und Septum erfolgt bei der Ratte über die Vermittlung durch den *Bett nukleus* (interstitiellen Nukleus) der Stria terminalis der Input aus dem limbischen System zum PVN (Nemeroff 1988). Unabhängig von der „Limbic-System-Hypothalamo-Pituitary-Axis“ (Limbisches-System-Hypothalamus-Hypophysen-Achse) (LHPA-Achse) findet eine Stimulation von CRH-freisetzenden Systemen durch NA im PVN des Hypothalamus, dem Bett nukleus der Stria terminalis und zentralem Kern der Amygdala der Ratte statt. Diese verknüpften Systeme sind bei pathologischen Reaktionen gegenüber Stressoren wie bei den affektiven Erkrankungen dann besonders empfindlich (Koob 1999). Durch NA-erge Projektionen, die selber mit Zellgruppen im LC in Verbindung stehen (Nemeroff 1988), und anderen Projektionen von Zellen in der ventrolateralen Medulla zum PVN wird die CRH-Sekretion in vivo bei der Ratte gesteigert (Plotski, Cunningham, Widmaier 1989). Zusätzlich kann durch die Projektionen von CRH-Fasern zu 5-HT-ergen Kerngebieten wie dem dorsalen Raphekern eine wesentliche Beeinflussung dieser Systeme erfolgen (Clark, Kaiyala 2003). Von adrenergen Zellen aus dem Nucleus tractus solitarii (NTS) werden Stimuli autonomer Nerven empfangen und an den PVN weitergeleitet, die als somato-viszerale Reize einen β -adrenerg vermittelten Stimulus für die ACTH- Antwort vermitteln (Plotski, Cunningham, Widmaier 1989).

Regulation

In der Regulation der LHP-Achse bewirkt die Sekretion von CRH aus dem Hypothalamus nicht nur die Freisetzung von ACTH und Cortisol bzw. Corticosteron, sondern auch die Sekretion weiterer Peptide, die aus dem gemeinsamen Precursormolekül POMC hervorgehen (Vale et al. 1981). Dazu gehören neben β - Lipotropin (β -LPH) und β - Endorphin (β -EP) auch N-terminales Proopiomelanocortin (N-POMC).

Diese Substanz potenziert die Wirkung von ACTH auf die Sekretion von Cortisol in vivo und in vitro (Leake, Griffiths, Ferrier 1989). Dabei wird über eine Steigerung von intrazellulärem cAMP durch CRH die Transkription des POMC-Gens beeinflusst, die bei Ratten in vivo durch Glukokortikoide gehemmt werden kann (Gagner, Drouin 1987). Die Aufhebung der ACTH-Freisetzung durch das „CRH-binding protein“ (CRH-BP) kann über cAMP via CREB und CRH über CRH-Rezeptoren erfolgen. Dadurch kann die hypothalamische CRH-Sekretion nach Stress-exposition die CRH-BP Gentranskription in corticotrophen Zellen aktivieren (Cortright et al. 1997). Die Induktion der Expression des CRH-Gens kann durch einen cAMP-vermittelten Mechanismus auch durch cAMP-Analoga und die Aktivierung der AC durch Forskolin erfolgen (Seasholtz, Thompson, Douglass 1988). Dabei wird ein cAMP-empfindliches Element im CRH-Gen beschrieben, das eine hohe genetische Homologie von 98,3% zwischen Ratte und Mensch aufweist (Seasholtz, Thompson, Douglass 1988), so dass dieser cAMP-vermittelte Mechanismus analog beim Menschen vermutet werden kann, wodurch eine Beeinflussung auf dieser Ebene durch eine Steigerung der cAMP-Verfügbarkeit wie bei Rolipram ebenfalls möglich ist.

Hohe Konzentrationen von CRH finden sich bei der Ratte in den Hirnregionen mit Zellkörpern der katecholaminergen (NA und DA) und indolaminergen (5-HT) Neurotransmitter und können damit die monoaminergen Systeme des ZNS beeinflussen (Nemeroff 1988). Umgekehrt finden sich in den Hirnregionen mit hohem CRH-Faseranteil zugleich katecholaminerge Fasern, so dass eine Integration von autonomen und neuroendokrinen Funktionen stattfinden kann (Owens, Nemeroff 1988, Hornby, Piekut 1989). Dabei können auch 5-HT-erge Stimulationen der CRH-Freisetzung aus dem Hypothalamus nachgewiesen werden (Owens, Edwards, Nemeroff 1990, Mikkelsen, Hay-Schmidt, Kiss 2004). Die anatomische Verteilung von CRH und CRH-Fasern entspricht dabei in hohem Maße der angenommenen Rolle von CRH bei der Modulation der Stressantwort im zentralen Nervensystem (Clark, Kaiyala 2003).

CRH aktiviert dabei genauso wie NA-erge Systeme motorisches Verhalten und die Reaktion auf Stressstimuli, wobei es eine Interaktion von CRH und NA im LC gibt. CRH erhöht dort die Entladungsrate von LC-Neuronen (Valentino, Foote, Aston-Jones 1983) und führt in wachen Ratten zu einer Aktivierung der NA-ergen Neurone zum Hippocampus als Ausdruck einer autonomen und Verhaltensaktivierung durch Stressexposition (Page, Abercombie 1999). Durch Rolipram können diese NA-ergen Neurone des LC ebenfalls stimuliert werden (Scuvée-Moreau, Giesbers, Dresse 1987).

CRH und Rhythmus

Bei der Beobachtung von Verhalten bei Ratten in den unterschiedlichen Beleuchtungszuständen erhöhen sich in der späten L-Phase entsprechend der ansteigenden allgemeinen Aktivität von Ratten, die Konzentrationen von CRH, ACTH und COR. Die Konzentrationen erhöhen sich dabei sowohl in den Kerngebieten der LHP-Achse, als auch anderen zentralen Regionen des Gehirns (Cerebellum, frontaler/parietaler Kortex, Septum und Nucleus suprachiasmaticus (SCN)) (Owens et al. 1990). Ratten besitzen im Hippocampus neben den GIR auch Mineralocorticoid-(MR)-Rezeptoren, die COR schon bei basalen Konzentrationen fast vollständig besetzt. Die übrigen GIR im Hippocampus werden erst unter steigenden COR-Konzentrationen wie bei Stress oder während des Anstiegs im circadianen Verlauf besetzt. Durch MR/GIR-Antagonistenversuche kann der hemmende Einfluss der MR über eine Aktivierung der hippocampalen GIR aufgehoben werden. Wird die Signalkette für COR beschädigt, erfolgt durch die stresserzeugte erhöhte Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achsen (HPA-Achsen) -Aktivität eine Sollwertverstellung mit resultierender dauerhafter HPA-Überaktivität (Holsboer 2000). Die HPA-Überaktivität mit verringerter GIR-Funktion, dadurch erhöhten ACTH-Konzentrationen mit adrenocortikaler Überempfindlichkeit gegenüber ACTH und einer insuffizienten Feedbackhemmung der CRH-Expression durch periphere Steroide kann in transgenen Mäusen abgeschwächt werden, die antisense exprimieren gegen GIR mRNA. Durch eine entsprechend verringerte CRH-Peptid Expression im HPA-System sind dann die COR-Konzentrationen gegenüber Kontrolltieren zu Beginn der L-Phase im Gegensatz zum normalen Rhythmus erhöht und gleichzeitig zum Ende der L-Phase deutlich erniedrigt (Keck, Holsboer 2001). Es bestehen zusätzliche Verbindungen zwischen dem zentralen Schrittmacher SCN und den CRH-Neuronen im PVN, durch die circadian rhythmische Informationen auf die HPA-Achse vermittelt werden können (Vrang et al. 1995).

Untersuchungsregime

Für eine Aussage über einen eventuell vorhandenen Rhythmus der LHPA-Achse sind serielle Blutentnahmen in kurzen Zeitabständen mit mindestens viertelstündigem Abstand notwendig. Da aber für Rolipram geringe Halbwertszeiten von ca. 30 Minuten bis 3 Stunden bei Ratten nachgewiesen sind (Krause, Kühne 1988), ist eine serielle Untersuchung nicht durchführbar. COR wird episodisch sezerniert, so dass die hier benutzten Abstände der Messungen zur Beurteilung der Messwerte zu groß sind (Moore-Ede, Sulzman, Fuller 1982). Unabhängig davon ist der Gipfel der COR-Konzentrationen in der zweiten Hälfte der L-Phase zu erwarten, wenige Stunden vor Beginn der Aktivitätsperiode (Krieger: Rhythms in CRF, ACTH and corticosteroids in Krieger (Hrsg.): Endocrine Rhythms, Comprehensive Endocrinology Series 1979). Werden Ratten Stress ausgesetzt, ist der höchste Anstieg von COR in der Talphase in der zweiten Nachthälfte zu erwarten (Dunn, Scheving, Millet 1972).

Neuroendokrine Reaktion auf Stress

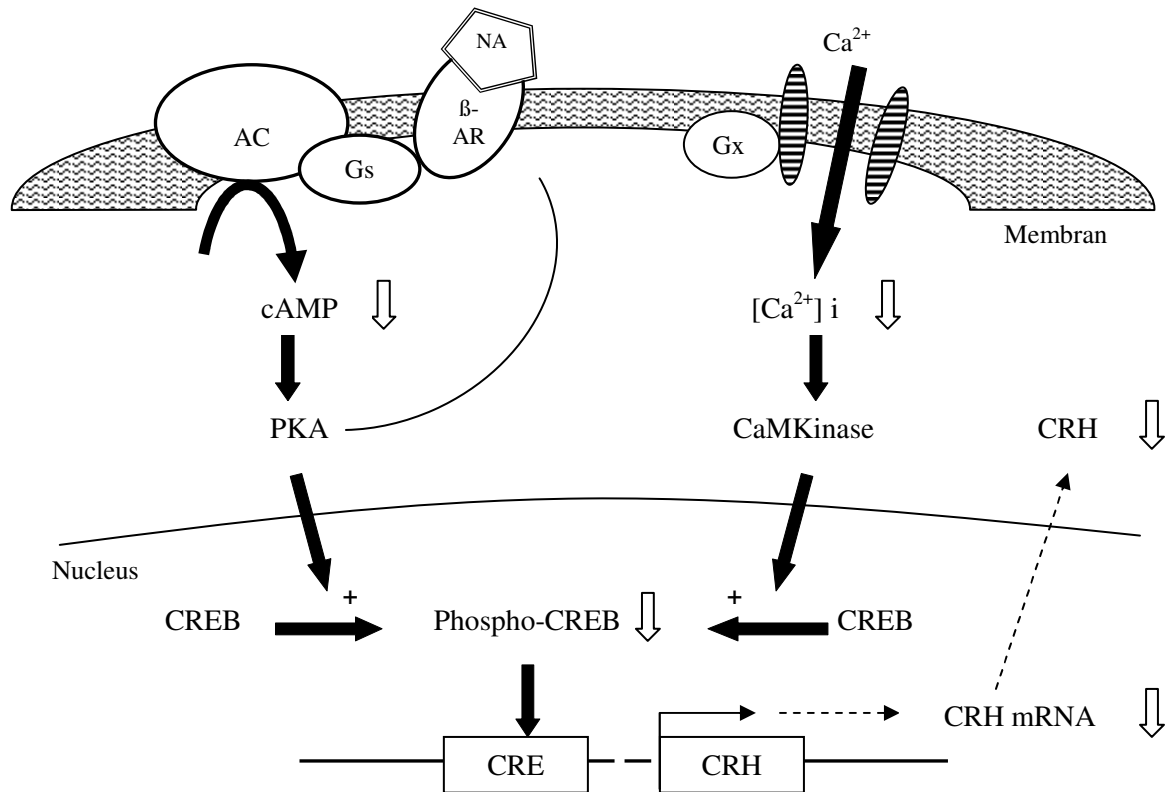
Die akute Antwort auf Stress ist notwendig, um die Homöostase im Organismus aufrechtzuerhalten. Frühzeitiger Lebensstress oder chronischer Stress sowie eine Fehlregulation des HPA-Systems können klinisch zu Affekterkrankungen führen (Bale, Vale 2004). Eine Beeinflussung vieler weiterer körpereigener Systeme wie Immunfunktion, Energiehaushalt und kardiovaskuläres System finden parallel statt (Habib, Gold, Chrousos 2001).

In Tiermodellen von Angst- und depressiven Erkrankungen werden CRH und eng verwandte Neuropeptide wie Urocortin (UCN) als auslösende Faktoren der Verhaltensänderungen identifiziert (Arborelius et al. 1999, Gold, Chrousos 2002). Es bestehen zusätzliche Verbindungen von erhöhtem CRH zu traumabezogenen Erkrankungen wie der posttraumatischen Belastungsstörung (Kasckow, Baker, Geraciotti 2001, Yehuda 2001).

CRH wirkt nicht nur über die HPA-Achse, sondern auch direkt im Gehirn. In klassischen Hirnarealen der Stressantwort wie dem LC bewirkt bei Ratten eine direkte Infusion von CRH in den LC eine Freisetzung von NA in den präfrontalen Cortex, eine vorhergehende Blockade durch CRH-Antagonisten blockiert die Aktivierung durch Stressoren (Clark, Kaiyala 2003). Dem entsprechen der Nachweis einer erhöhten CRH-Konzentration im Liquor von Depressiven sowie die verringerte Zahl von CRH-Bindungsstellen im Frontalkortex von Suizidalen (Nemeroff et al. 1984, Banki et al. 1987, Owens, Nemeroff 1988). Depressive Patienten zeigen eine abgeschwächte ACTH-Antwort nach Gabe von ovinem CRH (Gold et al. 1984 und 1986, Holsboer et al. 1984). Sie ist nicht auf eine abgeschwächte Reaktivität der Nebennieren zurückzuführen, so dass die Hypercortisolämie mehr durch die zentralen Effekte an der HPA-Achse bedingt ist (Jiang et al. 2000). Die Regulation der Funktion des LC bei bekannter Assoziation zwischen einer gestörten NA-ergen Aktivität und Affekterkrankungen ist klinisch wesentlich, da NA-erg wirksame AD die stressinduzierten Anstiege der CRH-Expression im PVN abschwächen, ohne die basale CRH-Expression zu beeinflussen (Clark, Kaiyala 2003). CRH-Rezeptorantagonisten zeigen in klinischen Studien ebenfalls ihre Wirksamkeit bei der Behandlung von Affekterkrankungen mit einer HPA-Achsen-Überaktivität (Zobel et al. 2000).

Die Kortikosteroidrezeptor-Hypothese beschreibt die abgeschwächte Regulation zur Reduzierung von CRH und AVP durch periphere Kortikosteroide als eine fehlende Abschaltung der CRH-Genexpression (Holsboer 2000, 2001, 2003). Das im Promotorgen für CRH vorhandene cAMP response element (CRE) bindet an ein CREB zur Aktivierung der CRH-Transkription. AD erhöhen durch Aktivierung einer phosphorylierenden PKA CREB. Die andauernde Erhöhung von biogenen Aminen bewirkt durch unempfindlicher werdende Rezeptoren eine Verringerung der CREB-Phosphorylierung und damit der CRH-Genexpression. Dieser zeitaufwendige Ablauf ist ein Teil der Erklärung für die zeitliche Verzögerung in der klinischen Wirkung von AD. Die biologischen Wirkungen von CRH werden über zwei Subtypen des Rezeptors vermittelt. Über den CRH-R1 werden zumeist die CRH-verursachten Effekte bei Depression und Angst-erkrankung ausgelöst (Holsboer 2003). Der CRH-R2 ist nicht anxiogen wirksam, aber in der akuten Stressphase als auch in der Erholungsphase aktiv. Die Aktivierung des CRH-R2 in knockout Mäusen zeigt aber durch eine überschießende Stressantwort einen möglichen gegensätzlichen Effekt zu den Effekten am CRH-R1, auch wenn dieser Effekt bei i.c.v. Gabe von CRH-R2-Antagonisten keine erfolgreiche Hemmung der HPA-Aktivierung bewirkt (Clark, Kaiyala 2003).

Bild 1



AC= Adenylatcyclase
Gs/x = G-Proteine (stimulierend/hemmend)

β-AR = β-Adrenozeptor
NA = Noradrenalin

CaMKinase = Calmodulinkinase
PKA = Proteinkinase A

Bild 1: Postulierte Effekte von AD führen zu verringerter Aktivierung (Phosphorylierung) von reichlich vorhandenem CREB und nachfolgender Abnahme der CRH-Genexpression (nach Holsboer 2001)

Zur Einschätzung des aktuellen Status' einer depressiven Erkrankung wird klinisch der kombinierte Dexamethason/ CRH-Test eingesetzt, er zeigt die Störung der peripheren Kortikosteroid-Rückkopplung auf die zentrale CRH-AVP-Genexpression an (Modell et al. 1997, Holsboer 2001). Bei anhaltender Überaktivität der HPA-Achse besteht eine positive Korrelation zu chronischen Verläufen oder Rückfällen bei depressiven Erkrankungen (Zobel et al. 1999). Durch die unter einer Behandlung eintretende Gesundung werden auch die beschriebenen Störungen der HPA-Achse wie Hyperkortisolämie, Nichtunterdrückbarkeit durch Dexamethason und eine abgeschwächte ACTH-Antwort aufgehoben (Arborelius 1999).

Physiologische und pathologische Effekte

Eine biologische Definition von Stress beinhaltet physiologische Veränderungen, bei der Ungleichgewichte in der inneren Homöostase auftreten und die Adaptation daran einen Überlebensvorteil erzeugt. Die erfolgreiche Antwort beinhaltet dabei sowohl die Hormonsekretion als auch die Kontrolle dieser Antwort auf Stress. Die HPA-Achse und das sympathische, adrenomedulläre System (SAM) sind Anteile dieses Stresssystems. Durch die synergistische Wirkung von CRH und AVP bei der Aktivierung der HPA-Achse werden ACTH und POMC-abhängige Opioidpeptide freigesetzt und das zentrale LC-NA System stimuliert (O'Connor, O'Halloran, Shanahan 2000). Die Aktivierung der HPA-Achse bewirkt über eine gemeinsame CRH- und AVP-Freisetzung durch ACTH eine Glukokortikoidfreisetzung, die über zwei Rezeptoren geregelt wird – den MR mit hoher Affinität und tonischer Aktivität und den GR mit 10-fach geringerer Affinität und phasischer Aktivität. Die MR, überwiegend im Hippocampus lokalisiert, sind in die Kontrolle der basalen Konzentrationen der Kortikoide involviert, die weiter verbreiteten GR mehr in die Kontrolle des circadianen Rhythmus und der stressinduzierten Kortikoidproduktion. Über Fasern vom PVN des Hypothalamus zum LC wird das SAM stimuliert, das die akute Stressantwort auslöst (Farvolden, Kennedy, Lam 2003). Auf zellulärer Ebene wird durch einen GR- „heat shock protein“ (HSP)-Komplex unter Freisetzung von HSP das Kortikoid aufgenommen und in den Zellkern transportiert. Durch die Bindung an glucocorticoid-responsive elements (GRE) der DNA kann mit der Gentranskription eine Immunantwort moduliert werden. Dabei werden Zytokinbildung (IL 1 β und 6) und entzündungsfördernde Transkriptionsfaktoren wie nuclear factor κ B (NF κ B) gehemmt. Die Aktivierung von IL-1 steigert dabei die Funktion des zentralen NA-ergen Systems und schwächt die des 5-HT-Systems ab (Leonard 2001). So wie die proinflammatorischen Zytokine IL-1, IL-6 und TNF α als Teil der Wirtsantwort bei Infektionen freigesetzt werden, können diese zusätzlich die HPA-Achse stimulieren und damit die Sekretion von Glukokortikoiden erhöhen (Rivier et al. 1989). Das dabei entstehende Krankheitssyndrom erinnert an das in Patienten mit Depression (Papanicolaou 1998). Durch die Hypersekretion von Glukokortikoiden in der Depression zeigt sich eine verminderte Funktion von GR an Immunzellen, die durch eine effektive AD-Behandlung wieder normalisiert werden kann. Somit stellt die Immunaktivierung eine wesentliche Komponente in der Pathogenese der Depression dar (Leonard 2001), die schon in der Makrophagentheorie der Depression beschrieben wurde (Smith 1991).

Ein weiteres System, das bei Depressiven verändert ist, ist die cAMP-kontrollierte PKA. Sie moduliert im Zellkern verschiedene cAMP-empfindliche Faktoren wie die CREB, die z.B. Gene des BDNF kodieren, der bei Depression und Suizid nachweislich beteiligt ist (Serafini et al. 2011). Bei Suizidalen ist die PKA regional (frontaler Kortex) und bei Depressiven insgesamt vermindert aktiv (Shelton, Manier, Sulser 1996, Dwivedi, Rizawi, Pandey 2002). PKA erscheint damit wesentlich beteiligt an Vorgängen im Umgang mit Stress und dem Erlernen von Vermeidungsreaktionen, die für suizidale Reaktionen mitverantwortlich sind (Dwivedi, Pandey 2011). Nach der Therapie mit AD können bei depressiven Patienten postmortal im präfrontalen Kortex erhöhte CREB-Konzentrationen gefunden werden, ansonsten wird dort und in anderen Regionen emotionaler Regulation wie Hippocampus und Amygdala eine verminderte Expression von CREB und PKA gefunden (Serafini et al. 2011). Da Rolipram die cAMP-vermittelte Aktivierung von CREB bewirken kann (im Tierversuch nach i.p. Gabe - Fujioka, Fujioka, Duman 2004), kann über eine Verbesserung der synaptischen Plastizität seine antidepressive Wirkung vermittelt werden (Nagakawa 2002).

Verhaltenseffekte beim Tier

Zur gezielten Untersuchung von CRH-Wirkungen werden Tierstämme gezüchtet, die eine veränderte Reaktion auf Stress zeigen oder bei denen CRH-Rezeptoren nicht mehr gebildet werden (Bale, Vale 2004). Die dabei zu beobachtenden Veränderungen beziehen sich nicht nur auf die HPA-Achse, sondern auch auf Lernen und Gedächtnis sowie exploratives und motorisches Verhalten (Müller, Holsboer, Keck 2002). Die Ängstlichkeit bei Ratten z.B. gegenüber einer neuen Umgebung kann als Stimulus zur Auslösung von GR beitragen, das durch Anxiolytika wie Benzodiazepine verringert werden kann (Rodriguez Echandria, Broitman, Foscolo 1983, Dunn et al. 1981).

Über das CRH/CRH-R1-System werden dabei motorische Aktivität, Schlaf und vor allem angstgekoppeltes Verhalten beeinflusst (Liebsch et al. 1995). Durch die Herabregulation des CRH-R1 wird ein signifikanter anxiolytischer Effekt bei Ratten *in vivo* und *in vitro* beobachtet (Liebsch et al. 1999, Skutella et al. 1998), der unabhängig von der HPA-Aktivität ist (Müller et al. 2003). Außerdem zeigt sich, dass Urocortin als CRH-R2 Agonist und die Aktivierung der CRH-R2 Achse nicht für die Aktivierung der HPA-Achse notwendig sind (Clark, Kaiyala 2003).

Durch die Züchtung von Rattenstämmen mit gesteigertem bzw. verringertem Angstverhalten (HAB = high anxiety-related behaviour und LAB = low anxiety-related behaviour –Ratten) können die CRH-rezeptorvermittelten Effekte gezielt untersucht werden. Das Verhalten der Tiere unterscheidet sich durch angeborene Ängstlichkeit, Stressbewältigung als auch Reaktivität gegenüber Benzodiazepinen (BDZ) und AD. HAB-Ratten haben dabei eine gesteigerte Empfindlichkeit auf einen bekannten externen Stressor und eine pathologische Antwort im Dexamethason-CRH-Test wie bei depressiven Patienten (Liebsch et al. 1998, Holsboer 2001). Sie zeigen zusätzlich eine gesteigerte HPA-Empfindlichkeit gegenüber externen Stressoren, was eine gesteigerte CRH-Freisetzung aus den PVN-Neuronen belegt (Landgraf et al. 1999).

Bei Ratten entsprechen die Verhaltensänderungen durch erhöhtes CRH im Explorations- und Sexualverhalten und der motorischen Aktivität denen in Tiermodellen der Depression und zeigen anxiogene Effekte an (Dunn, Berridge 1990). Über den zentralen Kern der Amygdala, der als einziges Kerngebiet der Amygdala reziproke Verbindungen zu den autonomen Zentren des Hirnstamms hat, wird in der Ratte *in vivo* die vegetative Komponente der Verhaltensantwort auf stressinduzierende Umweltstimuli vermittelt.

Weitergehende Untersuchungen in einem der Standardtests zur AD Wirksamkeit („Forced Swimming Test“ - FST), zeigen dabei aber deutlich, dass die nachgewiesene Wirkung von verschiedenen Klassen von AD auf der Beeinflussung ihrer jeweiligen Transmittersysteme beruhen. So können sowohl NA-erg als auch 5-HT-erg wirksame AD in diesen Tests über das jeweilige System ihre AD Wirksamkeit belegen, ohne das jeweils andere System dabei zu stören (Page et al. 1999, Page, Brown, Lucki 2003).

Bild 2

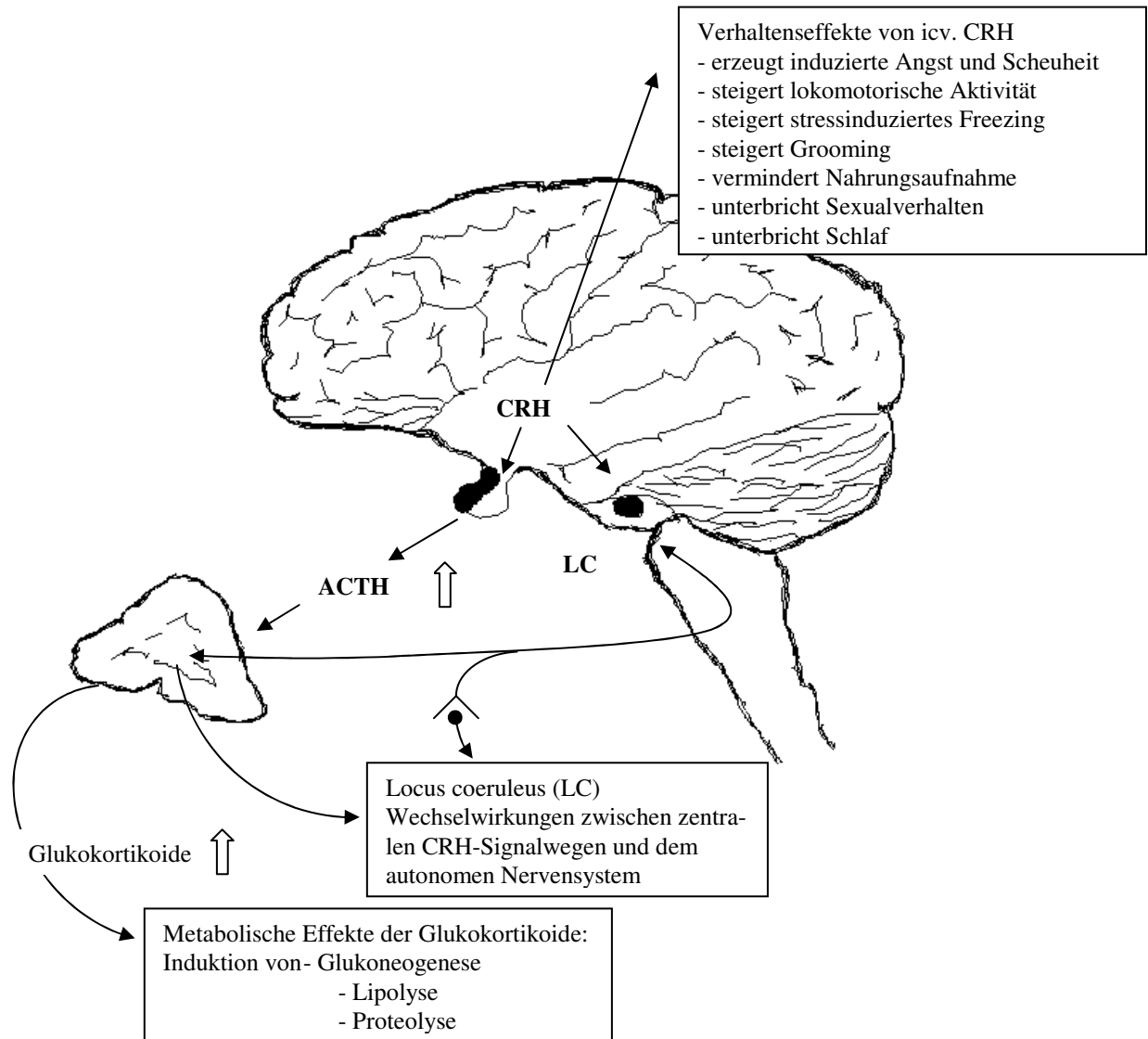


Bild 2: Erhöhte Konzentrationen von CRH induzieren depressionsähnliche Symptome in Tieren
(nach Holsboer 2003)

CRH und vegetatives Nervensystem

Zentrale Ebene

Durch die Bindung von CRH an seine Rezeptoren im Hypophysen-Vorderlappen wird ACTH freigesetzt. Durch Glukokortikoide wird bei Ratten *in vivo* und *in vitro* in der Hypophysenzellkultur nur im *Vorderlappen* die Transkription des POMC-Gens (Gagner, Drouin 1987) und *in vivo* die Freisetzung von ACTH gehemmt und eine verringerte Antwort auf NA und post-synaptischen Agonisten wie cAMP-Analoga beobachtet. Die negative Feedbackhemmung von Glukokortikoiden im Regelkreis der LHP-Achse wird durch Katecholamine über β -Rezeptoren im Hippocampus (Hauger et al. 1987) und einen cAMP-vermittelten Mechanismus an den CRH-freisetzenden Zellen des PVN ausgeübt (Plotski, Cunningham, Widmaier 1989).

Auf den corticotrophen Zellen der vorderen Hypophyse sind bei Ratten *in vivo* β -Rezeptoren vorhanden (Sato et al. 1989), bei denen durch ihre Antagonisten eine Steigerung (Plotski, Cunningham, Widmaier 1989) oder Hemmung (Szafarczyk et al. 1987) der ACTH-Sekretion bewirkt werden kann. Über *i.p.* applizierte Katecholamine (Adrenalin) kann bei Ratten *in vivo* über β_2 -Rezeptoren eine Steigerung der ACTH-Freisetzung bewirkt werden, so dass auch Katecholamine bei bestimmten Stressformen neben der sonst überwiegenden Stimulation durch CRH auf ACTH einwirken (Reisine 1985).

Im *Mittellappen* steigern CRH, cAMP-Analoga, Forskolin oder IBMX *in vivo* und *in vitro* eine Freisetzung von α -MSH, die durch β -adrenerge Agonisten und DA reguliert wird. DA hemmt die POMC-Transkription, ohne die ACTH-Freisetzung aus den Vorderlappenzellen zu beeinflussen (Gagner, Drouin 1985 und 1987).

Periphere Ebene

Im peripheren sympathischen System bewirkt CRH im Nebennierenmark und an sympathischen Ganglien ebenfalls eine Aktivierung der AC und Sekretion von Katecholaminen (Udelsman et al. 1986). Eine DA-erge Beeinflussung der CRH-Freisetzung konnte dabei ausgeschlossen werden. Extrazerebrale Bindungsstellen von CRH finden sich zusätzlich in allen sympathischen Ganglien von Primaten (Dunn, Berridge 1990), so dass damit weitere periphere Interaktionen zwischen CRH und NA-ergen Systemen möglich sind. Speziell im SCG innervieren präganglionäre CRH-reaktive Fasern aus dem thorakalen Sympathicus, durch die CRH das autonome System direkt beeinflussen kann (Wanaka et al. 1987).

Im Uterus kurz vor Entbindung ist die PDE4 die dominante PDE. Rolipram kann zu diesem Zeitpunkt im Modell mit humanen und tierischen Zellen den relaxierenden Effekt des stark erhöhten, lokal freigesetzten CRH weiter verstärken. CRH kann durch seine chronische cAMP-Erhöhung mit nachfolgender Verringerung der relaxationsfördernden Signalwege die Kontraktilität verstärken (Tyson, Smith, Read 2009).

CRH und Verhalten

Kategorisierung

Nach Silverman 1978 werden bei der Ratte verschiedene Kategorien an Verhalten unterschieden:

- nicht-soziales Verhalten:
- Explorationsverhalten („Exploration, Walking, Rearing“),
- Maintenanceverhalten („Washing, (Self)-Grooming, Scratching, Shaking, Eating, Drinking, Urinate, Defecate“) und
- Residualverhalten („Digging, Bouncing“),
- soziales Verhalten und
- Fluchtverhalten.

Maintenance-Verhalten

Physiologisches Verhalten

Beim Maintenance-Verhalten nimmt das Pflegeverhalten (grooming/GR) bei der wachen Ratte einen großen Anteil der Aktivität der Tiere ein (Bolles 1960) und kann zwischen 25-40 % der Wach-Zeit in Anspruch nehmen. Es tritt gehäuft in der Phase vor und nach der Schlafperiode auf (Bolles 1960, Spruijt, van Hooff, Gispen 1992). Physiologisch wird damit die Grenze zwischen innerem und äußerem Milieu in einem ausgeglichenen Zustand gehalten (Jolles 1980).

Maintenance-Verhalten tritt auch in anderen Situationen auf:

bei der Temperaturregulation, als Reaktion auf unerwartete Stimuli, in Konfliktsituationen und bei Frustrationen (Jolles 1980). Dieses stress- oder konfliktbezogene Verhalten wurde schon 1940 von Tinbergen als „Übersprungsbewegung“ bezeichnet. Dabei werde durch die fehlende Möglichkeit, einen „Drang“ abzureagieren, ein „Überspringen auf ein ‘ Nebengeleise ’ “ erforderlich.

Das Pflegeverhalten tritt bei Ratten dabei eher in der Phase nach einer Aktivierung auf und zeigt den Prozess einer De-Aktivierung an. Es kann dabei nach Sozialkontakten, Sexualverhalten und explorativem Verhalten auftreten und dem Schlafen vorangehen (Spruijt, van Hooff, Gispen 1992).

Induziertes Verhalten

Physiologisches Verhalten und ACTH

Die Steigerung der Vigilanz aktiviert sowohl die HPA-Achse als auch das Pflegeverhalten. Daher wurde deren Beziehung eingehend untersucht. Die Integrität der HPA-Achse ist dabei keine notwendige Voraussetzung für die Induktion von GR, da auch hypophysektomierte Ratten in neuer Umgebung ein gesteigertes GR zeigen. Zur Auslösung des GR ist keine Aktivierung der HPA-Achse erforderlich (Dunn, Berridge 1990). CRH bewirkt bei Ratten einen Zustand erhöhter Wachheit mit gesteigerter Bewegung (locomotion), Sniffing, Grooming und Rearing in bekannter Umgebung und verringertem Fressen und Sexualverhalten (Koob 1985, Koob, Bloom 1985). ACTH ist aber von Bedeutung für das Pflegeverhalten, da es nach intrakranialer Gabe bei Nagern ein Stretching- und Yawning- (YAW)-Syndrom nach ausgiebigem GR auslöst (Spruijt, van Hooff, Gispen 1992). Das GR kann dabei unterbrochen sein von Scratching (Kratzen - SCR), Wiping (Wischen), Licking (Lecken) und Shaking (Schütteln) des gesamten Körpers (Aldridge 2005).

Dabei wird syntaktisches GR (mit einer festen und kompletten Sequenz von Bewegungen) durch DA-erge Inputs zum Striatum via D1-Rezeptoren gesteigert (Berridge, Aldridge 2000 a und b). CRH erzeugt zwar exzessives GR, bewirkt aber sonst eine Verringerung von GR und dabei auch eine Verringerung von vollständigem GR (Dunn, Berridge 1990). Das CRH-induzierte GR kann durch 5-HT_{1A} Rezeptoragonisten gehemmt werden. Damit wird im Modell eine anxiolytische Wirkung der Agonisten auf ein stressbezogenes Verhalten belegt (Lazosky, Britton 1991), andererseits kann durch eine 5-HT Depletion das Verhalten nicht beeinträchtigt werden (Temel et al. 2003).

Induktion von Verhalten durch ACTH, MSH- und andere Peptide

Neben ACTH können Melanozyten-stimulierendes Hormon (MSH)-ähnliche Peptide und Dynorphin Pflegeverhalten induzieren, das dem zentral kontrollierten ähnelt (Aloyo et al. 1983). Lokale Applikation von ACTH und β - Endorphin in das periaquäduktale Grau bewirken exzessives GR und SCR, wobei letzteres mit Endorphinen assoziiert ist und vornehmlich durch Naloxon gehemmt werden kann (Spruijt, van Hooff, Gispen 1992).

Bei der Modulation von ACTH-induziertem GR sind das Neostriatum und die Substantia nigra (pars reticulata) als DA-erge Kerngebiete beteiligt, D₁-DA-erge Agonisten steigern dabei eine komplette Groomingsequenz (syntaktisches GR). ACTH kann GR exzessiv steigern, wobei die Sequenz seltener komplett beendet wird (Dunn, Berridge 1990, Aldridge 2005).

Das durch andere Neuropeptide ausgelöste GR lässt sich vom ACTH-induziertem GR unterscheiden. Bei Oxytocin und Prolactin überwiegt ein genital grooming (GGR), das im Gegensatz zu ACTH-induziertem GR durch Naloxon nicht gehemmt werden kann. Tachykinine induzieren ein faziales GR, durch Bombesin kann SCR induziert werden. Bei diesem sind zentrale cholinerge und DA-erge Systeme beteiligt (Spruijt, van Hooff, Gispen 1992).

Induktion von Verhalten und PDE-Hemmung

Durch Hadley, Flack, Buckingham konnte bereits 1993 bei Ratten *in vitro* der Nachweis geführt werden, dass Rolipram die ACTH-Freisetzung in Ruhe und nach Stimulation mit Hypophysenextrakt steigert. Rolipram steigert *in vitro* an kultivierten Hypophysenvorderzellen die basalen intrazellulären cAMP-Gehalte (Koch, Lutz-Bucher 1989). In 2002 zeigten Lim, Shipston, Antoni, dass in einer Primärkultur von Rattenhypophysenzellen Rolipram die verstärkende Wirkung von AVP auf CRH für die Bildung von cAMP und ACTH nachahmt und die hemmende Wirkung von COR auf die Freisetzung von ACTH abschwächt. Peripher bewirkt systemisch verabreichtes Rolipram bei Balb/c Mäusen *in vivo* eine Steigerung der COR-Konzentrationen (Pettipher et al. 1996). Kumari et al. konnten dieses 1997 bei Ratten nach *i.p.*-Gabe bestätigen. Da nicht nur CRH, sondern auch ein Hypophysen-Adenylatcyclase-aktivierendes Peptid (pituitary adenylate cyclase-activating peptide PACAP) *in vitro* an corticotrophen Zellen der Mauthypophyse den cAMP-Gehalt erhöht, kann Rolipram diesen Effekt über ein CRE steigern (Boutillier et al. 1994). In Untersuchungen zur intrazerebralen Hypoxie bei Ratten *in vivo* wird durch Rolipram wie auch durch weitere chronisch verabreichte NA-erge und 5-HT-erge AD die cAMP-CRE Signalkaskade aktiviert (Lee et al. 2004, Nibuya, Nestler, Duman 1996). Damit ist es möglich, dass Rolipram die Konzentration von COR durch eine Aktivierung der HPA-Achse erhöht (Kumari et al. 1997). Im Modell der „Learned helplessness“ zeigen Ratten den erwarteten Anstieg von Plasma-COR, aber eine verminderte Aktivität von AC, PDE 4 und CREB-Aktivität im akuten Stadium in Frontalkortex, Hippocampus und Striatum, die von einem Anstieg der PDE4 Aktivität aufgrund eines erniedrigt gebliebenen cAMP-Levels in der späteren Phase abgelöst wird (Itoh et al. 2003).

Rolipram erhöht bei chronischer Applikation in der Ratte die Expression von CREB (Nibuya, Nestler, Duman 1996). Phosphoryliertes CREB in Gyrus dentatus und Neokortex bei Ratten und im Nucleus accumbens bei Ratten und Mäusen *in vivo* im FST zeigen die Beteiligung von CREB bei stressinduzierten Verhaltensantworten an (Bachmann et al. 2005, Kreibich, Blendy 2004, Pliakas et al. 2001). Bei Ratten werden diese Wirkungen über den GIR vermittelt (Bachmann et al. 2005).

Die direkte Regulation innerhalb der LHPA-Achse kann auch durch einen überlagernden Effekt des SCN als primären Schrittmacher beeinflusst werden, da der COR-Rhythmus entsprechende beleuchtungsabhängige Schwankungen aufweist (Moore-Ede, Sulzman, Fuller 1982).

Induktion von Verhalten durch db-cAMP

Db-cAMP kann in verschiedenen katecholaminergen Systemen Verhaltenseffekte nachahmen oder verstärken. I.c.v. verabreicht kann es bei intakten Ratten eine grobmotorische Aktivierung mit Vorwärtsbewegungen, „Circling“, und „Rearing“ hervorrufen. „Grooming“, Kopfwiegen und „Scratching“ können als feinmotorische Bewegungen auftreten. Zusätzlich können Schwanz-anheben, Haarsträuben und Konvulsionen hervorgerufen werden. Zwischen einzelnen Konvulsionen treten Zustände stuporöser Ruhe auf (Lin, Chen, Chuang 1984). Nach chronischer Verarmung an Monoaminen durch i.c.v. Gabe von 6-OHDA steigern NA und db-cAMP i.c.v. bei der Ratte in vivo die motorische und explorative Aktivität („Walking“, „Sniffing“, „Washing“, „Rearing“).

Der Anstieg der Aktivität tritt erst nach 30 Minuten nach Applikation von db-cAMP ein, wie sie auch nach Einsetzen von Ratten in einen neuen Käfig beobachtet wird (Brus, Herman, Kostman 1974). Bei gleichzeitiger i.c.v. Applikation von NA und db-cAMP potenziert db-cAMP die exzitatorische Wirkung von NA (Herman 1973).

Das durch db-cAMP gesteigerte Verhalten wird durch 5-HT und ACh gehemmt, die die spontane motorische und explorative Aktivität in Ratten auch direkt hemmen können. DA steigert bei Ratten in vivo bei i.c.v. Administration die motorische Aktivität und das durch db-cAMP hervorgerufene „Jumping“ (Herman 1975).

Quasi-Morphin-Withdrawal-Syndrom (QMWS)

Noradrenalin und cAMP

Collier und Francis postulierten 1975, dass das True-Morphin-Withdrawal-Syndrom (TMWS) auf eine erhöhte Aktivität neuraler cAMP-Mechanismen zurückzuführen sei. Ausgangspunkt war die Annahme, dass bei Opiatabhängigkeit durch die Substanzwirkung ein neuronales cAMP-System gehemmt wird, das dadurch hypertrophiert. Um diesen Effekt zu unterdrücken, wurden primär PDE-Hemmer wie Iso-butyl-methyl-Xanthin (IBMX), Ro 20-724 und ICI 63 197 getestet, die das von Collier et al. 1974 erstmals beschriebene Quasi-Morphin-Withdrawal-Syndrom (QMWS) in Ratten auslösen können.

Dabei werden hauptsächlich folgende Verhaltensweisen und Symptome beobachtet: Ptosis, Rearing, Body shakes, Head shakes, Unruhe und Durchfall (Collier, Cuthbert, Francis 1981). Bei Rolipram werden dabei ähnliche Verhaltensänderungen wie beim QMWS beobachtet (Wachtel 1982).

Bei dem akuten, durch Methylxanthine ausgelösten QMWS können in vivo HTW bei Nagern nur in der Ratte beobachtet werden (Collier 1974). Die Verhaltensänderungen treten 20 Minuten nach Applikation auf und halten bis zu 180 Minuten an (Collier, Cuthbert, Francis 1981). Sie sind korreliert mit der Fähigkeit zur Hemmung einer zerebralen cAMP-abhängigen PDE (Collier, Cuthbert, Francis 1981, Galloway, Roth 1983) und sind in vivo bei Ratten stereospezifisch durch Opiode und ihre Antagonisten zu modulieren (Zaluzny et al. 1979, Collier, Cuthbert, Francis 1981). Bei der Aktivierung von zentralen NA-ergen Neuronen werden sowohl beim TMWS, als auch bei dem von Methylxanthinen induzierten QMWS NA-erge Neurone im LC aktiviert, die durch endogene und exogene Opiate wirksam gehemmt werden (Grant, Redmond 1982). Der Opiatentzug aktiviert dabei wirksam Neurone des LC (Aston-Jones et al. in Hammer, R (Hrsg.): The neurobiology of opiates New York 1993). 5-HT-erg wirksame Substanzen schwächen die LC-Hyperaktivität während des Opiatentzuges bei Ratten in vivo ab (Aston-Jones et al. 1991).

Da die Verhaltenseffekte von Psychostimulantien und Opiaten auch über cAMP-abhängige Systeme vom Nucleus accumbens vermittelt werden, können PDE-4-Hemmer (Rolipram) das durch diese Substanzen ausgelöste Verhalten abschwächen (Thompson et al. 2004) und bei chronischer Gabe von Morphin die Entwicklung einer Abhängigkeit verhindern (Hamdy et al. 2001).

Induktion von Verhalten durch CRH-Antagonisten

Der Morphinentzug in abhängigen Ratten zeigt in einem Testsystem zur antidepressiven Aktivität (FST, Porsolt 1979) das Auftreten eines depressionsähnlichen Verhaltens als Ausdruck eines negativen affektiven Status (Anraku et al. 2001). Die Hemmung eines Angstverhaltens durch CRH-Antagonisten führt bei Ratten auch im Entzug bei chronischer Kokain-Abhängigkeit zu einem verringerten Ängstlichkeits-Verhalten (Liebsch et al. 1995). Diese Effekte und die Blockade eines Morphinentzuges in Ratten werden durch den CRH-Rezeptor 1 (CRH-R1) vermittelt. Durch die Blockade des CRH-R1 wird ebenfalls die stressinduzierte Reaktivierung

der Suche nach Kokain bei vormals abhängigen Tieren verhindert (Clark, Kaiyala 2003). Derselbe Effekt kann auch bei Opiatabhängigkeitsmodellen beobachtet werden. So kann durch CRH-R1 Antagonisten ein TMWS in Ratten abgeschwächt werden (Iredale et al. 2000, Lu et al. 2000).

Die Blockade des CRH-R1 führt in einer explorativen klinischen Studie zur Verringerung von depressiven Symptomen bei Patienten (Zobel et al. 2000) und kann zu einer Senkung von Rückfällen nach vorangegangenen Suchtabhängigkeiten beitragen, wie bei Modellen zur Kokain- und Alkoholabhängigkeit gezeigt werden konnte (Clark, Kaiyala 2003).

Induktion von Head Twitches

HTW gehören zu einem natürlich vorkommenden Verhaltenskomplex, der von einem leichten Kopfschütteln bis zu massivem Körperschütteln reicht. Am umfangreichsten untersucht sind dabei 5-HT-erg wirksame Substanzen. „Shaking“-Verhalten kann vielfältig hervorgerufen werden durch pharmakologische (5-HT_{1A} Agonisten), elektrische (Hippocampusstimulation) und physikalische Reize (Pinnareflex) (Handley, Singh 1986, Vetulani et al. 1980).

Das als sog. 5-HT-Syndrom benannte Verhalten bei der Ratte umfasst dabei Tremor, Rigidität, Anziehen der Hinterpfoten, Schütteln der Vorderpfoten, den „Straub“ Rücken und Kopfschütteln (Jacobs 1976). Die stärkste Form des Schüttelns - der „Wet dog shake“ - kann in der Ratte in vivo durch elektrische Stimulation des Hippocampus ausgelöst werden (Handley, Singh 1986). Durch wiederholte elektrokonvulsive Schocks werden 5-HT Rezeptoren aktiviert, die dann zu einem verstärkten 5-HT-assoziierten „Shaking“ führen (Green, Heal: The effects of drugs on serotonin-mediated behavioural models in Green (Hrsg.): Neuropharmacology of serotonin 1985). Das Syndrom wird durch 5-HT_{1A} Rezeptoren vermittelt, wobei auch β_2 -Rezeptor-Antagonisten mit hoher 5-HT_{1A} Affinität die Wirkung blockieren können (Trulson, Eubanks, Jacobs 1976, Lucki, Wieland 1990). Anatomisch gemeinsam ist die der Auslösung zugrundeliegende Region im Hirnstamm zwischen den Colliculi und der vorderen Kommissur.

β -Rezeptoragonisten modulieren die 5-HT induzierte HTW Antwort, indem sie die HTW potenzieren bzw. hemmen. Moduliert wird die HTW-Antwort auch durch DA-erge und NA-erge Mechanismen (Handley, Singh 1985). α_1 -Rezeptorantagonisten hemmen präsynaptisch dosisabhängig in Ratten und Mäusen (Handley, Singh 1986, Vetulani et al. 1980); postsynaptisch führt eine α_2 -Rezeptoraktivierung zur Hemmung des „Shaking behaviour“ (Green, Heal: The effects of drugs on serotonin-mediated behavioural models in Green (Hrsg.): Neuropharmacology of serotonin 1985).

5-HT-induzierte HTW können weiterhin synergistisch beeinflusst werden über die Stimulierung γ -Aminobuttersäure (GABA)-erger Rezeptoren (GABA_a- und GABA_b) (Handley, Singh 1985 und 1986).

Melatonin

Einführung

In der Regulation der HPA-Achse bewirkt die Sekretion von CRH aus dem Hypothalamus nicht nur die vorbeschriebenen Effekte bei der Freisetzung von ACTH und von Cortisol bzw. Corticosteron, sondern auch die Sekretion weiterer Peptide, die aus dem gemeinsamen Precursor-molekül POMC hervorgehen. Dazu gehört neben β -LPH und β -EP auch N-terminales POMC (N-POMC₁₋₇₆). Diese Substanz potenziert die Wirkung von ACTH auf die Sekretion von Corticosteron in Nebennieren-Zellen von Ratten und bei (WISTAR-) Ratten in vivo und in vitro durch Steigerung seiner RNA-Synthese (Al Dujaili et al. 1981, Estivariz et al. 1982). Die aus POMC hervorgegangenen Peptide sind in hyperkortisolämischen Depressiven nach Verabreichung von Dexamethason erhöht (Leake, Griffiths, Ferrier 1989). Diese Hyperkortisolämie kann durch eine verminderte Sekretion zu geringeren MEL-Konzentrationen führen (Claustrat et al. 1984).

MEL ist einerseits eine tageszeitlich abhängige Variable, die von einem eigenständig oszillierenden SCN beeinflusst wird (Illnerova, Vanecek 1982). Dessen Aktivität ist aber vom Lichteinfall in der Retina abhängig, deren Ganglienzellen überwiegend via RHT mit Glutamat und PACAP diese Information zur Epiphyse vermitteln (Hannibal 2002). Mittels GABA hemmt der SCN am subjektiven Tag und stimuliert in der Dunkelphase die PVN-stimulierte MEL-Synthese (Kalsbeek 2000). Zur Etablierung eines Rhythmus kodieren Uhrengene wie Periodogene (Period *Per1*, *Per2*, *Per3*), Cryptochrom-Gene (*Cry1* und *Cry2*) sowie Gene für Transkriptionsfaktoren (*Clock* und *Bmal1*) die erforderlichen Proteine für die Regelkreise zur Entstehung einer 24-stündigen Oszillation. Durch BMAL1 und CLOCK wird die Bildung von *Per1-3*, *Cry1* und *2* und weiteren Uhrengenen aktiviert, durch deren Phosphorylierung Heterodimere zur Bildung von Komplexen führen, die diese Transkription wieder beenden (Korf, von Gall, Stehle 2003). Dabei steht die *Per1* und *Cry2* Gen-Expression unter positiver NA-erger Kontrolle aus dem SCG. Die Proteine werden zu Beginn der Dunkelphase wie die Arylalkylamin-N-Acetyltransferase (AA-NAT) exprimiert (Takekida et al. 2000, Fukuhara, Dirden, Tosini 2000). Die Induktion der *Per1* mRNA, des PER1 Proteins sowie der *Cry2* mRNA erfolgt über einen cAMP/PKA abhängigen Mechanismus unter Benutzung einer CRE Bindungsstelle im *mPer1* Genpromotor (Simonneaux et al. 2004). In der Dunkelphase wird die *Per1* Expression in der pars tuberalis der Hypophyse durch MEL über den Melatonin MT₁ Rezeptor unterdrückt (Dubocovich et al. 2003). Die Hemmung dieser cAMP-abhängigen Aktivierung wird im Verlauf der Dunkelphase durch MEL aufgehoben und bewirkt eine erhöhte Empfindlichkeit der AC zur Neubildung von cAMP und der von ihm beeinflussten Gene wie *Per1*, wodurch der Zyklus nach Absinken der MEL-Konzentration zur Hellphase hin erneut beginnen kann (Dubocovich et al. 2003, Korf, von Gall, Stehle 2003, Hastings, Maywood, Neill 2007).

Somit ist MEL andererseits eine photoperiodisch abhängige Variable, die von der Verteilung der Licht-Dunkel-Phasen abhängt, da überwiegend die Dauer der D-Phase die Synthese begrenzt (Illnerova, Vanecek 1982). Für die Etablierung eines empfindlichen Rhythmus' wie bei MEL ist der Lichtstärkenunterschied zwischen Licht- und Dunkelphase entscheidend.

Gedämpftes Licht in der Dunkelphase kann dann auch wie völlige Dunkelheit wahrgenommen werden (Lynch et al. 1981). Die AA-NAT ist als ein Schlüsselenzym bei der Synthese von MEL von der Stimulation der Expression seines Gens *Aa-nat* abhängig, die wie bei der Hydroxy-Indol-

O-Methyl-Transferase (HIOMT) durch ein P-CREB erfolgt (Roseboom, Klein 1995). In der Ratten-Epiphyse ist dies Folge der Induktion eines β -Rezeptor/AC/cAMP/PKA Stoffwechselwegs, der zusätzlich über die Induktion von *Crem* (cAMP response element modulator) die Bildung des Hemmproteins ICER (inducible cAMP early repressor) bewirkt, das in dieser Stoffwechselschleife dann die cAMP-induzierte Transkription wieder hemmt (Stehle et al. 1993 und 2001).

Damit besteht bei der der Synthese von MEL ein enger Zusammenhang zwischen der cAMP-Induktion und der Regulation seiner synthetisierenden Enzyme unter einem LD-abhängigen Rhythmus. Rolipram beeinflusst beide Prozesse, wodurch Auswirkungen bei der Applikation von Rolipram zu unterschiedlichen Tageszeiten auf die Konzentration von MEL erwartet werden können.

Phylogenetische Aspekte

In niederen Vertebraten beeinflusst Licht die Epiphyse als photorezeptives Organ direkt. Bei Säugern wird das durch indirekte Mechanismen der Lichtaufnahme und Weiterverarbeitung ersetzt. MEL ist ein Hormon, das in der Albinoratte fast ausschließlich durch die Epiphyse sezerniert wird. Es eignet sich gut zur Untersuchung der Beeinflussung von tageszeitlichen Schwankungen, die Sekretion von MEL folgt einem circadianen Rhythmus, der ab einem Alter von 35 Tagen bei WISTAR-Ratten mit einem durchschnittlichen Gewicht von etwa 120 Gramm vollständig entwickelt ist und bei dem die HIOMT als letztes Enzym bei der Synthese von MEL dann ihre volle Aktivität erlangt hat (Frowein, Lapin 1979, Niesink, van Ree 1982, Klein: Circadian Rhythms in the pineal gland in Krieger: Endocrine Rhythms 1979).

Genetische Konstanz

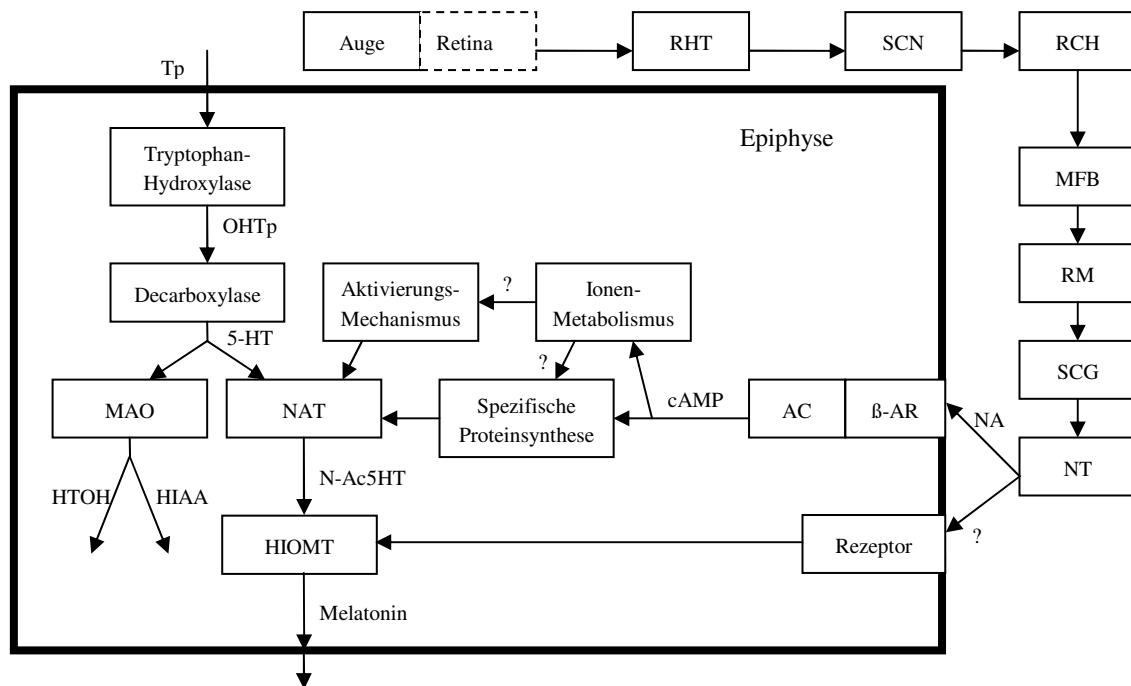
Die AA-NAT Gensequenz ist bei vielen Tierarten mit nur wenigen Abweichungen konstant. Somit können die Ergebnisse bei Mammaliern und niederen Spezies in vielen Aspekten auf den Menschen übertragen werden (Simonneaux, Ribelayga 2003). Die grundlegenden Mechanismen der tageszeitlichen Organisation von Rhythmen z.B. beim SCN sind bei einer hohen genetischen Konstanz von Drosophila bis Mensch der diesen Rhythmen zugrunde liegenden Uhrengene wie *Per*, *Clock*, *BMAL1* und *Cry* gut übertragbar (Richter et al. 2004, Hsu et al. 2003, Reppert, Weaver 2002).

Sympathicus und cAMP

Die Beeinflussung der Epiphyse erfolgt durch einen Kreislauf Retinohypothalamischer Trakt (RHT) – SCG – PVN und die dazugehörigen neuralen Verbindungen. Die Epiphyse wird daher auch als „Neural transducer“ bezeichnet, der vom hypothalamischen Schrittmacher angetrieben wird (Zatz, Mullen, Moskal 1988, Klein 2007). Die Axone aus dem PVN verlaufen zu den präganglionären sympathischen Fasern in der Columna intermediolateralis des thorakalen Rückenmarks. Von dort erfolgt der sympathische Input zu den oberen drei Kernen der SCG, von denen NA-erge Fasern zur Epiphyse zurückführen (Nervi conarii) (Zatz in Keibian, Nathanson (Hrsg.): Cyclic Nucleotides 1982).

Der sympathikotone Einfluss des SCG wird fast ausschließlich über NA auf die Epiphyse ausgeübt (Kappers 1960, Moore 1978b). Dabei wird durch α_{1B} - und β_1 -Rezeptoren die initiale Stimulation der AC potenziert, so dass durch den starken cAMP-Anstieg via CREB/CRE die AA-NAT gebildet wird (Klein 2007). Schon durch eine zehnprozentige Aktivierung der AA-NAT kann eine volle MEL-Synthese erreicht werden (Wheler et al. 1979).

cAMP kontrolliert damit einerseits die MEL-Produktion, andererseits stabilisiert es die AA-NAT und verhindert damit ihre Inaktivierung durch Verhinderung ihrer Proteolyse (Engel et al. 2004). Bei einem Abbau von cAMP durch PDE wird in Folge die Aktivität der AA-NAT verringert. Dabei hat die PDE-Aktivität der Epiphyse ebenfalls einen circadianen Rhythmus mit Maximum in der Mitte der D-Phase (Minneman, Iversen 1976).



AC	= Adenylatcyclase	β -AR	= β -Adrenozeptor
cAMP	= cyliches Adenosinmonophosphat	OHTp	= Hydroxytryptophan
5-HT	= 5-Hydroxytryptamin	HIOMT	= Hydroxyindol-O-Methyltransferase
HTOH	= Hydroxytryptophol	HIAA	= Hydroxyindolessigsäure
MAO	= Monoaminoxidase	MFB	= Mediales Vorderhirnbündel
NAT	= N-Acetyltransferase	N-Ac5HT	= N-Acetyl-Serotonin
NT	= Nervii terminales	NA	= Noradrenalin
RCH	= Retrochiasmatischer Hypothalamus	RHT	= Retinohypothalamischer Trakt
RM	= Rückenmark	SCN	= Nucleus suprachiasmaticus
SCG	= oberes Halsganglion	Tp	= Tryptophan

Bild 3: Eine schematische Darstellung der neuralen Kontrolle der Epiphyse

(nach Klein, Moore 1979 in Klein 1979)

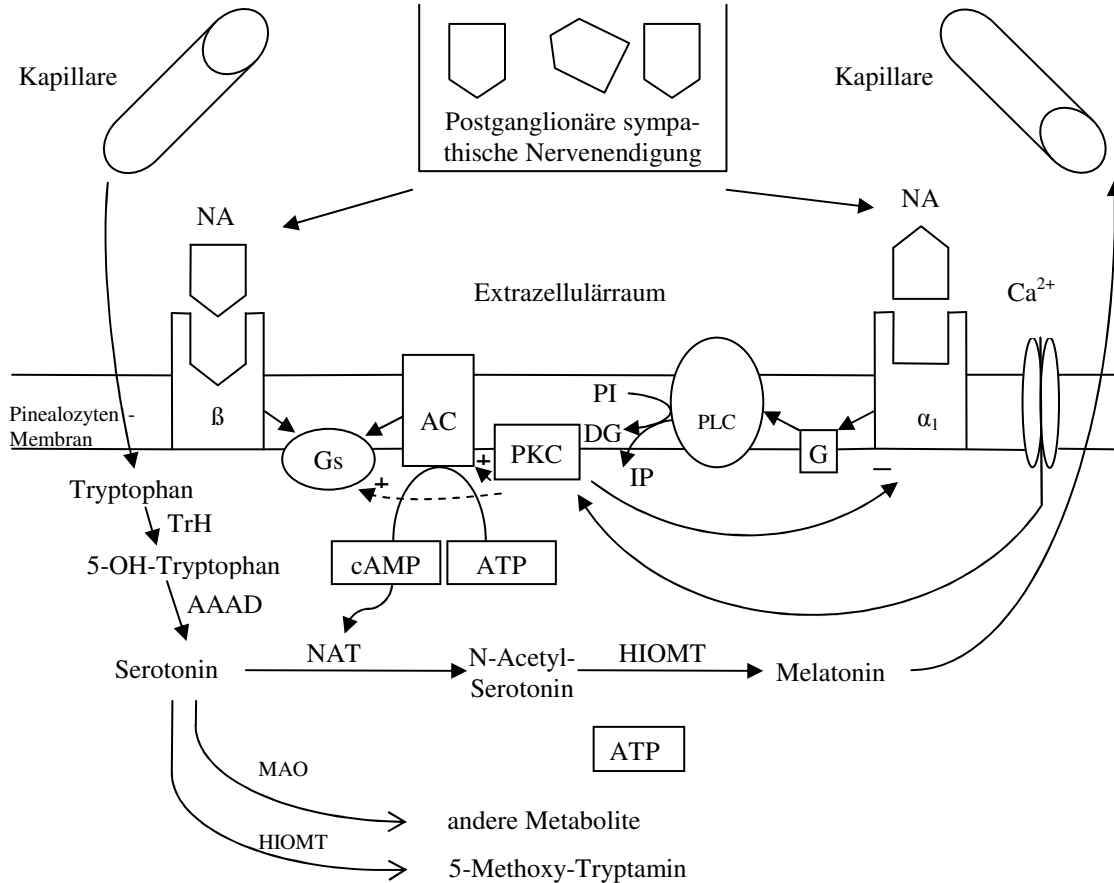
Synthese von Melatonin

Schlüsselenzym der Synthese von MEL ist die Serotonin-N-Acetyl-Transferase (SNAT, neu Arylalkylamin-N-Acetyltransferase = AA-NAT, EC 2.3.1.87), die nur geringe genetische Unterschiede ihrer cDNA-Sequenz bei Säugern zeigt (Simonneaux, Ribelayga 2003). Durch die hohe genetische Konstanz ist so ein Zusammenhang zwischen dem Monoaminstoffwechsel und der Schlaf-Wach-Aktivität auch schon in Modellen bei Drosophila-Arten nachweisbar (Shaw et al. 2000).

Die Aktivitätsdauer der AA-NAT wird durch die Photoperiode via SCN geregelt (Klein 2007). In der D-Phase erfolgt bei Ratten ein 70-facher Anstieg der Aktivität (Klein, Weller 1970) mit einem 150-fachen Anstieg der Aa-nat m-RNA im Vergleich zur L-Phase. Die Bildung der

AA-NAT erfolgt kontinuierlich über 24 Stunden, der nächtliche Anstieg beruht auf einer NA-cAMP-stimulierten Hemmung ihres Abbaus (Schomerus et al. 2000). Durch die benötigte Zeit zur Bildung der Aa-nat mRNA erfolgt ein verzögerter Anstieg von MEL nach Beginn der D-Phase (Coon et al. 1995).

Bild 4



AAAD= Aryl-Alkyl-Amin-Deyhydrogenase
 ATP = Adenosin-Tri-Phosphat
 cAMP = cyclisches AMP
 Gs = G-Rezeptor, stimulierend
 IP = Inositolphosphat
 NA = Noradrenalin
 PI = Phosphoinositol
 TrH = Tryptophan-Hydroxylase

α₁ = α-Adrenozeptor
 β = β-Adrenozeptor
 DG = Diacylglycerin
 HIOMT = Hydroxyindol-O-Methyltransferase
 MAO = Monoaminoxidase
 NAT = N-Acetyltransferase
 PLC = Phospholipase C
 AC = Adenylatcyclase
 Ca²⁺ = Calcium, ionisiert
 G = G-Rezeptor
 PKC = Proteinkinase C

Bild 4:

Interaktionen von NA, freigesetzt aus postganglionären sympathischen Fasern, mit β-Adrenozeptoren in der Pinealozytenmembran. Diese Interaktion bewirkt über verschiedene intrazelluläre Prozesse einen starken Anstieg der Acetylierung von Serotonin zu N-Acetyl-Serotonin durch das Enzym N-Acetyltransferase (NAT).

Das entstandene Melatonin wird zügig in das Kapillarnetz der Epiphyse freigesetzt und über den Liquor in den 3. Ventrikel transportiert. (nach Reiter 2003)

Molekularbiologische Aspekte

Die Schnelligkeit von Anstieg und Höhe der Aktivität der AA-NAT in Ratten ist abhängig von den adrenergen Inputs via Adrenozeptoren der Epiphyse durch den SCN und der Länge der Photoperiode. Die schnelle und verstärkte Induktion der AA-NAT ist dabei an das Vorhandensein einer langen Dunkelperiode gekoppelt, so dass erst nach sieben aufeinander folgenden Lichtzyklen eine wirksame Veränderung der AA-NAT Induzierbarkeit eintritt. Dabei hängt die Induzierbarkeit unter verschiedenen Photoperioden nicht von der adrenergen Stimulation der cAMP-Bildung ab (Engel et al. 2004). Die Auslösung der AA-NAT und HIOMT Transkription wird vermittelt über eine cAMP-abhängige Proteinkinase A II (PKA II), die ein CREB phosphoryliert. Phospho-CREB (P-CREB) steigert dann für AA-NAT die Genexpression und Transkription über Bindung an CREs in der *Aa-nat* Promotor Region (Simonneaux, Ribelayga 2003). Begrenzt wird die Transkription durch die durch cAMP ausgelöste Bildung von einem ICER, der mit P-CREB um die CREs in der *Aa-nat* Promoter-Region konkurriert. Dabei ist die P-CREB Dephosphorylierung der von der ICER-Bildung unabhängige Mechanismus, durch den die MEL-Synthese verringert wird (Engel et al. 2004, Koch et al. 2003). Eine ähnliche Signaltransduktion findet bei MEL an seinen Rezeptoren statt. MEL hemmt dabei überwiegend die über den RHT vermittelte, PACAP-induzierte CREB-Phosphorylierung über Melatonin MT₁ Rezeptoren (von Gall et al. 2000) und bewirkt damit eine Hemmung der cAMP-abhängigen Kaskade und somit die Magnitude der MEL-Konzentration.

Über den Melatonin MT₂ Rezeptor kann bei der Ratte über eine Aktivierung eines Proteinkinase C (PKC)-Weges die Phasenlage der circadianen Uhr verschoben werden. Die sensitiven Zeitfenster befinden sich jeweils vor den LD-Wechseln und korrespondieren mit den Wendepunkten in der MEL-Produktion (Dubocovich et al. 2003).

Damit sind beide Enzyme an der Regulation der Melatoninbildung beteiligt:

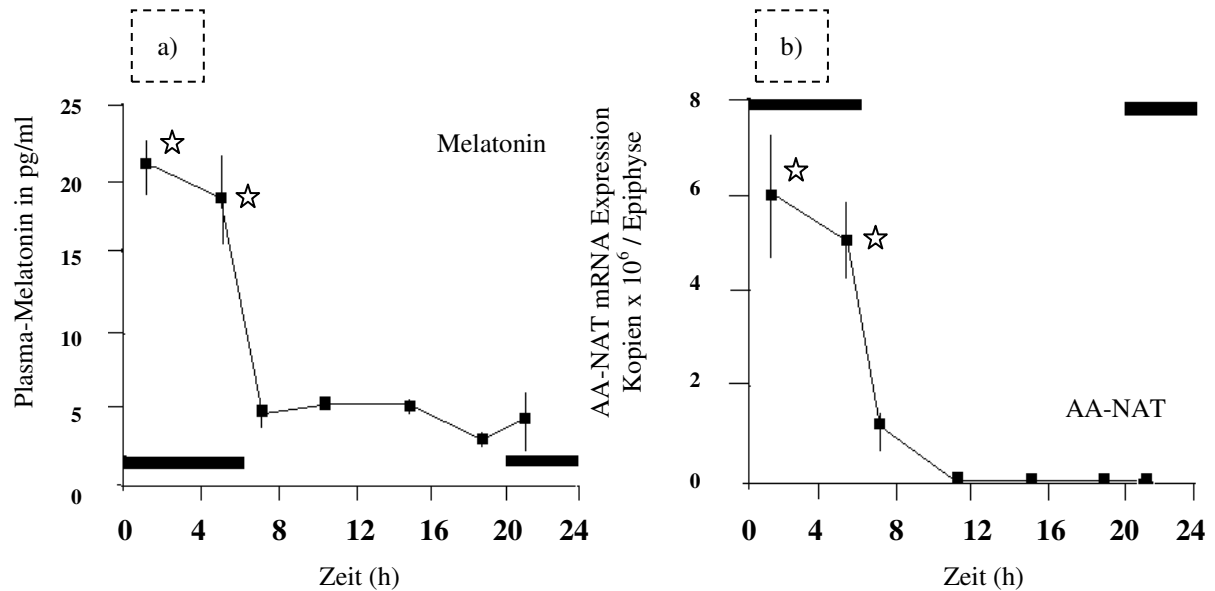
die AA-NAT schaltet die MEL-Synthese an und ab, wobei die Dauer der Synthese von der Länge der Photoperiode (und damit dem LD-Zyklus) abhängt und

die HIOMT steuert die Amplitude der nächtlichen MEL-Synthese (wobei der Umfang der Synthese vom LD-Zyklus abhängig ist) (Simonneaux, Ribelayga 2003).

LD-Zyklus

Bei einem konstanten LD- Zyklus findet sich ein charakteristischer MEL-Konzentrationsverlauf in Epiphyse und Blut (Turek, Swann, Earnest 1984, Klein: Photoneural regulation of the mammalian pineal gland in Evered, Clark (Hrsg.): Photoperiodism, melatonin and the pineal 1985, Wurtman, Waldhauser (Hrsg.): Melatonin in humans 1986).

Die mit RIA-Technik gemessenen Konzentrationen sind dabei in verschiedenen Rattenspezies ähnlich und liegen in der Dunkelphase bei 20-80 pg/ml und in der Lichtphase bei 5-20 pg/ml (Wurtman, Waldhauser (Hrsg.): Melatonin in humans 1986, Sugden 2003). Dabei entsprechen in der WISTAR-Ratte die Konzentrationsschwankungen von N-Acetylserotonin und MEL in der Epiphyse, sowie MEL im Serum dem LD-Zyklus (Ho et al. 1985).



AA-NAT = Arylalkylamin-N-Acetyltransferase

Bild 5:

Tagesprofile der Expression von AA-NAT mRNA in der Ratten-Epiphyse und der Plasma-Melatonin-Konzentration. Die mRNA-Werte entsprechen dem Mittelwert \pm Standardabweichung des Mittelwerts (Mean \pm SEM) der Anzahl von Kopien pro Epiphyse von vier bis fünf Tieren zu jedem Zeitpunkt.

Die schwarzen horizontalen Balken markieren die Dunkelphase (20.00 Uhr – 06.00 Uhr).

a) Melatonin wurde bestimmt aus zwei gleichen Aliquoten Plasma (500 μ l) mittels Radioimmunoassay nach Extraktion mit Dichlormethan und [³H]-Melatonin als Markierung.

Die Werte um 01.00 Uhr und 05.00 Uhr sind signifikant unterschiedlich ($\star = p < 0.02$) von den Werten um 07.00, 11.00, 15.00, 19.00 und 21.00 Uhr.

b) Die AA-NAT mRNA-Expressionen um 01.00 und 05.00 Uhr sind signifikant unterschiedlich gegenüber allen anderen Zeitpunkten ($\star = p < 0.02$).

(einfaktorielle Varianzanalyse (ANOVA))

nach Sugden 2003

Beleuchtungsfarben

Bereits Koenzyme der Tryptophanhydroxylase wie Tetrahydrobiopterin als Teil des synthetisierenden Systems für MEL sind lichtempfindlich. Die Exposition der Epiphyse gegenüber weißem Licht führt zu ihrem Zerfall. Durch weißes Licht wird bei 5-HT und MEL deren Synthese verringert. Unter weißem Licht an der Epiphyse scheinoperierte WISTAR-Ratten haben niedrigere MEL-Konzentrationen als unter Rotlicht operierte Tiere (Frowein, Lapin 1979). Das Lichtsehen bei Ratten wird durch zwei Populationen von Zapfen beschrieben, den Kurzwellenzapfen mit einem Maximum bei 359 nm (Ultraviolett), die zehn Prozent der

Population umfassen, und den Langwellenzapfen mit einem Maximum bei 510 nm (Grün). Zum Bereich größerer Wellenlängen (650 nm (Rot)) hin ist die Empfindlichkeit der Zapfen nur noch sehr gering (Prusky, Douglas: Vision in Whishaw, Kolb (Hrsg.): The behaviour of the laboratory rat 2005). Bei Albinoratten ist daher unter rotem Licht keine Beeinflussung der HIOMT verschiedener lichtempfindlicher Organe wie Epiphyse, Retina und „Harderian Gland“ möglich. Grünes Licht um 530 nm wirkt hingegen am effektivsten an Epiphyse und Retina (Cardinali, Larin, Wurtman 1972). Unter konstantem rotem Licht bleibt ein bestehender MEL-Rhythmus bei verschiedenen Spezies (Huhn, Ratte) in der Epiphyse *in vitro* erhalten. In beiden Spezies wird die Produktion von MEL und die Synthese durch die Lichtfarbe „Rot“ nicht beeinträchtigt (Zatz, Mullen, Moskal 1988). Licht der Wellenlänge um 509 nm ist am effektivsten, um die Produktion von MEL am Menschen zu unterdrücken (Lewy, Sack, Singer: Melatonin, light and chronobiological disorders in Evered, Clark (Hrsg.): Photoperiodism, melatonin and the pineal 1985). Das entspricht auch dem Wellenlängenbereich, bei dem die Bildung und der Zerfall von Rhodopsin am stärksten sind (Wald, Brown 1956).

Da inzwischen für die Entstehung biologischer Rhythmen phylogenetisch konservierte biochemische Mechanismen beschrieben worden sind, ist bekannt, dass Cryptochrome als Photorezeptoren Uhrengene regulieren, die Rhythmen wie die lokomotorische Aktivität steuern (Hsu et al. 1996, Miyamoto, Sancar 1998, Lin, Todo 2005) und die Lichtverarbeitung via SCN beeinflussen (Thompson, Sancar 2002). CRY1 Proteine setzen dabei in *Drosophila* Spezies wie in Mammaliern durch die Übermittlung von blauen Lichtreizen, die in ihrer Wirkung weißem Licht entsprechen, die circadiane Uhr zurück (Egan et al. 1999). In der Ratte kann dies durch die isoliert ansteigende mRNA Konzentrationen von *Cry1* in der Epiphyse nach Lichtpulsen zu verschiedenen Zeitpunkten nachgewiesen werden, so dass von beiden Cryptochrom Genen *Cry1* sowohl auf Licht als auch auf circadiane Informationen, *Cry2* aber nur auf circadiane Informationen reagiert (Nakamura et al. 2001). Im Menschen können die beiden Cryptochrome CRY1 und CRY2 nachgewiesen werden, wobei sich CRY2 in der Retina und CRY1 vorwiegend im SCN befinden. *Cry2* steht dabei eher für eine Photorezeptoreigenschaft und *Cry1* für eine wesentliche Komponente der molekularen Uhr (Thompson et al. 2003).

In der klinischen Beobachtung wird bei Patienten ab einer Lichtstärke von 1500 Lux die Produktion von MEL beeinträchtigt, die bei Exposition mit 2500 Lux zum Zeitpunkt der höchsten Produktion in der zweiten Hälfte der D-Phase sistiert. Bei Depressiven ist eine Lichtstärke von 500 Lux ausreichend, um die Produktion zu halbieren (Lewy, Sack, Singer: Melatonin, light and chronobiological disorders in Evered, Clark (Hrsg.): Photoperiodism, melatonin and the pineal 1985).

Bei Probanden kann durch gedämpftes Licht von 50 Lux oder Licht verschiedener Farben von 1000 Lux (Rot, Blau) keine Veränderung von MEL oder KT beobachtet werden (Morita, Tokura 1998).

Depression und Melatonin

Die Unversehrtheit der sympathischen Innervation der Epiphyse ist beim Menschen die Grundlage der MEL-Sekretion. Die Hemmung der NA-Wiederaufnahme führt bei Probanden zu einer gesteigerten MEL-Sekretion, die aber durch Blockade von β_1 -Rezeptoren gehemmt wird (Checkley et al. 1987). In der Epiphyse sind diese Adrenozeptoren an die AC gekoppelt, so dass cAMP als „2nd messenger“ die sekretionssteigernde Wirkung von NA im Menschen vermittelt (Zatz et al. 1976a).

Auch bei Alzheimer Patienten, bei denen im klinischen Verlauf die nächtliche MEL-Synthese abnimmt und der MEL-Rhythmus aufgehoben ist, zeigen postmortem Untersuchungen bereits in frühen Krankheitsstadien bei MEL auf Grundlage einer Verringerung der Genexpression der mRNA β -adrenerger Rezeptoren in der Epiphyse das Fehlen eines Tag/Nacht-Rhythmus' (Wu et al. 2003).

Als indirekter Parameter der MEL-Produktion kann sein Hauptmetabolit im Menschen, 6-sulfatoxy-Melatonin, im Urin gemessen werden (Jones, McGreer, Greiner 1969 in Checkley et al. 1987). Die Urinausscheidung von 6-sulfatoxy-Melatonin korreliert gut mit der Plasmakonzentration von MEL (Checkley et al. 1987). Trizyklische AD erhöhen nach mehreren Wochen Behandlung in depressiven Patienten die Ausscheidung des Metaboliten 6-sulfatoxy-Melatonin im Urin um das Doppelte. Es kann damit als Marker der adrenergen Aktivität der Epiphyse verwendet werden (Lewy, Sack, Singer: Melatonin, light and chronobiological disorders in Evered, Clark (Hrsg.): Photoperiodism, melatonin and the pineal 1985).

Der Beginn der MEL-Produktion erscheint bei Depressiven vorverlegt (Evered, Clark (Hrsg.): Photoperiodism, melatonin and the pineal 1985) und die Konzentration bei manischen Zuständen statistisch signifikant höher als bei depressiven Zuständen zu sein. Wetterberg berichtet, dass niedrige nächtliche Melatoninkonzentrationen mit hohem Cortisolspiegel, abnormem Dexamethason-Suppressionstest und eingeschränktem Rhythmus in der Depression die Produktion erhöhter CRH-Konzentrationen zulassen könnten. Der eingeschränkte Rhythmus weise auf eine Fehlfunktion zwischen Epiphyse und SCN, die niedrigen MEL-Konzentrationen auf einen Mangel von NA an Bindungsstellen hin (Wetterberg: Melatonin and affective disorders in Evered, Clark (Hrsg.): Photoperiodism, melatonin and the pineal 1985).

Bei depressiven Patienten liegt der nächtliche Maximalwert der MEL-Sekretion zeitlich später als bei den Kontrollprobanden, ebenso ist die 6-sulfatoxy-Melatonin-Ausscheidung in der D-Phase höher als in der frühen L-Phase (Crasson et al. 2004).

Durch Rolipram wurde in Probanden eine tageszeitlich abhängige Beeinflussung der Ausscheidung von 6-sulfatoxy-Melatonin nachgewiesen. In der Dunkelphase ist sie höher und in der Hellphase niedriger als bei Placebo. Nach einer Einmaldosis Desipramin können im Menschen erhöhte abendliche und erniedrigte morgendliche Plasma-MEL-Konzentrationen gemessen werden (Checkley et al. 1987).

Bei gesunden Probanden zeigt sich nach Einnahme von Rolipram eine Abschwächung ihrer Aktivität in psychometrischen Parametern zu Zeiten der höchsten Aktivität in Abhängigkeit vom chronobiologischen Typ (Morgen oder Abend) (Stephan, Dorow 1986 in Reinberg, Smolensky, Labrecque (Hrsg.): Annual review of chronopharmacology 1986).

Melatonin und AD bei der Ratte

Die chronische Gabe von AD einschließlich Rolipram bewirkt in vivo über die Aktivierung von unterschiedlichen 5-HT-ergen und adrenergen Rezeptoren die signifikante Steigerung der cAMP-vermittelten-Expression von CREB mRNA im Hippocampus. Die Koadministration von Imipramin und Rolipram verkürzt die Zeit zur Steigerung der CREB-Expression (Nibuya, Nestler, Duman 1996). Durch eine CRE-Bindungsstelle am *mPer1* Promotorgen, das für das Uhren-Gen *Per1* kodiert, wird über die Epiphyse die Oszillation des SCN reguliert (Simonneaux et al. 2004). Durch Rolipram wird die Ratten *Per1* Expression zum Maximum der Forskolin-induzierten Genexpression am stärksten gesteigert und hat in der Phase abnehmender Genexpression kaum noch einen Einfluss (Masumoto et al. 2003). Damit können die *Per1* Transkripte ein Auslöser für eine lichtinduzierte Phasenverschiebung biologischer Rhythmen sein. Die mehrfachen Angriffspunkte von Rolipram können damit eine Aktivierung der MEL-Synthese bewirken, da das entscheidende Enzym AA-NAT in der D-Phase über diesen gemeinsamen NA-/cAMP-Weg stimuliert wird (Engel et al. 2004).

Glucose

Nahrungsaufnahme und gesteigerte parasymphatische Aktivierung des Pankreas stimulieren die Insulinsekretion, so dass eine erhöhte Energiespeicherung stattfindet. Insulin verstärkt dabei die Leptinexpression und -sekretion aus weißem Fettgewebe, das in einem Regelkreis mit negativer Rückkopplung seine eigene Expression aus weißem Fettgewebe wieder verringert (Nonogaki 2000).

Bei Ratten kann in vitro an Inselzellpräparationen die Exozytose von Insulin, aber auch die Synthese von Proinsulin in der β - Zelle gesteuert werden. Eine Steigerung der Insulin-Gen-Transkription erfolgt durch ein CRE, dessen CRE-Bindungsprotein (CREB) durch eine freie katalytische Untereinheit der PKA phosphoryliert wird und damit die Änderungen der intrazellulären cAMP-Konzentrationen als Signal für die Insulinsynthese vermittelt. Die durch Glukose stimulierte Insulinfreisetzung kann durch steigende cAMP-Konzentrationen schon durch unspezifische PDE-Hemmer wie IBMX potenziert werden (Doherty, Clark 1994).

Durch Hormone und Neurotransmitter erfolgt die Regulation der Insulinfreisetzung. In der Inselzelle sind die für den Aufbau von cAMP wesentlichen Enzyme AC, Tyrosinkinase, PKA und C (LeBlanc et al. 1995, LeBlanc et al. 1985, Doherty, Clark 1994) und die für den Abbau vorhandenen PDEn vom Typ 3b, 4 und 1 (Shafiee-Nick et al. 1995, Zhao et al. 1997, Parker et al. 1995) nachweisbar. Durch spezifische Inhibitoren der PDE 3B wie Milrinon kann das intrazelluläre cAMP-Signal verstärkt werden, so dass es zur gesteigerten Ausschüttung von Insulin aus der β - Zelle in vitro kommt (Shafiee-Nick et al. 1995, Parker et al. 1995 und Zhao et al. 1997). In Nager-Inselzellen (Ratte und Maus) trägt die PDE 3B zu zwei Dritteln zur PDE-Gesamtaktivität bei (Shafiee-Nick et al. 1995). Im Zytosol wird außerdem eine PDE 1 gefunden, die das übrige Drittel der Aktivität umfasst (Parker et al. 1995). Zu einem geringen Prozentsatz ist auch eine durch Rolipram hemmbare PDE 4 nachweisbar, die jedoch bei der Sekretion von Insulin keinen wesentlichen Beitrag leistet. Im Vergleich mit menschlichen Inselzellen findet sich kein wesentlicher Unterschied in der Ausstattung mit PDEn (Shafiee-Nick et al. 1995, Parker et al. 1995).

Periphere Wirkung

Leber

Die Ausschüttung von Insulin aus den β - Zellen der Langerhansschen Inseln des Pankreas wird durch Glukose reguliert. Glukose wird dazu von der β - Zelle über einen spezifischen Glut-2-Rezeptor aufgenommen und durchläuft als Glukose-6-phosphat Glykolyse und Krebs-Zyklus. Ebenso wie im zentralen Nervensystem beeinflussen PDE-Inhibitoren die Serumglukosekonzentrationen mit direkter Wirkung an den Leberzellen. Die intrazellulären cAMP-Konzentrationen verändern den Phosphorylierungszustand der Schlüsselenzyme der Glukoneogenese. Auch die Induktion der Glukose-6-phosphatase Genexpression wird durch cAMP induziert. PDE-Inhibitoren wie Milrinon (PDE 3) und Rolipram (PDE 4) sind bei der Glukoneogenese von isolierten Rattenhepatozyten wirksam (Abdollahi et al. 2003). Dabei stimuliert ebenfalls ein CREB die Glukoneogenese durch Glukagon und Cortisol (Herzig et al. 2003).

Der Gegenspieler von Glukagon und β -adrenergen Agonisten in der Leber ist Insulin. In Nagern wirken dabei PDE 3 Inhibitoren in vivo als Insulin-Sekretagoga (El-Metwally et al. 1997) und werden in allen für den Energiehaushalt wesentlichen Zellen exprimiert (weißes und braunes Fettgewebe und Hepatozyten) (Härndahl et al. 2004). Insulin erhöht die PDE 3B Aktivität mit dem Effekt einer Verringerung von intrazellulärem cAMP und PKA-Aktivität. An den vorhandenen PDEn in den Inselzellen von Ratten wird in vitro die Glukose-induzierte Insulinsekretion durch den unspezifischen Inhibitor IBMX und durch spezifische PDE 3- Hemmer verstärkt. Inhibitoren anderer nachgewiesener PDEn (Typ 1, 4, 5) beeinflussen die induzierte Insulinsekretion nicht, so dass die PDE 3 entscheidend bei der Kontrolle der Insulinsekretion ist (Cheung, Yang, Boden 2003). Die rolipramhemmbare PDE Typ 4 findet sich in der sedimentierbaren Fraktion von Inselzellhomogenaten. In diesen Homogenaten kann Rolipram in vitro die PDE-Aktivität nicht wesentlich hemmen, was auch in vivo durch den fehlenden hypoglykämischen Effekt bestätigt wurde (Shafiee-Nick, Pyne, Furman 1995, El-Metwally et al. 1997). Durch die verringerte Phosphorylierung einiger Enzyme kommt es zu einem verringerten Glykogenabbau und steigender -synthese. Zusätzlich erfolgt eine Stimulation der Glykolyse und Hemmung der Glukoneogenese (Exton 1987, Pilkis, Claus, Raafat El-Maghrabi 1988). cAMP wirkt dabei wie in der β - Zelle des Pankreas auch auf die Gentranskription der entscheidenden Enzyme (Phosphoenolpyruvatcarboxykinase PEPCCK, Pyruvatkinase PK, Glukokinase GK) (Pilkis, Claus, Raafat El-Maghrabi 1988).

Die Wirkungen des sympathischen Nervensystems werden bei Ratten über α_1 -adrenerge Rezeptoren mit dem Phosphoinositolsystem (PI-System) weitergeleitet, das cAMP-unabhängig ist (Exton 1987, Pilkis, Claus, Raafat El-Maghrabi 1988).

Insulin und PDEn

Zwischen peripherem Fett- und Lebergewebe und Pankreas wird die Sekretion von Insulin durch die β - Zellen in einem Kreislauf mit negativem Feedback reguliert. In Adipozyten und Lebergewebe wird durch Insulin ebenfalls eine PDE 3 aktiviert. Durch diese wird die antilipolytische und antiglykogenolytische Wirkung von Insulin auf Adipozyten und Lebergewebe vermittelt (Zhao et

al. 1997, Rahn et al. 1994). In peripheren Fettzellen der Ratte findet sich in vitro eine Verteilung von Insulin-aktivierter PDE 3, die den antilipolytischen Effekt vermittelt und einer rolipram-sensitiven PDE 4, die keinen Effekt auf die Lipolyse hat (Schmitz-Pfeifer, Reeves, Denton 1992). Parker et al. konnten 1995 in Ergänzung dazu auch in humanen Inselzellen in vitro eine überwiegende PDE 3 Aktivität nachweisen. Koffein konnte bei Probanden die Plasmainsulin-Spiegel nicht beeinflussen (MacNaughton et al. 1990).

Rhythmus und Glukose

Die Leber ist als Regulationsorgan für den Kohlenhydratstoffwechsel abhängig von tageszeitlichen Schwankungen des Energiestoffwechsels. Nahrung wird diskontinuierlich aufgenommen, so dass Schlüsselenzyme den Metabolismus steuern.

In der Leber werden dafür in vivo die PEPCK (EC 4.1.1.32) als limitierender Faktor der Glukoneogenese und bei einer intensiven hepatischen Glykolyse die Phosphofruktokinase (EC 2.7.1.11) beschrieben (Kaminski, Kosenko 1987).

Die Blutglukose als Index des Kohlenhydratstoffwechsels zeigt tageszeitliche Differenzen, die keiner regelmäßigen Veränderung unterliegen. Zu allen Tageszeiten können bei tag- und nacht-aktiven Tieren unterschiedliche Konzentrationsgipfel und -täler auftreten. Zusätzliche jahreszeitliche Abweichungen erscheinen hingegen stabiler (Kaminski, Kosenko 1987).

Der Licht-Dunkel-(LD)-Zyklus und der Fütterungsrhythmus sind bei Ratten als schwache Synchronisatoren bekannt, Beeinflussungen der Schlüsselenzyme durch äußere Faktoren führen selbst bei Tieren gleichen Stammes, Geschlechts und Alters zu unterschiedlichen rhythmischen Veränderungen (Kaminski, Kosenko 1987).

Hepatische cAMP-Konzentrationen zeigen bei Ratten in vivo keine signifikanten circadianen Schwankungen. Sie wirken stimulierend auf Schlüsselenzyme der Glukoneogenese (Kaminski, Kosenko 1987), es gibt jedoch keine Korrelation zwischen diesen, der cAMP-Konzentration und der Tageszeit.

Beleuchtungsversuch

Um Beleuchtungseffekte besser zu quantifizieren, wurden ergänzende Experimente durchgeführt. Der nachfolgend beschriebene Versuch wird im Weiteren als „Beleuchtungsversuch“ bezeichnet.

Ablauf

Die Untersuchungen wurden an fünf Zeitpunkten von 04.00 bis 12.00 Uhr im Abstand von je zwei Stunden wie beim Hauptversuch durchgeführt. Dabei wurden jeweils fünf Zeitpunkte zu einem Versuchsblock zusammengefasst (siehe auch „Beleuchtung / Beleuchtungsversuch“).

Zielsetzung des Beleuchtungsversuchs

Durch die Verwendung der farbigen Beleuchtung zu einer Versuchszeit mit sonst weißer Raumbeleuchtung soll der Einfluss von Farbe auf die Wirkung von Rolipram dargestellt werden. Die erste Hälfte der L-Phase war für die Untersuchung der Substanzwirkung am besten geeignet, da in diesem Zeitraum die Effekte von Rolipram am ausgeprägtesten sind und zum Ende der Dunkelphase Licht einen Einfluss auf die Laufaktivität hat (Lincoln, Ebling, Almeida: Generation of melatonin rhythms in Evered, Clark (Hrsg.): Photoperiodism, melatonin and the pineal, 1985). Bei einer Verkürzung eines freilaufenden Rhythmus der Laufaktivität kann bei WISTAR-Ratten damit eine Verkürzung der Aktivitätsphase verbunden sein (Honma et al. 1985).

Farbige Beleuchtungen können in der Lichtphase MEL-Rhythmen verändern, da schon Lichtpulse von einer Minute die MEL-Produktion signifikant verringern (Illnerova, Vanecek 1982). Da diese Ergebnisse bei WISTAR-Ratten schon vorliegen, wurden im Rahmen dieses Versuchs Corticosteron, Glukose und Verhaltensparameter untersucht.

Beleuchtung und Parameter

Anhand bekannter Untersuchungen zur spektralen Empfindlichkeit eines Schlüsselenzyms der MEL-Synthese (Cardinali, Larin, Wurtman 1972) kann gezeigt werden, dass unter einer roten Beleuchtung zur D-Phase keine Beeinflussung dieses circadianen Systems erfolgen kann. Darin wird dargestellt, dass unter einer Beleuchtung mit einem Wellenlängenbereich von 660 ± 19 nm (Rot) die HIOMT in Retina und Epiphyse von Ratten nicht beeinflusst wird. Im Gegensatz dazu wird absteigend in der angegebenen Reihenfolge durch Beleuchtungen mit den Farben Gelb (590 ± 80 nm), Grün (530 ± 45 nm) und Blau (435 ± 54 nm) eine Beeinflussung der HIOMT beobachtet.

Als genereller Effekt von Licht wurde bereits 1972 von Klein und Weller eine Beendigung der neuralen Stimulation der Epiphyse dokumentiert. Über die Retina erfolgt ein wesentlicher Anteil der Regulation von circadian oszillierenden Systemen, da über eine Verbindung via RHT die Epiphyse innerviert wird. Mit der Untersuchung kann im Vorhinein eine Beeinflussung von MEL und COR durch die gewählte rote Beleuchtung weitgehend ausgeschlossen werden, da die

adrenerge Innervation mit Beteiligung von cAMP durch diese Beleuchtung in der Dunkelphase nicht stimuliert wird. Deshalb können die zu beobachtenden Effekte unter Rolipram in der Dunkelphase dessen pharmakologischer Wirkung zugeschrieben werden. Dabei ist allerdings zu berücksichtigen, dass nicht alle Systeme über den RHT beeinflusst werden. Für die übrigen Zeitpunkte in der Hellphase ist unter weißem Licht eine lichtabhängige Beeinflussung auch unter Rolipram anzunehmen, wobei deren Intensität von der Aktivierbarkeit der unterschiedlichen Regelkreise abhängen wird.

Für die Untersuchungen unter den anderen Lichtfarben in der Hellphase können unterschiedliche Effekte erwartet werden. Für den untersuchten Parameter COR kann bei einem tageszeitlich abhängigen Verlauf der Konzentrationen die pharmakologische Beeinflussbarkeit der HPA-Achse aufgezeigt werden, durch die dann in Folge eine abhängige Erhöhung der Glukosekonzentrationen zu erwarten ist. Zusätzliche Effekte von Rolipram auf den Glukosestoffwechsel erscheinen möglich, auch wenn eine Wechselwirkung zwischen der glukoneogenetischen Wirkung von Rolipram und der Steigerung der Insulinsekretion durch seine PDE-Hemmung zu möglicherweise nur geringen Effekten führt, da dabei die PDE 3 im Vordergrund steht.

Für die circadiane motorische Aktivität konnte gezeigt werden, dass blaue bis grüne Beleuchtung mit Wellenlängen um 357 nm stärker beeinflussen als mit Wellenlängen um 511 nm (Miyamoto, Sancar 1998). Außerdem fanden Halberg und Barnum 1958 bei Ratten eine relative Unempfindlichkeit für rotes Licht.

Ähnliches konnte für die Beeinflussung der KT von Ratten beobachtet werden. Grünes Licht mit Wellenlängen von 530 ± 45 nm war am effektivsten, einen lichtabhängigen Rhythmus der KT zu etablieren, Rot mit 660 ± 19 nm und Ultraviolett mit 360 ± 34 nm waren am wenigsten effektiv (McGuire, Rand, Wurtman 1973).

Fragestellung

Aus der Behandlung depressiv Erkrankter ist bekannt, dass charakteristisch für die Erkrankung die Störung von circadianen und neuroendokrinen Rhythmen ist, zu der die Aktivierung der LHPA-Achse zählt.

Da sowohl die Aktivierung der LHPA-Achse als auch die Regulation der in der Depression veränderten Rhythmen zum großen Teil über Monoamine erfolgt, wurde bisher bei therapeutischen Ansätzen versucht, gegen die vermuteten Defizite einzuwirken.

Als besonders wichtige Systeme haben sich das NA-erge und 5-HT-erge System herausgestellt, die über ihre Rezeptoren und die Störung der Synthese von Serotonin und Katecholaminen zu den beobachteten Symptomen beitragen. Durch den Einsatz von β -adrenerg wirksamen Substanzen, der Verwendung selektiver Aufnahmehemmer für diese Transmitter oder die Hemmung ihres Abbaus wird die gewünschte therapeutische Wirkung erzielt.

Dabei ist eine besonders interessante Klasse von AD die der PDE-Hemmer. Die klinische Wirksamkeit von PDE 4 Hemmern wie Rolipram konnte an depressiv Erkrankten belegt werden. Die Auslösung seines typischen Verhaltenssyndroms im Tiermodell erfolgt über die Steigerung der prä- und postsynaptischen Effekte an NA-ergen Neuronen.

Der erste Teil der Arbeit besteht daher in der Untersuchung dieses Verhaltenssyndroms sowie weiterer Verhaltensparameter aus dem Bereich des Spontanverhaltens in Hinblick auf die Veränderlichkeit im Auftreten bei der Untersuchung zu unterschiedlichen Zeitpunkten. Es soll damit herausgefunden werden, ob und wie die Wirkung der einmalig verabreichten Substanz das Auftreten von Verhalten verändert. Bei unterschiedlicher Auslösbarkeit des induzierten Verhaltens sollen damit Aktivitätszustände der zugrunde liegenden Transmittersysteme in Hinblick auf einen möglichen maximalen Effekt beschrieben werden. Um eine ausreichend sichere Aussage treffen zu können, wurden die Tiere des Hauptversuchs zweimal zur selben Jahreszeit untersucht.

Zusätzlich soll aufgrund der Induktion von motorischer und explorativer Aktivität, wie sie durch PDE-H beim QMWS und durch cAMP-Analoga beschrieben ist, geprüft werden, ob Rolipram neben seinem induzierten Verhalten auch Parameter des ansonsten auftretenden Normalverhaltens beeinflussen kann.

Um in der D-Phase das Verhalten der Tiere beobachten zu können, ist eine ausreichende und möglichst wenig beeinflussende Beleuchtung notwendig. Um den Einfluss der verwendeten Lichtfarbe „rot“ definieren zu können, wurden in einem zweiten Versuchsteil unterschiedliche Lichtfarben bei der Untersuchung der Tiere benutzt. Dabei sollte zu einem zur trainierten D-Phase gehörigen Zeitpunkt (04.00 Uhr) die Beleuchtung der L-Phase mit Einschalten der Beleuchtung vorweggenommen werden, so dass die für eine nachtaktive Spezies vermutete Hemmung von Spontanverhalten auftreten könnte. Zu verschiedenen anderen Zeitpunkten der L-Phase (06.00 Uhr bis 12.00 Uhr) sollten mit der Verwendung von „Gelb“, „Grün“, „Blau“ und „Rot“ die Veränderungen beim Vergleich von spontanem und induziertem Verhalten durch die jeweiligen Lichtfarben zu diesen Zeitpunkten beobachtet werden. Ziel soll es dabei sein, den Einfluss der „roten“ Beleuchtung möglichst genau zu definieren. Der aufgrund der geringen photopischen Empfindlichkeit der Ratte in diesem Teil des Lichtspektrums zu erwartenden vernachlässigbaren Einfluss soll auf diese Weise bestätigt werden.

Die Regulation der LHPA-Achse erfolgt in großen Anteilen im zentralen Nervensystem durch

CRH. Dessen Freisetzung wird stimuliert durch die NA-ergen und 5-HT-ergen Projektionen aus dem Limbischen System und Kerngebieten der Raphe. Durch Stress kann diese Achse ebenfalls aktiviert werden. Bei Depressiven ist diese Achse schon krankheitsbedingt dysreguliert, was durch erhöhte CRH-Konzentrationen im Liquor, Hyperkortisolämie und fehlende Suppression im Dexamethasontest belegt ist. Die Therapie mit klassischen AD führt zu einer Normalisierung dieser Regulation mit Abnahme der adrenergen Überaktivierung.

Da sowohl die Aktivierung der LHPA-Achse durch CRH als auch ihre Hemmung durch Glukokortikoide an β -adrenergen Rezeptoren und über die Vermittlung via cAMP erfolgt, ist durch die Verwendung von Rolipram die Beeinflussung dieses Mechanismus' mit einem Effekt auf die Bildung und Sekretion von Glukokortikoiden zu erwarten. Dabei kann Rolipram die Reaktion des zentralen und peripheren Anteils über seine PDE-Hemmung nachahmen, die dann über die gesteigerte Verfügbarkeit von cAMP die stressähnlichen Effekte über eine Steigerung der CRH-Expression und Aktivierung von sympathischen Ganglien und NNM bewirken kann. Die Aktivierung der HPA-Achse soll durch die Messung der COR-Konzentrationen als peripherem Summationsparameter untersucht werden.

Durch die Wirkung von CRH auf das Verhalten der Ratte werden verschiedene Transmittersysteme für eine der Hauptaktivitäten „Grooming“ beeinflusst. Da Rolipram hier ebenfalls über klar definierte Beeinflussung des NA-ergen Systems sowohl anatomisch auf der Ebene des Hippocampus, als auch funktionell durch Aktivierung der cAMP-CRE Kaskade eingreift, soll mit der Untersuchung der mögliche Einfluss auf sein induziertes Verhalten in Beziehung zur Aktivierung der LHPA-Achse beschrieben werden. Weitere Effekte auf das Spontanverhalten der Ratte sollen in Bezug auf die mögliche Induktion durch CRH-nachahmende Wirkungen von Rolipram ergänzend dargestellt werden.

Die Sekretion von CRH kann auch die Synthese von weiteren Peptiden aus dem gemeinsamen Precursormolekül POMC auslösen. Melatonin kann daher ebenfalls über eine Beeinflussung der Expression seiner die rhythmische Sekretion kodierenden Uhrengene über einen cAMP-abhängigen Mechanismus zeitabhängig beeinflusst werden.

Die Messung der MEL-Konzentrationen soll daher unter einem trainierten LD-Zyklus nach Beeinflussung durch Rolipram zu verschiedenen Zeitpunkten erfolgen.

MEL ist außerdem durch den via SCN über seine Uhrengene getriggerten Rhythmus eine zwar tageszeitlich abhängige Variable, die aber aufgrund der in sich geschlossenen feedback-Regelkreise überwiegend durch den Lichteinfall via SCN gesteuert wird. Dabei ist es dann wieder die NA-erg vermittelte Steigerung der cAMP-induzierten Aktivität, die aufgrund der identischen Beeinflussbarkeit durch Rolipram zur Beschreibung möglicher Einflüsse zu unterschiedlichen Zeitpunkten durch die Messung der MEL-Konzentrationen genutzt werden soll. Die Messung erfolgte erst zum Zeitraum des zweiten Teils des Hauptversuches, als ein ausreichend sensitiver Assay zur Verfügung stand.

Die periphere Wirkung einer Aktivierung der COR-Sekretion soll durch die Messung der Glukosekonzentrationen untersucht werden.

Da der Abstand der Untersuchungszeitpunkte weder einer seriellen Blutentnahme entspricht, noch so häufig ist, wie es periodisch sezernierte Substrate erfordern, kann in dieser Untersuchung nur eine zeitpunkt- oder phasenbezogene Beschreibung von Verhalten und Substraten erfolgen.

Damit soll diese Arbeit Hinweise auf ein Verfahren geben, dass tageszeitlich abhängige Parameter auch zu weiteren als den üblichen Arbeitszeiten zu untersuchen sind, wenn eine entsprechende Pharmakodynamik oder Beeinflussung circadianer Systeme bekannt ist oder vermutet wird. Mit den Resultaten soll dargestellt werden, dass generell bei der Beeinflussung biologischer Systeme in vermehrtem Maße tageszeitliche Untersuchungen zur Einschätzung und Bewertung circadianer Zusammenhänge durchgeführt werden sollten.

Methoden

Tiere

Tierart

Die Versuche wurden an insgesamt 576 männlichen Ratten, Stamm HAN:WISTAR (SPF) - Züchter Schering AG, Berlin, im Alter von vier bis sechs Wochen und einem Gewicht von 96 bis 168 g Körpergewicht durchgeführt. Männliche WISTAR-Ratten haben in einem Lebensalter von vier Wochen bzw. 35-48 Tagen ein Gewicht von ca. 120 bzw. 98-168 g (Niesink, van Ree 1982, nach Angaben Schering- Zentrale Tierhaltung (ZTH) - persönliche Mitteilung Dr. Schwarz).

Die Tiere wurden in den durchgeführten Versuchen jeweils nur einmal verwendet.

Tierhaltung

Die Haltung der Tiere erfolgte in einem temperaturkontrollierten Raum (21 ± 1 Grad C) mit einem Hell-Dunkel-Rhythmus von 12 / 12 Stunden (Hell von 06.00 bis 18.00 Uhr).

Es bestand eine durchschnittliche relative Luftfeuchtigkeit von 50 %.

Die Versuchsräume waren mit jeweils sechs Neon-Deckenleuchten Farbe „Weiß“ der Firma Philips, Eindhoven, Niederlande ausgestattet. Eine Lichtstärkenmessung wurde nicht durchgeführt.

Tierfutter

Die Tiere erhielten ein Altromin ® Standardfutter (Altromin Spezialfutterwerke, Lage, Deutschland) und Leitungswasser ad libitum.

Eingewöhnung an den Wohnkäfig

Für jeden Versuchszeitpunkt wurden je 24 Tiere in vier Käfigen zu je sechs Tieren eine Woche vor Durchführung der Untersuchung aus der Zuchttierhaltung in einen fensterlosen, innenliegenden Versuchsraum ohne Tageslicht übernommen.

Jeweils sechs Tiere wurden in einen standardisierten Kunststoffkäfig (Makrolon ®) mit Metallabdeckung umgesetzt (Maße - B x H x T = 260 x 325 x 150 mm), die auch Futterpellets und Trinkwasserflasche aufnahm.

Die Käfige wurden in ein fahrbares Gestell eingehängt, das sich im Versuchsraum befand. Damit war den Tieren die Möglichkeit gegeben, sich an die Umgebung, insbesondere an die Beleuchtungsverhältnisse zu gewöhnen. Zu diesem Zweck waren auch die im Versuchsraum befindlichen Messgeräte ständig eingeschaltet, damit sich die Tiere an die Skalenbeleuchtungen in der Dunkelphase adaptieren konnten.

Markierung der Tiere

Tiere in einem Wohnkäfig wurden bei Übernahme aus der Zuchttierhaltung zur Identifizierung an der Schwanzwurzel mit einem wasserfesten Stift markiert, um Veränderungen im Verhalten durch die Markierungen unmittelbar vor der Beobachtung zu vermeiden.

Beleuchtung

Hauptversuch (Teile 1 und 2)

Für die Dunkelphase wurde eine zusätzliche rote Beleuchtung am Beobachtungsplatz installiert. Dafür wurden zwei Bürotischleuchten mit Dunkelkammerlampen 15 W, Farbe Rot, Typ Nr. 4563 der Firma OSRAM, Deutschland, über den Beobachtungskäfigen eingerichtet. Diese Leuchten waren bauartgleich mit dem Dunkelkammerlampen-Modell PF 712 der Firma Philips, Eindhoven, Niederlande. Damit war der Beobachtungsplatz ausreichend ausgeleuchtet, was für schnelle Bewegungen der Tiere wie Head twitches erforderlich ist. Die Leuchten dienten in einem 12/12-Stunden-Beleuchtungsregime (06.00 Uhr bis 18.00 Uhr) als hauptsächliche Lichtquelle in der Dunkelphase.

Sie wurden parallel zur Tischoberfläche in einer Höhe von 410 Millimetern so angebracht, dass sie beim Beobachten der Tiere nicht blendeten. Die linke der beiden verwendeten Leuchten wurde zur Beleuchtung des linken Teils des Beobachtungsplatzes und des Mess- und Applikationsplatzes verwendet. Dafür war sie beweglich/schwenkbar angebracht. Um die linke Leuchte wieder auf eine definierte Beobachtungsposition einrichten zu können, wurde die rechte Leuchte starr fixiert und diente damit als Referenz für die Position der Leuchten.

Beleuchtungsversuch

Im Beleuchtungsversuch unterschied sich der Ablauf nur beim Beleuchtungsregime vom Hauptversuch. Zum Zeitpunkt 04.00 Uhr wurde statt Dunkelheit und roter Versuchsplatzbeleuchtung die Raumbeleuchtung eingeschaltet, so dass die Tiere zwei Stunden früher als gewohnt dieser Beleuchtung ausgesetzt waren. Zu den übrigen Zeitpunkten wurden die Tiere statt unter weißer Raumbeleuchtung in Dunkelheit mit farbiger Beleuchtung des Versuchsplatzes beobachtet. Dazu wurden zuvor die übrigen Tiere in einen angrenzenden Laborraum gebracht, in dem das gleiche Beleuchtungsregime wie sonst im Versuchsraum während des Hauptversuchs angewandt wurde. Die Tiere des jeweiligen Versuchszeitpunkts wurden in den Versuchsraum genommen und alle Verrichtungen, beginnend mit der Messung des Körpergewichts (siehe Versuchsablauf ab 1.4.1), unter farbiger Beleuchtung des Versuchsplatzes durchgeführt.

Leuchten:

Zu den folgenden Zeitpunkten wurden nachstehend je zwei der aufgeführten Leuchten verwendet:

- Zeitpunkt 06.00 Uhr: gelbe Dunkelkammerleuchte der Firma OSRAM, Typ Nr. 4533, baugleich mit Philips Typ PF 713, 15 W, Wellenlängen von 530-720 nm, relative spektrale Strahldichte $B_{e\lambda}$ (50%) 630 nm
- Zeitpunkt 08.00 Uhr: blaue Allgebrauchsleuchte der Firma OSRAM, Typ TR blau, 25 W, Tropfenform, dominante Wellenlänge bei 470-476 nm
- Zeitpunkt 10.00 Uhr: grüne Allgebrauchsleuchte der Firma OSRAM, Typ TR grün, 40 W, Tropfenform, dominante Wellenlänge bei 524-534 nm
- Zeitpunkt 12.00 Uhr: rote Dunkelkammerleuchte der Firma OSRAM, Typ Nr. 4563, bauartgleich mit Philips Typ PF 712, 15 W, Wellenlängen von 610-730 nm, relative spektrale Strahldichte $B_{e\lambda}$ (50%) 650 nm

Verwendete Substanzen und Lösungen

Substanzen

(±) - Rolipram (4 RS-(3-Cyclopentyloxy-4-methoxyphenyl)-2-pyrrolidin-on)
Schering AG, Berlin, Deutschland

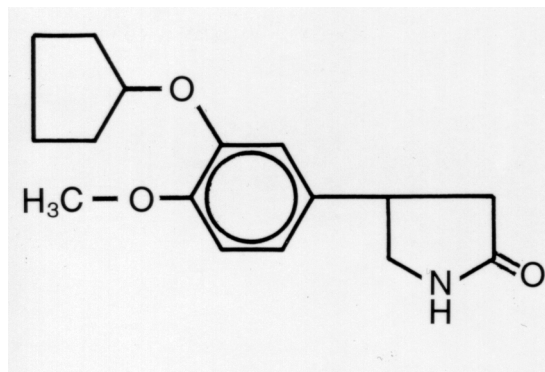


Bild 6: Chemische Formel von Rolipram

Cremophor EL ® (polyethoxyliertes Rizinusöl), BASF AG, Ludwigshafen, Deutschland.

Vehikel

Physiologische Kochsalz-Lösung mit Zusatz von 100 g/l Cremophor EL (=10 %ig).

Lösung

Rolipram wurde suspendiert im Vehikel mit einer Konzentration von 0,5 mg Rolipram/ ml. Für jeden Versuchsdurchgang wurde diese Suspension frisch angesetzt. Dabei wurden 2,5 mg Rolipram zu 5 ml Suspensionsmittel in eine Glasflasche gegeben und für fünf Minuten in einem Ultraschallbad suspendiert. Dadurch entstand eine homogen opaque Lösung. Die Flasche wurde zur Unterscheidung vom Suspensionsmittel mit einem schwarz markierten Gummistopfen verschlossen. Damit war eine eindeutige Identifizierung auch unter der roten Nachtbeleuchtung möglich. Vom Suspensionsmittel wurden ebenfalls 5 ml in eine Glasflasche gegeben und gleich lange im Ultraschallbad behandelt.

Verabreichungsrout

Rolipram und Vehikel wurden intraperitoneal (i.p.) verabreicht, wobei das Injektionsvolumen 5 ml/ kg Körpergewicht betrug.

Dosis

Es wurde eine Konzentration von 2,5 mg Rolipram/ kg Körpergewicht getestet.

Geräte

Messgeräte, Laborgeräte

Waage

Die Messung des Körpergewichts wurde mit einer Neigungsschaltgewichtswaage (Typ S 2000, Firma August Santer KG, Ebingen/ Württemberg, Deutschland), mit einem Wägebereich von 20 bis 200 g durchgeführt (ein Teilabschnitt = ein Gramm).

Thermometer

Zur Messung der KT wurde ein elektrisches Universal - Thermometer Typ T E 3, Firma Elektrolaboratoriet Kopenhagen, Dänemark, mit einer Thermosonde für Ratten, Typ RM 4 benutzt. Um eine definierte Eindringtiefe bei der Messung zu haben, wurde die Sonde fünf Millimeter vom Sondenende entfernt mit Isolierband umwickelt.

Zentrifuge

Zum Zentrifugieren der Blutproben wurde eine Zentrifuge „Hettich Rotixa“, Firma A. Hettich, Tuttlingen, Deutschland, verwendet.

Spritzen und Kanülen

Zum Aufziehen der Injektionsvolumina und zur Applikation wurden PRIMO ® Einmalspritzen, Firma Asin, Dänemark, Typ Luer Tuberkulinspritzen, 1 ml (Unterteilung von 1 ml Volumen mit 0,01 ml -Markierungen) und Sterican ® Loc Einmalkanülen, Firma B. Braun Melsungen AG, Deutschland, Typ Nr. 18, 0,45 × 23 mm (Außendurchmesser×Länge), verwendet.

Probenröhrchen

Zur Aufbewahrung des Serums wurden Plastibrand ® Probenröhrchen, „micro test tubes“, Volumen 1 ml, der Firma Brand GmbH & Co., Wertheim/ Main, Deutschland, benutzt.

Beobachtungsbox

Die Beobachtungsbox zur Registrierung des Verhaltens nach Prüfschema I und II (siehe unten) war in sechs voneinander getrennte Abteile unterteilt (transparentes PVC, B × T × H = 600×207×137 mm). Die Abteile hatten jeweils eine Breite von 100 Millimetern. Jedes Abteil hatte einen nach oben zu öffnenden Deckel, der mit fünfzehn gleichmäßig angebrachten Luftlöchern von jeweils zehn Millimetern Durchmesser versehen war. An der Rückfront jedes Abteils waren neun Luftlöcher mit einem Durchmesser von je fünf Millimetern angebracht. Beobachtungsbox und Transportkäfig wurden mit Holzspaneinstreu circa 15 Millimeter hoch gefüllt. Die Einstreu wurde jeweils nach Beendigung eines Versuchsdurchgangs durchgemischt und nach Ablauf eines Versuchsblocks erneuert.

Behandlungsschema

Ablauf-Versuchsblöcke

Zur Beobachtung von tageszeitlich bedingten Veränderungen von Verhaltensmustern und Bestimmungen von Hormonen wurden zwölf Zeitpunkte im Abstand von jeweils zwei Stunden gewählt: 02.00, 04.00, 06.00, ... , 24.00 Uhr. Bei der Beobachtung der Verhaltensmuster umfasste der Messzeitraum eine Stunde mit Beginn um z. B. 02.15 Uhr und Ende um 03.15 Uhr. Die Blutentnahme für die Hormonbestimmungen erfolgte nach der Verhaltensbeobachtung von z. B. 03.20 bis 03.30 Uhr. Für die Messung der Körpertemperaturen wurden zwei 5-Minuten-Intervalle vor der Injektion und nach der Verhaltensbeobachtung gewählt. Der Zeitpunkt $t = 0$ Minuten befand sich dabei z. B. im Zeitraum 01.50 bis 01.55 Uhr, der Zeitpunkt $t = 75$ Minuten z. B. im Zeitraum 03.15 bis 03.20 Uhr.

Messzeiträume für Verhaltensbeobachtung, KT und Hormonbestimmungen wurden unter dem Zeitpunkt der Injektion der Substanzen als „Versuchszeitpunkt“ (hier dann 02.00 Uhr) zusammengefasst. An jedem Zeitpunkt wurden sechs Tiere untersucht. Zur besseren Durchführbarkeit wurden jeweils vier Zeitpunkte zu einem gemeinsamen Block gruppiert. Der Beginn wurde jeweils auf 06.00, 14.00 oder 22.00 Uhr festgelegt. Die Verteilung der Blöcke auf die Wochentage erfolgte bei insgesamt zwölf Blöcken so, dass in einem Zeitraum von drei Wochen Beobachtungen an jedem Wochentag zu jedem Zeitpunkt stattfanden.

Die Beobachtungen fanden in zwei aufeinanderfolgenden Jahren jeweils im Herbst statt, um durch die Beobachtung der Tiere in zwei aufeinanderfolgenden Monaten der beiden Jahre jahreszeitliche Effekte auszuschließen (Martin et al. 1986).

Ablauf-Versuchszeitpunkte

Vor jedem neuen Versuchszeitpunkt wurde für die sechs Tiere jeweils durch Ziehen von einer aus sechs verdeckt liegenden Karten eine zufällige Zuordnung zu den Behandlungsgruppen „Kontrolle“ oder „Rolipram“ hergestellt. Je drei Karten waren mit „K“ oder „R“ beschriftet.

Im Zeitraum $t = -10$ bis $t = -5$ Minuten wurde der vorgesehene Wohnkäfig mit sechs Tieren aus dem Gestell entnommen und zum Messplatz gebracht. Die Tiere wurden dort nacheinander

- a) gewogen und ihr Gewicht auf einem gesonderten Protokoll notiert,
- b) einer rektalen KT-Messung unterzogen, die auf demselben Protokoll vermerkt wurde, und
- c) dann wieder in ihren Wohnkäfig eingesetzt.

Anschließend wurden aus den beiden bereitstehenden Glasflaschen mit Vehikel und Rolipram-Suspension entsprechend der vorher festgelegten Behandlungsgruppe die Injektionsvolumina in Spritzen aufgezogen. Die Spritzen wurden in einen Ständer eingestellt, dessen sechs Halterungen mit Zahlen von eins bis sechs beschriftet worden waren, so dass die Spritzen den Tieren sicher zugeordnet werden konnten und eine schnelle Injektion möglich war.

Im Zeitraum $t = -2$ bis $t = -1$ Minuten wurden den Tieren die Injektionen intraperitoneal verabreicht. Dazu wurden die Tiere nacheinander am Nackenfell aus ihrem Wohnkäfig entnommen, mit der Bauchseite zum Beobachter hin gehalten und die Nadel innerhalb der Regionales inguinales dextra bzw. sinistra durch die Leibeswand nach intraperitoneal geführt. Nach unauffälliger Aspiration wurde dann das Volumen appliziert und die Tiere entsprechend ihren Nummerierungen in die einzelnen Abteile der Beobachtungsbox eingesetzt. Damit war sichergestellt, dass alle Maßnahmen bis zum Beginn der Verhaltensbeobachtung unter demselben

Beleuchtungsregime durchgeführt werden konnten, da zu den Zeitpunkten 06.00 und 18.00 Uhr $t=0$ Minuten dem Zeitpunkt des Lichtwechsels entsprach.

Ab $t=0$ Minuten saßen die Tiere für fünfzehn Minuten ungestört in ihren Abteilen, um Effekte durch die Injektion bei der Verhaltensbeobachtung nicht als zusätzlich beeinflussenden Faktor zu haben.

Rolipram hat in der Ratte eine Halbwertszeit von 1-3 Stunden, eine maximale Plasmakonzentration nach ca. 30 Minuten und ist ab 0,2 mg/kg pharmakologisch wirksam (Krause, Kühne 1988), so dass ein ausreichender Wirkspiegel für die Zeit der Untersuchung angenommen werden kann und eine pharmakogene Beeinflussung des Verhaltens stattfindet.

Werden WISTAR-Ratten wie in dieser Untersuchung in neue Käfige zur Beobachtung umgesetzt, kann beim Beobachtungsablauf auf das Vorgehen von Gispen et al. 1975 zurückgegriffen werden. Dort beginnt die Untersuchung zum Verhalten 15 Minuten nach der Manipulation (Umsetzen, i.p.-Injektion, Transport) und dauert über insgesamt 50 Minuten an. Jolles, Rompa-Barendregt und Gispen zeigten 1979 (1979a) an WISTAR-Ratten, dass GR sich in allen neuen Situationen verstärkt, wobei Einzelheiten wie neue Umgebung allein oder mit zusätzlicher Injektion keinen Unterschied bewirken. Es ist auch nicht wesentlich, ob die Untersuchung in dem den Ratten bekannten oder in einem neuen Raum stattfindet.

Für die Auslösung des GR ist auch das intakte HPA-System nicht notwendig. Für den Zeitablauf des GR ist wesentlich, dass nach Vorbehandlung und neuer Umgebung das dadurch ausgelöste GR in den ersten 15-20 Minuten maximal ist und über einen Zeitraum bis etwa 60 Minuten das anschließend beobachtete, so ausgelöste GR gegen Null geht.

Da in dieser Untersuchung die ersten 15-20 Minuten nach Behandlung nicht in die Messung eingehen, kann nach Jolles, Rompa-Barendregt und Gispen 1979a diese Unschärfe (Größenordnung etwa 8,5 %) nicht eintreten und es wird nur das durch die Behandlung/Tageszeit verursachte GR erfasst.

Nach Ablauf von 60 Minuten Verhaltensbeobachtung wurden die Tiere zum Zeitpunkt $t=75$ Minuten aus den Abteilen entnommen, ihre KT erneut rektal gemessen und sie in eine Transportkiste umgesetzt. Bei Beobachtungen während der Dunkelphase oder unter farbiger Beleuchtung wurde vor dem Verlassen des Beobachtungsraumes eine zweite Transportkiste lichtdicht umgekehrt aufgesetzt, um die Tiere bis zur Dekapitation keiner Beleuchtung auszusetzen. Die Tiere wurden dann in den Dekapitationsraum gebracht, einzeln der Transportkiste entnommen und jeweils innerhalb von 90 Sekunden dekapitiert und ihr Blut in vorgekühlten Röhrchen aufgefangen.

Im Beobachtungsraum wurden die Deckel der Beobachtungsabteile bis zum Einsetzen der Tiere des nächsten Versuchszeitpunkts geöffnet gelassen, um eine Erwärmung der Abteile innerhalb eines Versuchsblocks zu vermeiden.

Prüfparameter

Körpertemperatur

Die KT wurde während des Versuchsablaufs in zwei Zeiträumen von $t = -10$ Minuten bis $t = -5$ Minuten und nach $t = 75$ Minuten bis $t = 80$ Minuten während des Versuchsablaufs rektal gemessen. Zum Zeitpunkt $t = 0$ Minuten erfolgte die Injektion von Vehikel oder Rolipram, so dass die Messung der Rektaltemperatur in geringem zeitlichen Abstand vor der Injektion erfolgte. Nach 75 Minuten war diese Messung die erste Tätigkeit nach Beendigung der Verhaltensbeobachtung.

Zu jedem Messzeitpunkt wurde das freie Ende der Thermosonde vorher in Glycerin getaucht, um ein rasches und schmerzarmes rektales Einführen zu ermöglichen. Die Temperatur wurde nach einer Verweildauer von 20 Sekunden abgelesen, deren Ablauf auf einer am Messplatz aufgestellten großformatigen Stoppuhr verfolgt werden konnte.

Prüfschema - I

Folgende Parameter wurden durch parallele Beobachtung an sechs Tieren registriert:

a) head twitches – HTW

kurzdauerndes, schnelles Schütteln des Kopfes oder Oberkörpers um die Körperlängsachse

b) grooming – GR

eine zusammenhängende Sequenz von Bewegungen bestehend aus Putzen von Schnauze und Kopf einschließlich der Ohren und Putzen des Flankenfells mit den Vorderpfoten zusammen mit dem Belecken des Flankenfells

c) genital grooming – GGR

Säuberung der Genital- und/ oder Analregion durch Belecken

d) scratching – SCR

Kratzen des Fells am Hinterkopf in der Nähe der Ohren mit der Hinterpfote

e) pelvic thrust – PT

eine nach vorn gerichtete Bewegung des Beckengürtels meist im Sitzen, zum Teil mit einer Ejakulation verbunden

Prüfschema - II

f) digging – DI

Graben in der Einstreu

g) yawning – YAW

Gähnen, teilweise mit Herausschieben der Zunge und Streckung des gesamten Körpers

h) sleeping – SL

Schlafen des Tieres (Augen geschlossen)

i) sniffing – SN

Beschnuppern von Luftlöchern am Deckel oder der Hinterwand des Käfigs, teilweise mit Hindurchstrecken der Zunge durch die Luftlöcher oder auch Belecken dieser

k) forepaw shaking – FPS

kurze, schnelle Schüttelbewegung der Vorderpfoten im Brustbereich

Gruppierung von Parametern

In der Zeit von 15 bis 75 Minuten nach Applikation der Lösungen wurde eine Verhaltensbeobachtung mit insgesamt zehn Parametern durchgeführt:

a) head twitches

b) grooming, forepaw shaking, genital grooming, scratching, pelvic thrust, digging, yawning und c) sleeping.

Quantifizierung der Parameter

Head twitches wurden quantitativ über den gesamten Beobachtungszeitraum erfasst.

Das mindestens einmalige Auftreten der Parameter unter b) innerhalb eines 5-min-Intervalls wurde als ein „Ereignis“ mit „eins“ bewertet. Damit betrug pro Tier und Beobachtungszeitraum die maximale „Ereigniszahl“ „zwölf“, im weiteren Verlauf wird synonym der Begriff „Inzidenz“ verwendet. Diese Intervalleinteilung war bereits in anderen Verhaltensstudien bei WISTAR-Ratten verwendet worden (Niesink, van Ree 1982 WISTAR, TNO, Niederlande).

Bei dem Parameter „Sleeping“ wurde eine differenzierte Bewertung vorgenommen:

Nur diejenigen Intervalle wurden mit „eins“ bewertet, in denen die Tiere von Beginn bis Ende schliefen und sie auch zum Ende des vorangegangenen Intervalls geschlafen hatten.

Waren die Tiere vor oder nach der Schlafphase in einem Intervall wach oder waren sie im vorausgehenden Intervall wach, wurde das aktuelle Intervall mit „0,5“ bewertet.

Während der Schlafphase konnten zusätzlich „Yawning“ und / oder „Scratching“ auftreten.

Das angegebene Procedere erfolgt in Anlehnung an eine Verhaltensuntersuchung bei WISTAR-Ratten. Dort wurde jeweils bei insgesamt fünf Aktivitätsstadien dasjenige Stadium angegeben, das mindestens eine halbe Minute bestanden hatte.

Klinisch-biochemische Parameter

Corticosteron

Die Messungen wurden mit einem kommerziellen RIA der Firma Endocrine Sciences, Tarzana, Kalifornien, USA durchgeführt. Zu dieser Methode sind schon verschiedene Literaturangaben publiziert, bei denen die Konzentrationen für Kontrolltiere zwischen 150 bis 450 pmol/ ml lagen (Fischette et al. 1980, Kile, Turner 1985, s. a. D'Agostino et al. 1982, Fink et al. 1980, Tagin et al. 1985, Miyabo et al. 1982).

Melatonin

Die Messungen wurden mit einem kommerziellen RIA der Firma Tecova AG, Wohlen, CH durchgeführt. Diese Methode ist ein eingeführtes Verfahren, das nach der Literatur für ³H-markiertes Melatonin auch bei niedrigen Konzentrationen im Bereich von 25 pg, wie sie in der Hell-Phase zu erwarten sind, zu verlässlichen Ergebnissen führte (VK intra-assay 1-7 %, inter-assay 2-13 %) (Lynch, Ozaki, Wurtman 1978). Bei ¹²⁵I-RIA konnten sogar minimale Konzentrationen von 7 pg/ml gemessen werden (Wurtman, Waldhauser (Hrsg.): Melatonin in humans, J Neural Transm Suppl 21 1986). Gegenüber einem ³H-RIA lagen die gemessenen Konzentrationen aber um bis zu 15% höher (Levy et al. 1984, Lynch et al. 1982, Wurtman, Waldhauser (Hrsg.): Melatonin in humans, J Neural Transm Suppl 21 1986.), so dass hier ein ³H-Assay verwendet wurde.

Glukose

Die Messungen wurden mit einem Beckman-Glukosemessgerät nach der Hexokinase-Methode durchgeführt.

Probengewinnung

Am Arbeitsplatz für die Probengewinnung wurden die für einen Versuchsblock benötigten Reagenzgläser mit Laborfilm verschlossen und in Eiswasser gekühlt.

Die Tiere wurden in Reihenfolge der Applikation dekapitiert und das Blut in den Reagenzgläsern aufgefangen und sofort wieder in Eiswasser gestellt.

Nach jeder Dekapitation wurde der Arbeitsplatz mit Wasser gesäubert und trocken gewischt. Der Behälter zur Aufnahme der Kadaver war bis auf den Zeitraum der Dekapitation abgedeckt.

Die vorgekühlten Proben wurden in einem temperaturkontrollierten Raum (Temperatur $T = 7 \text{ Grad C}$) über 15 Minuten bei 3175 U/min mit einer Zentrifuge "Hettich Rotixa", Firma A. Hettich, Tuttlingen, Deutschland, zentrifugiert.

Im Zeitraum $t = 0$ bis $t = 15$ Minuten wurden die zentrifugierten Proben der Zentrifuge entnommen. Am Arbeitsplatz für die Probengewinnung wurde das Serum in vorher mit der Nummer des Tieres beschriftete Probenröhrchen in Portionen von $3 \times 200 \mu\text{l}$ mit einer „Eppendorf Präzisionspipette $200 \mu\text{l}$ “ abpipettiert und der verbleibende Rest in ein gesondertes Röhrchen gegeben. Für jede Portion wurde eine neue Pipettenspitze verwendet, um eine Verschleppung von Blutkuchenbestandteilen auf ein Minimum reduzieren zu können.

Probenlagerung

Die Probenröhrchen wurden bis zur weiteren Verarbeitung für die Hormon- und Glukosebestimmungen zwei Wochen bei -20 Grad C und danach bei -70 Grad C gelagert.

Beobachtungsplatz

Räumliche Aufteilung

Der Beobachtungsplatz bestand aus drei Bereichen:

- a) Beobachtungsplatz,
- b) Mess- und Applikationsplatz und
- c) Platz zur Probengewinnung.

a) und b) befanden sich im Raum der Tierhaltung. Mess- und Applikationsplatz waren identisch. Der Platz zur Probengewinnung war von den anderen Plätzen räumlich getrennt. Damit wurde eine Beeinflussung der übrigen Tiere durch die Dekapitationen an diesem Platz vermieden (Wong et al. 1983).

Biometrische Auswertung

Zur Auswertung der Ergebnisse wurden folgende Annahmen getroffen worden:

Als Versuchsobjekt werden einzelne Ratten eingesetzt, die als Versuchseinheit Träger von Merkmalen sind. In dieser Untersuchung interessieren die Merkmale (Obergruppe) Verhalten, KT und Hormone/Substrate. Bei den Versuchsobjekten werden bei den einzelnen Merkmalen die nachfolgend beschriebenen Ausprägungen beobachtet oder gemessen:

als stetige Merkmale sind KT, Körpergewicht, Glukose und die Hormone vorhanden, die übrigen Merkmale sind als diskrete Merkmale zu bezeichnen.

Bei den Verhaltensparametern werden lediglich HTW mit einer metrischen Skala von Null bis zum Maximalwert bis zu 75 HTW/ Sitzung gemessen, alle übrigen sind mit einer Ordinalskala zu messen. Es wurden bei diesen die Ausprägung Null, ein Halb und Eins zugelassen.

Die übrigen Parameter sind mit metrischen Skalen messbar. Dabei können die metrischen Skalen weiter unterteilt werden. Die Skalen bei KT, Glukose und Hormonen sind Intervallskalen, beim Körpergewicht ist es eine Verhältnisskala.

Die Ratten wurden nach dem Zufallsprinzip aus der ZTH Schering mit einem Mindestgewicht ausgewählt. In einem weiteren Schritt wurden sie ebenfalls nach dem Zufallsprinzip zu 6 Tieren in einen Käfig gesetzt und zur Vorbereitung des Versuchstages nummeriert. Die weitere Zuordnung zu den einzelnen Behandlungsgruppen erfolgte durch eine zufällige Auswahl mit je drei mit K (Kontrolle) und R (Rolipram) beschrifteten Lose, die für jede Gruppe pro Versuchszeitpunkt neu gemischt und daraus für jedes Tier das Behandlungsregime ermittelt wurde. Da die Auswahl der Tiere und Verabreichung der Substanzen durch eine Person erfolgte, war das Prinzip der doppelblinden Untersuchung nur in Grenzen einzuhalten, aber für die Durchführung durch einen (gleichen) Untersucher erforderlich.

Für die deskriptive Statistik werden die folgenden Verfahren verwandt:

Ordinale Daten:

Für die Parameter mit geringer Ausprägung wie PT, YAW, GGR erfolgt die Darstellung in tabellarischer Form, für alle übrigen Parameter (FPS, GR, DI, SN, SCR, SL) in Form von Stabdiagrammen.

Als Kenngrößen in der Darstellung werden Mediane und die Quartile 25/75 verwandt.

Es erfolgt die Darstellung der Häufigkeiten pro Zeitpunkt.

Für diese Parameter wird angenommen, dass keine gegenseitige Beeinflussung erfolgt, sie so als unabhängige Stichproben gelten können. Über die Art der Verteilung kann keine sichere Aussage getroffen werden, daher wird als verteilungsunabhängiger Test der Kruskal-Wallis-Test eingesetzt.

Metrische Daten:

Alle Daten werden in Stabdiagrammen dargestellt.

Für die statistische Bearbeitung wird angenommen, dass sich alle metrischen Daten normalverteilt darstellen. Durch die Zahl von durchschnittlich 12 Tieren pro Versuchszeitpunkt erscheint eine ausreichend große Zahl an Daten vorzuliegen, die nach dem Zentralen Grenzwertsatz der Wahrscheinlichkeitsrechnung eine Annäherung an eine Normalverteilung zulässt.

Für Körpergewicht, Temperatur und die Wirkung eines Pharmakons auf Versuchstiere (Reaktionszeit nach Substanzapplikation) ist dies bekannt.

Die untersuchten Stichproben R und K sind unabhängige Stichproben. Für den Standardfehler der Differenz ist eine Testung auf Varianzenhomogenität notwendig, die mit einem Varianzquotiententest (F-Test) geprüft wird. Voraussetzung zur Anwendung ist die Variation der Merkmalsausprägungen gemäß einem Normalverteilungsgesetz, die wie oben beschrieben angenommen wird.

Für den Vergleich unabhängiger Stichproben bei metrischen Daten werden t-Test (gleiche Streuungen) und Welch-Test (unterschiedliche Streuungen) angewandt.

Um unabhängig vom angenommenen Verteilungsmodell zur numerischen Charakterisierung eines Punktschätzwertes zu sein, wird hier der Mittelwert mit seinem Standardfehler ($\text{Mean} \pm \text{SEM}$) verwendet und in der Darstellung verarbeitet.

Die hier verwandte Nullhypothese lautet immer: Die Behandlung mit Rolipram führt im Vergleich zur Kontrolle zu keiner Veränderung am untersuchten Parameter.

Als Irrtumswahrscheinlichkeit (Signifikanzniveau) wird $\alpha = 0.05$ gewählt und der Test als zweiseitiger Test durchgeführt.

Ergebnisse

1 Beleuchtungsversuch

1.1 Verhalten

1.1.1 Head twitches

1.1.1.1 Kontrollen

Zu allen fünf Zeitpunkten lagen die Werte sehr niedrig, um 04.00 Uhr (Licht an) mit zwei Head twitches / Stunde dabei am höchsten. (Abbildung 1)

1.1.1.2 Rolipram

Unter Rolipram kam es zu einem statistisch signifikanten starken Anstieg der Head twitches. Die höchsten Werte fanden sich um 04.00 Uhr (Licht an) und 06.00 Uhr (Gelb) mit 30 bis 35 Head twitches / Stunde. An den anderen drei Zeitpunkten lagen die Head twitches niedriger: um 10.00 Uhr (Grün) waren es 20 / Stunde, um 08.00 Uhr (Blau) und 12.00 Uhr (Rot) etwa 15 Head twitches / Stunde. (Abbildung 1)

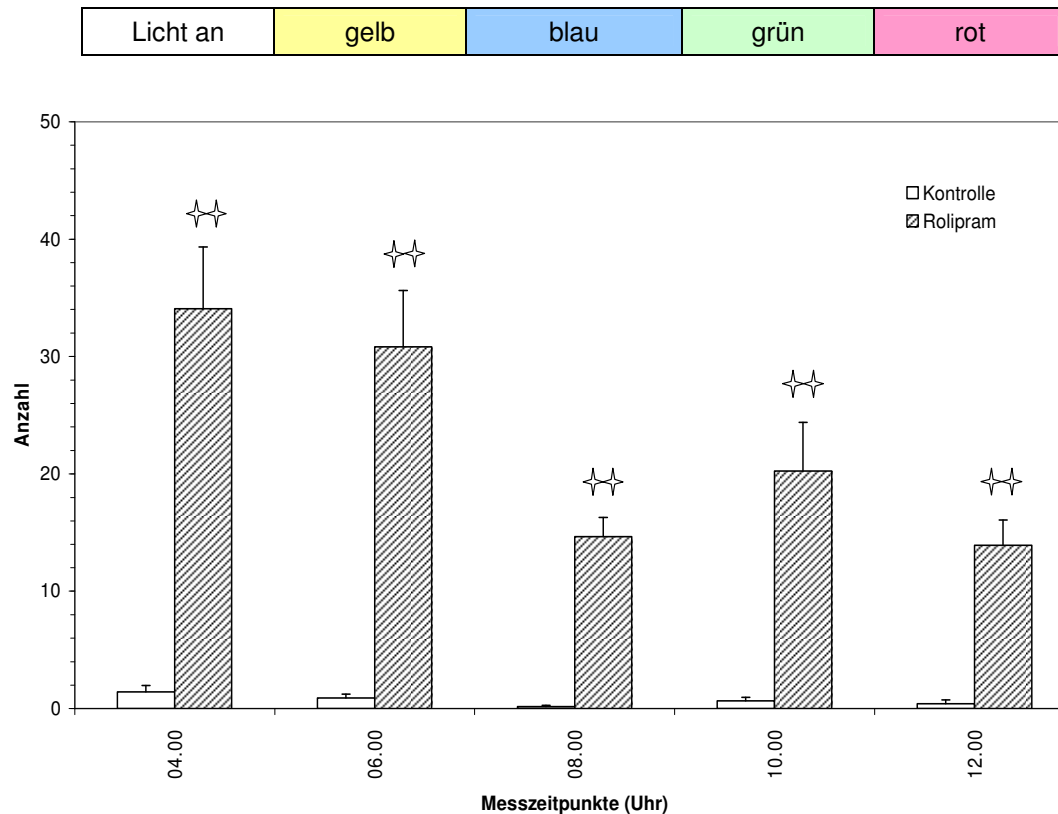


Abb. 1: Beleuchtungsversuch

Head-Twitches bei Ratten zu verschiedenen Tageszeitpunkten und unterschiedlichen Lichtbedingungen nach einmaliger intraperitonealer (i.p.) Vorbehandlung (15 min) mit Rolipram (2.5 mg/kg) bzw. Vehikel (Kontrolle).

Pro Tageszeitpunkt wurden jeweils 24 Tiere eingesetzt und nach Zufallskriterien den 2 Behandlungsgruppen zugeordnet (n = 12 Tiere Rolipram i.p.; n = 12 Tiere Vehikel i.p.).

Die Anzahl der Head-Twitches wurde während 1 h (von der 15. - 75. Min nach i.p. Behandlung) erfasst.

Dargestellt sind die Mittelwerte mit S.E.M.

(Signifikanzniveau: ** = $p < 0.01$, t-Test)

1.1.2 Forepaw shaking

1.1.2.1 Kontrollen

Dieser Parameter trat nur bei einzelnen Kontrolltieren auf. (Abbildung 2)

1.1.2.2 Rolipram

Nach Gabe von Rolipram trat Forepaw shaking mit einer Inzidenz von sieben statistisch signifikant erhöht auf. Zwischen den einzelnen Zeitpunkten waren keine großen Unterschiede zu sehen. (Abbildung 2)

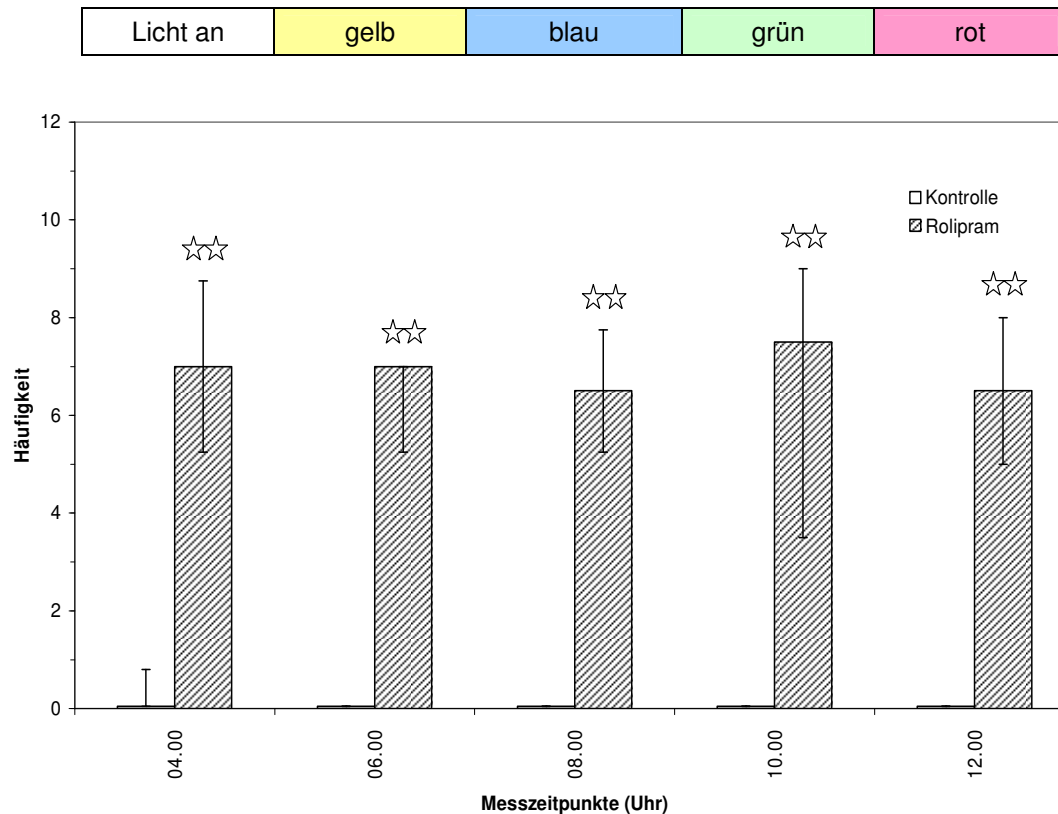


Abb. 2: Beleuchtungsversuch

Forepaw shaking bei Ratten zu verschiedenen Tageszeitpunkten und unterschiedlichen Lichtbedingungen nach einmaliger intraperitonealer (i.p.) Vorbehandlung (15 min) mit Rolipram (2.5 mg/kg) bzw. Vehikel (Kontrolle).

Pro Tageszeitpunkt wurden jeweils 24 Tiere eingesetzt und nach Zufallskriterien den 2 Behandlungsgruppen zugeordnet (n = 12 Tiere Rolipram i.p.; n = 12 Tiere Vehikel i.p.).

Das Vorhandensein von Forepaw shaking pro Zeitraum von 5 min wurde während 1 h (von der 15. - 75. min nach i.p. Behandlung) registriert (Inzidenzrate: maximal 12).

Dargestellt sind die Mediane mit 25/75%-Quartilen.

(Signifikanzniveau: ☆☆ = $p < 0.01$; Kruskal-Wallis-Test)

1.1.3 Grooming

1.1.3.1 Kontrollen

GR trat bei den Kontrollen zu allen Zeitpunkten in einer niedrigen Häufigkeit auf. Dabei fanden sich die höchsten Werte um 08.00 Uhr (Blau) mit einer Inzidenzrate von zwei. (Abbildung 3)

1.1.3.2 Rolipram

Unter Rolipram waren Groomingsequenzen häufig zu beobachten. Zu allen Zeitpunkten waren diese statistisch signifikant erhöht. Das Maximum fand sich dabei um 12.00 Uhr (Rot) mit einer Inzidenzrate von sieben, zu den restlichen Zeitpunkten lag die Rate bei etwa sechs. (Abbildung 3)

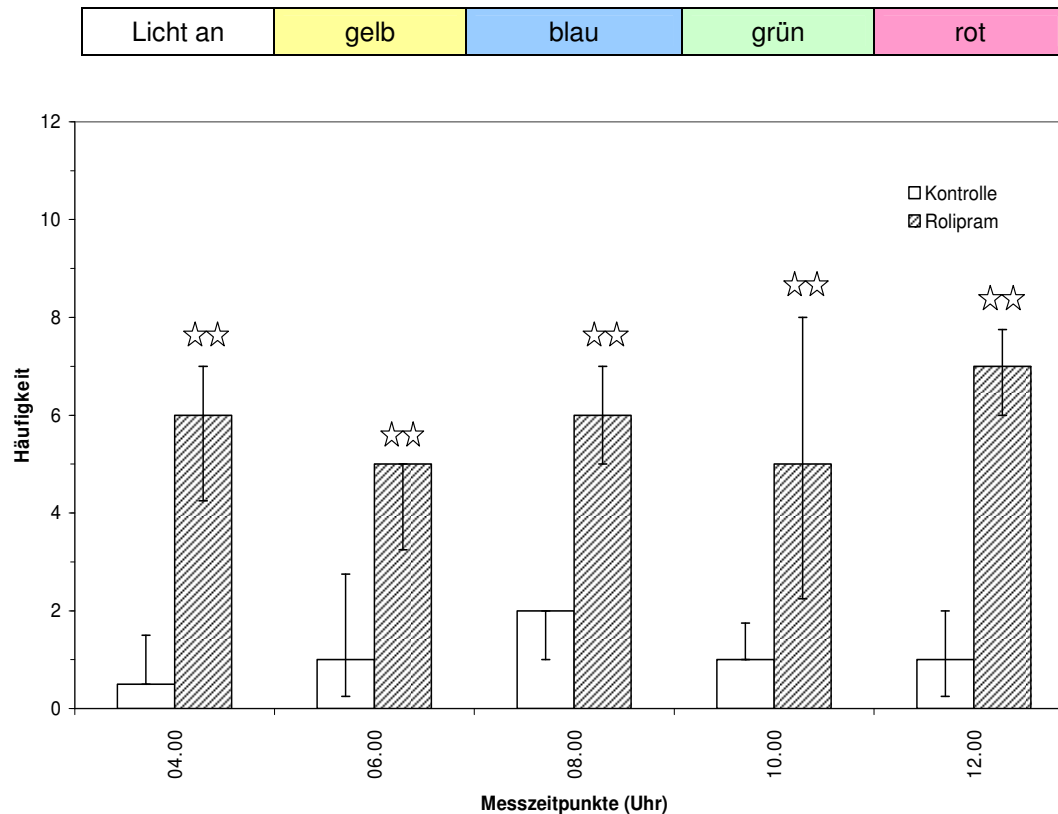


Abb. 3: Beleuchtungsversuch

Grooming bei Ratten zu verschiedenen Tageszeitpunkten und unterschiedlichen Lichtbedingungen nach einmaliger intraperitonealer (i.p.) Vorbehandlung (15 min) mit Rolipram (2.5 mg/kg) bzw. Vehikel (Kontrolle).

Pro Tageszeitpunkt wurden jeweils 24 Tiere eingesetzt und nach Zufallskriterien den 2 Behandlungsgruppen zugeordnet (n = 12 Tiere Rolipram i.p.; n = 12 Tiere Vehikel i.p.).

Das Vorhandensein von Grooming pro Zeitraum von 5 min wurde während 1 h (von der 15. - 75. min nach i.p. Behandlung) registriert (Inzidenzrate: maximal 12).

Dargestellt sind die Mediane mit 25/75%-Quartilen.

(Signifikanzniveau: ☆☆ = $p < 0.01$; Kruskal-Wallis-Test)

1.1.4 Scratching

1.1.4.1 Kontrollen

SCR trat bei den Kontrolltieren mit einer mäßigen Inzidenzrate von zwei bis fünf auf. Am häufigsten war es um 06.00 Uhr (Gelb) zu beobachten, 08.00 Uhr (Blau) und 10.00 Uhr (Grün) folgten mit einer Rate von drei. Die niedrigste Rate fand sich um 12.00 Uhr (Rot). (Abbildung 4)

1.1.4.2 Rolipram

Es kam zu einer fast vollständigen Suppression des Verhaltens, so dass sich ein statistisch signifikanter Unterschied zu allen Zeitpunkten ergab. (Abbildung 4)

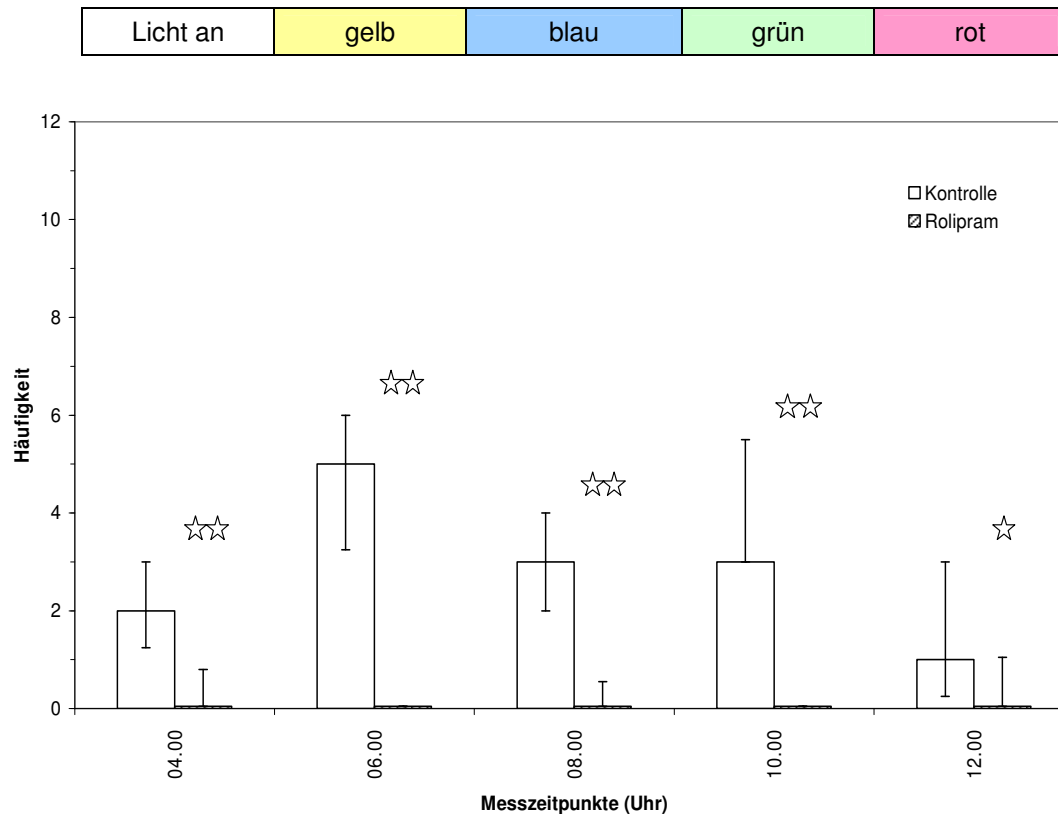


Abb. 4: Beleuchtungsversuch

Scratching bei Ratten zu verschiedenen Tageszeitpunkten und unterschiedlichen Lichtbedingungen nach einmaliger intraperitonealer (i.p.) Vorbehandlung (15 min) mit Rolipram (2.5 mg/kg) bzw. Vehikel (Kontrolle).

Pro Tageszeitpunkt wurden jeweils 24 Tiere eingesetzt und nach Zufallskriterien den 2 Behandlungsgruppen zugeordnet (n = 12 Tiere Rolipram i.p.; n = 12 Tiere Vehikel i.p.).

Das Vorhandensein von Scratching pro Zeitraum von 5 min wurde während 1 h (von der 15. - 75. min nach i.p. Behandlung) registriert (Inzidenzrate: maximal 12).

Dargestellt sind die Mediane mit 25/75%-Quartilen.

(Signifikanzniveau: ☆☆ = $p < 0.01$, ☆ = $p < 0.05$; Kruskal-Wallis-Test)

1.1.5 Genital grooming

1.1.5.1 Kontrollen

Dieser Parameter kann zu den in geringer Häufigkeit auftretenden Verhaltensphänomenen gezählt werden. Er trat zu den Zeitpunkten 04.00 Uhr (Licht an) und 06.00 Uhr (Gelb) mit einer Inzidenzrate von eins, danach mit einer Rate von zwei bis drei auf. (Tabelle 1a)

1.1.5.2 Rolipram

Unter Rolipram konnte keine wesentliche Abweichung im Auftreten registriert werden, so dass es zu keiner statistisch signifikanten Änderung kam. (Tabelle 1a)

Tabelle 1a: Beleuchtungsversuch

MZ	Beleuchtungsversuch Kontrolle			Beleuchtungsversuch Rolipram			Signifikanz-Niveau
	Quantil 25	Median	Quantil 75	Quantil 25	Median	Quantil 75	
04.00 Uhr	0,5	1,0	1,0	0,5	1,0	2,5	n.s.
06.00 Uhr	0,5	1,0	2,0	0,0	1,0	2,0	n.s.
08.00 Uhr	2,0	2,5	3,0	1,0	2,0	2,0	n.s.
10.00 Uhr	1,5	2,5	3,0	0,0	1,5	3,0	n.s.
12.00 Uhr	1,0	2,0	2,0	0,0	1,0	2,0	n.s.

MZ = Messzeitpunkt

n.s. = nicht signifikant

Genital Grooming bei Ratten zu verschiedenen Tageszeitpunkten und unterschiedlichen Lichtbedingungen nach einmaliger intraperitonealer (i.p.) Vorbehandlung (15 min) mit Rolipram (2.5 mg/kg) bzw. Vehikel (Kontrolle).

Pro Tageszeitpunkt wurden jeweils 24 Tiere eingesetzt und nach Zufallskriterien den 2 Behandlungsgruppen zugeordnet (n = 12 Tiere Rolipram i.p.; n = 12 Tiere Vehikel i.p.).

Das Vorhandensein von Genital Grooming pro Zeitraum von 5 min wurde während 1 h (von der 15. - 75. min nach i.p. Behandlung) registriert (Inzidenzrate: maximal 12).

Dargestellt sind die Mediane mit 25/75%-Quartilen.

(Signifikanzniveau: durchgehend $p > 0.05$; Kruskal-Wallis-Test)

1.1.6 Pelvic thrust

1.1.6.1 Kontrollen

Auch hierbei handelte es sich um ein selten auftretendes Verhaltensphänomen. Es trat zu den Zeitpunkten 08.00 Uhr (Blau) bis 12.00 Uhr (Rot) nur bei einzelnen Tieren auf. (Tabelle 2a)

1.1.6.2 Rolipram

Unter Rolipram trat der Parameter zu allen Zeitpunkten auf. Zum Zeitpunkt 08.00 Uhr (Blau) fand sich eine geringe Steigerung der Häufigkeit, die für einen statistisch signifikanten Unterschied ausreichend war. (Tabelle 2a)

Tabelle 2a: Beleuchtungsversuch

MZ	Beleuchtungsversuch Kontrolle			Beleuchtungsversuch Rolipram			Signifikanz-Niveau
	Quantil 25	Median	Quantil 75	Quantil 25	Median	Quantil 75	
04.00 Uhr	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	1,0	n.s.
06.00 Uhr	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	1,0	n.s.
08.00 Uhr	0,0	0,0	0,5	0,5	1,5	3,0	☆☆
10.00 Uhr	0,0	0,5	1,0	0,0	0,0	1,0	n.s.
12.00 Uhr	0,0	0,0	0,5	0,0	0,5	1,0	n.s.

MZ = Messzeitpunkt

n.s. = nicht signifikant

Pelvic Thrust bei Ratten zu verschiedenen Tageszeitpunkten und unterschiedlichen Lichtbedingungen nach einmaliger intraperitonealer (i.p.) Vorbehandlung (15 min) mit Rolipram (2.5 mg/kg) bzw. Vehikel (Kontrolle). Pro Tageszeitpunkt wurden jeweils 24 Tiere eingesetzt und nach Zufallskriterien den 2 Behandlungsgruppen zugeordnet (n = 12 Tiere Rolipram i.p.; n = 12 Tiere Vehikel i.p.). Das Vorhandensein von Pelvic Thrust pro Zeitraum von 5 min wurde während 1 h (von der 15. - 75. min nach i.p. Behandlung) registriert (Inzidenzrate: maximal 12).

Dargestellt sind die Mediane mit 25/75%-Quartilen.

(Signifikanzniveau: ☆☆ = $p < 0.01$; Kruskal-Wallis-Test)

1.1.7 Sniffing

1.1.7.1 Kontrollen

Bei diesem mäßig häufigen Parameter wurde als maximale Häufigkeit zum Zeitpunkt 06.00 Uhr (Gelb) eine Inzidenz von vier beobachtet.

Zu den Zeitpunkten 08.00 Uhr (Blau) und 12.00 Uhr (Rot) lag die Inzidenz bei drei, die Zeitpunkte 04.00 Uhr (Licht an) und 10.00 Uhr (Grün) hatten nur noch eine Inzidenz von zwei. (Abbildung 5)

1.1.7.2 Rolipram

Unter Rolipram war Sniffing immer statistisch signifikant supprimiert, so dass es nur noch bei einzelnen Tieren zu beobachten war. (Abbildung 5)

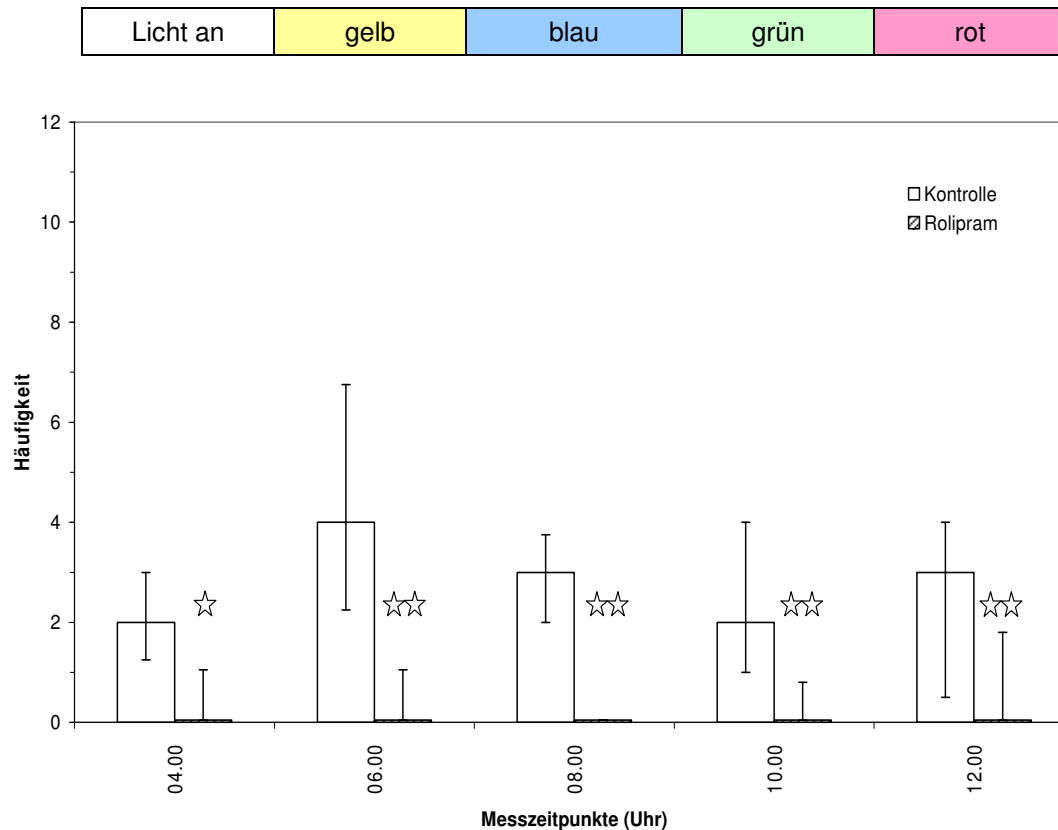


Abb. 5: Beleuchtungsversuch

Sniffing bei Ratten zu verschiedenen Tageszeitpunkten und unterschiedlichen Lichtbedingungen nach einmaliger intraperitonealer (i.p.) Vorbehandlung (15 min) mit Rolipram (2.5 mg/kg) bzw. Vehikel (Kontrolle).

Pro Tageszeitpunkt wurden jeweils 24 Tiere eingesetzt und nach Zufallskriterien den 2 Behandlungsgruppen zugeordnet (n = 12 Tiere Rolipram i.p.; n = 12 Tiere Vehikel i.p.).

Das Vorhandensein von Sniffing pro Zeitraum von 5 min wurde während 1 h (von der 15. - 75. min nach i.p. Behandlung) registriert (Inzidenzrate: maximal 12).

Dargestellt sind die Mediane mit 25/75%-Quartilen.

(Signifikanzniveau: ☆☆ = $p < 0.01$, ☆ = $p < 0.05$; Kruskal-Wallis-Test)

1.1.8 Digging

1.1.8.1 Kontrollen

Der Parameter wies eine ähnliche Häufigkeit wie Sniffing auf.

Das Maximum wurde um 06.00 Uhr (Gelb) mit einer Inzidenzrate von drei beobachtet, Minima lagen zu den Zeitpunkten 10.00 Uhr (Grün) und 12.00 Uhr (Rot) mit einer Rate von eins vor.
(Abbildung 6)

1.1.8.2 Rolipram

Entsprechend dem Verhalten von Sniffing unter Rolipram war Digging lediglich noch bei einzelnen Tieren zu beobachten; diese Abnahme war jeweils statistisch signifikant.

(Abbildung 6)

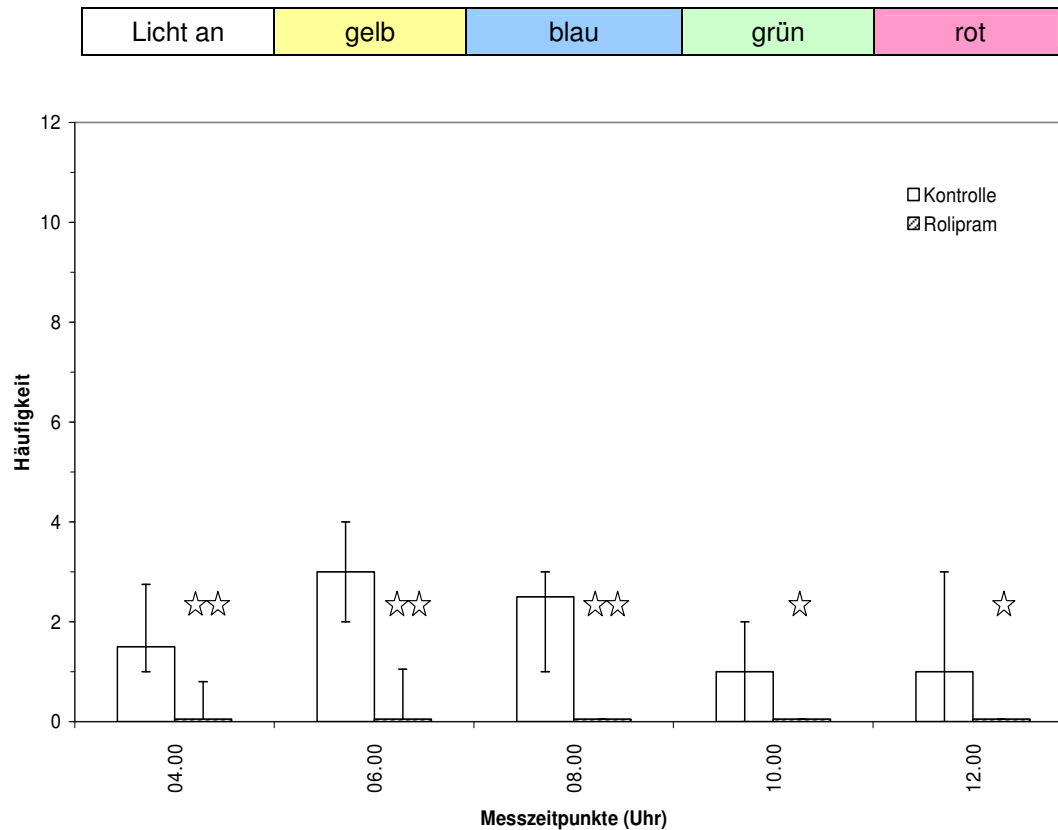


Abb. 6: Beleuchtungsversuch

Digging bei Ratten zu verschiedenen Tageszeitpunkten und unterschiedlichen Lichtbedingungen nach einmaliger intraperitonealer (i.p.) Vorbehandlung (15 min) mit Rolipram (2.5 mg/kg) bzw. Vehikel (Kontrolle).

Pro Tageszeitpunkt wurden jeweils 24 Tiere eingesetzt und nach Zufallskriterien den 2 Behandlungsgruppen zugeordnet (n = 12 Tiere Rolipram i.p.; n = 12 Tiere Vehikel i.p.).

Das Vorhandensein von Digging pro Zeitraum von 5 min wurde während 1 h (von der 15. - 75. min nach i.p. Behandlung) registriert (Inzidenzrate: maximal 12).

Dargestellt sind die Mediane mit 25/75%-Quartilen.

(Signifikanzniveau: ☆☆ = $p < 0.01$, ☆ = $p < 0.05$; Kruskal-Wallis-Test)

1.1.9 Sleeping

1.1.9.1 Kontrollen

Sleeping ist bei den Kontrolltieren ein häufiges Verhaltensphänomen. Es trat zu allen Zeitpunkten mit einer Inzidenzrate größer vier auf. Das Maximum fand sich um 04.00 Uhr (Licht an) mit einer Inzidenzrate um etwa acht, das Minimum fand sich zum Zeitpunkt 06.00 Uhr (Gelb) mit einer Rate von etwa viereinhalb. Zwischen den Zeitpunkten 08.00 Uhr (Blau) bis 12.00 Uhr (Rot) waren keine größeren Unterschiede zu sehen, Sleeping wies Inzidenzraten um fünf auf. (Abbildung 7)

1.1.9.2 Rolipram

Unter Rolipram wurde dieses Verhalten nahezu vollständig supprimiert, so dass es nur noch bei einzelnen Tieren beobachtet werden konnte. Demzufolge konnte ein statistisch signifikanter Abfall an allen Zeitpunkten errechnet werden. (Abbildung 7)

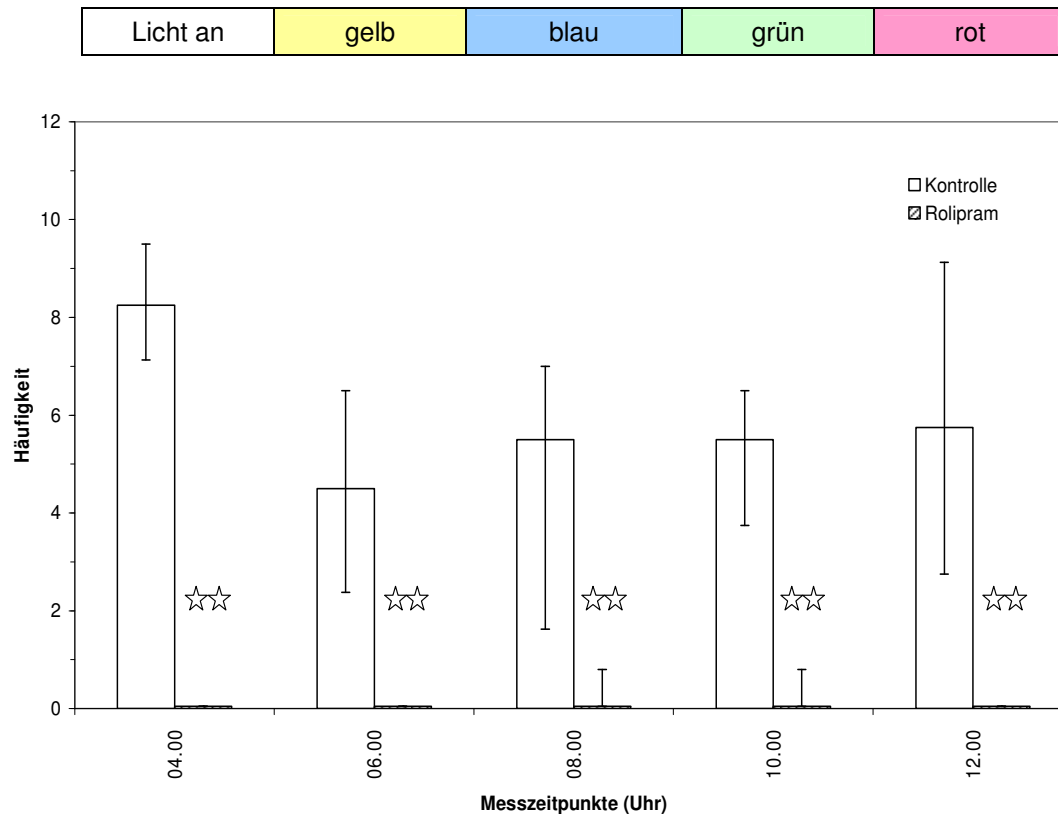


Abb. 7: Beleuchtungsversuch

Sleeping bei Ratten zu verschiedenen Tageszeitpunkten und unterschiedlichen Lichtbedingungen nach einmaliger intraperitonealer (i.p.) Vorbehandlung (15 min) mit Rolipram (2.5 mg/kg) bzw. Vehikel (Kontrolle).

Pro Tageszeitpunkt wurden jeweils 24 Tiere eingesetzt und nach Zufallskriterien den 2 Behandlungsgruppen zugeordnet (n = 12 Tiere Rolipram i.p.; n = 12 Tiere Vehikel i.p.).

Das Vorhandensein von Sleeping pro Zeitraum von 5 min wurde während 1 h (von der 15. - 75. min nach i.p. Behandlung) registriert (Inzidenzrate: maximal 12).

Dargestellt sind die Mediane mit 25/75%-Quartilen.

(Signifikanzniveau: ☆☆ = $p < 0.01$; Kruskal-Wallis-Test)

1.1.10 Yawning

1.1.10.1 Kontrollen

Yawning trat zu allen Zeitpunkten mit einer geringen Inzidenzrate auf. (Tabelle 3a)

1.1.10.2 Rolipram

Zu keinem Zeitpunkt konnte dieser Parameter beobachtet werden. Trotz der niedrigen Kontrollwerte war dadurch unter Rolipram ein statistisch signifikanter Abfall zu beobachten. (Tabelle 3a)

Tabelle 3a: Beleuchtungsversuch

MZ	Beleuchtungsversuch Kontrolle			Beleuchtungsversuch Rolipram			Signifikanz-Niveau
	Quantil 25	Median	Quantil 75	Quantil 25	Median	Quantil 75	
04.00 Uhr	0,0	0,0	1,0	0,0	0,0	0,0	☆
06.00 Uhr	0,5	1,0	2,0	0,0	0,0	0,0	☆☆
08.00 Uhr	0,0	1,0	2,5	0,0	0,0	0,0	☆☆
10.00 Uhr	0,0	1,0	2,0	0,0	0,0	0,0	☆☆
12.00 Uhr	0,0	0,5	2,0	0,0	0,0	0,0	☆☆

MZ = Messzeitpunkt

n.s. = nicht signifikant

Yawning bei Ratten zu verschiedenen Tageszeitpunkten und unterschiedlichen Lichtbedingungen nach einmaliger intraperitonealer (i.p.) Vorbehandlung (15 min) mit Rolipram (2.5 mg/kg) bzw. Vehikel (Kontrolle).

Pro Tageszeitpunkt wurden jeweils 24 Tiere eingesetzt und nach Zufallskriterien den 2 Behandlungsgruppen zugeordnet (n = 12 Tiere Rolipram i.p.; n = 12 Tiere Vehikel i.p.).

Das Vorhandensein von Yawning pro Zeitraum von 5 min wurde während 1 h (von der 15. - 75. min nach i.p. Behandlung) registriert (Inzidenzrate: maximal 12).

Dargestellt sind die Mediane mit 25/75%-Quartilen.

(Signifikanzniveau: ☆☆☆ = $p < 0.01$, ☆☆ = $p < 0.05$; Kruskal-Wallis-Test)

1.2 Klinisch - chemische Parameter

1.2.1 Melatonin

Zu diesem Parameter wurden keine Messwerte erhoben, da zum Zeitpunkt der Versuchsdurchführung kein ausreichend sensitiver Assay zur Verfügung stand.

1.2.2 Corticosteron

1.2.2.1 Kontrollen

Die Messwerte lagen zwischen einem Minimum von 900 pmol/ ml um 04.00 Uhr (Licht an) und einem Maximum von 1200 pmol/ ml um 08.00 Uhr (Blau). (Abbildung 8)

1.2.2.2 Rolipram

Unter Rolipram kam es zu einem gleichförmigen, statistisch signifikanten Anstieg der Corticosteron - Messwerte. Das Minimum wurde um 10.00 Uhr (Grün) mit einem Messwert von 1800 pmol/ ml und das Maximum um 06.00 Uhr (Gelb) mit 1900 pmol/ ml ermittelt. (Abbildung 8)

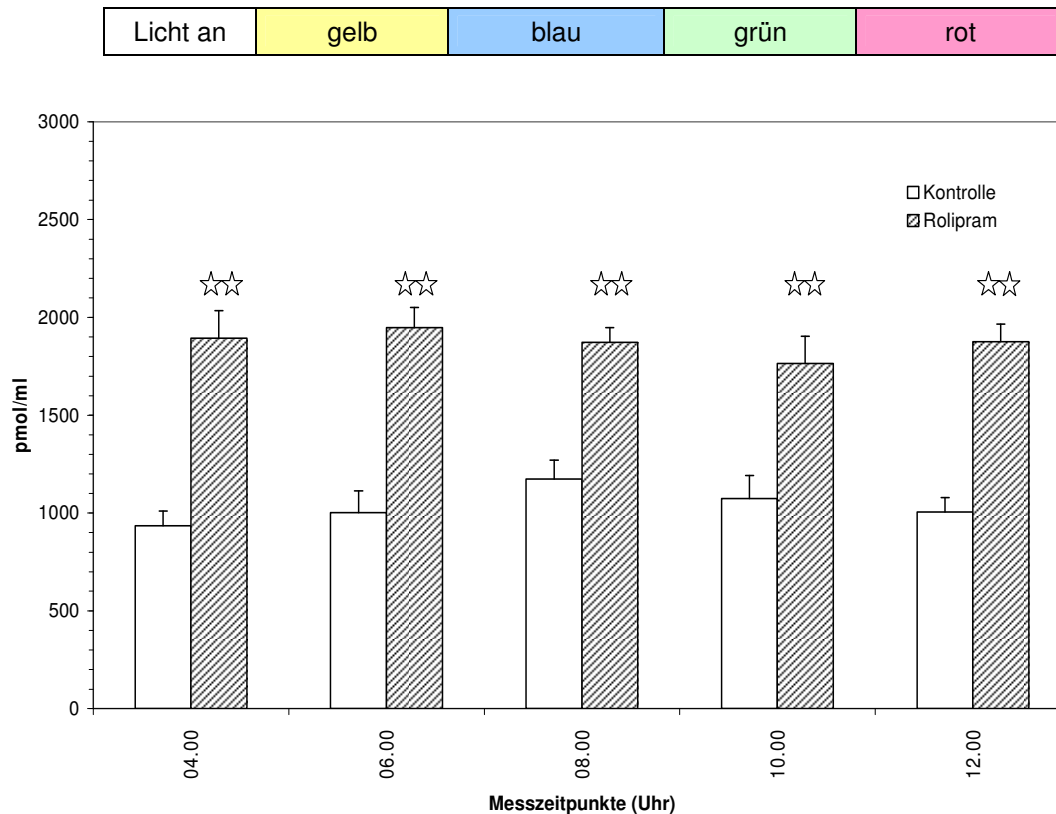


Abb. 8: Beleuchtungsversuch

Serum-Corticosteron bei Ratten zu verschiedenen Tageszeitpunkten und unterschiedlichen Lichtbedingungen 75 min nach einmaliger intraperitonealer (i.p.) Behandlung mit Rolipram (2.5 mg/kg) bzw. Vehikel (Kontrolle).

Pro Tageszeitpunkt wurden jeweils 24 Tiere eingesetzt und nach Zufallskriterien den 2 Behandlungsgruppen zugeordnet (n = 12 Tiere Rolipram i.p.; n = 12 Tiere Vehikel i.p.).

Die Serum-Corticosteron-Konzentration wurde radioimmunologisch bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte mit S.E.M.

(Signifikanzniveau: ☆ ☆ = $p < 0.01$; Welch-Test)

1.2.3 Glukose

1.2.3.1 Kontrollen

Es fanden sich zu allen Zeitpunkten etwa gleich hohe Konzentrationen um 140 mg/ dl. (Abbildung 9)

1.2.3.2 Rolipram

Durch Rolipram kam es zu einem statistisch signifikanten Anstieg der Glukosekonzentrationen, der zu den Zeitpunkten 04.00 Uhr bis 08.00 Uhr am ausgeprägtesten war. Der Maximalwert wurde um 06.00 Uhr mit 170 mg/ dl gemessen, der Minimalwert lag um 12.00 Uhr mit 155 mg/ dl vor. (Abbildung 9)

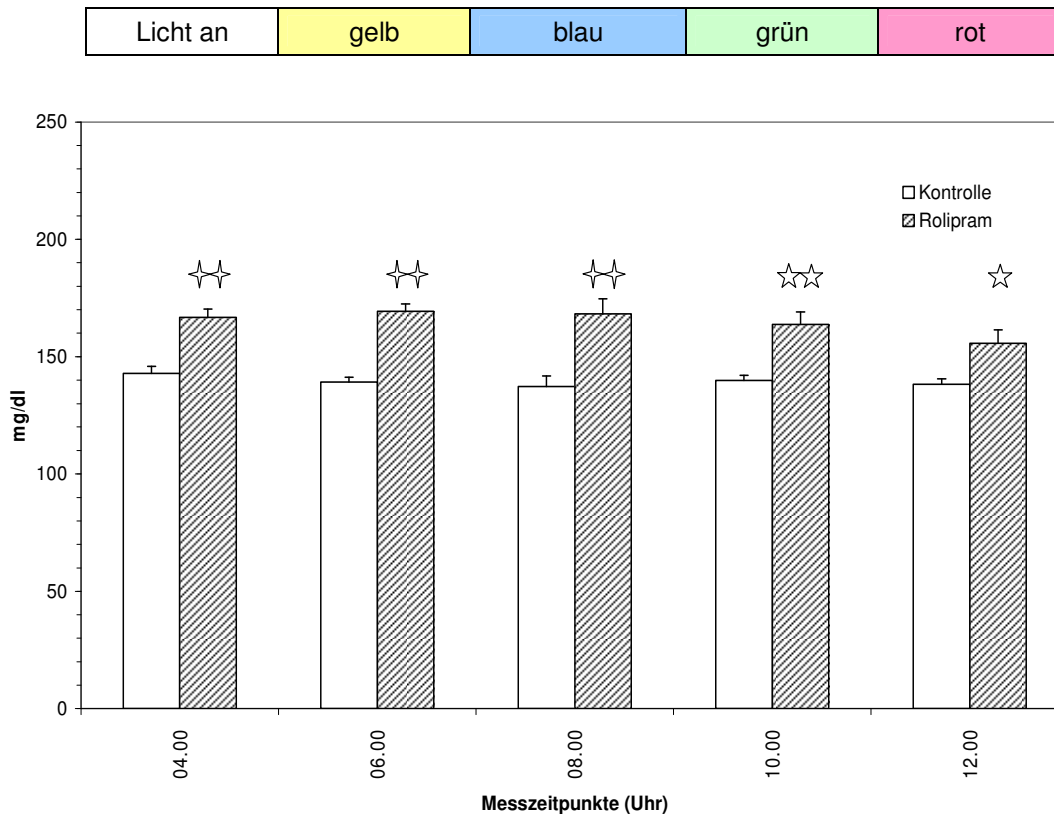


Abb. 9: Beleuchtungsversuch

Serum-Glukose bei Ratten zu verschiedenen Tageszeitpunkten und unterschiedlichen Lichtbedingungen 75 min nach einmaliger intraperitonealer (i.p.) Behandlung mit Rolipram (2.5 mg/kg) bzw. Vehikel (Kontrolle).

Pro Tageszeitpunkt wurden jeweils 24 Tiere eingesetzt und nach Zufallskriterien den 2 Behandlungsgruppen zugeordnet (n = 12 Tiere Rolipram i.p.; n = 12 Tiere Vehikel i.p.).

Die Serum-Glukose-Konzentration wurde enzymatisch (Hexokinase-Verfahren) bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte mit S.E.M..

(Signifikanzniveau: ✦✦ / ☆☆☆ = $p < 0.01$, ✦ / ☆ = $p < 0.05$;
t-Test (✦) bzw. Welch-Test (☆☆))

1.3 Temperatur - Regulation

1.3.1 Ausgangstemperaturen

Die Körpertemperaturen lagen zu allen fünf Zeitpunkten um 37 Grad Celsius.

Bei den für Rolipram vorgesehenen Tieren waren sehr geringe, statistisch nicht signifikante Veränderungen zu eher höheren Werten zu messen. (Abbildung 10)

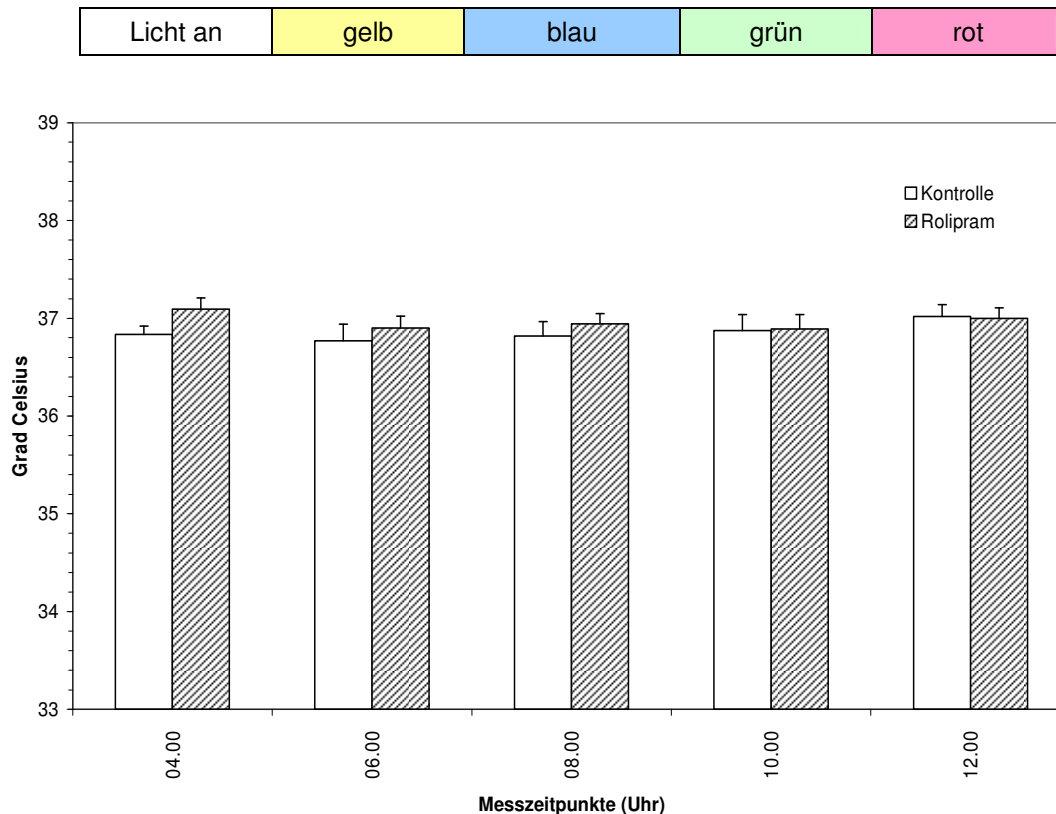


Abb. 10: Beleuchtungsversuch

Körpertemperatur bei Ratten zu verschiedenen Tageszeitpunkten und unterschiedlichen Lichtbedingungen unmittelbar vor einmaliger intraperitonealer (i.p.) Behandlung mit Rolipram (2.5 mg/kg) bzw. Vehikel (Kontrolle).

Pro Tageszeitpunkt wurden jeweils 24 Tiere eingesetzt und nach Zufallskriterien den 2 Behandlungsgruppen zugeordnet (n = 12 Tiere Rolipram i.p.; n = 12 Tiere Vehikel i.p.).

Die Körpertemperatur wurde mittels einer rektal eingeführten Thermosonde gemessen.

Dargestellt sind die Mittelwerte mit S.E.M..

(Signifikanzniveau durchweg $p > 0.05$; t-Test)

1.3.2 Temperaturen nach Verhaltensbeobachtung

Bei den Kontrolltieren waren keine Veränderungen in den Temperaturen zwischen den einzelnen Zeitpunkten zu erkennen. Sie lagen weiterhin um 37 Grad Celsius. Gegenüber den Ausgangstemperaturen waren keine statistisch signifikanten Veränderungen zu sehen.

Ein deutlicher hypothermer Effekt wurde unter Rolipram festgestellt. Es kam zu allen Zeitpunkten zu einem statistisch signifikanten Abfall der Körpertemperaturen auf 34,5 bis 35 Grad Celsius, wobei das Minimum zum Zeitpunkt 06.00 Uhr auftrat. (Abbildung 11).

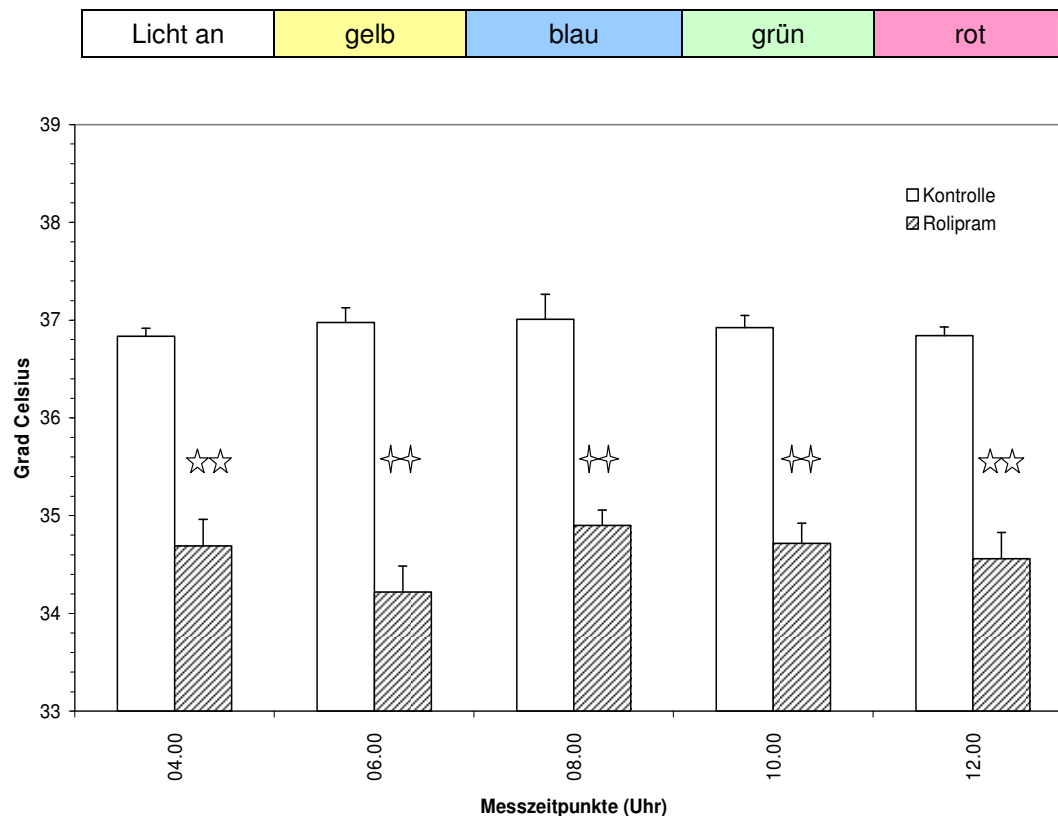


Abb. 11: Beleuchtungsversuch

Körpertemperatur bei Ratten zu verschiedenen Tageszeitpunkten und unterschiedlichen Lichtbedingungen 75 Minuten nach einmaliger intraperitonealer (i.p.) Behandlung mit Rolipram (2.5 mg/kg) bzw. Vehikel (Kontrolle).

Pro Tageszeitpunkt wurden jeweils 24 Tiere eingesetzt und nach Zufallskriterien den 2 Behandlungsgruppen zugeordnet (n = 12 Tiere Rolipram i.p.; n = 12 Tiere Vehikel i.p.).

Die Körpertemperatur wurde mittels einer rektal eingeführten Thermo-sonde gemessen.

Dargestellt sind die Mittelwerte mit S.E.M.

(Signifikanzniveau: ✨ ✨ / ☆ ☆ = $p < 0.01$; t-Test (✨) bzw. Welch-Test (☆))

2 Hauptversuch Teil 1

2.1 Verhalten

2.1.1 Head twitches

2.1.1.1 Kontrollen

Die höchsten Anzahlen fanden sich zu den Zeitpunkten 06.00 Uhr, 08.00 Uhr und 22.00 Uhr mit bis zu fünf Head twitches. Zu den übrigen Zeitpunkten fanden sich zwei bis drei Head twitches. (Abbildung 12)

2.1.1.2 Rolipram

Unter Rolipram waren Head twitches ein sehr häufig auftretender Parameter. Sie waren zu allen Zeitpunkten statistisch signifikant erhöht.

Deutlich erhöhte Werte fanden sich in der Hellphase von 06.00 Uhr bis 16.00 Uhr. Dabei lagen die Maxima zu den Zeitpunkten 06.00 Uhr und 08.00 Uhr bei circa 33 Head twitches / Stunde.

Die Hellphasenminima lagen zu den Zeitpunkten 10.00, 14.00 und 16.00 Uhr mit circa 23 bzw. 20 und 18 Head twitches / Stunde vor.

In der Dunkelphase fand sich ein deutlicher Abfall auf durchschnittlich fünf bis zehn Head twitches / Stunde. Zu Beginn und Ende der Dunkelphase um 18.00 Uhr bzw. 04.00 Uhr fanden sich die niedrigeren Werte mit sieben Head twitches / Stunde, zu den restlichen Zeitpunkten waren sie etwa gleichhoch mit zwölf Head twitches / Stunde. (Abbildung 12)

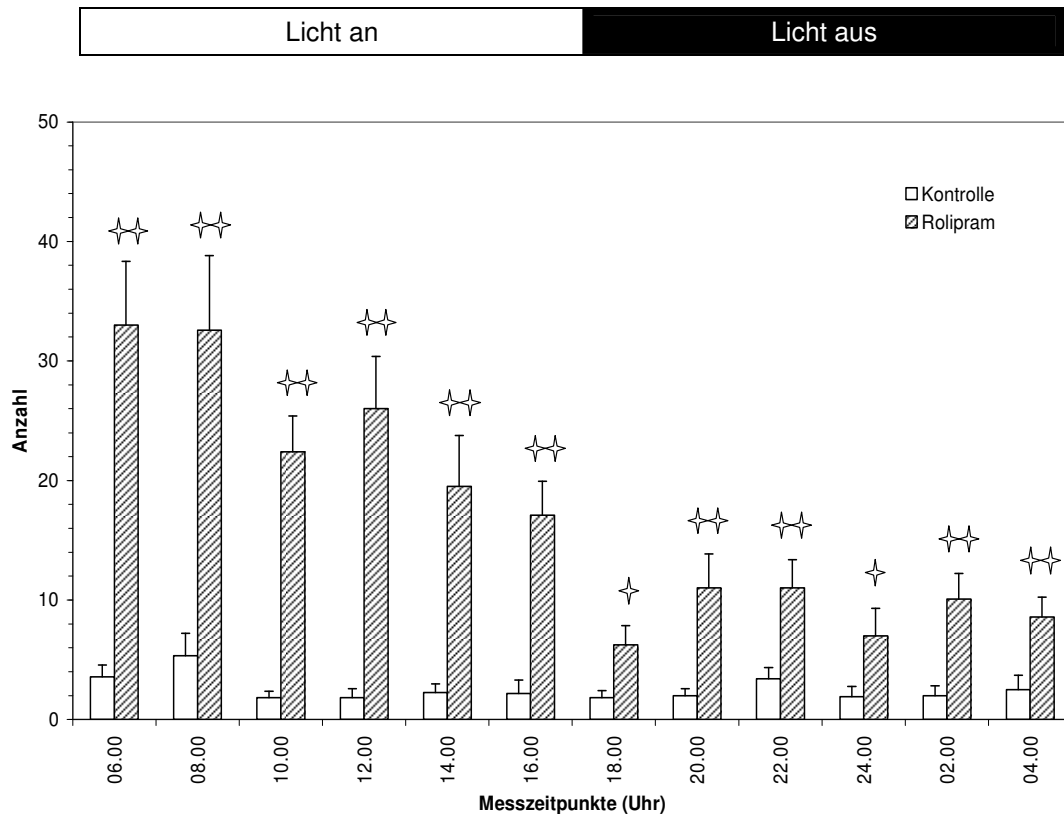


Abb. 12: Hauptversuch Teil 1

Head-Twitches bei Ratten zu verschiedenen Tageszeitpunkten und unterschiedlichen Lichtbedingungen nach einmaliger intraperitonealer (i.p.) Vorbehandlung (15 min) mit Rolipram (2.5 mg/kg) bzw. Vehikel (Kontrolle).

Pro Tageszeitpunkt wurden jeweils 24 Tiere eingesetzt und nach Zufallskriterien den 2 Behandlungsgruppen zugeordnet (n = 12 Tiere Rolipram i.p.; n = 12 Tiere Vehikel i.p.).

Die Anzahl der Head-Twitches wurde während 1 h (von der 15. - 75. Min nach i.p. Behandlung) erfasst.

Dargestellt sind die Mittelwerte mit S.E.M.

(Signifikanzniveau: ✨ ✨ = $p < 0.01$, ✨ = $p < 0.05$, t-Test)

2.1.2 Forepaw shaking

2.1.2.1 Kontrollen

Forepaw shaking trat bei den Kontrolltieren nur vereinzelt auf. (Abbildung 13)

2.1.2.2 Rolipram

Unter Rolipram war die Häufigkeit des Parameters deutlich und immer statistisch signifikant erhöht.

Sie lag in der Hellphase mit einer Inzidenzrate um sieben / Stunde etwa doppelt so hoch wie in der Dunkelphase. Die höchsten Inzidenzen von acht waren zu Beginn und Ende der Hellphase zu beobachten. Das Minimum trat um 08.00 Uhr mit einer Rate von sechs auf.

In der Dunkelphase lagen die Inzidenzen zwischen drei und vier, es fanden sich zwei Maxima zu Beginn und in der Mitte um 18.00 und 24.00 Uhr mit Inzidenzen von fünf und sechs. Minimale Forepaw shaking-Aktivität konnte um 20.00 Uhr beobachtet werden, die 02.00 Uhr- Inzidenz lag mit etwa 3,5 nur geringfügig darüber. (Abbildung 13)

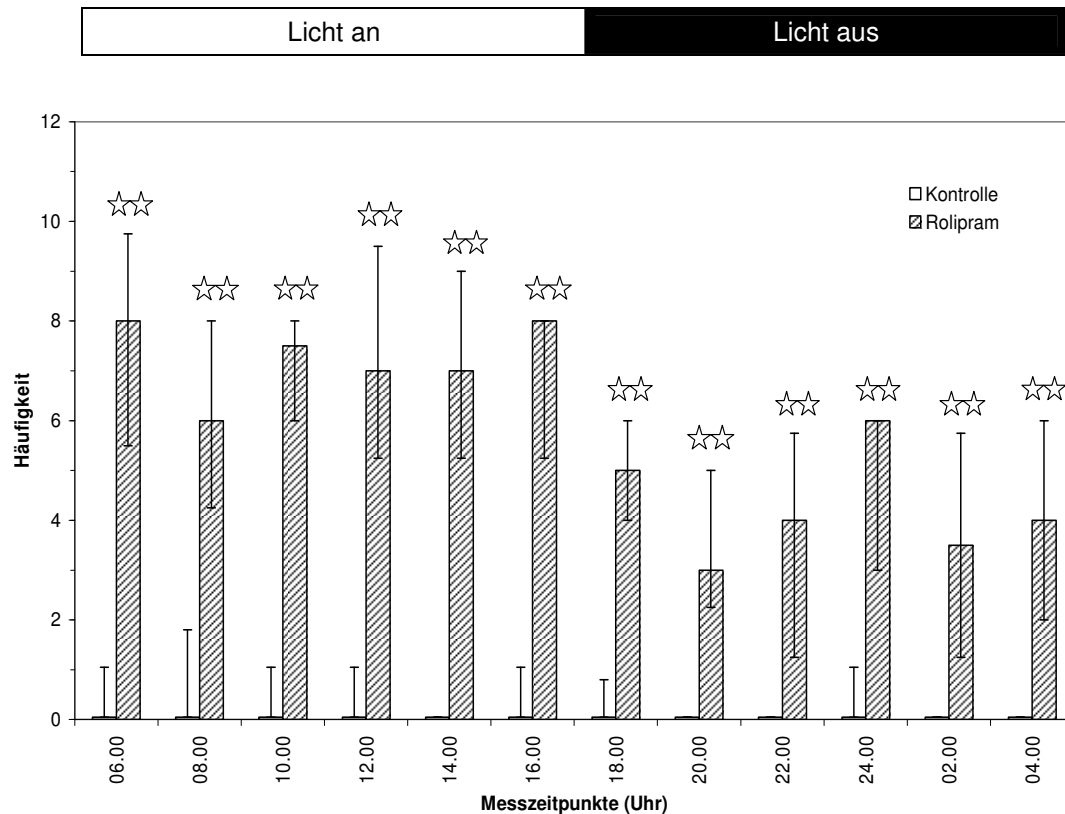


Abb. 13: Hauptversuch Teil 1

Forepaw shaking bei Ratten zu verschiedenen Tageszeitpunkten und unterschiedlichen Lichtbedingungen nach einmaliger intraperitonealer (i.p.) Vorbehandlung (15 min) mit Rolipram (2.5 mg/kg) bzw. Vehikel (Kontrolle).

Pro Tageszeitpunkt wurden jeweils 24 Tiere eingesetzt und nach Zufallskriterien den 2 Behandlungsgruppen zugeordnet (n = 12 Tiere Rolipram i.p.; n = 12 Tiere Vehikel i.p.).

Das Vorhandensein von Forepaw shaking pro Zeitraum von 5 min wurde während 1 h (von der 15. - 75. min nach i.p. Behandlung) registriert (Inzidenzrate: maximal 12).

Dargestellt sind die Mediane mit 25/75%-Quartilen.

(Signifikanzniveau: ☆☆ = $p < 0.01$; Kruskal-Wallis-Test)

2.1.3 Grooming

2.1.3.1 Kontrollen

Groomingsequenzen wurden in geringer Inzidenzrate bei den Kontrolltieren beobachtet. Sie erreichten Raten von maximal zwei.

In der Hellphase war dieses zwischen 08.00 Uhr und 12.00 Uhr zu beobachten. Nur gelegentliche Groomingsequenzen waren zu Beginn um 06.00 Uhr und in der zweiten Hälfte um 14.00 Uhr zu finden.

In der Dunkelphase wurden zu allen Zeitpunkten Groomingsequenzen beobachtet. Die höchsten Inzidenzen von zwei waren fast regelmäßig über die gesamte Phase verteilt, sie wurden um 18.00 Uhr, 22.00 Uhr und 04.00 Uhr beobachtet. (Abbildung 14)

2.1.3.2 Rolipram

Unter Rolipram kam es zu allen Zeitpunkten zu einer statistisch signifikanten Erhöhung der Inzidenzrate auf durchschnittlich fünf.

Die höheren Werte der Hellphase lagen in der zweiten Hälfte - die höchste Inzidenz wurde mit fast sechs um 12.00 Uhr beobachtet. Die geringste Inzidenz von vier lag um 08.00 Uhr vor.

In der Dunkelphase hatten die Inzidenzen der Zeitpunkte geringere Abweichungen untereinander. Die höchsten Inzidenzraten lagen zu Beginn und Ende mit fast sechs vor, ansonsten lagen die Inzidenzraten bei fünf. (Abbildung 14)

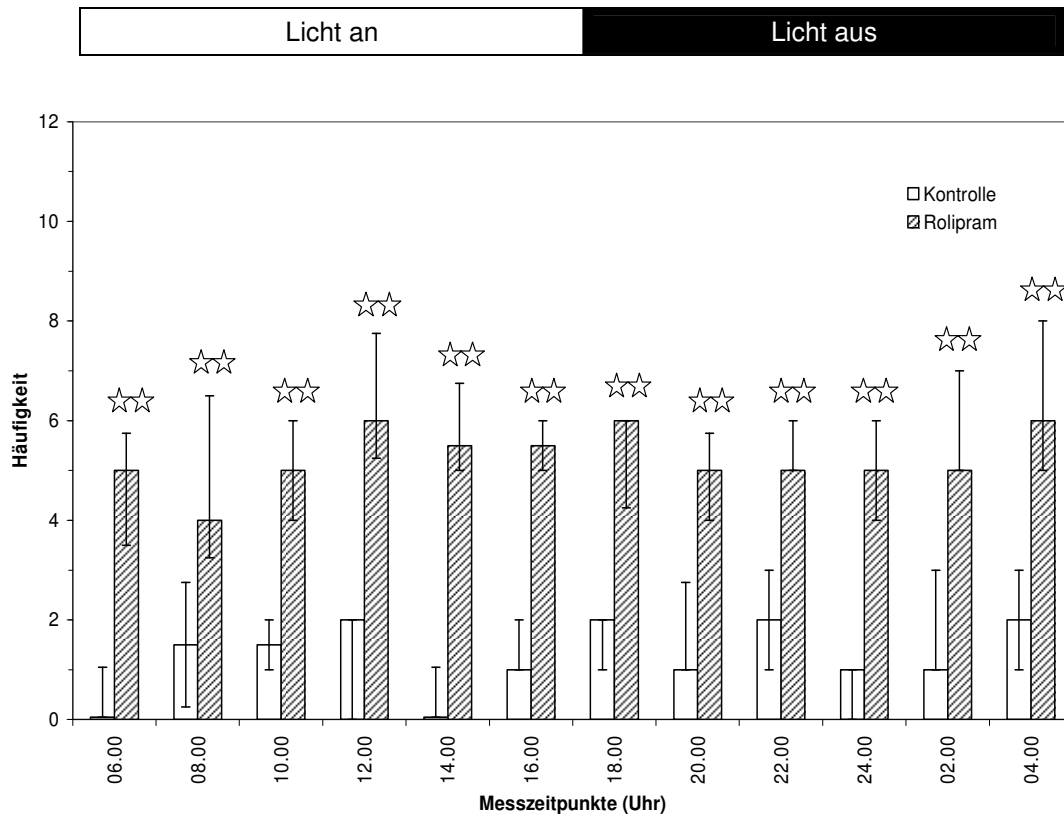


Abb. 14: Hauptversuch Teil 1

Grooming bei Ratten zu verschiedenen Tageszeitpunkten und unterschiedlichen Lichtbedingungen nach einmaliger intraperitonealer (i.p.) Vorbehandlung (15 min) mit Rolipram (2.5 mg/kg) bzw. Vehikel (Kontrolle).

Pro Tageszeitpunkt wurden jeweils 24 Tiere eingesetzt und nach Zufallskriterien den 2 Behandlungsgruppen zugeordnet (n = 12 Tiere Rolipram i.p.; n = 12 Tiere Vehikel i.p.).

Das Vorhandensein von Grooming pro Zeitraum von 5 min wurde während 1 h (von der 15. - 75. min nach i.p. Behandlung) registriert (Inzidenzrate: maximal 12).

Dargestellt sind die Mediane mit 25/75%-Quartilen.

(Signifikanzniveau: ☆☆ = $p < 0.01$; Kruskal-Wallis-Test)

2.1.4 Scratching

2.1.4.1 Kontrollen

Dieser Parameter trat bei den Kontrolltieren mit einer mäßigen Inzidenzrate von zwei bis vier auf.

Die hohen Inzidenzen waren am zweiten bzw. vorletzten Zeitpunkt (08.00 und 14.00 Uhr) der Hellphase zu beobachten. Die niedrigste Inzidenz konnte direkt nach Beginn um 06.00 Uhr ermittelt werden.

In der Dunkelphase waren die höheren Inzidenzen in der ersten Hälfte um 20.00 Uhr und 22.00 Uhr mit fast fünf und zum Ende um 04.00 Uhr mit etwa 4,5 anders als in der Hellphase verteilt. Dazwischen lag um 02.00 Uhr die niedrigste Inzidenzrate bei zwei. (Abbildung 15)

2.1.4.2 Rolipram

Unter Rolipram konnte eine statistisch signifikante Suppression beobachtet werden. Lediglich zu den Zeitpunkten 16.00 Uhr und 22.00 Uhr trat der Parameter mit einer Inzidenz von eins auf. (Abbildung 15)

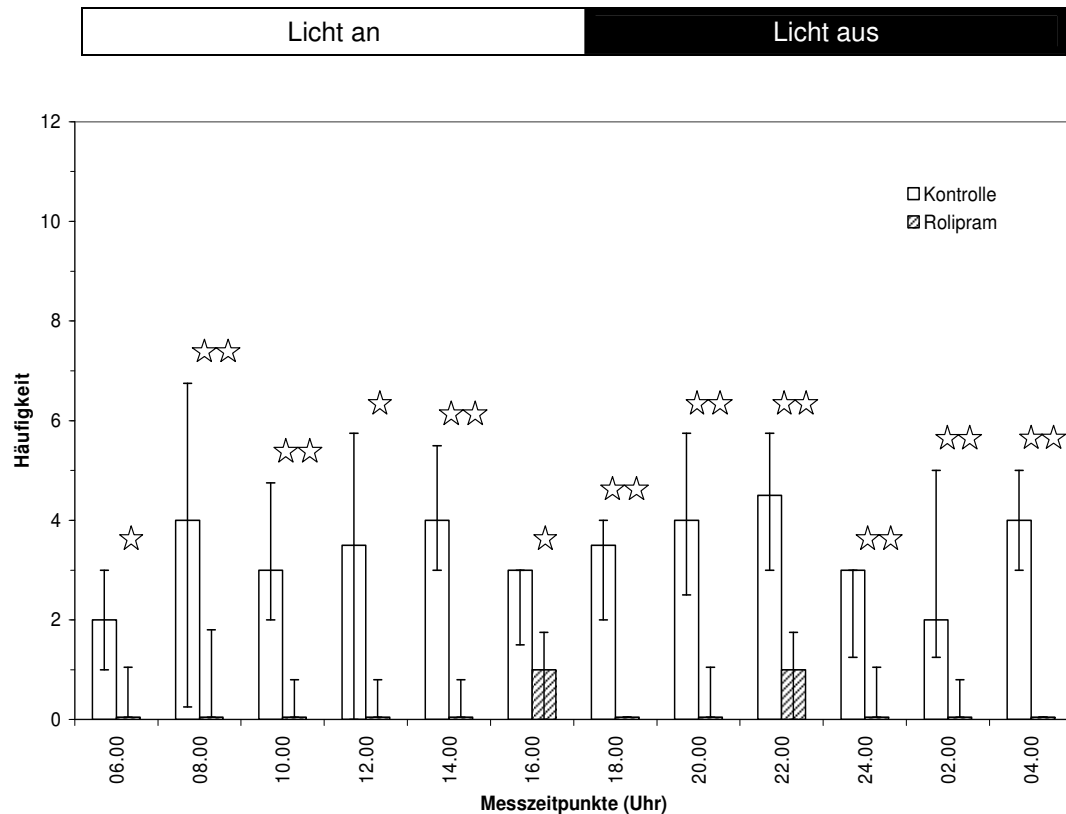


Abb. 15: Hauptversuch Teil 1

Scratching bei Ratten zu verschiedenen Tageszeitpunkten und unterschiedlichen Lichtbedingungen nach einmaliger intraperitonealer (i.p.) Vorbehandlung (15 min) mit Rolipram (2.5 mg/kg) bzw. Vehikel (Kontrolle).

Pro Tageszeitpunkt wurden jeweils 24 Tiere eingesetzt und nach Zufallskriterien den 2 Behandlungsgruppen zugeordnet (n = 12 Tiere Rolipram i.p.; n = 12 Tiere Vehikel i.p.).

Das Vorhandensein von Scratching pro Zeitraum von 5 min wurde während 1 h (von der 15. - 75. min nach i.p. Behandlung) registriert (Inzidenzrate: maximal 12).

Dargestellt sind die Mediane mit 25/75%-Quartilen.

(Signifikanzniveau: ☆☆ = $p < 0.01$, ☆ = $p < 0.05$; Kruskal-Wallis-Test)

2.1.5 Genital grooming

2.1.5.1 Kontrollen

Bei dem selten auftretenden Parameter wurden die größten Inzidenzen von drei nach Beginn der Dunkelphase beobachtet (18.00 Uhr bis 22.00 Uhr). Die übrigen Raten lagen zwischen eins und zwei, ohne dass eine Lichtphase bevorzugt höhere Werte zeigte. (Tabelle 1b)

2.1.5.2 Rolipram

Es fanden sich keine wesentlichen Abweichungen von den Inzidenzraten der Kontrollen und der Verteilung an den einzelnen Zeitpunkten, so dass es keinen statistisch signifikanten Unterschied gab. Nur um 14.00 Uhr in der Hellphase stieg die Rate um eins auf drei an, in der Dunkelphase fielen die Inzidenzraten um 18.00 und 20.00 Uhr von drei auf zwei. (Tabelle 1b)

Tabelle 1b: Hauptversuch Teil 1

MZ	Hauptversuch Teil 1 Kontrolle			Hauptversuch Teil 1 Rolipram			Signifikanz-Niveau
	Quantil 25	Median	Quantil 75	Quantil 25	Median	Quantil 75	
06.00 Uhr	0,00	1,00	2,00	0,00	0,50	1,50	n.s.
08.00 Uhr	1,50	2,00	2,50	0,50	2,00	2,50	n.s.
10.00 Uhr	0,00	1,50	3,00	1,00	1,00	2,00	n.s.
12.00 Uhr	1,00	1,50	2,00	1,00	2,00	2,50	n.s.
14.00 Uhr	1,00	2,00	3,00	1,00	3,00	4,00	n.s.
16.00 Uhr	1,00	1,00	2,00	1,00	1,50	3,00	n.s.
18.00 Uhr	2,00	3,00	3,75	1,25	2,00	4,75	n.s.
20.00 Uhr	2,00	3,00	4,00	0,00	2,00	3,00	n.s.
22.00 Uhr	2,00	3,00	4,75	1,25	3,00	3,75	n.s.
24.00 Uhr	0,00	1,00	2,00	0,25	1,00	2,75	n.s.
02.00 Uhr	1,00	2,00	4,50	1,00	2,00	2,75	n.s.
04.00 Uhr	2,00	2,00	3,00	1,50	2,00	2,50	n.s.

MZ = Messzeitpunkt

n.s. = nicht signifikant

Genital Grooming bei Ratten zu verschiedenen Tageszeitpunkten und unterschiedlichen Lichtbedingungen 75 Minuten nach einmaliger intraperitonealer (i.p.) Behandlung mit Rolipram (2.5 mg/kg) bzw. Vehikel (Kontrolle).

Pro Tageszeitpunkt wurden jeweils 24 Tiere eingesetzt und nach Zufallskriterien den 2 Behandlungsgruppen zugeordnet (n = 12 Tiere Rolipram i.p.; n = 12 Tiere Vehikel i.p.).

Das Vorhandensein von Genital Grooming pro Zeitraum von 5 min wurde während 1 h (von der 15. - 75. min nach i.p. Behandlung) registriert (Inzidenzrate: maximal 12).

Dargestellt sind die Mediane mit 25/75%-Quartilen.

(Signifikanzniveau: durchgehend $p > 0.05$; Kruskal-Wallis-Test)

2.1.6 Pelvic thrust

2.1.6.1 Kontrollen

Auch dieser Parameter trat selten auf. Er war nur unregelmäßig in etwa der Hälfte der untersuchten Zeiträume zu beobachten. (Tabelle 2b)

2.1.6.2 Rolipram

Auch unter Rolipram trat der Parameter nur unregelmäßig auf. Zum Zeitpunkt 12.00 Uhr reichte ein geringer Anstieg auf eine Inzidenz von eins für einen signifikanten Unterschied aus. (Tabelle 2b)

Tabelle 2b: Hauptversuch Teil 1

MZ	Hauptversuch Teil 1 Kontrolle			Hauptversuch Teil 1 Rolipram			Signifikanz-Niveau
	Quantil 25	Median	Quantil 75	Quantil 25	Median	Quantil 75	
06.00 Uhr	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	n.s.
08.00 Uhr	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,00	n.s.
10.00 Uhr	0,00	0,00	1,00	0,50	1,00	1,00	n.s.
12.00 Uhr	0,00	0,00	0,00	0,00	1,00	1,00	☆☆
14.00 Uhr	0,00	0,00	0,75	0,00	0,00	0,75	n.s.
16.00 Uhr	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,00	n.s.
18.00 Uhr	0,00	0,50	1,00	0,00	0,00	1,00	n.s.
20.00 Uhr	0,00	0,00	1,00	0,00	0,00	0,00	n.s.
22.00 Uhr	0,00	0,00	0,75	0,00	0,00	0,00	n.s.
24.00 Uhr	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	n.s.
02.00 Uhr	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	n.s.
04.00 Uhr	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	n.s.

MZ = Messzeitpunkt

n.s. = nicht signifikant

Pelvic Thrust bei Ratten zu verschiedenen Tageszeitpunkten und unterschiedlichen Lichtbedingungen nach einmaliger intraperitonealer (i.p.) Vorbehandlung (15 min) mit Rolipram (2.5 mg/kg) bzw. Vehikel (Kontrolle).

Pro Tageszeitpunkt wurden jeweils 24 Tiere eingesetzt und nach Zufallskriterien den 2 Behandlungsgruppen zugeordnet (n = 12 Tiere Rolipram i.p.; n = 12 Tiere Vehikel i.p.).

Das Vorhandensein von Pelvic Thrust pro Zeitraum von 5 min wurde während 1 h (von der 15. - 75. min nach i.p. Behandlung) registriert (Inzidenzrate: maximal 12).

Dargestellt sind die Mediane mit 25/75%-Quartilen.

(Signifikanzniveau: ☆☆ = $p < 0.01$; Kruskal-Wallis-Test)

2.1.7 Sniffing

2.1.7.1 Kontrollen

Dieses Verhalten zeigte eine unterschiedliche Verteilung beim Vergleich zwischen Hell- und Dunkelphase.

In der Hellphase lagen die Inzidenzraten zwischen zwei und etwa 4,5. Sie waren zu Beginn zum Zeitpunkt 08.00 Uhr am höchsten und zum Ende um 16.00 Uhr am niedrigsten.

In der Dunkelphase zeigte sich eine deutlich erhöhte Inzidenzrate. Sie lag zur Mitte um 22.00 Uhr und zum Ende um 04.00 Uhr am höchsten mit Werten zwischen sieben und acht. Am Beginn der Dunkelphase und zur Mitte um 24.00 Uhr fanden sich die geringsten Inzidenzraten zwischen drei und vier, so dass sich in der Übersicht ein ähnliche Verteilung der Inzidenzen in erster und zweiter Hälfte der Dunkelphase ergab. (Abbildung 16)

2.1.7.2 Rolipram

Durch eine deutliche Suppression dieses Verhaltensparameters unter Rolipram ergab sich zu fast allen Zeitpunkten ein statistisch signifikanter Unterschied.

In der Hellphase lagen die Inzidenzraten zwischen Null (14.00 Uhr) und 1,5 (06.00 Uhr). Zu den Zeitpunkten 10.00 und 12.00 Uhr konnten keine statistisch signifikanten Differenzen mehr errechnet werden.

Bis auf den Zeitpunkt 18.00 Uhr zu Beginn der Dunkelphase mit einer Inzidenzrate von zwei fanden sich zu den übrigen Zeitpunkten gleiche Raten von eins. Dies entsprach dem Suppressionsgrad in der Hellphase. Bei den hohen Inzidenzen der Kontrollen waren damit statistisch signifikante Unterschiede verbunden. (Abbildung 16)

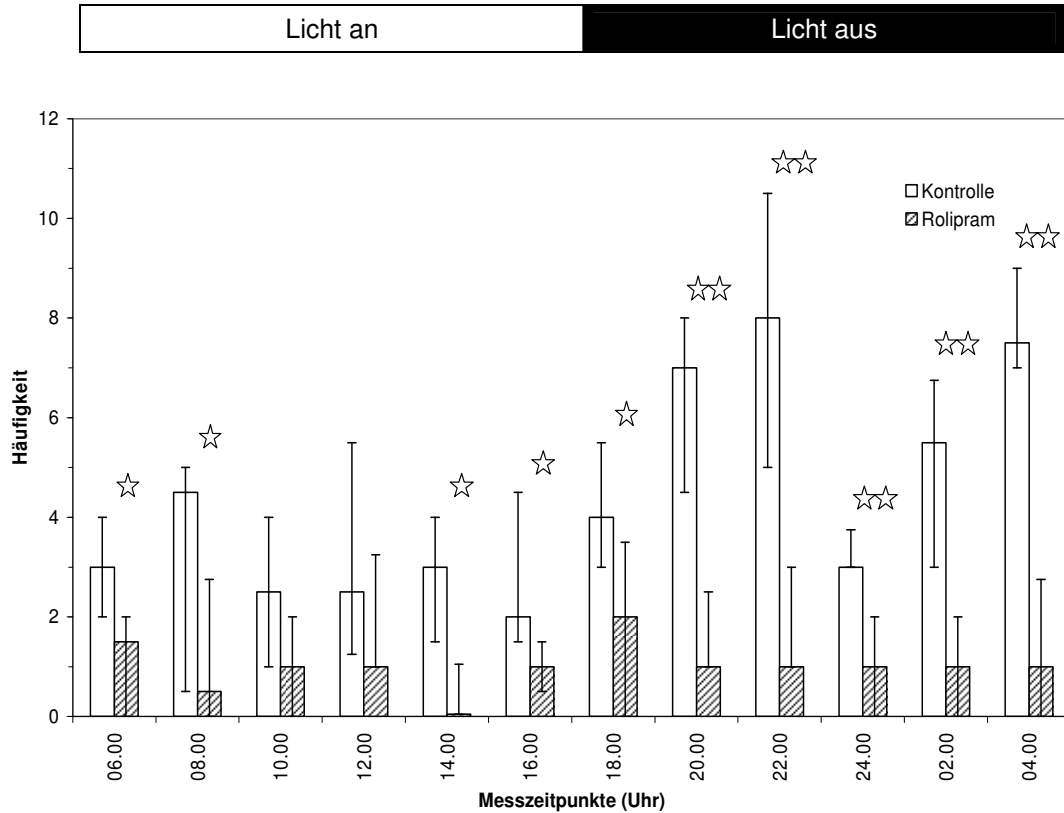


Abb. 16: Hauptversuch Teil 1

Sniffing bei Ratten zu verschiedenen Tageszeitpunkten und unterschiedlichen Lichtbedingungen nach einmaliger intraperitonealer (i.p.) Vorbehandlung (15 min) mit Rolipram (2.5 mg/kg) bzw. Vehikel (Kontrolle).

Pro Tageszeitpunkt wurden jeweils 24 Tiere eingesetzt und nach Zufallskriterien den 2 Behandlungsgruppen zugeordnet (n = 12 Tiere Rolipram i.p.; n = 12 Tiere Vehikel i.p.).

Das Vorhandensein von Sniffing pro Zeitraum von 5 min wurde während 1 h (von der 15. - 75. min nach i.p. Behandlung) registriert (Inzidenzrate: maximal 12).

Dargestellt sind die Mediane mit 25/75%-Quartilen.

(Signifikanzniveau: ☆☆ = $p < 0.01$, ☆ = $p < 0.05$; Kruskal-Wallis-Test)

2.1.8 Digging

2.1.8.1 Kontrollen

Der Parameter konnte mit einer mittleren Inzidenzrate von 1,5 bis sechs beobachtet werden. In der Hellphase waren die niedrigeren Inzidenzen zu beobachten. Sie lagen in der ersten Hälfte bei drei und waren zum Ende der Hellphase um 16.00 Uhr mit 1,5 auf die Hälfte verringert. Die höchste Inzidenzrate von etwa sechs konnte zum Ende der Dunkelphase um 04.00 Uhr beobachtet werden. Demgegenüber zeigte sich zu Beginn um 18.00 Uhr die niedrige Rate von zwei, eine weitere niedrige Inzidenzrate von drei konnte zur Mitte der Dunkelphase um 22.00 Uhr festgestellt werden. Zu den restlichen Zeitpunkten lagen die Inzidenzraten bei vier. (Abbildung 17)

2.1.8.2 Rolipram

Auch bei Digging war eine fast vollständige Suppression durch Rolipram zu beobachten, lediglich um 16.00 Uhr trat das Verhalten mit einer Inzidenz von eins auf. Nur zu diesem Zeitpunkt und um 14.00 Uhr mit einer größeren Streubreite bei niedrigem Medianwert zeigte sich bei der statistischen Bearbeitung keine Signifikanz mehr. (Abbildung 17)

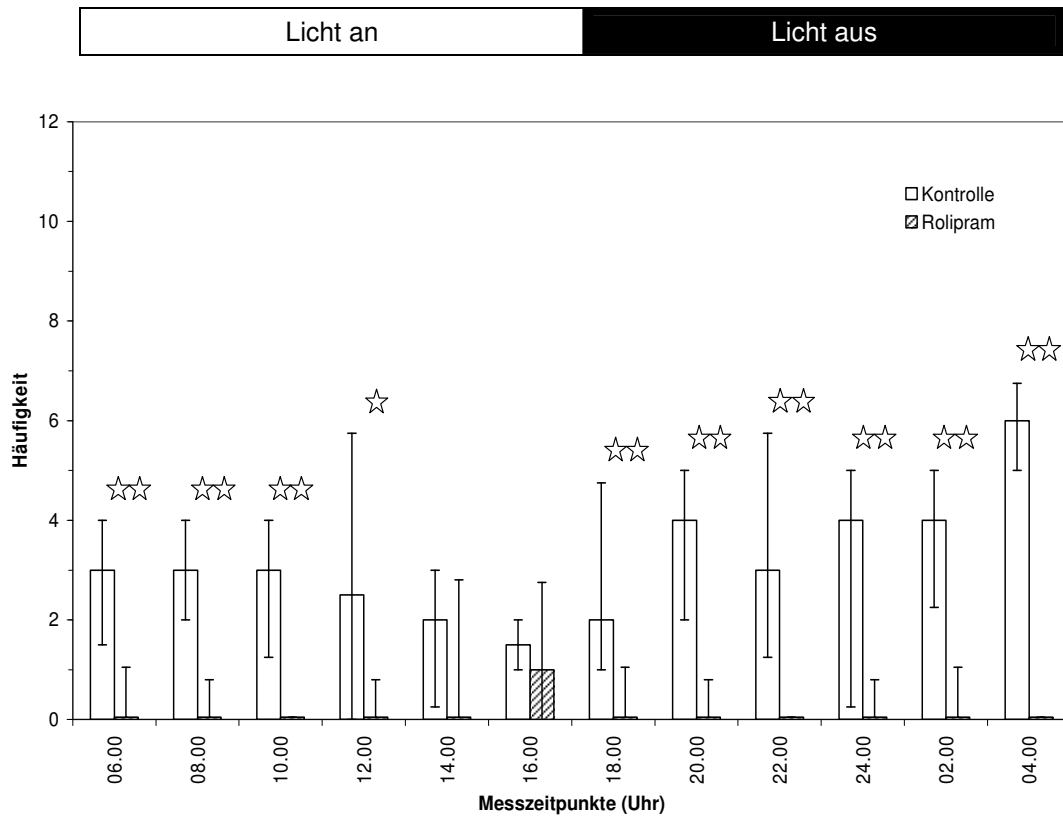


Abb. 17: Hauptversuch Teil 1

Digging bei Ratten zu verschiedenen Tageszeitpunkten und unterschiedlichen Lichtbedingungen nach einmaliger intraperitonealer (i.p.) Vorbehandlung (15 min) mit Rolipram (2.5 mg/kg) bzw. Vehikel (Kontrolle).

Pro Tageszeitpunkt wurden jeweils 24 Tiere eingesetzt und nach Zufallskriterien den 2 Behandlungsgruppen zugeordnet (n = 12 Tiere Rolipram i.p.; n = 12 Tiere Vehikel i.p.).

Das Vorhandensein von Digging pro Zeitraum von 5 min wurde während 1 h (von der 15. - 75. min nach i.p. Behandlung) registriert (Inzidenzrate: maximal 12).

Dargestellt sind die Mediane mit 25/75%-Quartilen.

(Signifikanzniveau: ☆☆ = $p < 0.01$, ☆ = $p < 0.05$; Kruskal-Wallis-Test)

2.1.9 Sleeping

2.1.9.1 Kontrollen

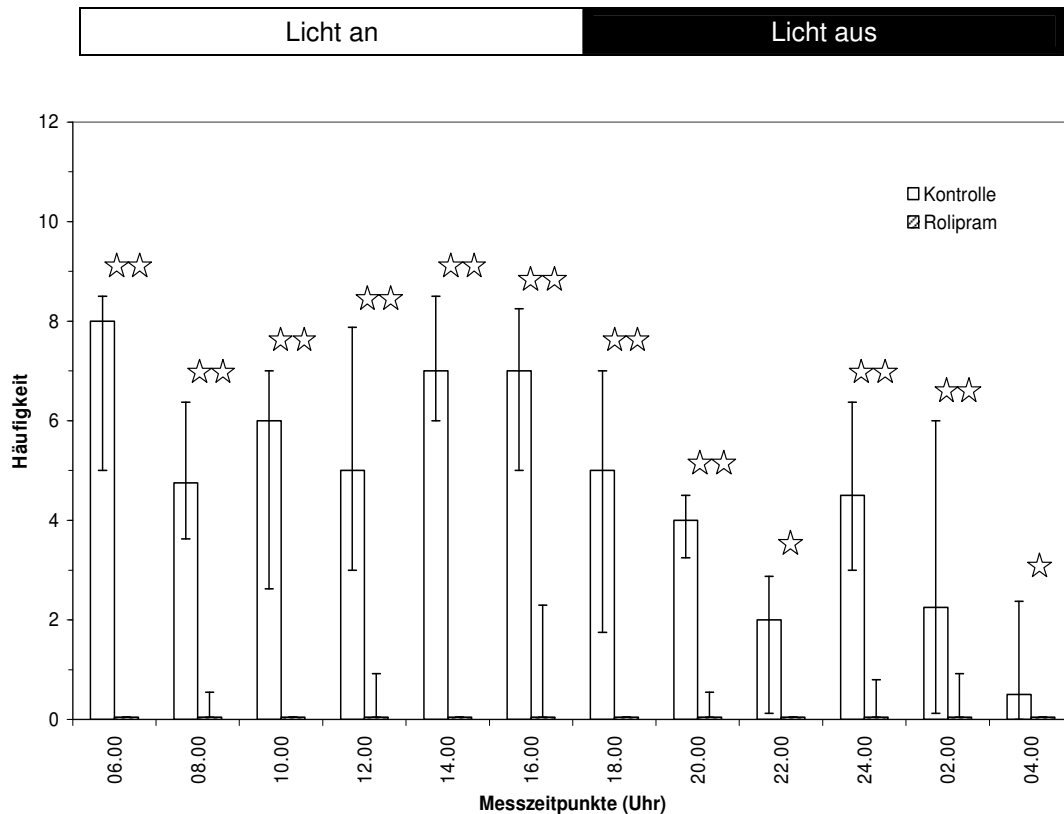
Die Verteilung der Inzidenzen war innerhalb der Beleuchtungsphasen etwa umgekehrt zu der bei Sniffing oder SCR. Die höheren Inzidenzraten fanden sich in der Hellphase, die niedrigeren in der Dunkelphase.

Mit Raten von 7,5 zu Beginn der Hellphase um 06.00 Uhr und zum Ende um 14.00 und 16.00 Uhr kann Sleeping zu den häufig auftretenden Parametern gezählt werden. Dazwischen waren Raten von etwa fünf mit einem Minimum von 4,5 um 08.00 Uhr zu beobachten.

In der Dunkelphase lagen die Inzidenzraten nur noch bei maximal fünf zu Beginn um 18.00 Uhr und in der Mitte um 24.00 Uhr. An den jeweils nachfolgenden zwei Zeitpunkten lagen die Inzidenzraten niedriger mit minimalen Werten von zwei um 22.00 Uhr und eins um 04.00 Uhr. (Abbildung 18)

2.1.9.2 Rolipram

Unter Rolipram wurde eine weitgehende Suppression dieses Verhaltens beobachtet, es trat nur noch bei einzelnen Tieren auf. Zu allen Zeitpunkten waren daher statistisch signifikante Unterschiede zu sehen. (Abbildung 18)

**Abb. 18: Hauptversuch Teil 1**

Sleeping bei Ratten zu verschiedenen Tageszeitpunkten und unterschiedlichen Lichtbedingungen nach einmaliger intraperitonealer (i.p.) Vorbehandlung (15 min) mit Rolipram (2.5 mg/kg) bzw. Vehikel (Kontrolle).

Pro Tageszeitpunkt wurden jeweils 24 Tiere eingesetzt und nach Zufallskriterien den 2 Behandlungsgruppen zugeordnet (n = 12 Tiere Rolipram i.p.; n = 12 Tiere Vehikel i.p.).

Das Vorhandensein von Sleeping pro Zeitraum von 5 min wurde während 1 h (von der 15. - 75. min nach i.p. Behandlung) registriert (Inzidenzrate: maximal 12).

Dargestellt sind die Mediane mit 25/75%-Quartilen.

(Signifikanzniveau: ☆☆ = $p < 0.01$, ☆ = $p < 0.05$; Kruskal-Wallis-Test)

2.1.10 Yawning

2.1.10.1 Kontrollen

Dieser Parameter ist den selten auftretenden zuzurechnen. Die Inzidenzraten lagen zwischen Null und 2,5, er trat aber zu allen Zeitpunkten auf. Die höheren Inzidenzraten wurden in der zweiten Hälfte der Hellphase und während der gesamten Dunkelphase beobachtet. (Tabelle 3b)

2.1.10.2 Rolipram

Unter Rolipram trat der Parameter nur noch unregelmäßig an den zwei Zeitpunkten 08.00 und 20.00 Uhr mit einer Inzidenzrate von höchstens eins auf. Dadurch ergaben sich auch zu fast allen Zeitpunkten statistisch signifikante Unterschiede. Um 06.00 und 08.00 Uhr waren die Unterschiede für einen statistischen Effekt zu gering. (Tabelle 3b)

Tabelle 3b: Hauptversuch Teil 1

MZ	Hauptversuch Teil 1 Kontrolle			Hauptversuch Teil 1 Rolipram			Signifikanz-Niveau
	Quantil 25	Median	Quantil 75	Quantil 25	Median	Quantil 75	
06.00 Uhr	0,00	0,00	1,00	0,00	0,000	0,00	n.s.
08.00 Uhr	0,00	1,00	2,00	0,00	0,00	0,50	n.s.
10.00 Uhr	0,00	1,00	1,50	0,00	0,00	0,00	☆☆
12.00 Uhr	0,00	0,50	1,00	0,00	0,00	0,00	☆
14.00 Uhr	1,00	1,50	3,00	0,00	0,00	0,00	☆☆
16.00 Uhr	0,00	1,00	2,00	0,00	0,00	0,00	☆☆
18.00 Uhr	0,25	1,50	2,00	0,00	0,00	0,00	☆☆
20.00 Uhr	1,00	2,50	3,00	0,00	0,00	1,00	☆☆
22.00 Uhr	1,00	1,50	3,00	0,00	0,00	0,00	☆☆
24.00 Uhr	0,00	1,00	2,00	0,00	0,00	0,00	☆
02.00 Uhr	1,00	1,00	2,00	0,00	0,00	0,00	☆☆
04.00 Uhr	1,00	1,50	2,00	0,00	0,00	0,00	☆☆

MZ = Messzeitpunkt

n.s. = nicht signifikant

Yawning bei Ratten zu verschiedenen Tageszeitpunkten und unterschiedlichen Lichtbedingungen nach einmaliger intraperitonealer (i.p.) Vorbehandlung (15 min) mit Rolipram (2.5 mg/kg) bzw. Vehikel (Kontrolle).

Pro Tageszeitpunkt wurden jeweils 24 Tiere eingesetzt und nach Zufallskriterien den 2 Behandlungsgruppen zugeordnet (n = 12 Tiere Rolipram i.p.; n = 12 Tiere Vehikel i.p.).

Das Vorhandensein von Yawning pro Zeitraum von 5 min wurde während 1 h (von der 15. - 75. min nach i.p. Behandlung) registriert (Inzidenzrate: maximal 12).

Dargestellt sind die Mediane mit 25/75%-Quartilen.

(Signifikanzniveau: ☆☆ = $p < 0.01$, ☆ = $p < 0.05$; Kruskal-Wallis-Test)

2.2 Klinisch - chemische Parameter

2.2.1 Melatonin

Zu diesem Parameter wurden keine Messwerte erhoben, da zum Zeitpunkt der Versuchsdurchführung kein ausreichend sensitiver Assay zur Verfügung stand.

2.2.2 Corticosteron

2.2.2.1 Kontrollen

Die Messwerte lagen zwischen einem Minimum von 1000 pmol/ ml um 20.00 Uhr und einem Maximum von 1300 pmol/ ml um 14.00 und 18.00 Uhr.

In der ersten Hälfte der Hellphase lagen die Messwerte etwa gleich um 1100 pmol/ ml, bis zum Ende waren sie höher mit etwa 1300 pmol/ ml und blieben auch zum ersten Zeitpunkt nach Beginn der Dunkelphase auf diesem Niveau.

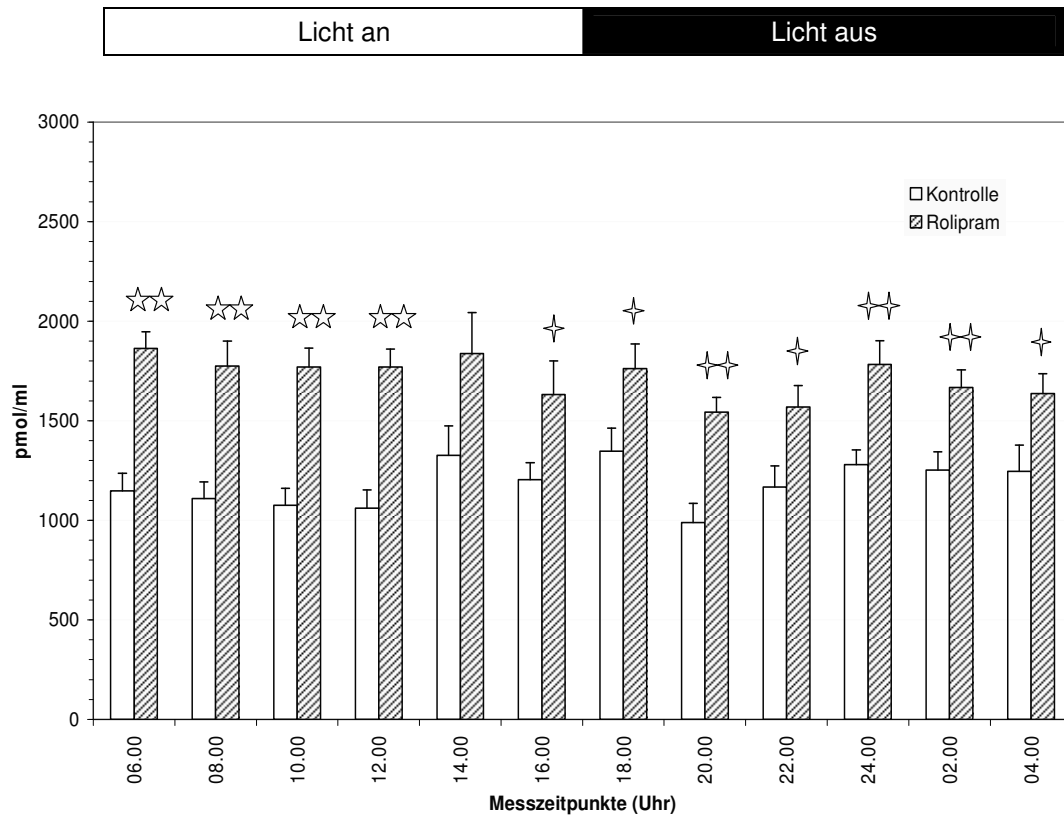
Nach diesem Zeitpunkt (18.00 Uhr) wurde der niedrigste Wert um 20.00 Uhr mit etwa 1000 pmol/ ml gemessen, ab 22.00 Uhr lagen dann die Messwerte bei etwa 1200 pmol/ ml. (Abbildung 19)

2.2.2.2 Rolipram

Unter Rolipram kam es zu einem Anstieg der Corticosteron - Messwerte. Sie lagen zwischen etwa 1900 pmol/ ml um 06.00 und 14.00 Uhr und 1500 pmol/ ml um 20.00 Uhr. Nur zu den Zeitpunkten 14.00 und 04.00 Uhr reichte es bei hohem Kontrollwert bzw. bei geringerer Steigerung unter Rolipram zu einem statistischen signifikanten Unterschied nicht mehr aus.

In der Hellphase fanden sich durchgehend ähnliche Werte von etwa 1800 pmol/ ml bis auf den letzten Zeitpunkt um 16.00 Uhr, der mit 1600 pmol/ ml am niedrigsten lag.

Die Dunkelphase zeigte Maxima zu Beginn um 18.00 Uhr und in der Mitte um 24.00 Uhr mit etwa 1800 pmol/ ml. Dazwischen lagen Zeitpunkte mit den niedrigsten Messwerten von etwa 1500 pmol/ ml. (Abbildung 19)

**Abb. 19: Hauptversuch Teil 1**

Serum-Corticosteron bei Ratten zu verschiedenen Tageszeitpunkten und unterschiedlichen Lichtbedingungen 75 min nach einmaliger intraperitonealer (i.p.) Behandlung mit Rolipram (2.5 mg/kg) bzw. Vehikel (Kontrolle).

Pro Tageszeitpunkt wurden jeweils 24 Tiere eingesetzt und nach Zufallskriterien den 2 Behandlungsgruppen zugeordnet (n = 12 Tiere Rolipram i.p.; n = 12 Tiere Vehikel i.p.).

Die Serum-Corticosteron-Konzentration wurde radioimmunologisch bestimmt.

Dargestellt sind die Mittelwerte mit S.E.M.

(Signifikanzniveau: ☆ ☆ / ☆ ☆ = $p < 0.01$, ☆ / ☆ = $p < 0.05$;

t-Test (☆) bzw. Welch-Test (☆☆))

2.2.3 Glukose

2.2.3.1 Kontrollen

Es wurden Konzentrationen in einem Bereich von 130 bis 150 mg/ dl ermittelt. Eine nach den Beleuchtungsphasen deutlich zu trennende Verteilung der Extremwerte konnte hier nicht vorgenommen werden. Zum Lichtwechsel um 04.00 und 06.00 Uhr sowie in der zweiten Hälfte der Hellphase um 14.00 Uhr waren die Messwerte am höchsten. Minima wurden in der ersten Hälfte der Hellphase um 08.00 Uhr und der ersten Hälfte der Dunkelphase um 22.00 Uhr gemessen. (Abbildung 20)

2.2.3.2 Rolipram

Durch Rolipram kam es zu einem Anstieg der Glukosekonzentrationen, deren stärkste Zunahmen in der Mitte der Hellphase, zu Beginn und Mitte der Dunkelphase und zum Lichtwechsel zur Hellphase gemessen werden konnten. Die Messwerte lagen dabei zwischen 170 und 180 mg/ dl. Bis auf den Zeitpunkt 16.00 Uhr waren die Unterschiede zu allen übrigen Zeitpunkten statistisch signifikant.

Da in der Hellphase die Messwerte durchgehend höher lagen als in der Dunkelphase, fanden sich als relativ niedriger Messwert 165 mg/ dl zu Beginn der Hellphase um 06.00 und 08.00 Uhr. In der Dunkelphase lagen die Messwerte zwischen den hohen Werten um 20.00 und 04.00 Uhr ebenfalls in dieser Höhe. Der niedrigste Wert um 20.00 Uhr wurde mit etwa 150 mg/ dl gemessen. (Abbildung 20)

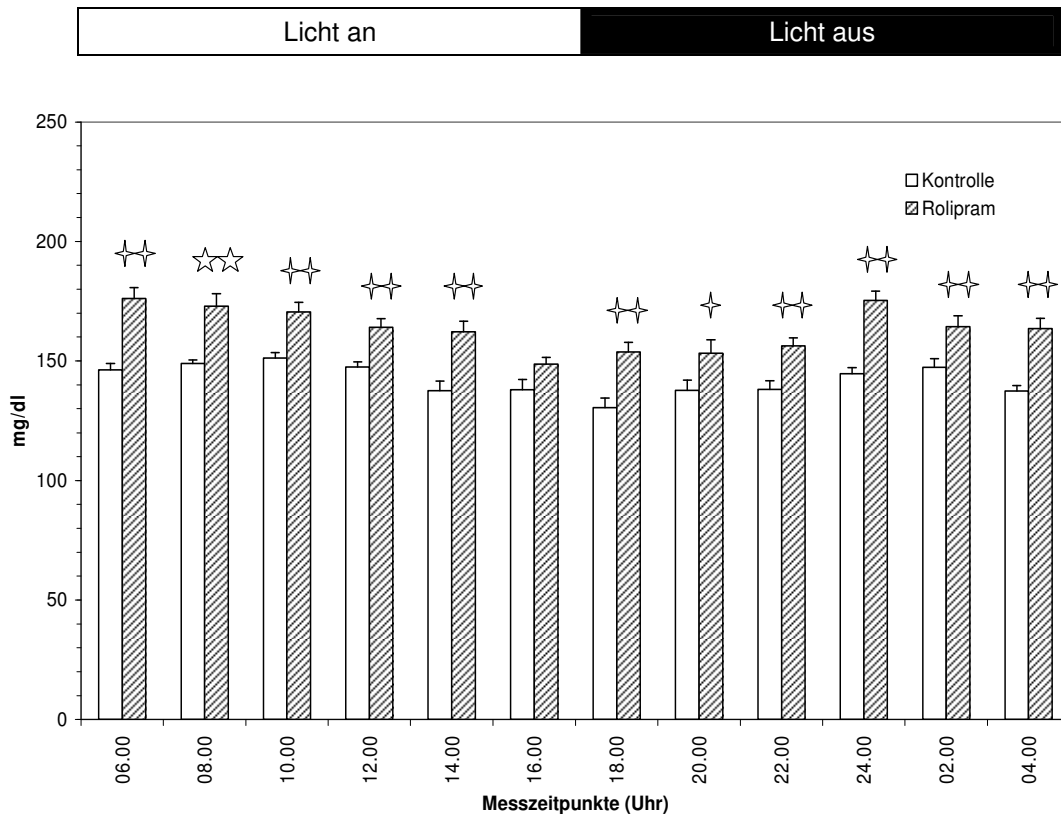


Abb. 20: Hauptversuch Teil 1

Serum-Glukose bei Ratten zu verschiedenen Tageszeitpunkten und unterschiedlichen Lichtbedingungen nach einmaliger intraperitonealer (i.p.) Vorbehandlung (15 min) mit Rolipram (2.5 mg/kg) bzw. Vehikel (Kontrolle).

Pro Tageszeitpunkt wurden jeweils 24 Tiere eingesetzt und nach Zufallskriterien den 2 Behandlungsgruppen zugeordnet (n = 12 Tiere Rolipram i.p.; n = 12 Tiere Vehikel i.p.).

Die Serum-Glukose-Konzentration wurde enzymatisch (Hexokinase-Verfahren) bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte mit S.E.M..

(Signifikanzniveau: ✦ ✦ / ☆ ☆ = $p < 0.01$, ✦ / ☆ = $p < 0.05$;
t-Test (✦) bzw. Welch-Test (☆))

2.3 Temperatur - Regulation

2.3.1 Ausgangstemperaturen

Die Körpertemperaturen lagen bei Werten zwischen 36,5 und 37,5 Grad Celsius.

Die höheren Werte wurden in der ersten Hälfte der Hellphase und der zweiten Hälfte der Dunkelphase gemessen.

Nach dem Minimum zum Zeitpunkt 12.00 Uhr stiegen die Messwerte an den nachfolgenden Zeitpunkten bis zum Zeitpunkt 24.00 Uhr an.

Statistisch signifikante Unterschiede zwischen den als Kontrollen und den für Rolipram vorgesehenen Tieren konnten nicht ermittelt werden. (Abbildung 21)

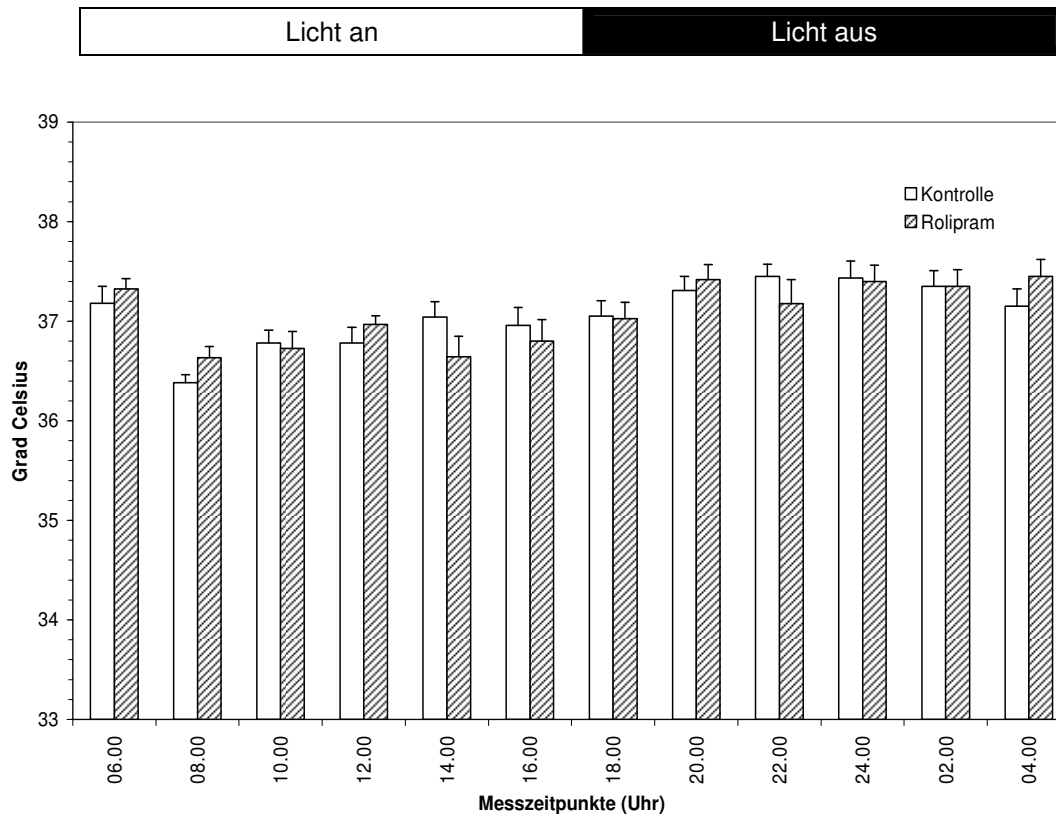


Abb. 21: Hauptversuch Teil 1

Körpertemperatur bei Ratten zu verschiedenen Tageszeitpunkten und unterschiedlichen Lichtbedingungen unmittelbar vor einmaliger intraperitonealer (i.p.) Behandlung mit Rolipram (2.5 mg/kg) bzw. Vehikel (Kontrolle).

Pro Tageszeitpunkt wurden jeweils 24 Tiere eingesetzt und nach Zufallskriterien den 2 Behandlungsgruppen zugeordnet (n = 12 Tiere Rolipram i.p.; n = 12 Tiere Vehikel i.p.).

Die Körpertemperatur wurde mittels einer rektal eingeführten Thermo-sonde gemessen.

Dargestellt sind die Mittelwerte mit S.E.M.

(Signifikanzniveau durchweg $p > 0.05$; t-Test)

2.3.2 Temperaturen nach Verhaltensbeobachtung

Die Kontrolltiere wiesen in der ersten Hälfte der Hellphase etwa gleiche Messwerte um 36,5 Grad Celsius mit einem Maximum um 12.00 Uhr auf.

Nach dem Minimum um 14.00 Uhr stiegen zu den nachfolgenden Zeitpunkten wie bei den Ausgangstemperaturen die Messwerte bis 20.00/ 22.00 Uhr auf etwas über 37 Grad an, um dann an den restlichen Zeitpunkten der Dunkelphase auf einem ähnlich hohen Niveau zu verbleiben. Ein größerer Unterschied zu den Messungen vor Beginn der Verhaltensbeobachtung bestand nicht.

Nach Rolipram konnte ein deutlicher hypothermer Effekt festgestellt werden.

Zu allen Zeitpunkten kam es zu einem statistisch signifikanten Abfall der Körpertemperaturen auf 34,5 bis 35,3 Grad Celsius.

Zwischen dem Minimum zu Beginn der Hellphase um 06.00 Uhr und dem Maximalwert in der ersten Hälfte der Dunkelphase um 20.00 Uhr lagen jeweils relativ gleichförmig ansteigende bzw. abfallende Messwerte vor. (Abbildung 22)

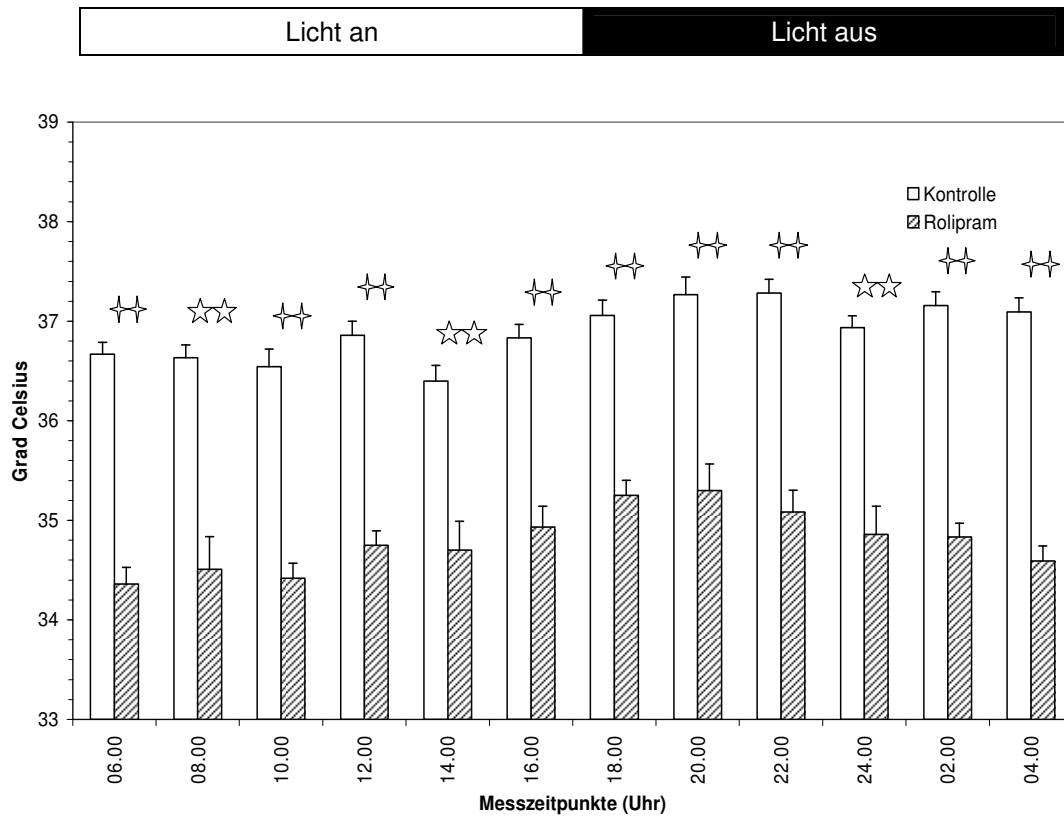


Abb. 22: Hauptversuch Teil 1

Körpertemperatur bei Ratten zu verschiedenen Tageszeitpunkten und unterschiedlichen Lichtbedingungen 75 Minuten nach einmaliger intraperitonealer (i.p.) Behandlung mit Rolipram (2.5 mg/kg) bzw. Vehikel (Kontrolle).

Pro Tageszeitpunkt wurden jeweils 24 Tiere eingesetzt und nach Zufallskriterien den 2 Behandlungsgruppen zugeordnet (n = 12 Tiere Rolipram i.p.; n = 12 Tiere Vehikel i.p.).

Die Körpertemperatur wurde mittels einer rektal eingeführten Thermosonde gemessen.

Dargestellt sind die Mittelwerte mit S.E.M.

(Signifikanzniveau: ✨ ✨ / ☆ ☆ = $p < 0.01$;
t-Test (✨) bzw. Welch-Test (☆))

3 Hauptversuch Teil 2

3.1 Verhalten

3.1.1 Head twitches

3.1.1.1 Kontrollen

Es fanden sich sehr geringe Anzahlen zu allen Zeitpunkten. Mit Betonung der Zeitpunkte zu den Lichtwechseln lagen die Werte bei maximal zwei. (Abbildung 23)

3.1.1.2 Rolipram

Unter Rolipram waren Head twitches ein sehr häufig auftretender Parameter. Sie waren zu allen Zeitpunkten statistisch signifikant erhöht.

Etwa gleich stark erhöhte Messwerte von 25 bis 30 Head twitches / Stunde fanden sich zu Beginn und Ende der Hellphase. Das Maximum mit etwa 40 Head twitches / Stunde konnte in der Mitte um 10.00 Uhr beobachtet werden. Um 16.00 Uhr lag der Wert am niedrigsten mit 23 Head twitches / Stunde.

In der Dunkelphase fand sich ein deutlicher Abfall der Werte. Nur zu Beginn der Dunkelphase lag der Messwert noch bei etwa zwölf Head twitches / Stunde. Um 20.00 und 04.00 Uhr lagen die Head twitches bei fünf und waren zur Mitte der Dunkelphase nochmals auf zehn Head twitches / Stunde erhöht. (Abbildung 23)

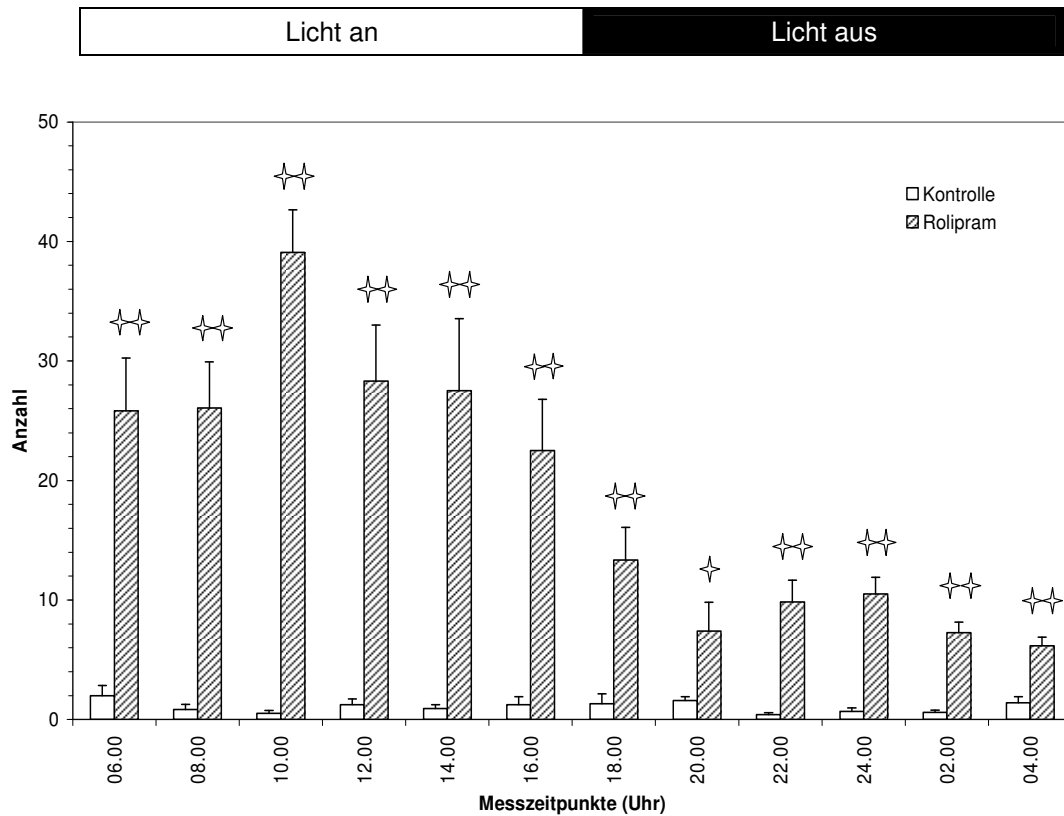


Abb. 23: Hauptversuch Teil 2

Head-Twitches bei Ratten zu verschiedenen Tageszeitpunkten und unterschiedlichen Lichtbedingungen nach einmaliger intraperitonealer (i.p.) Vorbehandlung (15 min) mit Rolipram (2.5 mg/kg) bzw. Vehikel (Kontrolle).

Pro Tageszeitpunkt wurden jeweils 24 Tiere eingesetzt und nach Zufallskriterien den 2 Behandlungsgruppen zugeordnet (n = 12 Tiere Rolipram i.p.; n = 12 Tiere Vehikel i.p.).

Die Anzahl der Head-Twitches wurde während 1 h (von der 15. - 75. Min nach i.p. Behandlung) erfasst.

Dargestellt sind die Mittelwerte mit S.E.M.

(Signifikanzniveau: ✨ ✨ = $p < 0.01$, ✨ = $p < 0.05$, t-Test)

3.1.2 Forepaw shaking

3.1.2.1 Kontrollen

Forepaw shaking trat bei den Kontrolltieren nur bei einzelnen Tieren auf. (Abbildung 24)

3.1.2.2 Rolipram

Unter Rolipram war die Häufigkeit des Parameters immer statistisch signifikant und deutlich erhöht.

In der Hellphase lagen die Inzidenzraten bei sieben bis neun. Zur Mitte um 10.00 und 12.00 Uhr sowie zum Ende um 16.00 Uhr waren die Inzidenzen am höchsten. Die geringsten Werte fanden sich an den Zeitpunkten vor und nach der Mitte der Hellphase.

Die Dunkelphase hatte niedrigere Inzidenzen im Vergleich zur Hellphase. Sie lagen zwischen fünf und sechs und zeigten die Maxima zu Beginn und in der Mitte der Dunkelphase um 18.00 und 24.00 Uhr. (Abbildung 24)

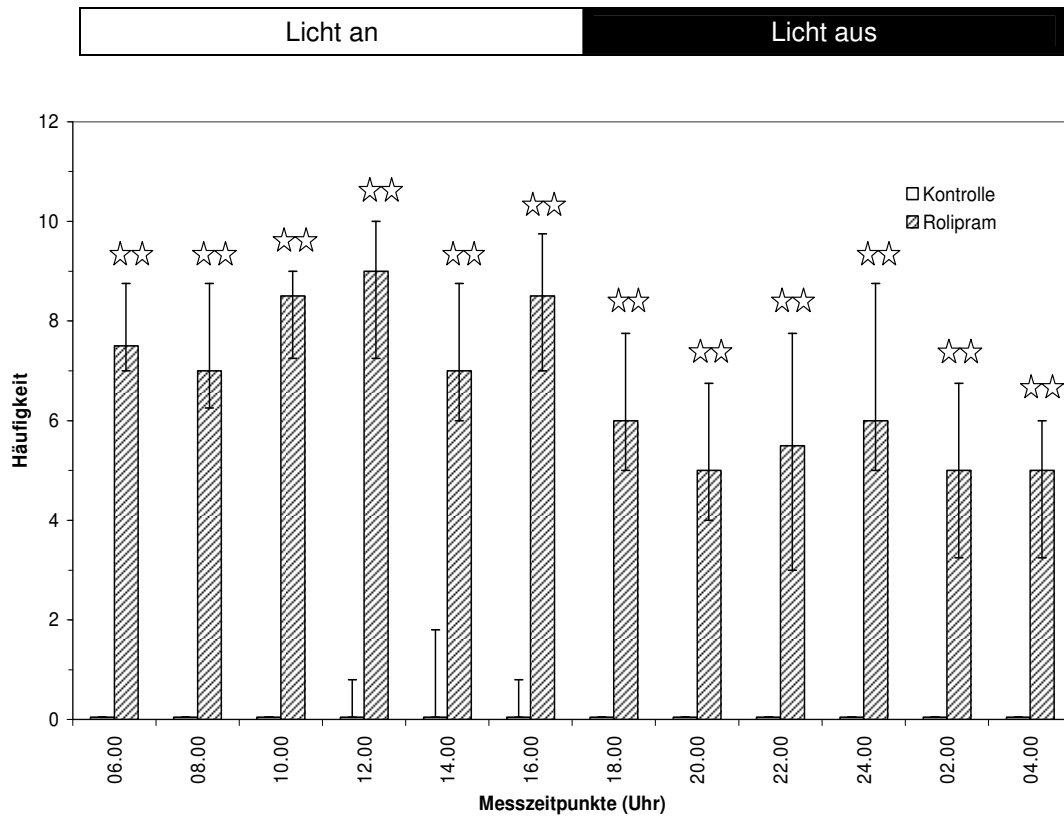


Abb. 24: Hauptversuch Teil 2

Forepaw shaking bei Ratten zu verschiedenen Tageszeitpunkten und unterschiedlichen Lichtbedingungen nach einmaliger intraperitonealer (i.p.) Vorbehandlung (15 min) mit Rolipram (2.5 mg/kg) bzw. Vehikel (Kontrolle).

Pro Tageszeitpunkt wurden jeweils 24 Tiere eingesetzt und nach Zufallskriterien den 2 Behandlungsgruppen zugeordnet (n = 12 Tiere Rolipram i.p.; n = 12 Tiere Vehikel i.p.).

Das Vorhandensein von Forepaw shaking pro Zeitraum von 5 min wurde während 1 h (von der 15. - 75. min nach i.p. Behandlung) registriert (Inzidenzrate: maximal 12).

Dargestellt sind die Mediane mit 25/75%-Quartilen.

(Signifikanzniveau: ☆☆ = $p < 0.01$; Kruskal-Wallis-Test)

3.1.3 Grooming

3.1.3.1 Kontrollen

Groomingsequenzen wurden in geringer Inzidenz bei den Kontrolltieren beobachtet.

Die höchsten Raten lagen bei 1,5.

In der Hellphase wurde die maximale Inzidenzrate um 14.00 Uhr erreicht, zu Beginn und Ende der Phase trat dieses Verhalten kaum noch auf.

In der Dunkelphase lag zwischen niedrigen Inzidenzraten von eins um 18.00 und 24.00 Uhr ein Inzidenzmaximum von 1,5 um 20.00 Uhr vor. Zum Ende der Dunkelphase lagen die Inzidenzen erneut höher und damit auf dem Niveau von 20.00 Uhr. (Abbildung 25)

3.1.3.2 Rolipram

Unter Rolipram kam es zu einer statistisch signifikanten Erhöhung bei GR, das dann mit Inzidenzen zwischen fünf und etwa sechs auftrat.

Die höchsten Inzidenzraten in der Hellphase fanden sich zur Mitte um 10.00 Uhr und zum Ende um 16.00 Uhr mit etwas über sechs.

Das Minimum lag zu Beginn der Phase bei etwa 3,5.

In der Dunkelphase zeigten sich drei Spitzen zu Beginn, Mitte und Ende mit Inzidenzraten zwischen 5,5 und sechs. In den dazwischen liegenden Zeiträumen lag die niedrigste Inzidenz um 20.00 Uhr bei 4,5. (Abbildung 25)

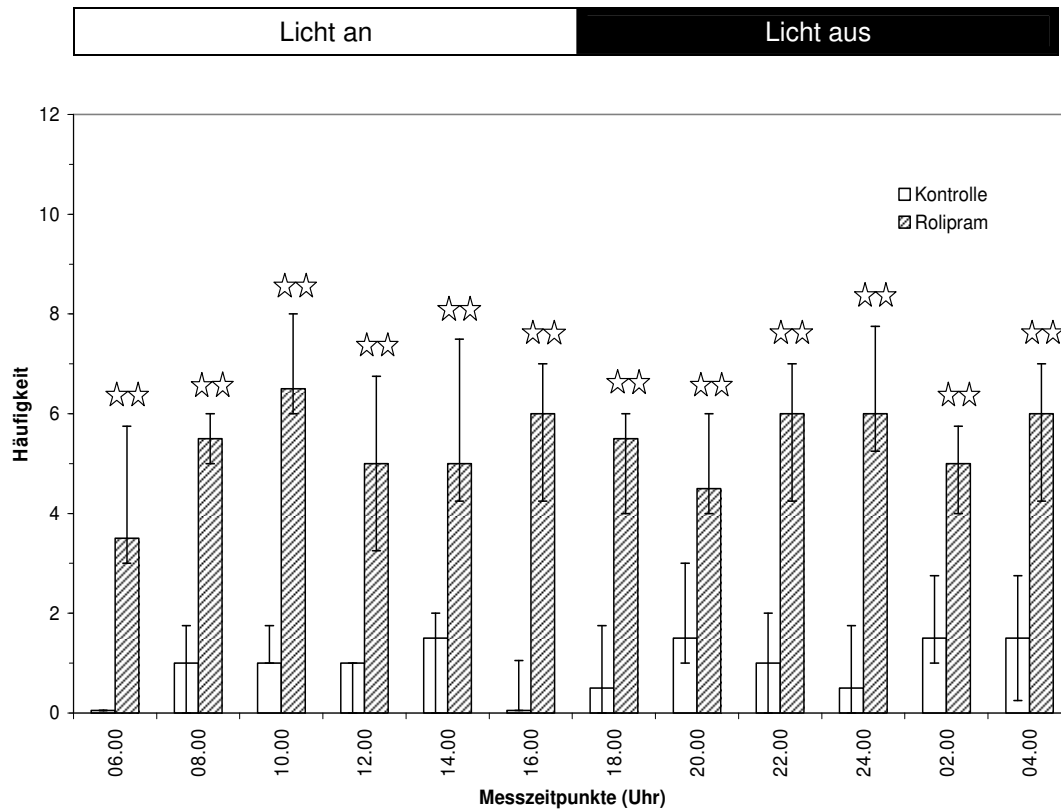


Abb. 25: Hauptversuch Teil 2

Grooming bei Ratten zu verschiedenen Tageszeitpunkten und unterschiedlichen Lichtbedingungen nach einmaliger intraperitonealer (i.p.) Vorbehandlung (15 min) mit Rolipram (2.5 mg/kg) bzw. Vehikel (Kontrolle).

Pro Tageszeitpunkt wurden jeweils 24 Tiere eingesetzt und nach Zufallskriterien den 2 Behandlungsgruppen zugeordnet (n = 12 Tiere Rolipram i.p.; n = 12 Tiere Vehikel i.p.).

Das Vorhandensein von Grooming pro Zeitraum von 5 min wurde während 1 h (von der 15. - 75. min nach i.p. Behandlung) registriert (Inzidenzrate: maximal 12).

Dargestellt sind die Mediane mit 25/75%-Quartilen.

(Signifikanzniveau: ☆☆ = $p < 0.01$; Kruskal-Wallis-Test)

3.1.4 Scratching

3.1.4.1 Kontrollen

Dieser Parameter trat bei den Kontrolltieren mit einer mäßigen Inzidenzrate von eins bis 3,5 auf. Dabei konnten die höchsten Raten jeweils zum Ende der Beleuchtungsphasen beobachtet werden.

In der Hellphase hatte das Minimum zu Beginn um 06.00 Uhr eine Inzidenzrate von eins.

In der Dunkelphase lagen die minimalen Werte zu den Zeitpunkten 18.00 bis 24.00 Uhr bei zwei. (Abbildung 26)

3.1.4.2 Rolipram

Unter Rolipram konnte eine statistisch signifikante Suppression beobachtet werden.

Der Parameter wurde nur noch bei einzelnen Tieren beobachtet. (Abbildung 26)

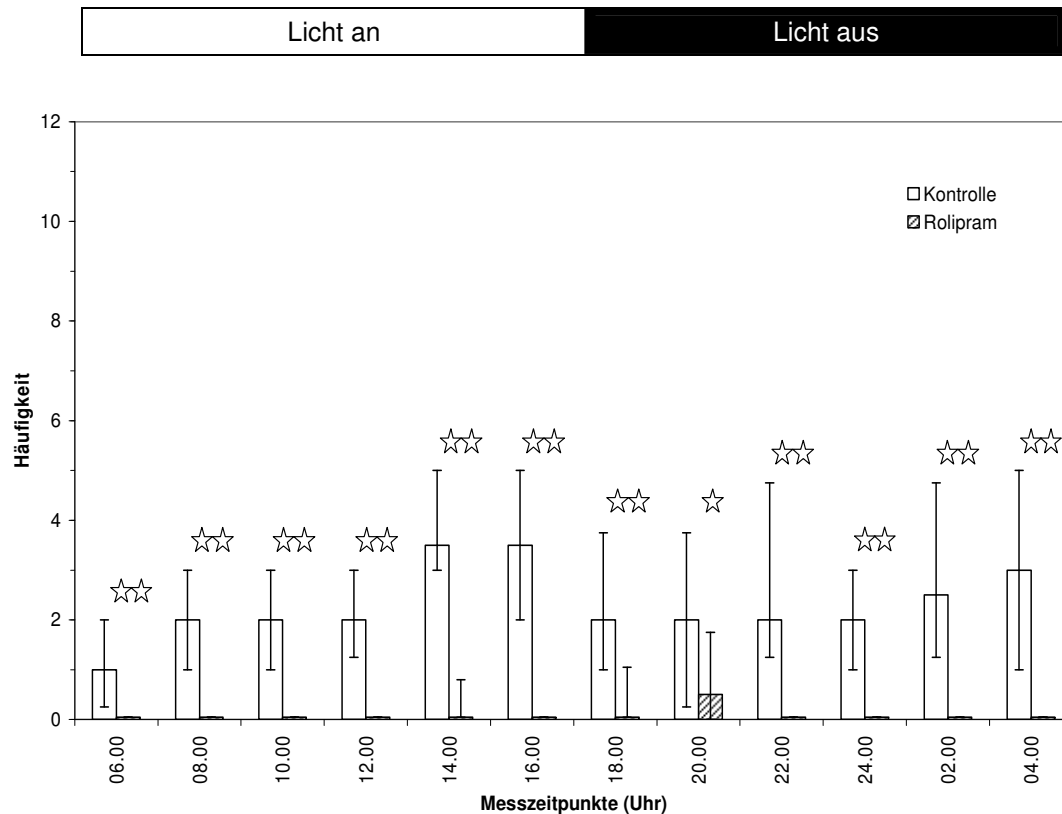


Abb. 26: Hauptversuch Teil 2

Scratching bei Ratten zu verschiedenen Tageszeitpunkten und unterschiedlichen Lichtbedingungen nach einmaliger intraperitonealer (i.p.) Vorbehandlung (15 min) mit Rolipram (2.5 mg/kg) bzw. Vehikel (Kontrolle).

Pro Tageszeitpunkt wurden jeweils 24 Tiere eingesetzt und nach Zufallskriterien den 2 Behandlungsgruppen zugeordnet (n = 12 Tiere Rolipram i.p.; n = 12 Tiere Vehikel i.p.).

Das Vorhandensein von Scratching pro Zeitraum von 5 min wurde während 1 h (von der 15. - 75. min nach i.p. Behandlung) registriert (Inzidenzrate: maximal 12).

Dargestellt sind die Mediane mit 25/75%-Quartilen.

(Signifikanzniveau: ☆☆ = $p < 0.01$, ☆ = $p < 0.05$; Kruskal-Wallis-Test)

3.1.5 Genital grooming

3.1.5.1 Kontrollen

Bei dem selten auftretenden Parameter wurden die größten Inzidenzraten mit 1,5 bis zwei nach Beginn der Dunkelfase beobachtet (18.00 Uhr bis 22.00 Uhr).

Weitere erhöhte Inzidenzen von 1,5 fanden sich in der Mitte der Hellphase und zum Ende der Dunkelfase. (Tabelle 1c)

3.1.5.2 Rolipram

Unter Rolipram konnte zu den Zeitpunkten mit erhöhten Inzidenzwerten der Kontrollen ein Abfall registriert werden, so dass um 12.00, 18.00, 24.00 und 04.00 Uhr ein signifikanter Unterschied errechnet werden konnte. Zu den übrigen Zeitpunkten lagen die Inzidenzen zwischen den Behandlungsgruppen gleich oder zu dicht beieinander, als dass sich ein statistisch signifikanter Unterschied ergeben hat. (Tabelle 1c)

Tabelle 1c: Hauptversuch Teil 2

MZ	Hauptversuch Teil 2 Kontrolle			Hauptversuch Teil 2 Rolipram			Signifikanz-Niveau
	Quantil 25	Median	Quantil 75	Quantil 25	Median	Quantil 75	
06.00 Uhr	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,00	n.s.
08.00 Uhr	0,00	1,00	2,00	0,00	0,00	1,50	n.s.
10.00 Uhr	1,00	1,50	2,00	0,00	1,00	2,00	n.s.
12.00 Uhr	1,00	1,50	3,00	0,00	0,00	1,00	n.s.
14.00 Uhr	0,25	1,00	2,00	0,00	0,50	1,00	n.s.
16.00 Uhr	1,00	1,50	2,75	0,00	1,00	2,00	n.s.
18.00 Uhr	0,00	1,50	3,00	0,00	0,00	1,00	n.s.
20.00 Uhr	1,00	2,00	2,75	0,00	1,00	2,00	n.s.
22.00 Uhr	1,00	1,50	3,75	1,00	1,00	2,00	n.s.
24.00 Uhr	0,00	1,00	2,00	0,00	0,00	0,00	n.s.
02.00 Uhr	0,25	1,50	2,75	0,00	0,00	1,00	n.s.
04.00 Uhr	1,00	1,00	1,75	0,00	0,00	0,75	n.s.

MZ = Messzeitpunkt

n.s. = nicht signifikant

Genital Grooming bei Ratten zu verschiedenen Tageszeitpunkten und unterschiedlichen Lichtbedingungen 75 Minuten nach einmaliger intraperitonealer (i.p.) Behandlung mit Rolipram (2.5 mg/kg) bzw. Vehikel (Kontrolle).

Pro Tageszeitpunkt wurden jeweils 24 Tiere eingesetzt und nach Zufallskriterien den 2 Behandlungsgruppen zugeordnet (n = 12 Tiere Rolipram i.p.; n = 12 Tiere Vehikel i.p.).

Das Vorhandensein von Genital Grooming pro Zeitraum von 5 min wurde während 1 h (von der 15. - 75. min nach i.p. Behandlung) registriert (Inzidenzrate: maximal 12).

Dargestellt sind die Mediane mit 25/75%-Quartilen.

(Signifikanzniveau: durchgehend $p > 0.05$; Kruskal-Wallis-Test)

3.1.6 Pelvic thrust

3.1.6.1 Kontrollen

Auch dieser Parameter trat selten auf und war nur in einem Drittel der Zeitpunkte zu beobachten. (Tabelle 2c)

3.1.6.2 Rolipram

Vom niedrigen Niveau der Kontrollwerte ausgehend ergaben sich durch geringe Anstiege der Inzidenzen um 10.00 Uhr, 16.00 Uhr und 04.00 Uhr auf eins statistisch signifikante Unterschiede. (Tabelle 2c)

Tabelle 2c: Hauptversuch Teil 2

MZ	Hauptversuch Teil 2 Kontrolle			Hauptversuch Teil 2 Rolipram			Signifikanz-Niveau
	Quantil 25	Median	Quantil 75	Quantil 25	Median	Quantil 75	
06.00 Uhr	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	entfällt
08.00 Uhr	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,00	n.s.
10.00 Uhr	0,00	0,00	0,00	0,00	1,00	1,75	☆☆
12.00 Uhr	0,00	0,00	1,00	0,00	1,00	1,00	n.s.
14.00 Uhr	0,00	0,00	1,00	0,00	0,50	2,00	n.s.
16.00 Uhr	0,00	0,00	0,75	0,00	1,00	2,00	☆
18.00 Uhr	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,00	n.s.
20.00 Uhr	0,00	0,00	0,75	0,00	0,00	0,75	n.s.
22.00 Uhr	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,00	n.s.
24.00 Uhr	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	n.s.
02.00 Uhr	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	entfällt
04.00 Uhr	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,00	☆

MZ = Messzeitpunkt

n.s. = nicht signifikant

Pelvic Thrust bei Ratten zu verschiedenen Tageszeitpunkten und unterschiedlichen Lichtbedingungen 75 Minuten nach einmaliger intraperitonealer (i.p.) Behandlung mit Rolipram (2.5 mg/kg) bzw. Vehikel (Kontrolle).

Pro Tageszeitpunkt wurden jeweils 24 Tiere eingesetzt und nach Zufallskriterien den 2 Behandlungsgruppen zugeordnet (n = 12 Tiere Rolipram i.p.; n = 12 Tiere Vehikel i.p.).

Das Vorhandensein von Pelvic Thrust pro Zeitraum von 5 min wurde während 1 h (von der 15. - 75. min nach i.p. Behandlung) registriert (Inzidenzrate: maximal 12).

Dargestellt sind die Mediane mit 25/75%-Quartilen.

(Signifikanzniveau: ☆☆ = $p < 0.01$, ☆ = $p < 0.05$; Kruskal-Wallis-Test)

3.1.7 Sniffing

3.1.7.1 Kontrollen

Bei den beiden Beleuchtungsphasen ergaben sich unterschiedliche Inzidenzbereiche. In der Hellphase lag dieser bei eins bis drei, in der Dunkelphase bei drei bis etwa sieben. In der Hellphase konnten die höheren Inzidenzen um 08.00 und 12.00 Uhr beobachtet werden, zu den übrigen Zeitpunkten lag die Inzidenzrate auf etwa gleichem Niveau bei 2,5. Die niedrigen Inzidenzen fanden sich zu Beginn und Ende der Hellphase mit einer Rate von eins. Die Inzidenzen der Dunkelphase lagen zum Ende mit einer Rate von etwa sieben am höchsten. Niedrige Inzidenzraten fanden sich mit etwa drei zu Beginn um 18.00 Uhr und in der Mitte um 24.00 Uhr. (Abbildung 27)

3.1.7.2 Rolipram

Zu fast allen Zeitpunkten fanden sich unter Rolipram statistisch signifikante Suppressionen des Parameters mit einer Inzidenz von maximal eins um 20.00 Uhr. Bei niedrigen Kontrollwerten konnte in der Hellphase ein statistisch signifikanter Unterschied zu den Zeitpunkten 06.00 und 10.00 Uhr nicht mehr errechnet werden. (Abbildung 27)

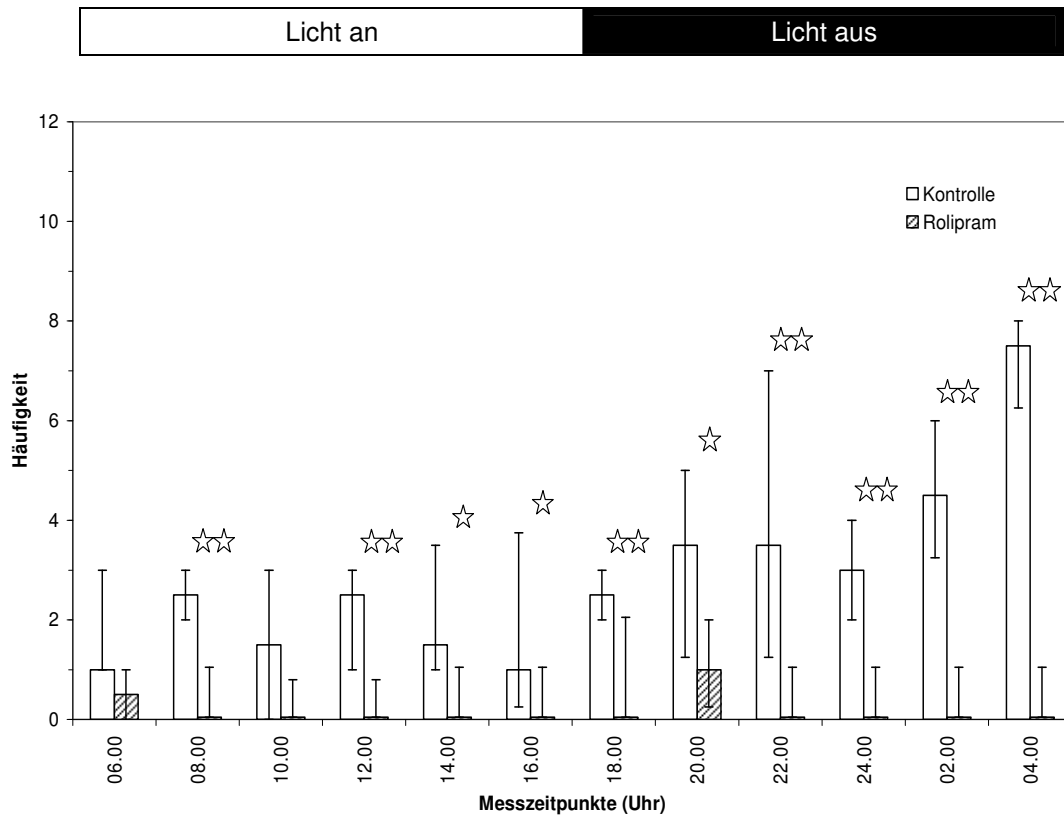


Abb. 27: Hauptversuch Teil 2

Sniffing bei Ratten zu verschiedenen Tageszeitpunkten und unterschiedlichen Lichtbedingungen nach einmaliger intraperitonealer (i.p.) Vorbehandlung (15 min) mit Rolipram (2.5 mg/kg) bzw. Vehikel (Kontrolle).

Pro Tageszeitpunkt wurden jeweils 24 Tiere eingesetzt und nach Zufallskriterien den 2 Behandlungsgruppen zugeordnet (n = 12 Tiere Rolipram i.p.; n = 12 Tiere Vehikel i.p.).

Das Vorhandensein von Sniffing pro Zeitraum von 5 min wurde während 1 h (von der 15. - 75. min nach i.p. Behandlung) registriert (Inzidenzrate: maximal 12).

Dargestellt sind die Mediane mit 25/75%-Quartilen.

(Signifikanzniveau: ☆☆ = $p < 0.01$, ☆ = $p < 0.05$; Kruskal-Wallis-Test)

3.1.8 Digging

3.1.8.1 Kontrollen

Das Verhalten wurde in diesem Versuch nur zu einem Zeitpunkt mit höherer Inzidenz beobachtet.

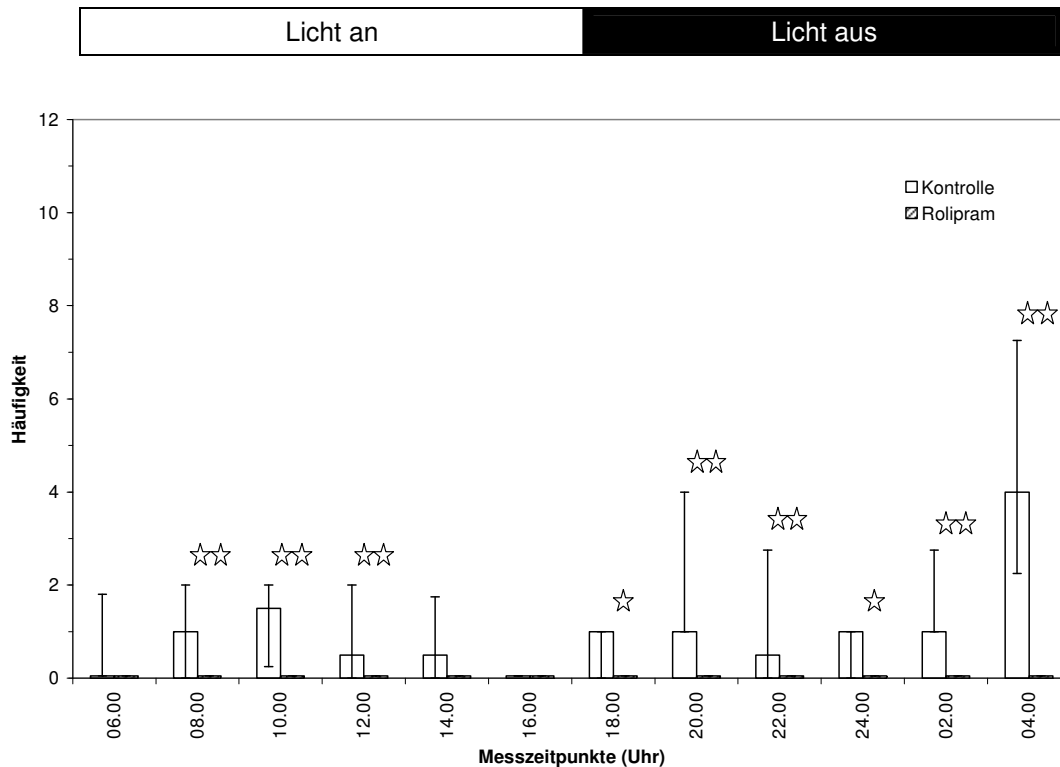
Um 04.00 Uhr lag sie einmalig bei vier, zu allen übrigen Zeitpunkten zwischen Null und 1,5.

Die Inzidenzen von 1,5 wurden um 10.00 Uhr registriert, jene von Null zu Beginn und Ende der Hellphase. (Abbildung 28)

3.1.8.2 Rolipram

Unter Rolipram kam es zu einer fast vollständigen Suppression des Verhaltens, so dass sich bis auf drei Zeitpunkte ein statistisch signifikanter Unterschied ergab.

Zu den Zeitpunkten 06.00, 14.00 und 16.00 Uhr waren die Ausgangswerte zu gering für einen statistisch nachweisbaren Unterschied. (Abbildung 28)

**Abb. 28: Hauptversuch Teil 2**

Digging bei Ratten zu verschiedenen Tageszeitpunkten und unterschiedlichen Lichtbedingungen nach einmaliger intraperitonealer (i.p.) Vorbehandlung (15 min) mit Rolipram (2.5 mg/kg) bzw. Vehikel (Kontrolle).

Pro Tageszeitpunkt wurden jeweils 24 Tiere eingesetzt und nach Zufallskriterien den 2 Behandlungsgruppen zugeordnet (n = 12 Tiere Rolipram i.p.; n = 12 Tiere Vehikel i.p.).

Das Vorhandensein von Digging pro Zeitraum von 5 min wurde während 1 h (von der 15. - 75. min nach i.p. Behandlung) registriert (Inzidenzrate: maximal 12).

Dargestellt sind die Mediane mit 25/75%-Quartilen.

(Signifikanzniveau: ☆☆ = $p < 0.01$, ☆ = $p < 0.05$; Kruskal-Wallis-Test)

3.1.9 Sleeping

3.1.9.1 Kontrollen

Der Parameter konnte abhängig von den Beleuchtungsphasen in hoher bis mittlerer Inzidenz beobachtet werden.

In der Hellphase lagen die hohen, in der Dunkelphase deutlich differierenden Inzidenzraten vor. Zu Beginn und in der zweiten Hälfte der Hellphase lagen die Inzidenzen bei etwa acht, die geringste Rate konnte um 10.00 Uhr mit 6,5 ermittelt werden.

In der Dunkelphase gab es zu Beginn um 18.00 Uhr und in der Mitte um 24.00 Uhr die höchsten Inzidenzraten von sechs bis 6,5. Dazwischen wurde ein Minimum von drei um 20.00 Uhr beobachtet. Zum Ende der Dunkelphase zum Zeitpunkt 04.00 Uhr trat der Parameter fast nicht mehr auf. (Abbildung 29)

3.1.9.2 Rolipram

Unter Rolipram wurde eine vollständige Suppression dieses Verhaltens beobachtet.

Auch zum Zeitpunkt 04.00 Uhr reichte die geringe Inzidenz aus, so dass zu allen Zeitpunkten statistisch signifikante Unterschiede zu sehen waren. (Abbildung 29)

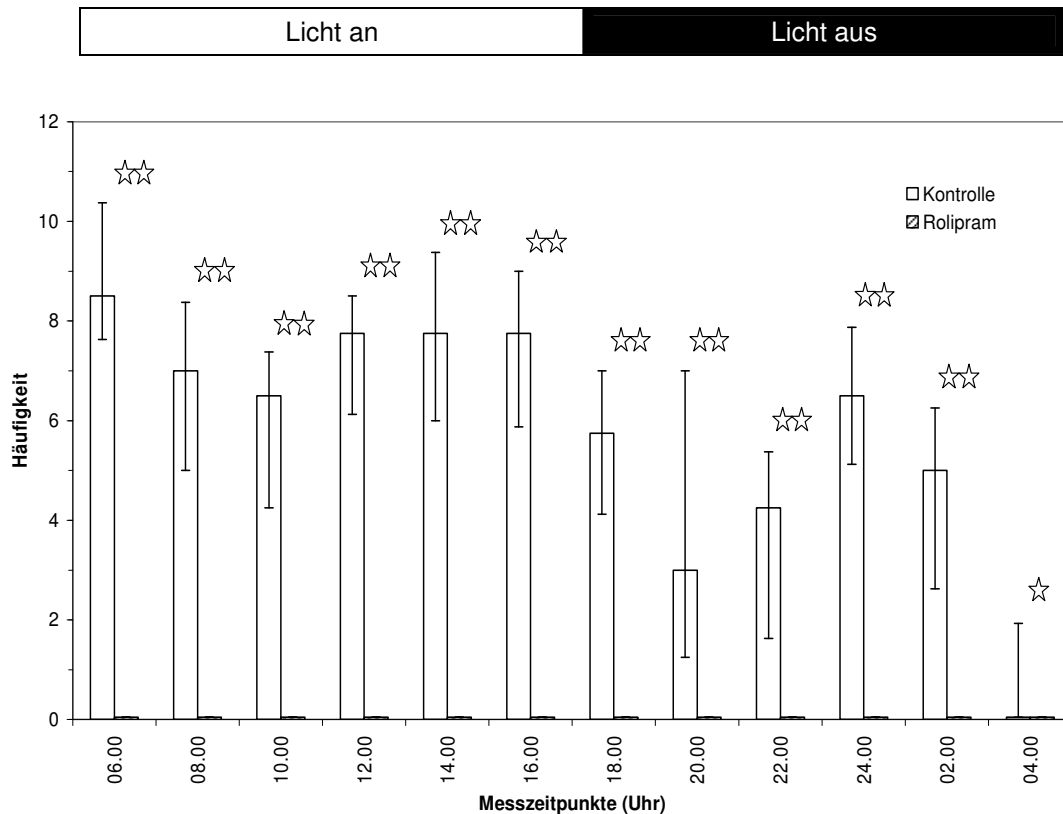


Abb. 29: Hauptversuch Teil 2

Sleeping bei Ratten zu verschiedenen Tageszeitpunkten und unterschiedlichen Lichtbedingungen nach einmaliger intraperitonealer (i.p.) Vorbehandlung (15 min) mit Rolipram (2.5 mg/kg) bzw. Vehikel (Kontrolle).

Pro Tageszeitpunkt wurden jeweils 24 Tiere eingesetzt und nach Zufallskriterien den 2 Behandlungsgruppen zugeordnet (n = 12 Tiere Rolipram i.p.; n = 12 Tiere Vehikel i.p.).

Das Vorhandensein von Sleeping pro Zeitraum von 5 min wurde während 1 h (von der 15. - 75. min nach i.p. Behandlung) registriert (Inzidenzrate: maximal 12).

Dargestellt sind die Mediane mit 25/75%-Quartilen.

(Signifikanzniveau: ☆☆ = $p < 0.01$, ☆ = $p < 0.05$; Kruskal-Wallis-Test)

3.1.10 Yawning

3.1.10.1 Kontrollen

Dieser Parameter trat selten auf. In der Hellphase wurden die niedrigeren Inzidenzen bis 1,5 und in der Dunkelphase die höheren bis 2,5 beobachtet. (Tabelle 3c)

3.1.10.2 Rolipram

Unter Rolipram kam es zu einer weitestgehenden Suppression, der Parameter konnte nur noch um 20.00 Uhr mit einer Inzidenz von eins beobachtet werden. Zu allen Zeitpunkten bestand ein statistisch signifikanter Unterschied. (Tabelle 3c)

Tabelle 3c: Hauptversuch Teil 2

MZ	Hauptversuch Teil 2 Kontrolle			Hauptversuch Teil 2 Rolipram			Signifikanz-Niveau
	Quantil 25	Median	Quantil 75	Quantil 25	Median	Quantil 75	
06.00 Uhr	0,00	1,00	1,00	0,00	0,00	0,00	☆☆
08.00 Uhr	0,00	1,50	2,00	0,00	0,00	0,00	☆☆
10.00 Uhr	0,00	1,00	2,00	0,00	0,00	0,00	☆☆
12.00 Uhr	0,00	0,50	1,75	0,00	0,00	0,00	☆
14.00 Uhr	1,00	1,00	2,75	0,00	0,00	0,00	☆☆
16.00 Uhr	0,00	0,50	1,00	0,00	0,00	0,00	☆
18.00 Uhr	0,25	2,00	3,00	0,00	0,00	0,00	☆☆
20.00 Uhr	1,00	2,00	2,75	0,00	0,00	1,00	☆☆
22.00 Uhr	1,00	2,00	3,75	0,00	0,00	0,00	☆☆
24.00 Uhr	1,00	1,50	3,50	0,00	0,00	0,00	☆☆
02.00 Uhr	0,25	2,50	3,75	0,00	0,00	0,00	☆☆
04.00 Uhr	0,00	1,00	1,75	0,00	0,00	0,00	☆☆

MZ = Messzeitpunkt

n.s. = nicht signifikant

Yawning bei Ratten zu verschiedenen Tageszeitpunkten und unterschiedlichen Lichtbedingungen 75 Minuten nach einmaliger intraperitonealer (i.p.) Behandlung mit Rolipram (2.5 mg/kg) bzw. Vehikel (Kontrolle).

Pro Tageszeitpunkt wurden jeweils 24 Tiere eingesetzt und nach Zufallskriterien den 2 Behandlungsgruppen zugeordnet (n = 12 Tiere Rolipram i.p.; n = 12 Tiere Vehikel i.p.).

Das Vorhandensein von Yawning pro Zeitraum von 5 min wurde während 1 h (von der 15. - 75. min nach i.p. Behandlung) registriert (Inzidenzrate: maximal 12).

Dargestellt sind die Mediane mit 25/75%-Quartilen.

(Signifikanzniveau: ☆☆ = $p < 0.01$, ☆ = $p < 0.05$; Kruskal-Wallis-Test)

3.2 Klinisch - chemische Parameter

3.2.1 Melatonin

3.2.1.1 Kontrollen

Die Messwerte lagen zwischen Minima von 12 pg/ ml um 08.00 und 18.00 Uhr und Maxima von 42 pg/ ml um 24.00 und 02.00 Uhr.

In der Hellphase lagen die Messwerte in einem engen Bereich zusammen. Sie hatten geringe Werte zwischen 12 pg/ ml zu Beginn und mit 15 pg/ ml zum Ende.

Auch zum ersten Zeitpunkt der Dunkelphase um 18.00 Uhr lag der Messwert niedrig bei 12 pg/ml.

Das Maximum konnte zur Mitte der Hellphase um 12.00 Uhr mit 17 pg/ml gemessen werden.

In der Dunkelphase konnten nach dem niedrigen Messwert um 18.00 Uhr deutlich erhöhte Werte um 20.00 Uhr mit 30 pg/ ml und wieder um 24.00 und 02.00 Uhr mit 42 pg/ ml gemessen werden.

An den dazwischen liegenden Zeitpunkten lagen die Werte auf etwa dem maximalen Niveau der Hellphase mit 17 pg/ ml. (Abbildung 30)

3.2.1.2 Rolipram

Unter Rolipram konnten zwei Tendenzen festgestellt werden.

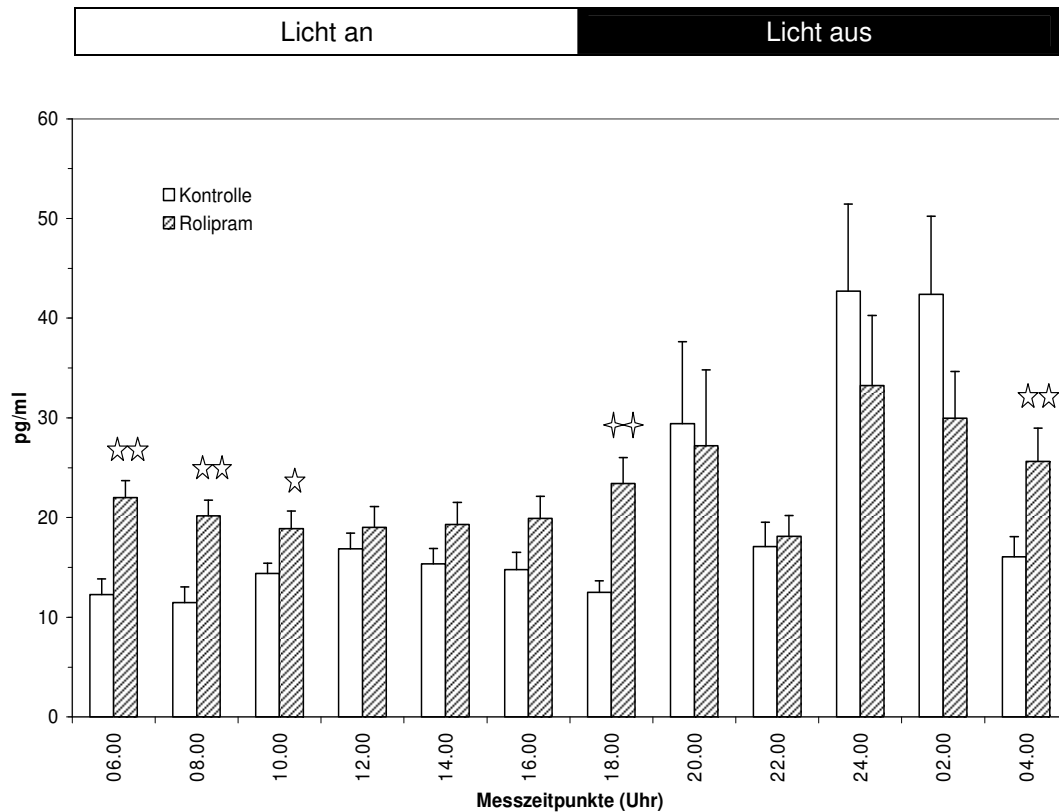
Die Messwerte stiegen an den Zeitpunkten mit niedrigen Kontrollwerten deutlich an, an den Zeitpunkten mit hohen Messwerten lagen sie gering bis mäßig niedriger.

In der Hellphase fanden sich daher die höchste Werte zu Beginn und Ende mit etwa 20 pg/ ml, der niedrigste Wert lag in der Mitte um 12.00 Uhr bei 19 pg/ ml. Dadurch waren zu den Zeitpunkten 12.00 bis 16.00 Uhr keine statistisch signifikanten Unterschiede mehr zu sehen, die die übrigen Zeitpunkte noch aufwiesen.

In der Dunkelphase lagen die Messwerte auch jeweils zu Beginn und Ende deutlich und statistisch signifikant über den Kontrollwerten.

An den übrigen Zeitpunkten waren die Ergebnisse etwa gleichhoch mit 30 bzw. 20 pg/ ml (20.00 und 22.00 Uhr) oder lagen um etwa ein Viertel niedriger bei etwa 32 pg/ ml (24.00 und 02.00 Uhr).

Diese Differenzen waren dann nicht mehr statistisch signifikant. (Abbildung 30)

**Abb. 30: Hauptversuch Teil 2**

Melatonin bei Ratten zu verschiedenen Tageszeitpunkten und unterschiedlichen Lichtbedingungen 75 min nach einmaliger intraperitonealer (i.p.) Behandlung mit Rolipram (2.5 mg/kg) bzw. Vehikel (Kontrolle).

Pro Tageszeitpunkt wurden jeweils 24 Tiere eingesetzt und nach Zufallskriterien den 2 Behandlungsgruppen zugeordnet (n = 12 Tiere Rolipram i.p.; n = 12 Tiere Vehikel i.p.).

Die Serum-Melatonin-Konzentration wurde radioimmunologisch bestimmt.

Dargestellt sind die Mittelwerte mit S.E.M.

(Signifikanzniveau: ☆☆☆ / ☆☆☆ = $p < 0.01$, ☆☆ / ☆ = $p < 0.05$;
t-Test (☆☆) bzw. Welch-Test (☆☆))

3.2.2 Corticosteron

3.2.2.1 Kontrollen

Die Messwerte lagen zwischen einem Minimum von 900 pmol/ ml um 14.00 und 20.00 Uhr und einem Maximum von 1200 pmol/ ml um 10.00 und 02.00 Uhr.

Zwischen den Beleuchtungsphasen fanden sich keine großen Abweichungen.

In der Hellphase konnte der höchste Messwert in der Mitte um 10.00 Uhr ermittelt werden. An den Zeitpunkten davor lagen die Werte mit 1100 bis 1200 pmol/ ml höher und danach bis zum Ende mit etwa 1000 pmol/ ml niedriger.

Der niedrigste Wert der Dunkelphase lag um 20.00 Uhr mit 900 pmol/ ml vor, am nachfolgenden Zeitpunkt 24.00 Uhr war der Messwert fast unverändert hoch.

Der höchste Wert konnte dann um 02.00 Uhr mit etwa 1200 pmol/ ml ermittelt werden.

Zu Beginn und Ende der Dunkelphase lagen die Werte etwa gleich hoch und vor allem um 04.00 Uhr mit 1000 pmol/ ml ähnlich hoch wie der benachbarte erste Messwert der Hellphase. (Abbildung 31)

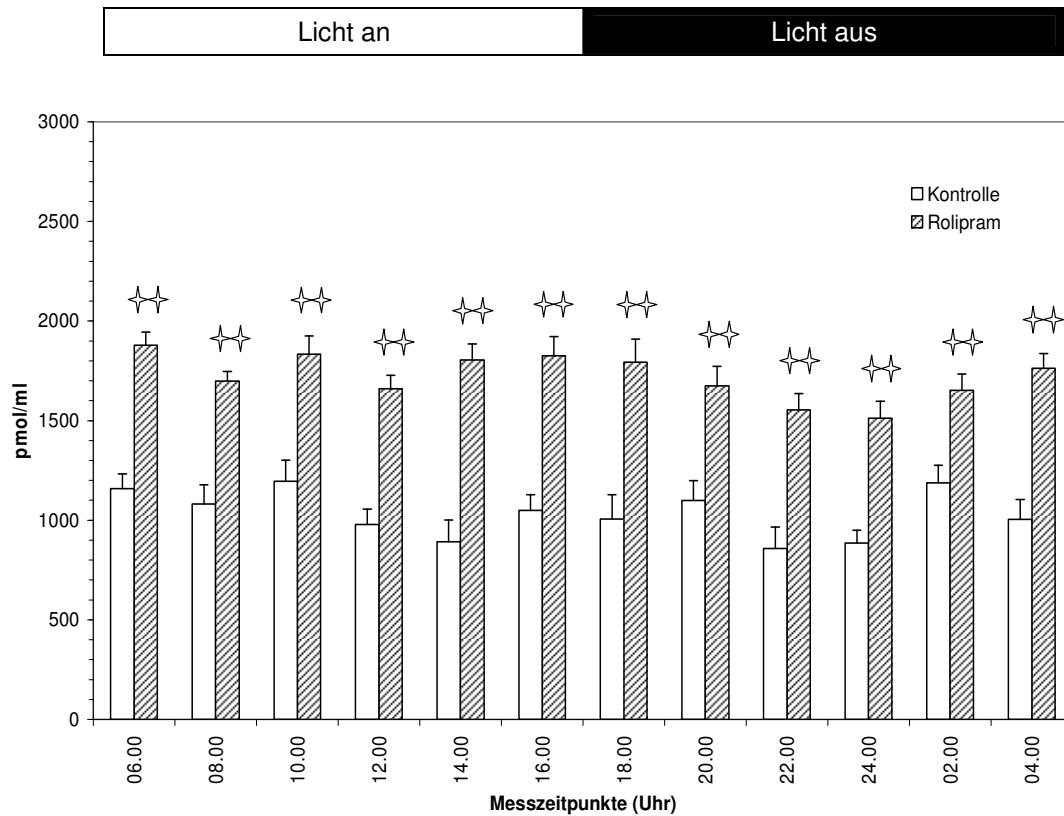
3.2.2.2 Rolipram

Unter Rolipram kam es an allen Zeitpunkten zu einem deutlichen, statistisch signifikanten Anstieg der Corticosteronwerte in den Bereich von 1600 bis 1900 pmol/ ml.

In der Hellphase lagen die niedrigen Werte um 08.00 und 12.00 Uhr mit 1700 pmol/ ml vor, an den übrigen Zeitpunkten lagen die Werte etwa gleichhoch bei etwa 1900 pmol/ ml.

In der Dunkelphase lagen die niedrigsten Werte in der Mitte um 22.00 und 24.00 Uhr mit etwa 1600 pmol/ ml und die höchsten zu Beginn und Ende um 18.00 und 04.00 Uhr mit etwa 1900 pmol/ ml vor.

In der ersten Hälfte der Dunkelphase konnten dann jeweils niedrigere Messwerte bis zum Zeitpunkt 22.00 Uhr gemessen werden, ab 24.00 Uhr bis zum Ende der Dunkelphase dann nur noch jeweils höhere. (Abbildung 31)

**Abb. 31: Hauptversuch Teil 2**

Serum-Corticosteron bei Ratten zu verschiedenen Tageszeitpunkten und unterschiedlichen Lichtbedingungen 75 min nach einmaliger intraperitonealer (i.p.) Behandlung mit Rolipram (2.5 mg/kg) bzw. Vehikel (Kontrolle).

Pro Tageszeitpunkt wurden jeweils 24 Tiere eingesetzt und nach Zufallskriterien den 2 Behandlungsgruppen zugeordnet (n = 12 Tiere Rolipram i.p.; n = 12 Tiere Vehikel i.p.).

Die Serum-Corticosteron-Konzentration wurde radioimmunologisch bestimmt.

Dargestellt sind die Mittelwerte mit S.E.M.

(Signifikanzniveau: ✨ ✨ = $p < 0.01$; t-Test)

3.2.3 Glukose

3.2.3.1 Kontrollen

Es wurden Konzentrationen in einem Bereich von 135 bis 155 mg/ dl ermittelt.

Zwischen den Lichtphasen konnten keine deutlichen Unterschiede ermittelt werden.

Der höchste Messwert lag um 14.00 Uhr mit 155 mg/dl vor.

Bis zum Minimum um 02.00 Uhr lagen dann die Messwerte wieder niedriger und in einem engen Intervall zwischen 140 bis 150 mg/ dl. Bis zum Zeitpunkt 14.00 Uhr lagen an den dazwischen liegenden Zeitpunkten wieder jeweils höhere Messwerte vor. (Abbildung 32)

3.2.3.2 Rolipram

Unter Rolipram lagen die Messwerte durchschnittlich um etwa 20 bis 30 mg/ dl höher.

Die Maxima lagen hierbei um 12.00 und 16.00 Uhr bei 185 mg/ dl.

Die niedrigsten Werte konnten um 22.00 und 24.00 Uhr mit 160 mg/ dl ermittelt werden.

Zu fast allen Zeitpunkten waren die Unterschiede statistisch signifikant, am Zeitpunkt 10.00 Uhr wurde mit einem p-Wert von 0,0501 das Kriterium nicht mehr erfüllt. (Abbildung 32)

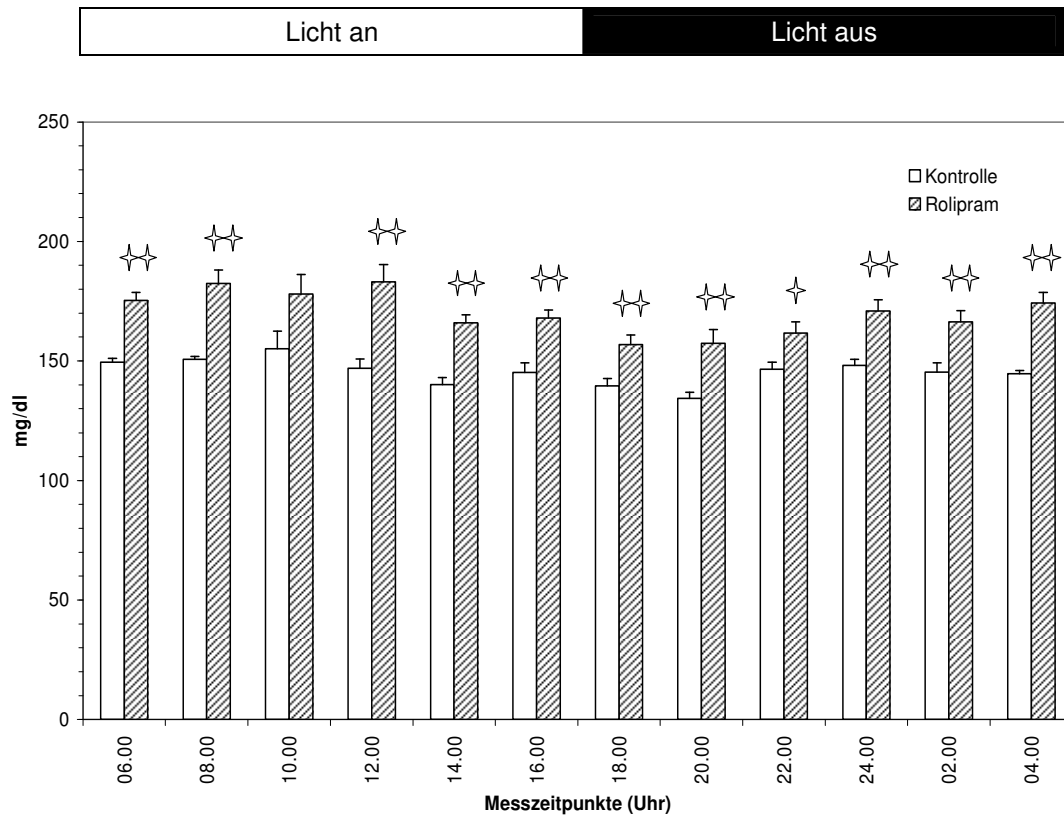


Abb. 32: Hauptversuch Teil 2

Serum-Glukose bei Ratten zu verschiedenen Tageszeitpunkten und unterschiedlichen Lichtbedingungen nach einmaliger intraperitonealer (i.p.) Vorbehandlung (15 min) mit Rolipram (2.5 mg/kg) bzw. Vehikel (Kontrolle).

Pro Tageszeitpunkt wurden jeweils 24 Tiere eingesetzt und nach Zufallskriterien den 2 Behandlungsgruppen zugeordnet (n = 12 Tiere Rolipram i.p.; n = 12 Tiere Vehikel i.p.).

Die Serum-Glukose-Konzentration wurde enzymatisch (Hexokinase-Verfahren) bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte mit S.E.M..

(Signifikanzniveau: ✨ ✨ = $p < 0.01$; t-Test)

3.3 Temperatur - Regulation

3.3.1 Ausgangstemperaturen

Die Körpertemperaturen lagen bei Werten zwischen 36 und 37,1 Grad Celsius.

Nach einem Maximum um 08.00 Uhr mit 37,2 Grad Celsius konnte um 12.00 Uhr das Minimum von 36 Grad Celsius ermittelt werden.

Bis zum Zeitpunkt 02.00 Uhr mit 37 Grad Celsius stiegen die Messwerte an den dazwischen liegenden Zeitpunkten durchgehend an und blieben dann bis zum Maximum um 08.00 Uhr auf etwa gleich hohem Niveau.

Statistisch signifikante Unterschiede zwischen den als Kontrollen und den für Rolipram vorgesehenen Tieren konnten nicht ermittelt werden. (Abbildung 33)

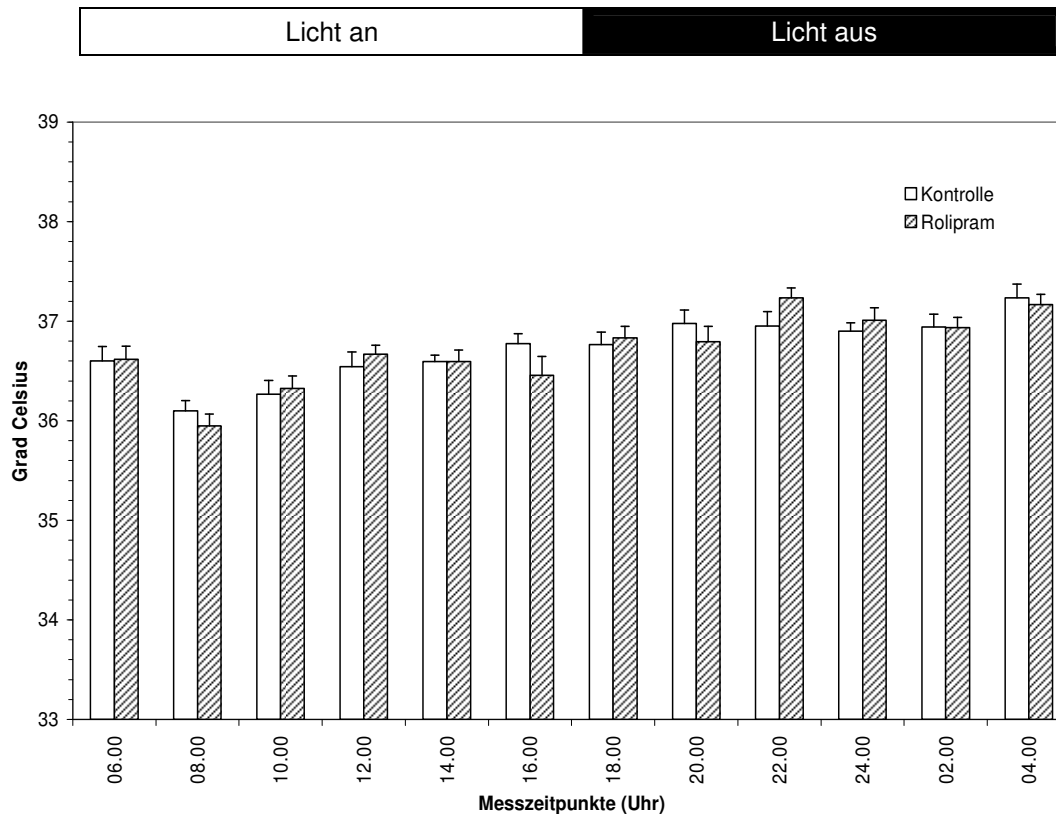


Abb. 33: Hauptversuch Teil 2

Körpertemperatur bei Ratten zu verschiedenen Tageszeitpunkten und unterschiedlichen Lichtbedingungen unmittelbar vor einmaliger intraperitonealer (i.p.) Behandlung mit Rolipram (2.5 mg/kg) bzw. Vehikel (Kontrolle).

Pro Tageszeitpunkt wurden jeweils 24 Tiere eingesetzt und nach Zufallskriterien den 2 Behandlungsgruppen zugeordnet (n = 12 Tiere Rolipram i.p.; n = 12 Tiere Vehikel i.p.).

Die Körpertemperatur wurde mittels einer rektal eingeführten Thermo-sonde gemessen.

Dargestellt sind die Mittelwerte mit S.E.M.

(Signifikanzniveau durchweg $p > 0.05$; t-Test)

3.3.2 Temperaturen nach Verhaltensbeobachtung

Die Körpertemperaturen der Kontrollen lagen bei Werten zwischen 36,2 und 37,1 Grad Celsius.

Die Messwerte lagen in der Hellphase etwas niedriger als in der Dunkelphase.

Ab dem Minimum um 06.00 Uhr lagen sie an den nachfolgenden Zeitpunkten bis 20.00 Uhr zunehmend höher und verblieben dann auf diesem Niveau mit dem Maximalwert um 02.00 Uhr. Danach konnte zwischen 04.00 und 06.00 Uhr ein deutlicherer Abfall in der Temperatur gemessen werden.

Unter Rolipram konnten Unterschiede zwischen den Beleuchtungsphasen beobachtet werden.

Der zu allen Zeitpunkten deutlich ausgeprägte Abfall der KT war in der Hellphase größer als in der Dunkelphase. Er war zu allen Zeitpunkten statistisch signifikant.

Zwischen den höchsten Temperaturwerten von 34 Grad Celsius zu Beginn und Ende der Hellphase lagen zu den übrigen Zeitpunkten die Messwerte nur noch bei etwa 33,5 Grad Celsius.

In der Dunkelphase lagen sie zu Beginn schon bei 34,8 Grad Celsius. Sie stiegen zum Maximum um 20.00 Uhr auf 35 Grad Celsius an, um dann bis zum Zeitpunkt 04.00 Uhr wieder jeweils niedriger zu liegen und bis auf 34,2 Grad Celsius zurückzugehen. (Abbildung 34)

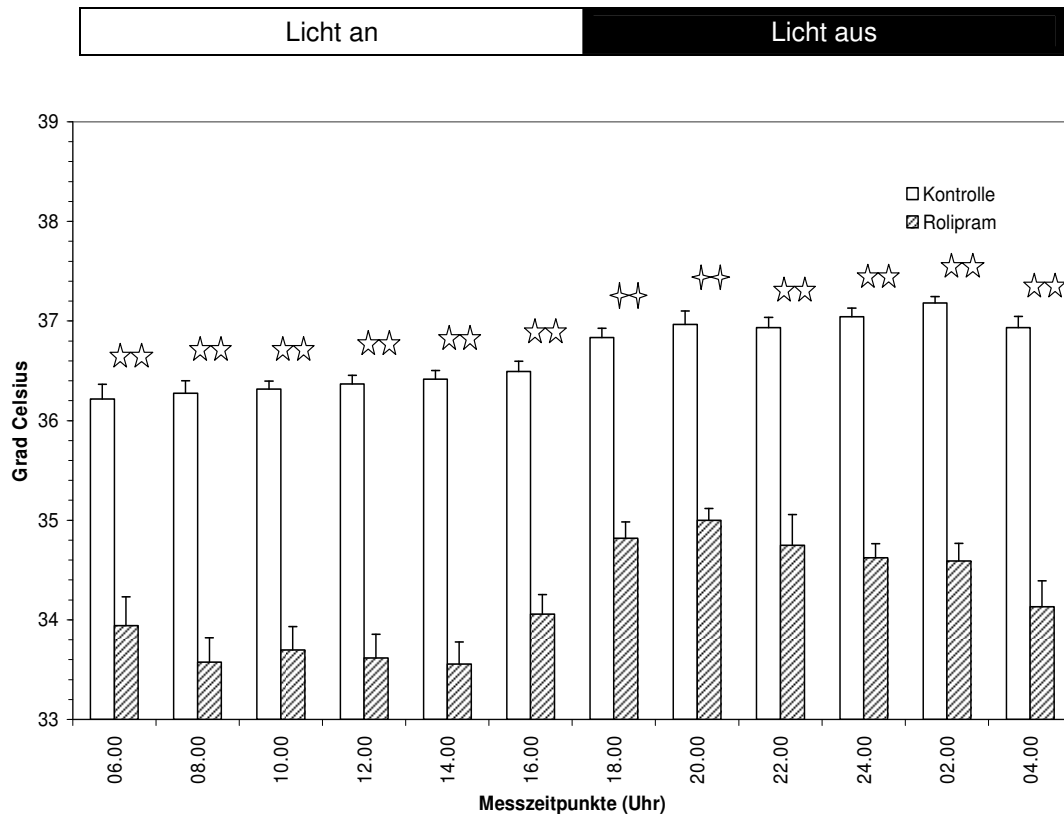


Abb. 34: Hauptversuch Teil 2

Körpertemperatur bei Ratten zu verschiedenen Tageszeitpunkten und unterschiedlichen Lichtbedingungen 75 Minuten nach einmaliger intraperitonealer (i.p.) Behandlung mit Rolipram (2.5 mg/kg) bzw. Vehikel (Kontrolle).

Pro Tageszeitpunkt wurden jeweils 24 Tiere eingesetzt und nach Zufallskriterien den 2 Behandlungsgruppen zugeordnet (n = 12 Tiere Rolipram i.p.; n = 12 Tiere Vehikel i.p.).

Die Körpertemperatur wurde mittels einer rektal eingeführten Thermosonde gemessen.

Dargestellt sind die Mittelwerte mit S.E.M.

(Signifikanzniveau: ☆☆ / ☆☆☆ = $p < 0.01$;
t-Test (☆☆) bzw. Welch-Test (☆☆))

Diskussion

Beleuchtung

Beleuchtungsversuch

Für die Bewertung der unterschiedlichen Lichtregime werden die Zeitpunkte ab Beginn der trainierten L-Phase für die Verhaltensparameter zusammengefasst betrachtet. Es wird auf die jeweiligen Besonderheiten dabei gesondert eingegangen.

Zur Beschreibung der Aktivitätsparameter wird unabhängig von ihrer Zuordnung zu verschiedenen Kategorien auf das gemeinsame Muster der Nicht-Aktivität, das SL, zuerst eingegangen. Der Parameter SL ist bei den Kontroll-Ratten der Hauptversuche in L höher als in D; in D findet sich lediglich ein zusätzlicher Gipfel in der Mitte der D-Phase, was aber in Untersuchungen an verschiedenen Rattenstämmen bereits beschrieben wurde (Wollnik 1991). Beim explorativen Verhalten ist bei den Kontrollen der Hauptversuche bei den Parametern SN und DI der L/D-Unterschied erkennbar.

Die Vorverlegung des Beginns der L-Phase mit „Licht an“ um 04.00 Uhr entspricht einem klassischen „Phase advance“ aus der Chronobiologie. In Folge wird die Induktion von Inaktivität und Schlaf bei der nachtaktiven Ratte erwartet (Korf, von Gall, Stehle 2003).

Im Beleuchtungsversuch zeigt sich bei den Kontrolltieren, dass durch „Licht an“ SL induziert und DI deutlich mehr als SN verringert wird. Unter „rot“ wird allerdings keine Abnahme von SL wie in der D-Phase beobachtet. Es besteht die Möglichkeit, dass die Tiere durch ihren Aufenthalt in einem weiß beleuchteten Raum bis zum Versuchsbeginn in den verbleibenden ca. 20 Minuten unter der farbigen Beleuchtung bis zum Beginn der Verhaltensuntersuchung sich nicht auf die spezifischen Helligkeiten im Versuchsraum einstellen können. Die Induktion von Verhalten der D-Phase ist somit bei sechs Stunden „Licht an“ nicht mehr möglich. Das wird mit den Parametern SN und DI unterstützt, da deren erwarteter niedrigerer Messwerte mit den gleichen Häufigkeiten wie unter weißer Beleuchtung zum jeweiligen Zeitpunkt gemessen werden. Beim „Phase advance“ um 04.00 Uhr ist die Verringerung der motorischen Aktivität am stärksten ausgeprägt. Die Häufigkeiten zu den Parametern für Inaktivität/Schlaf sind außer bei „Rot“ geringer als in den Hauptversuchen. Unter „Rot“ bleibt es bei der sonst zu diesem Zeitpunkt typischen Verteilung von Aktivität und Schlafen.

Auch wenn damit die Lichtfarben zu diesen Zeitpunkten in der L-Phase keine Effekte auslösen, die unter „Licht an“ zu erwarten sind (Steigerung von SL), liegen diese Häufigkeiten immer noch deutlich über den geringen SL-Werten wie in der zweiten Hälfte der D-Phase. Die Lichtfarben haben somit auf das Verhalten aufgrund ihrer eigenen Wirkung wie „Licht an“ keine dominanten Effekte wie unter „Licht aus“, zeigen aber, dass durch die zunehmenden Zeitdauern von „Licht an“ bis zum Beginn der jeweiligen Untersuchung, selbst unter der am ehesten als D wahrgenommenen Lichtfarbe „Rot“, kein besonderer Einfluss mehr auf das Verhalten beobachtet werden kann. Das bedeutet aber auch, dass unter „Rot“ keine Unterbrechung des bereits induzierten Verhaltens in der L-Phase mehr erreicht werden kann. Es kommt im Gegensatz zur D-Phase lediglich zur Verringerung bei explorativen Parametern wie SN, DI, SCR wie unter „Licht an“ zu erwarten.

Unter Rolipram treten SL ebenso wie DI im Beleuchtungsversuch fast nicht auf, bei SN liegen die Werte noch unter denen von Hauptversuch Teil 1. Das damit fast völlige Fehlen von explorativem Verhalten wird ergänzt durch einen fehlenden Parameter des Pflegeverhaltens - SCR. Bei dem Parameter PT ist lediglich unter „Blau“ mit Rolipram eine Erhöhung der Häufigkeit zu sehen. Da in der L-Phase sexuelles Verhalten von männlichen Ratten durch den SCN gehemmt werden kann (Södersten, Hansen, Srebro 1981), wird unter der blauen Beleuchtung diese Hemmung möglicherweise durch die Induktion von Afferenzen über die Cryptochrome zum SCN verringert und so PT damit auslösbar sein.

Bei den Parametern des induzierten Verhaltens hat GR als Pflegeverhalten einen speziellen Status, da es zusätzlich zum durch Rolipram ausgelösten Verhaltenssyndrom gehört. Bei den Kontrolltieren ist keine Veränderung durch die farbige Beleuchtung zu erkennen, auch unter Rolipram liegen die Häufigkeiten in den Bereichen wie unter der entsprechenden Beleuchtung zum gleichen Zeitpunkt in den Hauptversuchen.

Bei den beiden übrigen Parametern des Rolipram-Verhaltenssyndroms - FPS und HTW - bewirkt „Licht an“ (04.00 Uhr) eine Erhöhung wie zum Zeitpunkt 06.00 Uhr.

Bei FPS bleiben die Häufigkeiten bei den Beleuchtungsfarben wie unter L höher als in der D-Phase, so dass unter der farbigen Beleuchtung kein Unterschied gegenüber einer weißen Beleuchtung erkennbar ist.

Bei den HTW differiert dies in Abhängigkeit von der Beleuchtungsfarbe. Um 04.00 Uhr ist die Induktion von HTW so hoch wie unter L, so dass hier „Licht an“ sofort zu einer Wirkung führt. Unter Rolipram kommt es nach dem regulären Lichtwechsel um 06.00 Uhr bei „Gelb“ zu keiner Veränderung bei der Anzahl der HTW, sie liegen etwa so hoch wie direkt nach dem Lichtwechsel beobachtet. Um 08.00 Uhr unter „Grün“ werden mindestens Werte wie unter weißem Licht zum selben Zeitpunkt erreicht, auch wenn die Werte aus den Hauptversuchen Teile 1 und 2 um ein Viertel differieren. Unter „Blau“ (08.00 Uhr) und „Rot“ (12.00 Uhr) liegen die Messwerte auf der Höhe wie in der D-Phase zu den entsprechenden Zeitpunkten 20.00 und 24.00 Uhr und damit deutlich unter den Werten in der L-Phase zu diesen Zeitpunkten.

Bei den HTW scheinen damit neben dem „Phase advance“ Effekt nur „Gelb“ und „Grün“ wie „Licht an“ zu wirken.

Wenn „Rot“ hier im Gegensatz zum Effekt bei spontanem Verhalten wie D wahrgenommen wird, zeigt das hier eine kurzfristige Induzierbarkeit durch eine mögliche Beeinflussung der Regelkreise in der Epiphyse, so wie es für die AA-NAT bereits beschrieben wurde (Wang, Du, Tong 2007). Für „Blau“ ist dies überraschend, da über die Cryptochrome bei diesen Wellenlängen ein Effekt wie Tageslicht erwartet werden konnte (Miyamoto, Sancar 1998, Thompson, Sancar 2002). „Blau“ könnte somit hemmend einwirken auf die Aktivierung adrenerger Systeme durch Rolipram, so dass der eigentlich steigernde Effekt, wie unter Tageslicht zu diesem Zeitpunkt zu erwarten, aufgrund der zusätzlichen „Blau“-Wirkung auf die lichtverarbeitenden Regelkreise aufgehoben wird. Dies könnte der beschriebenen Wirkung auf die Induktion von PT entsprechen, das auch durch eine Induktion des SCN verstärkt worden sein kann.

Diese Ergebnisse zur Untersuchung von Tieren in der D-Phase unterstützen eher noch die Wahl einer roten Beleuchtung als D-Phasenbeleuchtung.

Bei COR und Glukose sind keine Beeinflussungen unter den unterschiedlichen Lichtfarben sowohl im Vergleich zu weißem Licht zum selben Zeitpunkt, als auch zu den korrespondierenden Zeitpunkten in der D-Phase zu erkennen. Eine besondere Beeinflussbarkeit der HPA-Achse ist in dieser Anordnung von veränderten Lichtfarben somit weitgehend auszuschließen.

Corticosteron

Hauptversuch Teil 1 und 2

Durch in vivo und in vitro durchgeführte Untersuchungen an Nagern ist bekannt, dass Rolipram verschiedene Ebenen der LHPA-Achse stimulieren kann (Kumari et al. 1997, Lim, Shipston, Antoni 2002, Lee et al. 2004). Hier kann gezeigt werden, dass es unter Rolipram zu allen Tageszeiten und damit Aktivitätsphasen zu einer Erhöhung der COR-Konzentrationen kommt. Werden Ratten Stress ausgesetzt, ist der höchste Anstieg von COR in der Talphase in der zweiten Nachthälfte zu erwarten (Dunn, Scheving, Millet 1972). Da keine Steigerung der COR-Konzentrationen beobachtet werden kann, erscheint keine besondere stressogene Belastung der Tiere vorgelegen zu haben. Damit ist möglich, dass der durch die Untersuchung möglicherweise trotzdem vorhandene stressende Effekt durch Handling der Tiere und Dekapitation keine erkennbaren Auswirkungen hat.

Nur in Hauptversuch Teil 1 sind zu verschiedenen Zeitpunkten die Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen geringer: der Anstieg zum Zeitpunkt 14.00 Uhr ist nicht mehr signifikant, an den beiden nachfolgenden Zeitpunkten 16.00 Uhr und 18.00 Uhr, aber auch um 22.00 Uhr und 04.00 Uhr sind die Signifikanzniveaus geringer. An den Zeitpunkten, zu denen sich die motorische Aktivität der Versuchstiere physiologischerweise erhöht, kann die zugrundeliegende Steigerung der NA-ergen Aktivität das Ausmaß der Rolipramwirkung verringern. Das kann mit der beginnenden Steigerung der motorischen Aktivität zu diesem Zeitpunkt zusammenhängen, die durch eine Steigerung der NA-ergen Aktivität z. B. im LC verursacht ist. Das NA-erge System wirkt über Fasern direkt auf die LHP-Achse ein (Nemeroff 1988) und kann über eine Stimulation des vegetativen (sympathischen) Systems die CRH-Sekretion verstärken. Außerdem kann über die Verbindung des Hypothalamus zum LC das SAM aktiviert werden und eine periphere Antwort mit Erhöhung der COR-Konzentrationen auslösen.

Über β -adrenerge Rezeptoren kann Rolipram zusätzlich direkt an den corticotropen Zellen der Hypophyse eine AC-gekoppelte oder durch eine spezifische PDE 4-Hemmung hervorgerufene Steigerung der cAMP-Konzentration erreichen (Boutillier 1994, Koch, Lutz-Bucher 1989, Hadley, Flack, Buckingham 1993), so dass bei gleichbleibender Reaktivität dieses Systems eine gleichstarke, beleuchtungsunabhängige Erhöhung der ACTH-Ausschüttung und damit der COR-Konzentrationen bewirkt werden kann. Das bestätigt die von Kumari et al. 1997 in vitro und in vivo an Ratten gezeigte Aktivierung der HPA-Achse durch selektive PDE 4-Hemmer, die innerhalb von 20 Minuten zu einem Anstieg von COR führt.

Die Aktivierung sogenannter Uhrengene und ihrer Proteine wie PER1, PER2 und CRY1, die dem D/L-Rhythmus folgen, wird bei Nagern auch über Transkriptionsfaktoren reguliert, die ihrerseits durch CREB-Phosphorylierung aktiviert werden. Die Wirkung von Rolipram auf diese Faktoren über seine cAMP-Wirkung erlaubt die Schlussfolgerung, dass die durch sie gesteuerten tageszeitlichen Variationen bei COR und KT stimuliert werden können (Richter et al. 2004) und so zu einer generellen Erhöhung bzw. Absenkung durch Rolipram führen, ohne dass die tageszeitlichen Differenzen wesentlich verändert werden.

Für eine Aussage über einen eventuell vorhandenen circadianen Rhythmus der LHPA-Achse sind nicht genügend Messpunkte vorhanden. COR wird episodisch sezerniert, so dass die hier vorhandenen Abstände der Messungen erwartungsgemäß zu groß sind (Moore-Ede, Sulzman, Fuller 1982). Der Gipfel der COR-Konzentrationen wäre dazu in der zweiten Hälfte der L-Phase zu erwarten, wenige Stunden vor Beginn der Aktivitätsperiode (Krieger: Rhythms in CRF, ACTH and corticosteroids in Krieger (Hrsg.): Endocrine Rhythms, Comprehensive Endocrinology Series 1979), der hier aber nicht deutlich ausgeprägt vorhanden ist.

Durch die Aktivierung der LHP-Achse über eine gesteigerte intrazelluläre cAMP-Konzentration besteht außerdem die Möglichkeit der Nachahmung der Wirkung von CRH auf das Verhalten von Ratten. Die unter Rolipram beobachtete Steigerung einzelner Aktivitäten, die primär dem typischen Verhaltenssyndrom unter Rolipram zugerechnet werden, könnte in diesem Zusammenhang eine neue Bedeutung erhalten. Bei GR findet sich zu allen Zeitpunkten eine Steigerung gegenüber den Kontrollen. GR wird von Koob und Bloom 1985 als ein Parameter des „general arousal“ und von Holsboer 2003 als eine Wirkung nach CRH-Administration genannt. Damit entsteht die Frage, ob diese Verhaltenseffekte über eine Beeinflussung der LHPA-Achse, z.B. über den CRH-R1 moduliert werden können. Dieser Aspekt soll daher unter dem Abschnitt Verhalten diskutiert werden.

Beleuchtungsversuch und COR

Die Vorverlegung des Beginns der L-Phase mit Licht an um 04.00 Uhr entspricht einem klassischen „Phase advance“ aus der Chronobiologie. In Folge wird die Induktion von Inaktivität und Schlaf bei der nachtaktiven Ratte erwartet (Korf, von Gall, Stehle 2003).

Zugleich ist zu erwarten, dass sich bei den Tieren der Kontrollgruppe entsprechend der abnehmenden motorischen Aktivität die COR-Konzentrationen in einem niedrigeren Bereich befinden als während der Aktivitätsphase. Unter den tageszeitlich nachfolgenden Farben sollte durch die Rezeption von „Gelb“ und „Grün“ wie „Licht an“ die Konzentration niedrig bleiben, da Lichtpulse während des subjektiven Tages keinen Einfluss auf die Phasenlage der Aktivität haben (Korf, von Gall, Stehle 2003). Lediglich unter „Blau“ kann durch die besondere Empfindlichkeit der Cryptochrome eine Induktion der HPA-Achse möglich sein. Für „Rot“ wird bei Inaktivität der Tiere keine Veränderung gegenüber den L-Werten erwartet.

Ein deutlicher Hinweis auf eine tageszeitlich abhängige Schwankung von COR findet sich zu den Zeitpunkten 04.00 Uhr und 06.00 Uhr. Nach Beginn der L-Phase sinkt die COR-Konzentration der Kontrolltiere ab. Nach Vorverlegen dieses Beginns zeigt COR im Beleuchtungsversuch bei den Kontrolltieren um 04.00 Uhr auch eine Abnahme wie bei Hauptversuch Teil 1 um 06.00 Uhr. Rolipram kann aber um 06.00 Uhr im Beleuchtungsversuch einen Anstieg wie unter „Licht an“ erzeugen. An den folgenden Zeitpunkten ist zwischen Beleuchtungs- und Hauptversuch bei beiden Behandlungen jeweils kein Unterschied in derselben Behandlungsgruppe mehr festzustellen.

Dabei kann die bereits in der L-Phase verbrachte Zeit der Tiere vor Injektion ab 06.00 Uhr eine Abnahme der COR-Konzentration auf das Niveau in der ersten Hälfte der L-Phase bewirkt haben, die unter der experimentellen Situation innerhalb der kurzen Zeit (noch) nicht zu einem Anstieg geführt hat. Die direkte Regulation innerhalb der LHP-Achse könnte aber auch durch einen überlagernden Effekt des SCN als primären Schrittmacher bedingt sein, da die COR-Konzentrationen sich wie in der L-Phase darstellen (Moore-Ede, Sulzman, Fuller 1982). Die Beleuchtungsfarbe „Rot“ in der D-Phase hat unter diesen möglichen Einschränkungen auch bei COR keinen Einfluss auf die Konzentrationen.

Glukose

Hauptversuch Teile 1 und 2

Durch die Behandlung mit Rolipram kommt es zu fast allen Zeitpunkten (in jeder Serie ist zu einem Zeitpunkt kein signifikanter Unterschied mehr vorhanden) zu einer durchschnittlichen Erhöhung um 20-40 mg/ dl.

Dass Glukosekonzentrationen bei Rattenstämmen stark unterschiedlich sein können, zeigen auch hier die Daten der Kontrolltiere. Starke tageszeitliche Schwankungen sind bei Werten von 140 ± 10 mg/ dl bei den Kontrolltieren nicht gemessen worden, sie liegen im Bereich der Studien von Jolin und Montes 1973 und Strubbe et al. 1987. Damit kann nicht von einer Erhöhung durch die Versuchsanordnung ausgegangen werden. Auch eine mögliche Irritation der Tiere durch das Umsetzen in eine Transportbox bis zur Dekapitation kann zwar nicht völlig ausgeschlossen werden, dürfte aber nach den vorliegenden Ergebnissen gering ausgeprägt sein.

Eine i.p. Kontrollinjektion kann bei WISTAR-Ratten nach einer Stunde eine Erhöhung der Blutglukosekonzentration um bis zu 30 mg/dl auslösen (Strubelt 1969). Die hier durchgeführten Injektionen lassen zwar bei allen Kontrolltieren eine Erhöhung der Glukosekonzentrationen möglich erscheinen, aber eine besondere Beeinflussung zu einzelnen Zeitpunkten findet sich nicht. Außerdem kann aufgrund der oben zitierten Studien eine Belastung als ebenfalls eher gering eingestuft werden.

Da sich die Versuchskäfige für die Verhaltensbeobachtung im Raum befanden, in dem die Tiere bis zum Versuch untergebracht waren, ist aus einer ähnlichen Untersuchung an Sprague-Dawley Ratten bekannt, dass COR um bis zu 15 mg/dl ansteigen und Glukose eine mittlere Konzentration von 120 mg/dl im Blut aufweisen kann (Flaherty, Rowan, Pohorecky 1986). Auch durch diese Ergebnisse kann ein möglicher stressogener Effekt auf diese Parameter als gering ausgeprägt eingeschätzt werden.

Die durch unspezifische PDE-Hemmer beschriebene Erhöhung der Blutglukosekonzentrationen (Strubelt 1969, LeBlanc et al. 1985) führt innerhalb einer Stunde zu einem ähnlichen Ergebnis. Da es unwahrscheinlich ist, dass Rolipram als PDE 4-Hemmer an der β - Zelle des Pankreas eine hemmende Wirkung in der hier verwendeten Dosis auf die dort nachgewiesenen PDE 3 hat, muss ein weiterer Effekt die Erhöhung der Blutglukosekonzentrationen bewirken.

Das kann einerseits eine auf die PDE 3 wirkende Substanz sein oder andererseits Transmitter wie Katecholamine. Da aber Katecholamine an der β - Zelle des Pankreas nur die glukose-induzierte Insulinfreisetzung modulieren (Doherty, Clark 1994), besteht eher die Möglichkeit einer Wirkung von Katecholaminen an dem zweiten Erfolgsorgan des Glukosestoffwechsels, der Leber (Kalsbeek et al. 2004). Dort ist aber die Vermittlung der Signale des sympathischen Nervensystems cAMP-unabhängig (Exton 1987, Pilkis, Claus, Raafat El-Maghrabi 1988). Da auch dort keine PDE 4 die Regulation beeinflussen kann, besteht lediglich die Möglichkeit der Steigerung der Glukoneogenese durch Glukokortikoide. PDE-Hemmer können über eine Aktivierung des sympathischen Nervensystems mit Ausschüttung von Adrenalin eine Hyperglykämie bewirken, die über β -adrenerge Rezeptoren vermittelt wird (Strubelt 1969, LeBlanc et al. 1985). Zentral wird durch Adrenalin zusätzlich die HPA-Achse aktiviert und COR ausgeschüttet. COR bewirkt eine Hyperglykämie in der Ratte, die durch Hemmung der Ausschüttung von Adrenalin aus dem NNM durch ein Somatostatinanalogon verhindert werden kann (Rothwell 1990). Rolipram kann in deutlichem Ausmaß die Regelkreise aktivieren, die

peripher die COR-Konzentrationen erhöhen, so dass damit sowohl in der Leber die Glukoneogenese, als auch in der β - Zelle des Pankreas über die Hemmung der Insulinfreisetzung mit der fehlenden Aktivierung durch eine Phosphorylierung ein hyperglykämischer Zustand bewirkt werden kann.

Da kein Reiz zur Steigerung der Insulinsekretion erfolgt, kommt es nicht zu der ganzen Kaskade mit der Freisetzung von IGF-1 (Zhao et al. 1997) und der Steigerung der Insulinsekretion aus den Inselzellen mit dem Resultat, dass eine Hyperglykämie erhalten bleibt. Vor allem bei den hier vorliegenden leicht hyperglykämischen Werten erscheint diese Regulation als wichtigste Erklärung für die Rolipramwirkung (Zhao et al 1997, Shafiee-Nick, Pyne, Furman 1995).

Beleuchtungsversuch

Die Veränderungen des Beleuchtungsregimes haben keinen Einfluss auf die Blutglukosekonzentrationen. Die Stimulation durch COR hat zu den untersuchten Zeitpunkten eine etwa gleich starke Steigerung der Glukosekonzentrationen zur Folge, die unterschiedlichen Farben wirken sich nicht aus. Damit ist auch für Glukose kein besonderer Einfluss durch die Lichtfarbe „Rot“ nachzuweisen.

Melatonin

Um den Einfluss der Beleuchtung auf die Konzentrationen von MEL einzuschätzen, ist die Bewertung der gewählten Beleuchtungsfarbe „rot“ erforderlich. Für MEL liegt mit der Arbeit von Lynch, Wurtman, Ronsheim 1982 bereits ein Ergebnis zu Beleuchtungsregimen vor. Ratten zeigen danach unter einer simulierten Nachtbeleuchtung wie in einer Vollmondnacht das gleiche Verhalten bei Futter-, Wasseraufnahme und motorischer Aktivität wie Tiere in kompletter Dunkelheit und haben in der D-Phase entsprechend höhere MEL-Werte als in der L-Phase. In der L-Phase fallen die Werte auch bei einer komplett abgedunkelten Schlafhöhle auf Werte wie bei Tieren in normalen Laborkäfigen ohne Lichtschutz.

Somit erscheint es möglich, dass unter einer roten Beleuchtung, die auch in der Literatur für Versuche zu MEL in D-Phasen eingesetzt worden ist, keine Hemmung der MEL-Sekretion erfolgt (Redman, Armstrong, Ng 1983 in Evered, Clark (Hrsg.): *Photoperiodism, melatonin and the pineal* 1985). Dies ist erforderlich, um wie bereits bei Boulos und Terman 1979 beschrieben, gedämpftes rotes Licht als konstante Dunkelheit zur Beobachtung von Verhalten einsetzen zu können. Bei einer Untersuchung von männlichen Schafen wurde in der D-Phase eine rote 15W Leuchte verwendet, bei der die Tiere Nahrung aufnehmen und Blutproben entnommen werden konnten. Darunter bleibt ein etablierter MEL-Rhythmus erhalten, Veränderungen beruhen nur auf der Verschiebung von LD-Anteilen (Lincoln, Ebling, Almeida: *Generation of melatonin rhythms in Evered, Clark (Hrsg.): Photoperiodism, melatonin and the pineal* 1985). Weiße Lichtpulse von einer Minute Dauer in der D-Phase reichen aus, um die MEL-Produktion nachhaltig zu unterdrücken (Illnerova, Vanecek 1982). Unter Verwendung der hier gewählten roten Beleuchtung kann eine Unterdrückung der MEL-Produktion durch dieses Licht am Versuchsplatz in der D-Phase und die helle Raumbeleuchtung bei der Dekapitation zur Probengewinnung auch nach Verlassen des Versuchsraums ausgeschlossen werden, da in der D-Phase durchgehend höhere MEL-Werten als in der L-Phase gemessen wurden.

Damit können Effekte durch das Öffnen der Labortür zum beleuchteten Laborgang, der Transport der Tiere in den Raum mit der hellen Arbeitsbeleuchtung zur Dekapitation weitgehend ausgeschlossen werden (Evered, Clark (Hrsg.): *Photoperiodism, melatonin and the pineal* 1985).

Außerdem erscheint die Abdeckung der Transportkiste der Tiere zum Transport erfolgreich gewesen zu sein. Die Steuerung zur Bildung des Melatonins ist wie bei Tieren unter einem 12:12 LD-Rhythmus erhalten geblieben.

Zusätzlich war auszuschließen, dass die vor Versuchsbeginn erfolgte Injektionsbehandlung bei den Tieren Einfluss auf die MEL-Konzentrationen hat. Zwar beeinflusst eine Injektionsbehandlung einen bestehenden MEL-Rhythmus nicht, aber zum D/L-Übergang sind Ratten empfänglich durch Beeinflussung mit Handling, Injektionen oder einem chemischen Inhaltsstoff der Trägerlösung, die dann auch die MEL-Konzentrationen verändern können (Lincoln, Ebling, Almeida: *Generation of melatonin rhythms in Evered, Clark (Hrsg.): Photoperiodism, melatonin and the pineal* 1985).

Aufgrund der erhalten gebliebenen D/L-Unterschiede bei den MEL-Konzentrationen zu den Lichtwechseln sind mögliche Beeinflussungen im Umgang mit den Tieren in der Versuchssituation weitgehend auszuschließen.

Ein weiterer Einfluss auf die MEL-Konzentrationen liegt in der Entwicklung von biologischen Rhythmen bei Ratten in Abhängigkeit vom Lebensalter. In der Zeit zwischen 30 bis 60 Tagen Lebensalter hat sich bei Ratten ein gut organisierter tageszeitlicher Verhaltensablauf entwickelt (Draper 1967), zu dem auch die vollständige Entwicklung eines circadianen Rhythmus bei Tieren älter als 35 Tagen gehört (Frowein, Lapin 1979, Niesink, van Ree 1982, Klein: *Circadian*

Rhythms in the pineal gland in Krieger: *Endocrine Rhythms* 1979).

Bei den hier untersuchten Ratten lag das Alter der untersuchten Tiere mit über 35 Tagen über diesem Zeitraum, so dass von einem voll entwickelten, tageszeitlich organisierten Verhalten ausgegangen, ein entwickelter circadianer Rhythmus wie bei ausgewachsenen Tieren erwartet und eine Beeinflussung durch das Alter der Tiere ausgeschlossen werden kann.

Der Beginn einer L-Periode supprimiert die MEL-Sekretion. Bei den hier untersuchten Ratten bestätigen sich beide Effekte der beschriebenen Beleuchtungsarten:

die weiße Beleuchtung unterdrückt die Sekretion von MEL, rotes Licht beeinflusst die Höhe der circadian typischen Konzentrationen zu den untersuchten Zeitpunkten nicht.

Dabei sind die MEL-Werte unter Rolipram in der D-Phase gegenüber den Kontrollen nicht signifikant verändert. Nur zu beiden Lichtwechseln und in der ersten Hälfte der L-Phase bewirkt Rolipram gesteigerte MEL-Konzentrationen. Damit erscheint ein MEL-Rhythmus regelrecht vorhanden zu sein und nur zu wenigen Zeitpunkten möglicherweise über die endogene Aktivierung hinaus durch cAMP-vermittelte Mechanismen oder den MT2 Rezeptor weiter zu steigern zu sein (Dubocovich et al. 2003). Es kann auch durch eine Aktivierung von MT1 Rezeptoren zu einer MEL-eigenen Hemmung seiner Konzentrationen gekommen sein, so dass die Aktivierung von NA-ergen/cAMP-abhängigen Mechanismen durch Rolipram eher einen hemmenden Effekt auf die MEL-Konzentrationen gehabt hätte (von Gall et al. 2000). Dieser Effekt kann auch durch die Induktion von ICER erfolgen (Engel et al. 2004, Koch et al. 2003).

Bei den Kontrolltieren ist nach der Induktionsphase der MEL-Bildung zu Beginn der D-Phase ein Anstieg der Konzentrationen noch nicht erfolgt (Romero, Zatz, Axelrod 1975a), in der bereits durch Rolipram nach dem Lichtwechsel zu D die adrenerge Stimulation an der Epiphyse wirksam ist.

Danach erfolgt bei beiden Gruppen der Anstieg der Serumkonzentrationen zu zwei Maxima in der D-Phase (Perreaux-Lenz et al. 2004), ohne dass bei der dann maximalen Stimulation des Systems noch eine weitere Steigerung durch einen adrenerg vermittelten Stimulus wie durch Rolipram erfolgt. Das ändert sich erst wieder unter der Suppression der MEL-Bildung und -Sekretion durch die Raumbelichtung und den zugrunde liegenden Regelkreisen (Hastings, Maywood, Neill 2007).

Durch sogenannte transcriptional/post-translational feedback loops (TTFL), durch die bereits vor „Licht an“ die Sekretion von MEL abnimmt, wird dies zum Zeitpunkt 04.00 Uhr bei den Kontrolltieren sichtbar und die vorwiegend adrenerg vermittelte Stimulation durch Rolipram bewirkt hier einen signifikanten Unterschied. Dieser Effekt ist bis zur Mitte der L-Phase zu beobachten. Eine Ursache für diesen Effekt könnte die anhaltende Stimulierung der AA-NAT sein, wenn Rolipram via CREB durch cAMP-vermittelte Stimulierung der Transkription die Bildung des Enzyms aufrechterhält (Korf, von Gall, Stehle 2003).

Damit kann Rolipram zu einzelnen Zeitpunkten eine Induzierbarkeit der MEL-Sekretion bewirken und es damit bei aufeinanderfolgenden Zeitpunkten wie eine Verlängerung der D-Phase erscheinen, da aufgrund der Effekte über die Uhrengene eine Induktion der AA-NAT angenommen wird (Simonneaux et al. 2004, Masumoto et al. 2003). Die beschriebene NA-cAMP-stimulierte Hemmung des AA-NAT-Abbaus durch Rolipram wirkt sich nur in einem tageszeitlichen Abschnitt aus, in dem diese Hemmung nicht maximal ausgeprägt ist (ab Mitte der L-Phase und in der Mitte der D-Phase) (Vollrath 2002, Schomerus et al. 2000). Darüber hinaus kann Rolipram durch Stimulation des SAM einen adrenergen Input zur Epiphyse generieren, der dann die MEL-Sekretion induziert (Kim et al. 2005). Allerdings weicht diese Aktivierung von bisherigen Ergebnissen zur AA-NAT-Induzierbarkeit durch adrenerge Stimuli ab, weil dort die Photoperiode nicht die Stärke der cAMP-Antwort beeinflusst hat (Engel et al. 2004).

Andererseits wird die AA-NAT Induktion durch die in der „Feedback loop“ gebildeten ICER-Proteine zum Ende der D-Phase verringert (Foulkes et al.: *Rhythmic transcription: the molecular*

basis of oscillatory melatonin synthesis in Veldhuis (Hrsg.): Mechanisms and biological significance in pulsatile hormone secretion, 2000), was aber hier möglicherweise durch die Wirkung von Rolipram seinerseits abgeschwächt wird. Damit bleibt dann die adrenerge Stimulation der MEL-Bildung noch zu den nachfolgenden Zeitpunkten erhalten, so dass sich ab 04.00 Uhr signifikant erhöhte MEL-Konzentrationen messen lassen.

Dabei lässt sich in dieser Untersuchung nicht eindeutig klären, ob eine auch circadian vermittelte lichtabhängige Verhaltensantwort ausgelöst wird. Es ist nicht eindeutig klar, ob diese Effekte nur einer adrenergen Stimulation zuzurechnen sind oder durch die gezielte Induktion von POMC-Peptiden (Al Dujaili et al. 1981, Estivariz et al. 1982), die eine ACTH-Wirkung verstärken, entstehen. Entstehen könnten sie auch durch die verlängert andauernde Bildung von Uhrengenen wie *Per1* und *Cry2*, die über die cAMP-Anreicherung eine Steigerung der MEL-Bildung - auch durch Stabilisierung der AA-NAT - bewirken (Schomerus et al. 2000, Engel et al. 2004).

Diese Verlängerung der Induktivität der sonst zu Beginn der L-Phase via SCN supprimierten MEL-Bildung kann ein Versuch zur Erklärung der signifikant erhöhten MEL-Konzentrationen unter Rolipram sein (Simonneaux et al. 2004, Dubocovich et al. 2003, Hastings, Maywood, Neill 2007). Hinweise dafür geben die durch Rolipram cAMP-vermittelte Expression von CREB (Nibuya, Nestler, Duman 1996), die die *Per1* Genexpression zur Erhöhung der MEL-Bildung steigert (Masumoto et al. 2003, Simonneaux et al. 2004) oder die Verschiebung von circadianen Rhythmen über den MT2 Rezeptor zu den LD-Wechseln bewirkt (Dubocovich et al. 2003). Dadurch könnten dann noch bis in die erste Hälfte der L-Phase, aber auch schon zu Beginn der D-Phase die MEL-Konzentrationen gegenüber den Kontrolltieren ansteigen.

Falls durch Rolipram in der ersten Hälfte der L-Phase eine Steigerung der MEL-Konzentration möglich ist und die damit verknüpfte Auslösung des Rolipram-typischen Verhaltens ebenfalls adrenerg vermittelt ist, könnte beides über eine zugrundeliegende Stimulation zweier tageszeitlich abhängiger, gekoppelter Systeme erfolgen. Vom rolipramtypischen Verhalten fügen sich aber dabei bestenfalls nur HTW in diesen Regulationsmechanismus ein. FPS und GR lassen sich in der Art der Stimulation durch Rolipram auch unter diesem Aspekt als Verhaltensparameter abgrenzen.

Wenn eine positive Beeinflussung der Ausprägung einer Depression durch Substanzen bekannt ist, die die MEL-Konzentrationen im Serum erhöhen, und eine Phasenverschiebung mit einer verlängerten Induktion durch Rolipram in der Ruhephase in der Ratte gezeigt worden ist, könnte dies bei entsprechender Übertragung der Ergebnisse auf den Menschen ein Anzeichen für die gewünschte Verzögerung von circadianen Rhythmen bei Depressiven sein, durch die wieder eine regelrechte Phasenlage entstehen kann. Grundlage erhält dies durch die Nachweise von Vecsey et al. 2009 und Smith et al. 2008 in Tiermodellen *in vivo* auch für Alzheimer Erkrankungen, da bei circadianen Rhythmusstörungen mit verringerter Gedächtnisleistung ursächliche Effekte der gesteigerten PDE4 Aktivität durch Rolipram aufgehoben werden können.

Verhalten

Bei der Untersuchung von Verhaltensparametern gilt das erste Interesse der Darstellung der Verhaltensparameter, die bei den als Kontrollen untersuchten Tieren aufgetreten sind. Dabei wird auch bei dieser Versuchsanordnung davon ausgegangen, dass die Verteilung der Aktivität der als nachtaktiv beschriebenen Labormaus sich in den hier im Abstand von zwei Stunden untersuchten Einzelgruppen nicht grundlegend vom Verhalten bei kontinuierlicher Beobachtung unterscheidet. Der Versuchsablauf ist so gewählt, dass die Manipulation der Tiere durch Umsetzen und Injektionen mehr als 15 Minuten vor Beginn der eigentlichen Verhaltensbeobachtung abgeschlossen ist. Damit sind die möglichen störenden, weil aktivierenden Effekte z.B. auf GR (da in beiden Gruppen beobachtbar) dann abgeklungen und es werden die für die untersuchte Tageszeit üblichen Häufigkeiten gefunden (Gispén et al. 1975, Jolles, Rompa-Barendregt, Gispén 1979a).

Bei den Kontrolltieren können daher auch die erwarteten Unterschiede zwischen L- und D-Phase beobachtet werden. Die Parameter für das explorative und residuale Verhalten (SN, DI, SCR) sind in der D-Phase - entsprechend dem erhöhten SL - erkennbar niedriger als in der L-Phase. Bei SN und SCR kann zusätzlich die verringerte Aktivität in der Mitte der D-Phase bei entsprechend gesteigertem SL gefunden werden (SL-Gipfel in der D-Phase siehe Wollnik 1991). Diese Verteilung der Verhaltensparameter entspricht damit denen bei kontinuierlicher Beobachtung. Dieses ist wesentlich festzuhalten, da hiermit die Veränderungen durch Rolipram zu den jeweiligen Zeitpunkten die Beeinflussung eines regelrechten Verhaltens darstellen und somit als verlässlich pharmakogen ausgelöst einzustufen sind.

Unter Rolipram kommt es zu allen Zeitpunkten zu einer wesentlichen Veränderung des Verhaltens. Maintenanceverhalten und exploratives Verhalten mit seinen lokomotorischen Anteilen werden zu sehr großen Anteilen durch das typische Verhalten unter Substanzwirkung ersetzt. Das geht soweit, dass sich eine Inaktivität bei den Tieren unter Rolipram nicht mehr beobachten lässt, stattdessen aber teilweise fortlaufend auftretende HTW, FPS und GR auftreten. Das in der Ruhephase der Tiere in der L-Phase auftretende SL wird durch pharmakogen induziertes Verhalten ersetzt oder unterbrochen.

Die Induktion des Verhaltenssyndroms bewirkt eine Unterdrückung oder ein Ersetzen des spontanen Verhaltensrepertoires von Labormäusen. Das explorative Verhalten, hier durch die Parameter SN und DI repräsentiert, wird auf Kosten des Rolipram-typischen Verhaltens verringert.

Das unter Rolipram beobachtete Verhaltenssyndrom mit HTW, FPS und GR tritt in beiden Lichtphasen auf.

Auch wenn in Anzahl oder Häufigkeit zum Teil deutliche Unterschiede zwischen L- und D-Phase bestehen, bleibt auch in der D-Phase immer ein typisches Verhaltensmuster zu beobachten. Das Rolipramverhalten scheint dabei aber selbst noch in zwei unterscheidbare Teile zu dissoziieren:

- die Induktion der HTW, die einem klaren lichtabhängigen Antrieb unterliegen und
- die in einer abgeschwächten Form ebenfalls lichtabhängig auftretenden FPS, die aber keiner über die L-Phase abnehmenden Induzierbarkeit unterliegen und
- das zu allen Zeitpunkten gesteigerten GR.

HTW und FPS können dann als lichtabhängig induzierbare Parameter des Rolipramverhaltens eingestuft werden, die einer Aktivierung über den RHT oder durch Aktivierung retinaler Proteine unterliegen.

Dabei erscheint auffällig, dass die Induzierbarkeit des Rolipram-Verhaltens (Anteile HTW und FPS) zu den Zeitpunkten besonders hoch ist, an denen die motorische Aktivität bei den Kontrolltieren ebenfalls hoch ist. Die Auslösung von motorischer Aktivität durch CRH kann nicht mit einer möglichen Aktivierung der LHPA-Achse anhand der COR-Konzentrationen begründet werden, da die COR-Konzentrationen zwischen L- und -D-Phase nur gering schwanken. Damit könnte die Auslösung des Verhaltens in seiner Gesamtheit eher über einen CRH-Effekt auf den SCN reguliert sein.

Die Wirkungen auf den SCN, die durch die peripher erhöhten Konzentrationen von COR angezeigt werden, sind bei der Auslösung von HTW und FPS dann besonders stark, wenn der SCN in der L-Phase durch Licht gehemmt wird.

Rolipram scheint damit entweder einen aktivierenden Einfluss auf die Ratten auszuüben oder durch seine Unterdrückung des Spontanverhaltens einen pharmakogenen Anspannungszustand zu bewirken. Damit erreicht Rolipram möglicherweise durch Aktivierung des SCN und der Unterdrückung des sonst üblichen Spontanverhaltens eine phasisch ausgeprägte Auslösung von HTW und FPS, aber eine tonisch ausgeprägte Auslösung von GR.

Auf der anderen Seite gilt die Beeinflussung von motorischer Aktivität und GR durch ACTH in der Ratte als direkte Wirkung von ACTH auf spezifische Hirnareale unabhängig von seiner Aktivierung der HPA-Achse (Matsuzaki, Takamatsu, Moroji 1989, Spadaro et al. 1990).

Intra-Amygdala Injektionen von CRH bewirken eine Reduktion des explorativen Verhaltens von Ratten (Liang, Lee 1988).

Dabei bleibt auch für COR und das durch CRH abhängig stimulierbare Verhalten in dieser Untersuchung offen, ob diese Effekte durch adrenerge Stimulation oder die gezielte Induktion von POMC-Peptiden entstehen, die eine ACTH-Wirkung verstärken (Al Dujaili et al. 1981, Estivariz et al. 1982).

Durch eine Rolipram-vermittelte Aktivierung von Regelkreisen, die die COR-Konzentrationen peripher erhöhen, kann alternativ mit db-cAMP bei der Ratte eine Steigerung von GR, motorischer Aktivität und „Rearing“ induziert werden (Lin, Chen, Chuang 1984). Dieses kann in dieser Untersuchung nicht beobachtet werden, da die spontanen Verhaltensparameter durch das spezifische Verhaltenssyndrom überlagert bzw. ersetzt werden. Bei diesem Syndrom sind die Verlaufsmuster der Aktivitäten durch Rolipram auch zu unterschiedlich, als dass sie auf einer direkten Stimulation nur eines Systems beruhen können.

Da außerdem aber über CRH-R motorische Aktivität und Schlaf beeinflusst werden können (Liebsch et al. 1995), besteht zusätzlich die Möglichkeit für GR, dass seine Induktion entsprechend der gleichförmigen Steigerung gegenüber dem GR der Kontrolltiere den Anstiegen der COR-Konzentrationen folgt.

GR ist der einzige Parameter, der sich auf dem erhöhten Niveau ähnlich wie bei den Kontrolltieren verhält und bei dem es keinen großen Unterschied zwischen L und D gibt. Für die beiden anderen Parameter HTW und FPS zeigt sich ein D/L- Unterschied mit einer vom Beleuchtungszustand abhängigen Induzierbarkeit (L>D).

Für den Parameter GR ist bereits aus der Untersuchung von Bolles 1960 bekannt, dass GR in Ratten am häufigsten in den ersten Stunden der L-Phase auftritt und seltener in der zweiten Hälfte der L-Phase vor Beginn der Dunkelheit. Dieser Verlauf ist in dieser Untersuchung bei den Kontrolltieren nicht nachzuvollziehen.

Es finden sich bei den Kontrolltieren allerdings mehrere Zeitpunkte, an denen das GR maximal ist (Hauptversuch 1: 12.00, 18.00 und 04.00 Uhr; Hauptversuch 2: 10.00, 16.00, 22.00, 24.00 und 04.00 Uhr). Dieses würde andererseits auch nicht mit Beobachtungen übereinstimmen, bei denen die höchste Aktivität kurz vor und nach der täglichen Schlafperiode beobachtet wurde (Bolles 1960, Spruijt, van Hooff und Gispen 1992). Trotz eines ansteigenden Aktivitätszustands

der Kontrolltiere - außer zur Mitte der D-Phase - bleiben die GR-Häufigkeiten unter Rolipram bei nur noch gering ausgeprägten Unterschieden zwischen den Zeitpunkten etwa gleichhoch. Aktivitätsspitzen bei den Kontrolltieren führen nicht zur entsprechenden Erhöhung beim GR unter Rolipram.

Damit ist GR aber auch nicht wesentlich beeinflusst von den übrigen Aktivitätsparametern des Explorations- und Residualverhaltens. Seine Induzierbarkeit ist somit bei geringer Aktivität auch dieser Parameter (SL hoch) verringert, steigt aber bei hoher Aktivität der Tiere (20.00, 22.00 und 04.00 Uhr) nicht dementsprechend an. Nur nach „Licht an“ (06.00 und 08.00 Uhr) kommt es zusätzlich an jeweils einem Zeitpunkt der beiden Hauptversuche zu den niedrigsten Häufigkeiten bei GR, wobei die generelle Inaktivität anhand der Häufigkeit von SL dabei keinen ausreichenden Grund dafür liefert.

Dies entspricht dann der durch Spruijt, van Hooff, Gispén 1992 beschriebenen Ausgleichsaktivität als Status einer Entspannung zwischen Aktivitäten und Stressoren, die dann wie beobachtet zu allen Zeitpunkten auftritt und nur durch weitere Regelkreise parameterspezifisch und tageszeitlich abhängig beeinflusst wird.

Damit kann GR mit den beiden anderen Parametern des Rolipramverhaltens anzeigen, dass sich die Tiere beim GR unter Rolipram immer von einer ausgeprägten zentralen Aktivierung regenerieren oder ein „displacement behaviour“ ausführen. Diese erhöhte Aktivierung unter Rolipram wird bei Ratten auch schon nach einer ersten Dosis von 1 mg/ kg als erhöhte `Wachheit bei Untersuchung des Schlaf/Wach-Rhythmus´ beobachtet (Lelkes et al. 1998).

Damit können die beiden in unterschiedlicher Weise induzierten Verhaltensmuster somit sowohl eine zentrale als auch periphere Wirkung von Rolipram auf die LHPA-Achse darstellen.

Das durch Rolipram ausgelöste Verhalten ist somit insgesamt in seinen jeweiligen Anteilen beleuchtungsabhängig und trotzdem eindeutig pharmakogen ausgelöst.

Beim sonstigen Spontanverhalten kann für das sehr gering ausgeprägte Sexualverhalten PT bei der geringen Steigerung durch Rolipram an zwei Zeitpunkten nicht von einer generellen Veränderung gesprochen werden. Allerdings geben die Ergebnisse von Yuan et al. 2011 Hinweise, dass das sexuelle Erfüllung suchende Verhalten unter Rolipram i.c.v. gesteigert wird. Ein gehemmtes sexuelles Verhalten (Libidoverlust) ist bei depressiven Patienten bereits als Syndrom verursacht beschrieben.

Regulation der Körpertemperatur

Aus circadianen Untersuchungen ist bekannt, dass lokomotorische Aktivität, KT und COR sich gleichförmig verändern (Honma, Hiroshige 1978). Daraus resultiert eine erhöhte KT in der D-Phase. Das ist bei freilaufenden Tieren mit Nahrungssuche und Aktivität verbunden, so dass die erhöhte metabolische Rate in dieser Zeit von Suche und Konsum von Nahrung erlaubt wird. In der Ruhephase während der L-Phase wird ein Absinken dieser metabolischen Rate und damit ein Absinken der KT bewirkt (Satinoff: Thermoregulation in: Wishaw, Kolb: The behaviour of the laboratory rat 2005).

Der Anstieg der KT erfolgt etwa zwei Stunden vor Beginn der täglich aktiven Phase der Ratten (Antle, Mistlberger: Circadian rhythms in: Wishaw, Kolb: The behaviour of the laboratory rat 2005). Da Licht die tägliche Aktivität hemmt, sinkt daher auch die KT in der L-Phase wieder ab. Durch Stress-Stimuli wie der Durchführung einer rektalen KT-Messung kann es zu einem Anstieg der KT bei Ratten kommen (Eikelboom, Stewart 1982). In der hier durchgeführten Untersuchung zeigen sich bei den Vergleichen aller Tiere zum Zeitpunkt $t = 0$ Minuten keine signifikanten Unterschiede in der KT zwischen den Behandlungsgruppen. Es zeigen sich geringe Unterschiede in der KT zwischen den Lichtphasen entsprechend der dort vorherrschenden Aktivität der Tiere. Damit ergibt sich kein Hinweis auf einen störenden Einfluss stressogener Stimuli durch Tierhaltung und Vorbereitung auf die Untersuchung mit Handling und Injektionen. Die KT der Tiere liegt im Vergleich zu anderen Untersuchungen mit einem 12h/12h LD-Zyklus in beiden Lichtphasen eher um mindestens ein halbes Grad Celsius niedriger als bei den dort untersuchten Tieren (36,2 bis 37,4 °C gegenüber 37,3 bis 38,1 °C) (Antle, Mistlberger: Circadian rhythms in: Wishaw, Kolb: The behaviour of the laboratory rat 2005). Dabei liegt bei dieser Untersuchung die Raumtemperatur mit 21 ± 1 °C im Bereich der bevorzugten Temperatur für die Aktivitätsphase der Ratten.

Daraus lassen sich keine Hinweise auf eine zu geringe Raumtemperatur ziehen, das beobachtete Verhalten bei den Kontrolltieren ist damit ebenfalls nicht beeinträchtigt. Deren KT nach Ende der Verhaltensuntersuchung weist weiterhin einen Unterschied zwischen den Lichtphasen auf, es bestehen aber keine großen Unterschiede zu ihren Ausgangstemperaturen. Die Verhaltensuntersuchung an sich und die Unterbringung der Tiere in ihren kleinen Untersuchungsboxen bewirken keinen KT-Anstieg, der unter der vorhandenen Beleuchtung mit Glühlampen sonst vermutet worden wäre, so dass daraus folgende mögliche Veränderungen beim Verhalten wie eine Verringerung der Aktivität auszuschließen sind.

Unter Rolipram kommt es zu den typischen beschriebenen Absenkungen der KT zu allen Zeitpunkten.

Es ist auffällig, dass entgegen dem Verlauf der KT bei den Kontrolltieren eine tageszeitlich unterschiedliche Absenkung der KT unter Rolipram zu beobachten ist. Damit erscheint ein stärker ausgeprägter Rhythmus der Beeinflussung unter Rolipram vorhanden zu sein.

Eine Kopplung zu sonst gleichförmig verlaufenden Rhythmen wie COR kann nicht erkannt werden, auch wenn bei der Aktivität der Kontrolltiere die Anstiege ähnlich verlaufen. Rolipram bewirkt aber eine erhebliche Veränderung des gezeigten Verhaltens, mit dem zwar eine deutliche motorische Komponente verbunden ist, die aber mit der ansteigenden KT in der zweiten Hälfte der L-Phase zur D-Phase hin und in der ersten Hälfte der D-Phase nicht übereinstimmt. Dieser Verlauf erinnert am ehesten an die physiologische Regulation der HPA-Achse mit der Aktivierung der COR-Bildung durch ACTH, die aber unter Rolipram so nicht gefunden wird, da die gesteigerte Bildung von COR weniger Schwankungen als bei den Kontrolltieren aufweist und damit keinem physiologischen Verlauf folgt.

Zusammengefasst ergibt sich daraus die Möglichkeit einer tageszeitlich abhängigen Absenkung der KT unter Rolipram, die dem ursprünglich vorhandenen Rhythmus der Aktivität der Kontrolltiere folgt, bei dem in der Ruhephase der Tiere dann die pharmakogene Absenkung am stärksten ausgeprägt ist.

Beleuchtungsversuch

Die tageszeitlich abhängige Absenkung der KT wird durch den Beleuchtungsversuch unterstützt, wo zum Zeitpunkt der vorzeitigen Beleuchtung mit „Licht an“ um 04.00 Uhr die KT der Kontrolltiere sich im Bereich der KT von der regulären „Licht an“ Zeit um 06.00 Uhr befindet, und damit niedriger als zum Ende der D-Phase ist (36,8 °C gegenüber 37,2°C).

Unter den nachfolgend untersuchten Lichtfarben kommt es zu keiner Änderung der KT zwischen den Zeitpunkten.

Auch wenn sich die KT zwischen den beiden Kontrollgruppen der Hauptversuche unterscheiden, bestehen jeweils keine Unterschiede zwischen den Zeitpunkten eines Hauptversuchs in der ersten Hälfte der L-Phase. Zwischen den KT der Kontrolltiere des zeitlich benachbarten Hauptversuchs 1 und den KT des Beleuchtungsversuchs bestehen dabei ebenfalls keine Unterschiede.

Durch Rolipram kommt es sowohl zum vorzeitigen „Licht an“ um 04.00 Uhr, dem regulären „Licht an“ um 06.00 Uhr und auch unter „gelb“ um 06.00 Uhr bei den in allen Versuchen höchsten Anzahl an HTW. Auch diese starke Aktivität bewirkt keine Änderung der KT unter Rolipram gegenüber der KT bei den nachfolgenden Lichtfarben unter Rolipram, auch wenn bei denen die HTW deutlich geringer sind und bei den anderen Rolipramparametern sich keine entsprechenden Steigerungen zeigen, durch die die geringeren Anzahlen an HTW in Bezug auf eine körperliche Aktivität ausgeglichen werden können.

Bei allen Lichtfarben zeigen sich damit bei beiden Behandlungen keine zusätzlichen Effekte auf die KT, nur ein früheres „Licht an“ verringert die KT auf den entsprechenden Wert.

Resümee

Die Untersuchung gliedert sich in die zwei Teile:

die Bewertung der Auswahl der Bedingungen zur Untersuchung von Effekten über einen gesamten Tag, sowie die Darstellung der Ergebnisse bei Verhalten und Hormonen von Kontrolltieren und unter Rolipram mit Berücksichtigung möglicher zeitpunktabhängiger Wirkungen. Zur Beurteilung des ersten Teils sind bei einer circadianen Untersuchung die Randbedingungen zu betrachten. Zu denen gehören sowohl die Auswahl der Tiere, als auch die Vorbereitung und Durchführung der Verfahren zur Untersuchung der Tiere. Da es vorrangig um die Untersuchung von tageszeitlichen Phänomenen geht, gehört dazu die Möglichkeit, Verhalten auch in der D-Phase untersuchen zu können. Die in solchen Untersuchungen übliche Beleuchtung mit der Farbe „rot“ entspricht der Verteilung von farbsensitiven Strukturen in der Retina der Versuchstiere Ratte, von denen „rot“ wie dunkel wahrgenommen wird. Zur Einschätzung der Effekte der Farbe „rot“ ist ein Beleuchtungsversuch notwendig. Die Initiierung eines Beleuchtungsversuchs setzt die Idee um, an verschiedenen Zeitpunkten mittels Wahl verschiedener Beleuchtungsfarben einen Einfluss eben dieser Farben auf Verhalten und hormonelle Regelkreise zu beschreiben.

Dazu wird hier die Vorverlegung der L-Phase vorgenommen. Diese Vorverlegung von „Licht an“ konnte beweisen, dass die Beeinflussung von Aktivität bei den Kontrolltieren und substanztypischem Verhalten unter Rolipram den Ergebnissen zum regelrechten Zeitpunkt „Licht an“ entspricht. Der Einsatz anderer Beleuchtungsfarben konnte nicht beweisen, dass im Verlauf der L-Phase die kurzzeitige Exposition von Ratten gegenüber einer Lichtfarbe den aufgrund ihrer spektralen Zusammensetzung erwarteten Effekt wie unter „Licht an“ oder „Licht aus“ noch aufweist. Die explorative Aktivität der Kontrolltiere ist zum früheren Zeitpunkt unter Licht ebenso unverändert wie unter „Licht an“, sie sinkt auch unter „rot“ in der L-Phase nicht ab (und SL nimmt nicht zu).

Unter Rolipram zeigt sich eine dissoziierte Antwort der substanztypischen Parameter. FPS und GR sind unter den farbigen Beleuchtungen nicht verändert. Bei den HTW lösen nur „Licht an“ und „gelb“ hohe Anzahlen wie zu Beginn der L-Phase aus. Im Gegensatz zu den anderen Verhaltensparametern kann bei den HTW auch zur Mitte der L-Phase „rot“ einen Effekt wie unter D auslösen. Damit kann bewiesen werden, dass es auch bei einem zusammenhängenden Verhaltenskomplex bei Veränderung von Beleuchtungsregimen zu einer sich aufteilenden Reaktion und damit unterschiedlichen Induzierbarkeit kommt. Im Beleuchtungsversuch sollte lediglich die Unschädlichkeit von „rot“ dargestellt werden, was aufgrund der Ergebnisse dieser Teil der Fragestellung als gelöst angesehen werden kann. Für die Beeinflussung zu tageszeitlich unterschiedlichen Zeitpunkten muss allerdings festgehalten werden, dass die Wahl von Zeitpunkten nach dem Lichtwechsel zur Beurteilung unterschiedlicher Farbwirkungen keine verlässliche Genauigkeit bietet, da die kurzfristige Exposition gegenüber einer neuen Lichtfarbe nicht zu den erwarteten Ergebnissen führt.

Bei der Untersuchung zur Beeinflussung der Vermittlung von Lichtreizen auf die Bildung von MEL wurde aufgrund bekannter Ergebnisse die rote Beleuchtung für die D-Phase als nicht störend und die Auswahl der Tiere als alt genug für die Etablierung eines typischen Konzentrationsverlaufs vorausgesetzt. Als weiterer Einflussfaktor ist das Handling der Tiere einschließlich der Probengewinnung beschrieben, das aber ebenfalls keine Auswirkungen auf die zu den beiden Lichtphasen erwarteten Konzentrationen hatte.

Da die Tiere sich über die Zeit unter Einwirkung von Rolipram in der Freisetzung von MEL nur zu wenigen Zeitpunkten unterscheiden, hat Rolipram damit offensichtlich keinen wesentlichen

Einfluss auf die circadian unterschiedlichen MEL-Werte. Es scheint davon abhängig zu sein, ob das zugrundeliegende System zur Melatoninproduktion bereits stimuliert wurde oder nicht. Allerdings können damit für die Rolipramwirkungen weitere Zeitfenster als die zu den Lichtwechseln erwarteten beschrieben werden, in denen die Induktion der MEL-Bildung und -Sekretion zu signifikanten Unterschieden gegenüber den Auswirkungen bei den Kontrolltieren führen. Durch die anhaltende Stimulation der MEL-Bildung kann in der beginnenden L-Phase die stark sinkende Freisetzung von MEL signifikant erhöht werden. Dies gelingt ebenfalls bei der schon wieder sensitiven Phase des Lichtwechsels von der L-Phase zur D-Phase, so dass hier Rolipram zumindest punktuell schon stimulieren kann. Leider können wegen fehlender weiterer Daten von Parametern auf molekularer Ebene (wie Cryptochromaktivität, Transkriptionsschleifen) keine höher differenzierten Betrachtungen über deren Beeinflussung vorgenommen werden, die die Effekte im engen Beeinflussungsfenster erlaubt hätten. Eine Verlängerung der Induzierbarkeit der MEL-Bildung und Sekretion kann mit den Ergebnissen bei der Behandlung von Depressiven übereinstimmen, bei denen im Krankheitszustand Phasenvorverlegungen von Rhythmen beschrieben werden. Rolipram könnte damit am Menschen diese Wirkungen abschwächen oder durch Aufhebung der Phasenvorverlegung mindestens teilweise rückgängig machen und hätte damit am Menschen eine erweiterte, belegbare Wirkung nicht nur zu den Lichtwechseln, die sich damit nicht nur experimentell in weiteren Nagerspezies nachweisen ließe. Damit kann in einem Modell zur gezielten Untersuchung von Substanzen mit diesem PDE 4-Hemmeeffekt die Therapie Depressiver weiterentwickelt werden.

Dieser Effekt wird dann noch deutlicher sichtbar, wenn zusätzlich die wie eine Sollwertverstellung gemessene Erhöhung der COR-Konzentrationen betrachtet wird. Das Untersuchungsergebnis folgt dabei bisherigen Daten, weitet sie aber aufgrund der zu allen Zeitpunkten gemessenen Erhöhung deutlich aus und belegt zumindest in diesem Bereich der Untersuchung von circadianen Effekten von Rolipram die sonst vermutete unterschiedliche Induzierbarkeit von Hormonen durch Rolipram. Für eine generelle Aussage zu diesen Effekten bleibt zu berücksichtigen, dass für klassisch-rhythmische Untersuchungen die Häufigkeit und Art der Blutentnahmen anders und mit wesentlich geringeren Abständen (vorzugsweise kontinuierlich) durchgeführt werden sollten.

Für die Kontrolltiere wird belegt, dass Handling und Versuchsablauf nicht zu deutlich bemerkbaren, stressbedingten Anstiegen bei dem leicht zu beeinflussenden COR als Effektor der HPA-Achse geführt haben. Für Rolipram bietet sich darüber hinaus bei Betrachtung seiner Effekte die Möglichkeit an, hierüber wesentliche Wirkungen der Induktion von CRH zu beschreiben und zu bewerten. Da dieses bei der Versuchsplanung aufgrund fehlender Daten nicht in Betracht gezogen werden konnte, sollte dieses aber in weiteren Untersuchungen unbedingt weiter bearbeitet werden.

Der Beweis der Beeinflussung von CRH durch Rolipram ermöglicht seinen Einsatz als Tool bei der Testung von Substanzen wie CRH-Antagonisten, die als neue antidepressiv wirkende Agenzien sich derzeit in der Erforschung befinden.

Die Untersuchung der von den Kortikoiden in einem peripheren Regelkreis abhängigen Glukosekonzentration sollte Aufschluss über deren Anstieg bei Induktion der LHPA-Achse im Bereich der Effektororgane geben. Durch den fast gleichförmigen Anstieg der Konzentrationen unter Rolipram ist das in diesem Modell belegt. Dabei kommt es aber etwas anders als bei COR zu einer der tageszeitlichen Schwankung folgenden Erhöhung von Glukose. Aufgrund der in der Peripherie überwiegend über PDE 3 vermittelten Wirkungen bleibt für Rolipram an der Leber dort kein Angriffspunkt, deshalb sollten die Ergebnisse als Wirkung auf die LHPA-Achse interpretiert werden können. Glukose ist damit zwar aufgrund seiner vielfältigen Beeinflussbarkeiten im Metabolismus nur ein Summenparameter, kann aber bei gleichzeitiger Betrachtung der LHPA-Aktivität zur Beurteilung der Beeinflussung einzelner Stellglieder verwendet werden. Die

Aussagekraft besteht dann darin, die Abschwächung von hyperkortisolemischen Zuständen über eine periphere Wirkung relativ einfach beschreiben zu können. Da auch beim Einsatz von CRH-Antagonisten die Normalisierung der aktivierten LHPA-Achse erwünscht ist, könnte deren Erfolg über die Glukosekonzentrationen zumindest bei mechanistischer Betrachtungsweise ergänzend belegt werden.

Wenn bisher die gleichförmige Beeinflussung der Rhythmen von COR, KT und lokomotorischer Aktivität beschrieben wurde, kann unter Rolipram auch bei der KT eine tageszeitlich abhängige und dabei noch eher lichtabhängige Senkung der KT in der Ruhephase der Tiere dargestellt werden. Dies kann durch die Ergebnisse im Beleuchtungsversuch noch weiter unterstützt werden und bildet damit ein weiteres Element der tageszeitlichen Beeinflussung von Rolipram auf körpereigene Rhythmen.

Davon kann umso mehr gesprochen werden, als die zu den untersuchten Zeitpunkten festgestellten Veränderungen der Kontrolltiere sich gut in die Verläufe von circadianen Untersuchungen einpassen lassen und zusätzlich aufgrund der Ergebnisse aus dem Beleuchtungsversuch für einige Parameter die lichtabhängige Beeinflussung wie zur sonst üblichen Lichtphase bewiesen werden konnte.

Zusätzlich kann durch die angenommene Lichtabhängigkeit bei der Auslösung von HTW und FPS ein tageszeitlich abhängiger Effekt erstmals beschrieben werden:

Über eine AA-NAT wird die cAMP-abhängige Synthese von MEL reguliert. Bei einer Steigerung der adrenergen Transmission können durch Rolipram direkt oder über die Steigerung der Produktion oder die Stimulation von CRH-vermittelten Genprodukten unter mehreren CRH-abhängigen Regelkreisen die Verhaltensparameter unter Rolipram zu den unterschiedlichen Zeitpunkten beobachtet werden. Dabei entfalten sich aber aufgrund der Hemmung der MEL-Synthese durch Licht nur FPS und GR in der Dunkelphase. Bei der Ratte sind die eingefrorene Aktivität zwischen den rolipramtypischen Verhaltensweisen und der nicht beobachtbare Schlaf bei diesen Tieren ein möglicher Hinweis auf eine unterdrückte physiologische Aktivität. Wenn diese Abläufe aber in der Depression gestört sind, könnte sich einerseits über die Beeinflussung von Rolipram dessen verzögerter Wirkeintritt für die klinisch beobachteten Prozesse bei Patienten erklären lassen. Im Ergebnis bewirkte Rolipram dann aber andererseits eine Steigerung der Synthese entsprechender Genprodukte für eine Regulierung der gestörten vegetativen und kognitiven Funktionen schon auf der molekularen Ebene, womit dann seine Einsetzbarkeit als Tool für zukünftige Untersuchungen sichtbar wird.

Zusammenfassung

Die pharmakologische Wirkung von Rolipram wird mit einer Dosis von 2,5 mg/kg Körpergewicht bei männlichen WISTAR-Ratten untersucht.

Die Wahl dieser Dosierung wird getroffen, um während der Beobachtungszeit eine sichere Auslösung der in der Literatur beschriebenen Wirkungen auf Verhaltensparameter, die Thermoregulation und die Hormonsekretion darstellen zu können (Wachtel 1982, 1983a, Schneider 1984, Schneider et al. 1986, Wachtel, Schneider 1986, Kaulen et al. 1989, Schmiechen et al. 1990).

Der Versuchsablauf ist gekennzeichnet durch eine über insgesamt 24 Stunden in jeweils zweistündigem Abstand durchgeführte jeweils sechzigminütige Verhaltensbeobachtung der Tiere mit begleitender Temperaturmessung und anschließender Gewinnung von Blut zur Labordiagnostik. Damit wird eine punktuelle Untersuchung der Parameter durchgeführt, ohne eine circadiane Rhythmik longitudinal beschreiben zu wollen und zu können.

Das untersuchte Verhalten wird in verschiedene Gruppen aufgeteilt:

substantztypisches Verhalten, Explorations-, Maintenanceverhalten und Wachheitszustand. Zur Beobachtung aller Verhaltensweisen in der D-Phase wird in einem Beleuchtungsversuch die Farbe „Rot“ als die die untersuchten Parameter nicht beeinflussende Beleuchtungsfarbe der D-Phase gewählt und anhand der erhobenen Ergebnisse überprüft und bestätigt.

Die beobachteten Wirkungen von Rolipram äußern sich in der deutlich beleuchtungsabhängigen Induktion von substantztypischem Verhalten. Ein Schlafzustand tritt bei den Rolipram-behandelten Tieren nicht mehr auf. Durch die gewählte Dosis erfolgt eine Unterdrückung fast jeglichen anderen Verhaltens, so dass keine aussagekräftigen Vergleiche zwischen Rolipramwirkung und Spontanverhalten zu den untersuchten Zeitpunkten angestellt werden können. Es kann überwiegend nur substanzinduziertes Verhalten beobachtet werden.

Bei Thermoregulation und Hormonkonzentrationen können aussagekräftige Daten nach 75 Minuten erhoben werden, die jeweils wie bei einer Sollwertverstellung die Substanzwirkung anzeigen (Wachtel 1983a, Wachtel et al. 1987).

Es sind anhand der Ergebnisse vier Tendenzen zu erkennen:

- 1) Rolipram zeigt seine maximale Wirkung zu Beginn der Hellphase. Diese fällt zusammen mit dem Zeitraum der verminderten Vigilanz der nachtaktiven Tiere. Der Vigilanzzustand wird durch den Rückgang bei den Explorations- und Maintenanceparametern sowie dem anhaltenden Wachheitszustand ohne physiologische Aktivitäten beschrieben.
- 2) Die Änderungen des physiologischen Verhaltens werden nur bei den Kontrolltieren beobachtet, die alle einen ungestörten Verhaltensablauf während der Beobachtungen zeigen. Sie entsprechen den bisher beschriebenen Aktivitätszuständen in Hell- und Dunkelphasen, da es nach Unterdrückung durch Rolipram zu diesen Zeiten kein typisches Verhalten mehr gibt.
- 3) Es lassen sich anhand der COR-Sekretion und der an sie peripher gekoppelten Erhöhung der Glukosekonzentration Trends zur Induktion der LHPA-Achse erkennen, die einen Rückschluss auf die Beeinflussung weiterer vorhandener, zentraler Regelkreise wahrscheinlich machen.
- 4) Ein weiterer robuster Parameter für tageszeitliche Schwankungen (KT) zeigt eine der Literatur entsprechende tageszeitliche Veränderung (Honma, Hiroshige 1978, Antle, Mistlberger: Circadian rhythms in: Wishaw, Kolb: The behaviour of the laboratory rat 2005), die unter Rolipram ebenfalls wie bei einer Sollwertänderung beeinflusst wird.

Nach Durchführung der Untersuchungen ist in der Auswertung eine tageszeitlich abgestufte

Wirkung unter Rolipram zu beobachten. Dabei zeigen sich sowohl bei den substanztypischen, als auch anderen Verhaltensparametern vom Zeitpunkt und Beleuchtungszustand abhängige Veränderungen. Da die Regulation des beobachteten Verhaltens und der gemessenen Hormone mit einer Veränderung von Gehalten oder Verfügbarkeit zentraler Monoamine und deren Regulation einherzugehen scheint, greift Rolipram durch seinen bisher beschriebenen Wirkmechanismus in diese Regulation ein und beeinflusst sie zu bestimmten Zeitpunkten besonders intensiv. Bezogen auf die Auswirkungen in einem Depressionsmodell bietet sich damit ein belegbarer Ansatz für die Beschreibung einer tageszeitlich abhängigen Wirkung der Substanz. Zwischen der experimentellen Wirkung am Tier und den möglichen Auswirkungen am Menschen können Vergleiche gezogen werden, da die Regelprozesse durch homologe Geneprodukte beteiligter Enzyme in den unterschiedlichen Spezies gleichförmig gesteuert werden. Dies kann auf eine chronopharmakologisch begründbare Therapiewirkung hindeuten, was in weiteren Untersuchungen und in anderen für diese Substanz verwendeten Modellen zu bestätigen sein wird.

Damit sind das gewählte Modell und die Anwendung der Methode zu festgelegten Zeiten eines zusammengesetzten theoretischen Tages in der Lage, substanztypische Effekte als tageszeitlich abhängig zu beschreiben, was die Planung und Anwendbarkeit ähnlicher Untersuchungen zukünftig erleichtern wird.

Durch die Unterdrückung des Spontanverhaltens erscheint das gewählte Modell unter Rolipram in generellen Untersuchungen zur circadianen Rhythmik eher nicht geeignet. Lediglich die unterschiedliche Auslösbarkeit des substanztypischen Verhaltens kann Aufschluss zu möglichen therapeutischen Wirkungen und den Zeitpunkten ihrer maximalen Wirkung geben, so dass sich daraus Verabreichungszeitpunkte am Menschen gezielt herausarbeiten lassen können. Diese Zeitpunkte hängen dann von den jeweils gewollten Haupt- und Nebeneffekten ab, um einen wirksamen, aber nebenwirkungsarmen Zeitpunkt der Applikation festlegen zu können.

Das angewandte Modell ist bei kurzfristig schwankenden hormonellen Rhythmen nicht in der Lage, deren Einfluss unter Rolipram direkt zu beschreiben, sondern muss sich mit der Nutzung von peripheren Effekten oder Summeneffekten begnügen. Damit sind die Ergebnisse nur ein Hinweis, dem nur durch die Verwendung von ausreichend genauen Methoden der Messung von Hormonen oder der genetisch bedingten Veränderung von genau definierten Anteilen in den Regelkreisen gefolgt werden kann.

Da dieses zum Zeitpunkt der Untersuchung noch nicht möglich war, liefern die erhaltenen Ergebnisse trotzdem einen deutlichen Zuwachs an detaillierteren Informationen zur tageszeitlichen Abhängigkeit von Verhalten und Hormonen unter Rolipram in einem Depressionsmodell.

Literatur

- Abe, K, Robison, GA, Liddle, GW, Butcher, R, Nicholson, WE, Baird, CE: Role of cyclic AMP in mediating effects of MSH, norepinephrine and melatonin on frog skin colour 1969, *Endocrinology* 85: 674-82
- Abdollahi, M, Chan, TS, Subrahmanyam, V, O'Brien, PJO: Effects of phosphodiesterase 3,4,5 inhibitors on hepatocyte cAMP levels, glycogenolysis, gluconeogenesis and susceptibility to a mitochondrial toxin 2003, *Mol Cell Biochem* 252: 205-11
- Akerstedt, T: Altered Sleep/Wake patterns and circadian rhythms, Laboratory and field studies of sympatho-adrenomedullary and related variables 1979, *Acta Physiol Scand Suppl* 469: 1-48
- Aldridge, JW: Grooming in Whishaw, IQ, Kolb, B (Hrs.): The behaviour of the laboratory rat, A Handbook with tests, New York 2005
- Al-Dujaili, EAS, Hope, J, Estivariz, FE, Lowry, PJ, Edwards, CRW: Circulating human pituitary pro- γ -melanotropin enhances the adrenal response to ACTH 1981, *Nature* 291: 156-59
- Aloyo, VJ, Spruijt, B, Zwiers, H, Gispen, WH: Peptide-induced excessive grooming in the rat: the role of opiate receptors 1983, *Peptides* 4: 833-36
- Anacker, C, Zunszain, PA, Cattaneo, A, Carvalho, LA, Garabedian, MJ, Thuret, S, Price, J, Pariante, CM: Antidepressants increase human hippocampal neurogenesis by activating the glucocorticoid receptor 2011, *Mol Psychiatry* 16: 738-750
- Anden, NE, Butcher, SG, Corrodi, H, Fuxe, K, Ungerstedt, U: Receptor activity and turnover of dopamine and noradrenaline after neuroleptics 1970, *Eur J Pharmacol* 11: 303-14
- Anraku, T, Ikegaya, Y, Matsuki, N, Nishiyama, N: Withdrawal from chronic morphine administration causes prolonged enhancement of immobility in rat forced swimming test 2001, *Psychopharmacology* 157: 217-20
- Antle, MC, Mistlberger, RE: Circadian rhythms in: Wishaw, IQ, Kolb, B (Hrsg.): The behaviour of the laboratory rat, New York 2005
- Antoni, FA, Palkovits, M, Makara, GB, Linton, EA, Lowry, PJ, Kiss, JZ: Immunoreactive corticotropin-releasing hormone in the hypothalamoinfundibular tract 1983, *Neuroendocrinology* 36: 415-23
- Arborelius, L, Owens, MJ, Plotsky, PM, Nemeroff, CB: The role of corticotropin-releasing factor in depression and anxiety disorders 1999, *J Endocrinol* 160: 1-12
- Arendt, J, Bojkowski, C, Franey, C, Wright, J, Marks, V: Immunoassay of 6-hydroxymelatonin sulphate in human plasma and urine: abolition of the urinary 24 hours rhythm with atenolol 1985, *J Clin Endocrinol Metab* 60: 166-73
- Armstrong, SM, Redman, J: Melatonin administration: effects on rodent circadian rhythms in Evered, D, Clark, S (Hrsg.): Photoperiodism, melatonin and the pineal, Ciba Foundation Symposium 117, London 1985
- Arnsten, AFT, Ramos, BP, Birnbaum, SG, Taylor, JR: Protein kinase A as a therapeutic target for memory disorders: rationale and challenges 2005, *Trends Mol Med* 11: 121-128
- Arnt, J, Hyttel, J, Larsen, JJ: The citalopram/5-HTP-induced head shake syndrome is correlated to 5-HT₂ receptor affinity and also influenced by other transmitters 1984, *Acta Pharmacol Toxicol* 55: 363-72
- Aschoff, J, Daan, S, Groos, GA: Vertebrate Circadian System, Structure and Physiology, Berlin 1982

- Assenmacher, I, Farner, DS (Hrsg.): Environmental Endocrinology, Proceedings of an International Symposium held in Montpellier (France) 1977, Berlin 1978
- Aston-Jones, G, Akaoka, H, Charley, P, Chouvet, G: Serotonin selectively attenuates glutamate-evoked activation of locus coeruleus neurons in vivo 1991, *J Neurosci* 11: 760–69
- Aston-Jones, G, Shiekhattar, R, Rajkowski, J, Kubiak, P, Akaoka, H: Opiates influence noradrenergic locus coeruleus neurons by potent indirect as well as direct effects in Hammer, R (Hrsg.): The neurobiology of opiates New York 1993
- Atkins, CM, Oliva Jr., AA, Alonso, OF, Pearse, DD, Bramlett, HM, Dietrich, WD: Modulation of the cAMP signaling pathway after traumatic brain injury 2007, *Exp Neurol* 208: 145–158
- Avni, D, Philosoph, A, Meijler, MM, Zor, T: The ceramide-1-phosphate analogue PCERA-1 modulates tumour necrosis factor- α and interleukin-10 production in macrophages via the cAMP–PKA–CREB pathway in a GTP-dependent manner 2009, *Immunology* 129: 375–385
- Bachmann, CG, Bilang-Bleuel, A, De Carli, S, Linthorst, AC, Reul, JM: The selective glucocorticoid receptor antagonist ORG 34116 decreases immobility time in the forced swimming test and affects cAMP-responsive element-binding protein phosphorylation in rat brain 2005, *Neuroendocrinology* 81: 129-36
- Baillie, GS, MacKenzie, SJ, McPhee, I, Houslay, MD: Sub-family selective actions in the ability of Erk2 MAP kinase to phosphorylate and regulate the activity of PDE4 cyclic AMP-specific phosphodiesterases 2000, *Br J Pharmacol* 131: 811-819
- Bale, TL, Vale, WW: CRF and CRF receptors: Role in stress responsivity and other behaviours 2004, *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 44: 525-57
- Banki, CM, Bissette, G, Arato, M, O'Connor, L, Nemeroff, CB: Cerebrospinal fluid corticotropin-releasing factor-like immunoreactivity in depression and schizophrenia 1987, *Am J Psychiatry* 144: 873-77
- Barber, R, Baillie, GS, Bergmann, R, Shepherd, MC, Sepper, R, Houslay, MD, Heeke, GV: Differential expression of PDE4 cAMP phosphodiesterase isoforms in inflammatory cells of smokers with COPD, smokers without COPD, and nonsmokers 2004, *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 287: L332-343
- Bargmann, W, Oksche, A, Polenov, A, Scharrer, B (Hrsg.): Neurosecretion and Neuroendocrine Activity, Evolution, Structure and Function, Proceedings of the VIIth International Symposium on Neurosecretion Leningrad 1976, Berlin 1978
- Barnett, SA: The Rat, A Study in Behaviour, Chicago 1973
- Battaglia, G, Webster, EL, DeSouza, EB: Characterization of corticotropin-releasing factor receptor-mediated adenylat cyclase activity in the rat central nervous system 1987, *Synapse* 1: 572-581
- Beaumont, E, Whitaker, CM, Burke, DA, Hetman, M, Onifer, SM: Effects of Rolipram on Adult Rat Oligodendrocytes and Functional Recovery after Contusive Cervical Spinal Cord Injury 2009, *Neuroscience* 163: 985–990
- Beavo, JA: Cyclic nucleotide phosphodiesterases: Functional implications of multiple isoforms 1995, *Physiol Res* 75:725-48
- Beavo, JA, Brunton, LL: Cyclic nucleotide research – still expanding after half a century 2002, *Nat Rev Mol Cell Biol*: 710–718
- Beebe, SJ, Redmon, JB, Blackmore, PF, Corbin, JD: Discriminative insulin antagonism of stimulatory effects of various cAMP analogs on adipocyte lipolysis and hepatocyte glycogenolysis 1985, *J Biol Chem* 260: 15781-88
- Bender, AT, Beavo, JA: Cyclic nucleotide phosphodiesterases: molecular regulation to clinical use 2006, *Pharmacol Rev* 58: 488-520

Berridge, KC, Aldridge, JW: Super-stereotypy. I: Enhancement of a complex movement sequence by systemic dopamine D1 agonists 2000a, *Synapse* 37: 194-204

Berridge, KC, Aldridge, JW: Super-stereotypy. II: Enhancement of a complex movement sequence by intraventricular dopamine D1 agonists 2000b, *Synapse* 37: 205-15

Bertolino, A, Crippa, D, di Dio, S, Fichte, K, Musmeci, G, Porro, V, Rapisarda, V, Sastre-y-Hernandez, M, Schratzer, M: Rolipram versus imipramine in inpatients with major, "minor" or atypical depressive disorder: a double-blind double-dummy study aimed at testing a novel therapeutic approach 1988, *Int Clin Psychopharmacol* 3: 245-53

Bielekova, B, Lincoln, A, McFarland, H, Martin, R: Therapeutic potential of phosphodiesterase-4 and -3 inhibitors in Th1-mediated autoimmune diseases 2000, *J Immunol* 164: 1117-24

Bielekova, B, Richert, N, Howard, T, Packer, AN, Blevins, G, Ohayon, J, McFarland, HF, Stürzebecher, CS, Martin, R: Treatment with the phosphodiesterase type 4 inhibitor rolipram fails to inhibit blood brain barrier disruption in MS 2009, *Mult Scler* 15: 1206-1214

Birkmayer, W: Depressionen, Köln 1977

Bobon, D, Breulet, M, Gerard-Vandenhove, MA, Guiot-Goffioul, F, Plomteux, G, Sastre-y-Hernandez, M, Schratzer, M, Troisfontaines, B, von-Frenckell, R, Wachtel, H: Is phosphodiesterase inhibition a new mechanism of antidepressant action? A double blind double-dummy study between rolipram and desipramine in hospitalized major and/or endogenous depressives 1988, *Eur Arch Psychiatry Neurol Sci* 238: 2-6

De Boer, SF, van der Gugten, J: Daily variations in plasma noradrenaline, adrenaline and corticosterone concentrations in rats 1987, *Physiol Behav* 40: 323-28

Bolles, RC: Grooming behaviour in the rat 1960, *J Comp Physiol Psychol* 53: 306-10

Boutillier, AL, Monnier, D, Koch, B, Loeffler, JP: Pituitary adenylyl cyclase-activating peptide: a hypophysiotropic factor that stimulates proopiomelanocortin gene transcription, and proopiomelanocortin-derived peptide secretion in corticotropic cells 1994, *Neuroendocrinology* 60: 493-502

Boxall, R, Porteous, DJ, Thomson, PA: DISC1 and Huntington's Disease – Overlapping Pathways of Vulnerability to Neurological Disorder? 2011, *PLoS ONE* 6: e16263

Breyer-Pfaff, U, Gaertner, HJ: Antidepressiva in Ammon, HPT, Werning, C (Hrsg.): *Medizinisch-pharmakologisches Kompendium Band 5*, Stuttgart 1987

Brown, JA, Gianino, SM, Gutmann, DH: Defective Cyclic AMP Generation Underlies the Sensitivity of Central Nervous System Neurons to Neurofibromatosis-1 Heterozygosity 2010, *J Neurosci* 30: 5579–5589

Brown, MR, Fisher, LA: Corticotropin-releasing factor: Effect on the autonomic nervous system and visceral systems 1985, *Fed Proc* 44: 243-48

Brown, MR, Fisher, LA, Spiess, J, Rivier, C, Rivier, J, Vale, W: Corticotropin-releasing factor: actions on the sympathetic nervous system and metabolism 1982, *Endocrinology* 111:928-31

Bruno, O, Fedele, E, Prickaerts, J, Parker, L, Canepa, E, Brullo, C, Cavallero, A, Gardella, E, Balbi, A, Domenicotti, C, Bollen, E, Gijssels, H, Vanmierlo, T, Erb, K, Limebeer, C, Argellati, F, Marinari, U, Pronzato, M, Ricciarelli, R: GEBR-7b, a novel PDE4D selective inhibitor that improves memory in rodents at non-emetic doses 2011, *Br J Pharmacol*. 164: 2054-63

Brus, R, Herman, ZS, Kostman, F: Behavioural effects of norepinephrine and dibutyryl 3',5'AMP in centrally sympathectomized rats 1974, *Pharmacol Biochem Behav* 2: 719-24

Bruss, MD, Richter, W, Horner, K, Jin, SLC, Conti, M: Critical Role of PDE4D in β_2 -Adrenoceptor-dependent cAMP Signaling in Mouse Embryonic Fibroblasts 2008, *J Biol Chem* 283: 22430–22442

- Buckingham, JC, Cooper, TA: Interrelationships of opioidergic and adrenergic mechanisms controlling the secretion of corticotrophin releasing factor in the rat 1987, *Neuroendocrinology* 46: 199-206
- Burgin, AB, Magnusson, OT, Singh, J, Witte, P, Staker, BL, Bjornsson, JM, Thorsteinsdottir, M, Hrafnisdottir, S, Hagen, T, Kiselyov, AS, Stewart, LJ, Gurney, ME: Design of phosphodiesterase 4D (PDE4D) allosteric modulators for enhancing cognition with improved safety 2010, *Nature Biotechnology* 28: 63-70
- Butt, NM, Collier, HOJ, Cuthbert, NJ, Francis, DL, Saeed, SA: Mechanisms of quasi-morphine withdrawal behaviour induced by methylxanthines 1979, *Eur J Pharmacol* 53: 375-78
- van Calker, D, Berger, M : Erhaltungstherapie und Prophylaxe rezidivierender affektiver Erkrankungen 1995, *Nervenheilkunde* 14:108-117
- Cardinali, DP, Larin, F, Wurtman, RJ: Action spectra for effects of light on hydroxyindole-O-methyl transferases in rat pineal, retina and Harderian gland 1972, *Endocrinology* 91: 877-86
- Carlson, LL, Weaver, DR, Reppert, SM: Melatonin signal transduction in hamster brain: inhibition of adenylyl cyclase by pertussis toxin-sensitive G protein 1989, *Endocrinology* 125: 2670-76
- Castro, A, Jerez, MJ, Gil, C, Martinez, A: Cyclic nucleotide phosphodiesterases and their role in immunomodulatory responses: Advances in the development of specific phosphodiesterase inhibitors 2005, *Med Res Rev* 25: 229-244
- Challiss, RA, Nicholson, CD: Effects of selective phosphodiesterase inhibition on cyclic AMP hydrolysis in rat cerebral cortical slices 1990, *Br J Pharmacol* 99: 47-52
- Checkley, SA, Thompson, C, Burton, S, Franey, C, Arendt, J: Clinical studies of the effect of (+) and (-) oxaprotiline upon noradrenergic uptake 1985, *Psychopharmacology (Berl)* 87: 116-18
- Checkley, SA, Winton, F, Corn, T, Franey, C, Arendt, J: Effects of a phosphodiesterase inhibitor (Rolipram) on the urinary excretion of 6-sulphatoxy melatonin in man 1987, *J Psychopharmacol* 1: 20-22
- Cherry, JA, Davis, RL: Cyclic AMP phosphodiesterases are localized in regions of the mouse brain associated with reinforcement, movement, and affect 1999, *J Comp Neurol* 407: 287-301
- Cheung, P, Yang, G, Boden, G: Milrinone, a selective phosphodiesterase 3 inhibitor, stimulates lipolysis, endogenous glucose production, and insulin secretion 2003, *Metabolism* 52: 1496-1500
- Clapcote, SJ, Lipina, TV, Millar, JK, Mackie, S, Christie, S, Ogawa, F, Lerch, JP, Trimble, K, Uchiyama, M, Sakuraba, Y, Kaneda, H, Shiroishi, T, Houslay, MD, Henkelman, RM, Sled, JG, Gondo, Y, Porteous, DJ, Roder, JC: Behavioural Phenotypes of Disc1 Missense Mutations in Mice 2007, *Neuron* 54: 387-402
- Clark, MS, Kaiyala, KJ: Role of corticotropin-releasing factor family peptides and receptors in stress-related psychiatric disorders 2003, *Semin Clin Neuropsychiatry* 8: 119-36
- Claustrat, B, Chazot, G, Brun, J, Jordan, D, Sassolas, G: A chronobiological study of melatonin and cortisol secretion in depressed subjects: plasma melatonin, a biochemical marker in major depression 1984, *Biol Psychiat* 19: 1215-28
- Collier, HOJ: The concept of quasi-abstinence effect and its use in investigation of dependence mechanisms 1974, *Pharmacology* 11: 58-61
- Collier, HOJ, Francis, DL, Henderson, G, Schneider C: Quasi-morphine abstinence syndrome 1974, *Nature* 249: 471-73
- Collier, HOJ, Cuthbert, NJ, Francis, DL: Character and meaning of quasi-morphine withdrawal phenomena elicited by methylxanthines 1981, *Fed Proc* 40: 1513-18
- Collier, HOJ, Francis, DL: Morphine abstinence is associated with increased brain cAMP 1975, *Nature* 255: 159-62

- Conti, M, Richter, W, Mehats, C, Livera, G, Park, JY, Jin, C: Cyclic AMP-specific PDE4 phosphodiesterases as critical components of cyclic AMP signalling 2003, *J Biol Chem* 278: 5493–5496
- Coon, SL, Roseboom, PH, Baler, R, Weller, JL, Namboodiri, MAA, Koonin, EV, Klein, DC: Pineal serotonin N-acetyltransferase: expression cloning and molecular analysis 1995, *Science* 270: 1681-83
- Coppen, A: The biochemistry of affective disorders 1967, *Br J Psychiatry* 113: 1237-64
- Copsel, S, Garcia, C, Diez, F, Vermeulem, M, Baldi, A, Bianciotti, LG, Russel, FGM, Shayo, C, Davio, C: Multidrug Resistance Protein 4 (MRP4/ABCC4) Regulates cAMP Cellular Levels and Controls Human Leukemia Cell Proliferation and Differentiation 2011, *J Biol Chem* 286: 6979-6988
- Cortright, DN, Goosens, KA, Lesh, JS, Seasholtz, AF: Isolation and characterization of the rat corticotrophin-releasing hormone (CRH)-binding protein gene: Transcriptional regulation by cyclic adenosine monophosphate and CRH 1997, *Endocrinology* 138: 2098-108
- Cowan, A: Quasi-morphine withdrawal syndrome: recent developments 1981, *Fed Proc* 40: 1489-90
- Cowen, PJ, Fraser, S, Sammons, N, Green, AR: Atenolol reduces plasma melatonin concentrations in man 1983, *Br J Clin Pharmacol* 15: 579-81
- Craft, CM, Morgan, WW, Reiter, RJ: 24-hour changes in catecholamine synthesis in rat and hamster pineal glands 1984, *Neuroendocrinology* 38: 193-98
- Crasson, M, Kjiri, S, Colin, A, Kjiri, K, L'Hermite-Baleriaux, M, Ansseau, M, Legros, JJ: Serum melatonin and urinary 6-sulfatoxymelatonin in major depression 2004, *Psychoneuroendocrinology (England)* 29: 1-12
- Crilly, A, Robertson, S, Reilly, JH, Gracie, JA, Lai, W-Q, Leung, BP, Life, PF, McInnes, IB: Phosphodiesterase 4 (PDE4) regulation of proinflammatory cytokine and chemokine release from rheumatoid synovial membrane 2011, *Ann Rheum Dis* 70: 1130-1137
- Csillik, B, Kappers, JA (Hrsg.): Neurovegetative Transmission Mechanisms, Proceedings of the International Neurovegetative Symposium Tihany 1972, *J Neural Transm Suppl* XI, Wien 1974
- Davies, JA, Navaratnam, V, Redfern, PH: The effect of phase-shift on the passive avoidance response in rats and the modifying action of chlordiazepoxide 1974, *Br J Pharmacol* 51:447-51
- Davis, CW: Assessment of selective inhibition of rat cerebral cortical calcium-independent and calcium-dependent phosphodiesterases in crude extracts using deoxycyclic AMP and potassium ions 1984, *Biochim Biophys Acta* 797: 354-62
- DeCherney, GS, DeBold, CR, Jackson, RV, Sheldon, WR, Island, DP, Orth, DN: Diurnal variation in the response of plasma adrenocorticotropin and cortisol to intravenous ovine corticotropin-releasing hormone 1985, *J Clin Endocrinol Metab* 61: 273-79
- Deguchi, T: Role of the beta adrenergic receptor in the elevation of adenosine cyclic 3',5'-monophosphate and induction of serotonin N-acetyltransferase in rat pineal glands 1973, *Mol Pharmacol* 9: 184-90
- Delini-Stula, A: Experimentelle und klinische Pharmakologie in Riederer, P, Laux, G, Pödlinger, W (Hrsg.): *Neuro-Psychopharmaka*, Bd. 3, Wien 1993
- DeMarch, Z, Giampa, C, Patassini, S, Bernardi, G, Fusco, FR: Beneficial effects of rolipram in the R6/2 mouse model of Huntington's disease 2008, *Neurobiol Dis* 30: 375–387
- Digestive Disease Week 2004, New Orleans, USA, Presentation OPC-6535 Phase III Trials
- Docherty, K, Clark, AR: Nutrient regulation of insulin gene expression 1994, *FASEB J* 8: 20-27

- Donaldson, J, Brown, AM, Hill, SJ: Influence of rolipram on the cyclic 3',5'-adenosine monophosphate response to histamine and adenosine in slices of guinea-pig cerebral cortex 1988, *Biochem Pharmacol* 37F: 715-23
- Donovan, B: *Neuroendokrinologie der Säugetiere*, Stuttgart 1973
- Dourish, CT: An observational analysis of the behavioural effects of 8-phenylethylamine in isolated and grouped mice 1982, *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 6, 143-58
- Draper, WA: A behavioural study of the home-cage activity of the white rat 1967, *Behaviour* 28: 280-306
- Drees, M, Zimmermann, R, Eisenbrand, G: 3',5'-Cyclic nucleotide phosphodiesterase in tumor cells as potential target for tumor growth inhibition 1993, *Cancer Res* 53: 3058-3061
- Dubocovich, ML, Rivera-Bermudez, MA, Gerdin, MJ, Masana, MI: Molecular pharmacology, regulation and function of mammalian melatonin receptors 2003, *Front Biosci* 8: d1093-1108
- Dunn, AJ, Berridge, CW: Physiological and behavioural responses to corticotropin-releasing factor administration: is CRF a mediator of anxiety or stress responses? 1990, *Brain Res Brain Res Reviews* 15:71-100
- Dwivedi, Y, Pandey, GN: Elucidating biological risk factors in suicide: Role of protein kinase A 2011, *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 35: 831-41
- Dwivedi, Y, Rizavi, HS, Pandey, GN: Differential effects of haloperidol and clozapine on H³cAMP binding, protein kinase A (PKA) activity, and mRNA and protein expression of selective regulatory and catalytic subunit isoforms of PKA in rat brain 2002, *J Pharmacol Exp Ther*: 197-209
- Dwivedi, Y, Rizavi, HS, Roberts, RC, Conley, RC, Tamminga, CA, Pandey, GN: Reduced activation and expression of ERK1/2 MAP kinase in the post-mortem brain of depressed suicide subjects 2001, *J Neurochem* 77: 916-928
- Eckel-Mahan, KL, Phan, T, Han, S, Wang, H, Chan, GC, Scheiner, ZS, Storm, DR: Circadian oscillation of hippocampal MAPK activity and cAMP: implications for memory persistence 2008, *Nature Neuroscience* 11: 1074-1082
- Edwards, MR, Haas, J, Panettieri, Jr., RA, Johnson, M, Johnston, SL: Corticosteroids and β 2 Agonists Differentially Regulate Rhinovirus-induced Interleukin-6 via Distinct Cis-acting Elements 2007, *J Biol Chem* 282: 15366-15375
- Egan, ES, Franklin, TM, Hilderbrand-Chae, MJ, McNeil, GP, Roberts, MA, Schroeder, AJ, Zhang, X, Jackson, FR: An extraretinally expressed insect cryptochrome with similarity to the blue light photoreceptors of mammals and plants 1999, *J Neurosci* 19: 3665-73
- Ehlers, CL, Chaplin, RI, Koob, GF: Antidepressants modulate the CNS effects of corticotropin releasing factor in rats 1987, *Med Sci Res* 15: 719-20
- Eikelboom, R, Stewart, J: Conditioning of drug-induced physiological responses 1982, *Psychol Rev* 89: 507-28
- El-Metwally, M, Shaffie-Nick, R, Pyne, NJ, Furman, BL: The effect of selective phosphodiesterase inhibitors on plasma insulin concentrations and insulin secretion in vitro in the rat 1997, *Eur J Pharmacol* 324: 227-32
- Elwood, W, Sun, J, Barnes, PJ, Giembycz, MA, Chung, KF: Inhibition of allergen-induced lung eosinophilia by type-III and combined type-III and IV-selective phosphodiesterase inhibitors in Brown-Norway rats 1995, *Inflamm Res* 44: 83-86
- Endröczy, E: Cellular and molecular bases of neuroendocrine processes, Symposium of the International Society of Psychoneuroendocrinology, Visegrad, Hungary 1975, Budapest 1976
- Engel, L, Mathes, A, Schwerdtle, I, Heinrich, B, Pogorzelski, B, Holthues, H, Vollrath, L, Spessert, R: Rat pineal arylalkylamine-N-acetyltransferase: cyclic AMP inducibility of its gene depends on prior entrained photoperiod 2004, *Mol Brain Res* 123: 45-55

- Episkopou, V: SOX2 functions in adult neural stem cells 2005, *Trends Neurosci* 28: 219-221
- Eriksson, H: Studies on the metabolism of steroid hormones in the rat, *Opuscula Medica Supplementum XVIII*, Stockholm 1971
- Estivariz, FE, Iturizza, F, McLean, C, Hope, J, Lowry, PJ: Stimulation of adrenal mitogenesis by N-terminal proopiomelanocortin peptides 1982, *Nature* 297:419-22
- Exton, JH: Mechanisms of hormonal regulation of hepatic glucose metabolism 1987, *Diabetes/Metab Rev* 3: 163-83
- Farvolden, P, Kennedy, SH, Lam, RW: Recent developments in the psychobiology and pharmacotherapy of depression: optimising existing treatments and novel approaches for the future 2003, *Expert Opin Investig Drugs* 12: 65-86
- Faust, V, Wolfersdorf, M, Hole, G: Zur Diagnose der Depressionen in Faust, V, Hole, G (Hrsg.): *Depressionen*, Stuttgart 1982
- Fisher, LA: Corticotropin-releasing factor: endocrine and autonomic integration of responses to stress 1989, *Trends Pharmacol Sci* 10:189-93
- Flaherty, CF, Rowan, GA, Pohorecky, LA: Corticosterone, novelty-induced hyperglycemia, and chlordiazepoxide 1986, *Physiol Behav* 37: 393-96
- Fleischhacker, WW, Hinterhuber, H, Bauer, H, Pflug, B, Berner, P, Simhandl, C, Wolf, R, Gerlach, W, Jaklitsch, H, Sastre-y-Hernandez, M, et al.: A multicenter double-blind study of three different doses of the new cAMP-phosphodiesterase inhibitor rolipram in patients with major depressive disorder 1992, *Neuropsychobiology* 26: 59-64
- Flicker, C, Geyer, MA: Behaviour during hippocampal microinfusion. I. Norepinephrine and diversive exploration 1982, *Brain Res Brain Res Rev* 4: 79-103
- Flugy, A, Gagliano, M, La Rocca, S, Novara, V, Cannizzaro, G: Head-twitch and forepaw shake responses after single and repeated treatment with rolipram: interaction with noradrenergic and dopaminergic agonists and antagonists 1988, *Pharmacol Res Comm* 20: 1127-28
- Foulkes, NS, Cermakian, N, Whitmore, Sassone-Corsi, P: Rhythmic transcription: the molecular basis of oscillatory melatonin synthesis in Veldhuis, JD (Hrsg.): *Mechanisms and biological significance in pulsatile hormone secretion*, Novartis Foundation Symposium 227, Hoboken 2000
- Franey, C, Aldhous, M, Burton, S, Checkley, S, Arendt, J: Acute treatment with desipramine stimulates melatonin and 6-sulphatoxy melatonin in man 1986, *Br J Clin Pharmacol* 22: 73-79
- Frowein, A, Lapin, V: Effects of sham-pinelectomy, performed under white and red light, on the melatonin content of rat pineal glands 1979, *Experientia* 35: 1681
- Fujimaki, K, Morinobu, S, Duman, RS: Administration of a cAMP phosphodiesterase 4 inhibitor enhances antidepressant-induced of BDNF mRNA in rat hippocampus 2000, *Neuropsychopharmacology* 22: 42-51
- Fujioka, T, Fujioka, A, Duman, RS: Activation of cAMP signaling facilitates the morphological maturation of newborn neurons in adult hippocampus 2004, *J Neurosci* 24: 319-328
- Fukuhara, C, Dirden, JC, Tosini, G: Circadian expression of period1, period2, and arylalkylamine N-acetyltransferase m-RNA in the rat pineal gland under different light conditions 2000, *Neurosci Lett* 286: 167-170
- Furman, BL, Pyne, NJ: Islet phosphodiesterase isoenzymes and insulin secretion 1990, *Diabet Med* 7: 19A - 20A

Fuxe, K, Gustafsson, J-Å, Wetterberg, L (Hrsg.): Steroid hormone regulation of the brain, Proceedings of an International Symposium held at the Wenner-Gren Center Stockholm 1980, Wenner-Gren Center International Symposium Series Volume 34, Oxford 1981

Gaffori, O, Le Moal, M, Stinus L: Locomotor hyperactivity and hypoexploration after lesion of the dopaminergic-A10 area in the ventral mesencephalic tegmentum (VMT) of rats 1980, *Behav Brain Res* 1: 313-29

Gagner, J, P, Drouin, J: Opposite regulation of proopiomelanocortin gene transcription by glucocorticoids and CRH 1985, *Mol Cell Endocrinol* 40: 25-32

Gagner, J, P, Drouin, J: Tissue-specific regulation of pituitary proopiomelanocortin gene transcription by corticotropin-releasing hormone, 3', 5'-cyclic adenosine monophosphate, and glucocorticoids 1987, *Mol Endocrinol* 1: 677-82

Galeno, TM, van Hoesen, GW, Brody, MJ: Central amygdaloid nucleus lesion attenuates exaggerated hemodynamic responses to noise stress in spontaneously hypertensive rats 1984, *Brain Res* 291: 249-59

Von Gall, C, Weaver, DR, Kock, M, Korf, HW, Stehle, JH: Melatonin limits transcriptional impact of phospho-CREB in the mouse SCN via the Mel1a receptor 2000, *Neuroreport* 11: 1803-07

Galloway, MP, Roth, RH: Clonidine prevents methylxanthine stimulation of norepinephrine metabolism in rat brain 1983, *J Neurochem* 40: 246-51

Gastpar, M, Rimpel, J : Akutbehandlung affektiver Erkrankungen 1995, *Nervenheilkunde* 14:100-107

Giembycz, MA, Newton, R: Harnessing the clinical efficacy of phosphodiesterase 4 inhibitors in inflammatory lung diseases: dual-selective phosphodiesterase inhibitors and novel combination therapies 2011, *Handb Exp Pharmacol* 204: 415-46

Giampa, C, Middei, S, Patassini, S, Borreca, A, Marullo, F, Laurenti, D, Bernardi, G, Ammassari-Teule, M, Fusco, FR: Phosphodiesterase type IV inhibition prevents sequestration of CREB binding protein, protects striatal parvalbumin interneurons and rescues motor deficits in the R6/2 mouse model of Huntington's disease 2009, *Eur J Neurosci* 29: 902-910

Giorgi, M, Modica, A, Pompili, A, Pacitti, C, Gasbarri, A: The induction of cyclic nucleotide phosphodiesterase 4 gene (PDE4D) impairs memory in a water maze task 2004, *Behav Brain Res* 154: 99-106

Gispen, WH, Wiegant, VM, Greven, HM, de Wied, D: The induction of excessive grooming in the rat by intraventricular application of peptides derived from ACTH: Structure activity studies 1975, *Life Sci* 17: 645-52

Gold, PW, Chrousos, GP: Organisation of the stress system and its dysregulation in melancholic and atypical depression: high vs. low CRH/NE states 2002, *Mol Psychiatry* 7: 254-75

Gold, PW, Chrousos, G, Kellner, C, Post, R, Roy, A, Augerino, P, Schulte, H, Oldfield, E, Loriaux, DL: Psychiatric implications of basic and clinical studies with corticotrophin-releasing factor 1984, *Am J Psychiatry* 141: 619-27

Gold, PW, Loriaux, L, Roy, A, Kling, MA, Calabrese, JR, Kellner, CH, Niemann, LK, Post, RM, Pickar, D, Galucci, W, Avgerinos, P, Paul, S, Oldfield, E, Cutler, GB Jr, Chrousos, GP: Responses to corticotropin-releasing hormone in the hypercortisolism of depression and Cushings' disease 1986, *N Engl J Med* 314: 1129-1335

Goldhoff, P, Warrington, N, Limbrick Jr., DD, Hope, A, Woerner, BM, Jackson, E, Perry, A, Piwnica-Worms, D, Rubin, JB: CCR-08-0827 Version 2 Targeted inhibition of cyclic AMP phosphodiesterase-4 promotes brain tumor regression 2008, *Clin Cancer Res* 14: 7717-7725

Gong, B, Vitolo, OV, Trinchese, F, Liu, S, Shelanski, M, Arancio, O: Persistent improvement in synaptic and cognitive functions in an Alzheimer mouse model after rolipram treatment 2004, *J Clin Invest* 114: 1624-1634

Gordon, T: The role of neurotrophic factors in nerve regeneration 2009, *Neurosurg Focus* 26: E3

- Graham, V, Khudyakov, J, Ellis, P, Pevny, L: SOX2 functions to maintain neural progenitor identity 2003, *Neuron* 39: 749-765
- Grant, SJ, Redmond, DE Jr: Clonidine suppresses methylxanthine induced quasi-morphine withdrawal syndrome 1982, *Pharmacol Biochem Behav* 17: 655-58
- Green, AR, Heal, DJ: The effects of drugs on serotonin-mediated behavioural models in Green, AR (Hrsg.): *Neuropharmacology of serotonin*, Oxford 1985
- Gretarsdottir, S, Thorleifsson, G, Reynisdottir, ST, Manolescu, A, Jonsdottir, S, Jonsdottir, T, Gudmundsdottir, T, Bjarnadottir, SM, Einarsson, OB, Gudjonsdottir, HM, Hawkins, M, Gudmundsson, G, Gudmundsdottir, H, Andrason, H, Gudmundsdottir, AS, Sigurdardottir, M, Chou, TT, Nahmias, J, Goss, S, Sveinbjörnsdottir, S, Valdimarsson, EM, Jakobsson, F, Agnarsson, U, Gudnason, V, Thorgeirsson, G, Fingerle, J, Gurney, M, Gudbjartsson, D, Frigge, ML, Kong, A, Stefansson, K, Gulcher, JR: The gene encoding phosphodiesterase 4D confers risk of ischemic stroke 2003, *Nat Genet* 35: 131-138
- Guiot-Goffioul, F, Gerard-Vandenhove, M-A, Troisfontaines, B, Breulet, M, Frenckell, R von, Bobon, D: [Preliminary results of a double blind trial of rolipram and desipramine in hospitalized major depressives] 1987, *Acta Psychiatr Belg* 87: 230-35
- Habib, KE, Gold, PW, Chrousos, GP: Neuroendocrinology of stress 2001, *Neuroendocrinology* 30: 695-728
- Hadley, AJ, Flack, JD, Buckingham, JC: Effects of selective phosphodiesterase inhibitors on the release of ACTH and LH from the rat anterior pituitary gland in vitro 1993, *Pharmacology Communications* 3: 283-95
- Härndahl, L, Wierup, N, Enerbäck, S, Mulder, H, Manganiello, VC, Sundler, F, Degerman, E, Ahrén, B, Holst, LS: β -Cell-targeted overexpression of phosphodiesterase 3B in mice caused impaired insulin secretion, glucose intolerance, and deranged islet morphology 2004, *J Biol Chem* 279:15214-222
- Halberg, F, Barnum, CP: Biorhythms and human reproduction 1958, *Proc Soc Exp Biol Med* 97: 897-900
- Hamdy, MM, Mamiya, T, Noda, Y, Sayed, M, Assi, AA, Gomaa, A, Yamada, K, Nabeshima, T: A selective phosphodiesterase IV inhibitor, rolipram blocks both withdrawal behavioural manifestations, and c-fos protein expression in morphine dependent mice 2001, *Behav Brain Res* 118: 85-93
- Handley, SL, Singh, L: Modulation of 5-hydroxytryptamine-induced head-twitch response by drugs acting at GABA and related receptors 1985, *Br J Pharmacol* 86: 297-303
- Handley, SL, Singh, L: Neurotransmitters and shaking behaviour - more than a 'gut-bath' for the brain? 1986, *Trends Pharmacol Sci* 7: 324-28
- Hannibal, J: Neurotransmitters of the retino-hypothalamic tract 2002, *Cell Tissue Res* 309: 73-88
- Hannila, SS, Filbin, MT: The role of cyclic AMP signaling in promoting axonal regeneration after spinal cord injury 2008, *Exp Neurol* 209: 321-332
- Hartmann, G, Bidlingmaier, C, Siegmund, B, Albrich, S, Schulze, J, Tschoep, K, Eigler, A, Lehr, HA, Endres, S: Specific type IV phosphodiesterase inhibitor rolipram mitigates experimental colitis in mice 2000, *J Pharmacol Exp Ther* 292: 22-30
- Hastings, MH, Maywood, ES, Neill, JS: Cellular circadian pacemaking and the role of cytosolic rhythms 2007, *Curr Biol* 18: R805-15
- Hauger, RL, Millan, MA, Catt, KJ, and Aguilera, G: Differential regulation of brain and pituitary corticotropin-releasing factor receptors by corticosterone 1987, *Endocrinology* 120:1527-33
- Heal, DJ, Green, AR: Repeated electroconvulsive shock increases the behavioural responses of rats to injections of both dopamine and dibutyryl cyclic AMP into the nucleus accumbens 1978, *Neuropharmacology* 17: 1085-87

- Hebenstreit, GF, Fellerer, K, Fichte, K, Fischer, G, Geyer, N, Meya, U, Sastre-y-Hernandez, M, Schony, W, Schratzer, M, Soukop, W, et al.: Rolipram in major depressive disorder: results of a double-blind comparative study with imipramine 1989, *Pharmacopsychiatry* 22: 156-60
- Henkel, Tigges, J, Davis, RL: Rat homologs of the drosophila dunce gene code for cyclic AMP phosphodiesterases sensitive to rolipram and Ro 20-1724 1990, *Mol Pharmacol* 37: 7-10
- Herman, ZS: Behavioural effects of dibutyryl cyclic 3', 5'AMP, noradrenaline and cyclic 3', 5'AMP in rats 1973, *Neuropharmacology* 12: 705-09
- Herman, ZS: Behavioural effects of dibutyryl cyclic 3', 5'AMP and biogenic amines in rats 1975, *Acta Physiol Pol* 26: 109-12
- Hermisdorf, T, Richter, W, Dettmer, D: Effects of dexamethasone and glukagon after long-term exposure on cyclic AMP phosphodiesterase 4 in cultured rat hepatocytes 1999, *Cell Signal* 11: 685-90
- Herzig, S, Hedrick, S, Moranette, I, Koo, S-H, Galimi, F, Montminy, M: CREB controls hepatic lipid metabolism through nuclear hormone receptor PPAR- γ 2003, *Nature* 426: 190-93
- Hertz, AL, Andrew T. Bender, AT, Smith, KC, Gilchrist, M, Amieux, PS, Aderem, A, Beavo, JA: Elevated cyclic AMP and PDE4 inhibition induce chemokine expression in human monocyte-derived macrophages 2009, *Proc Natl Acad Sci USA* 106: 21978-21983
- Hervé, R, Schmitz, T, Evain-Brion, D, Cabrol, D, Leroy, M-J, Méhats, C: The PDE4 Inhibitor Rolipram Prevents NF- κ B Binding Activity and Proinflammatory Cytokine Release in Human Chorionic Cells 2008, *J Immunol* 181: 2196 -2202
- Hetman, JM, Robas, N, Baxendale, R, Fidock, M, Phillips, SC, Soderling, SH, Beavo, JA: Cloning and characterization of two splice variants of human phosphodiesterase 11A, *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 12891-12895
- Ho, AK, Burns, TG, Grotta, LJ, Brown, GM: Scheduled feeding and 24-hour rhythms of N-acetylserotonin and melatonin in rats 1985, *Endocrinology* 116: 1858-62
- Hole, G : Diagnostik und Diagnosewandel bei der Depression in Faust, V, Hole, G (Hrsg.): Depressionen, Stuttgart 1982
- Holsboer, F: The corticosteroid receptor hypothesis of depression 2000, *Neuropsychopharmacology* 23: 477-501
- Holsboer, F: Stress, hypercortisolism and corticosteroid receptors in depression: implications for therapy 2001, *J Affect Disord* 62: 77-91
- Holsboer, F: High-quality antidepressant discovery by understanding stress hormone physiology 2003, *Ann N Y Acad Sci* 1007: 394-404
- Holsboer, F, Müller, OA, Doerr, HG, Sippell, WG, Stalla, GK, Gerken, A, Steiger, A, Boll, E, Benker, O: ACTH and multiteroid responses to corticotropin-releasing factor in depressive illness: Relationship to multiteroid responses after ACTH stimulation and dexamethasone suppression 1984, *Psychoneuroendocrinology* 9: 147-60
- Honma, KI, Hiroshige, T: Internal synchronisation among several circadian rhythms in rats under constant light 1978, *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 235: R243-49
- Hornby, PA, Piekut, DT: Opiocortin and catecholamine input to CRF-immunoreactive neurons in rat forebrain 1989, *Peptides* 10: 1139-46
- Horowski, R, Sastre-y-Hernandez, M: Clinical effects of the neurotropic selective cAMP phosphodiesterase inhibitor rolipram in depressed patients: Global evaluation of the preliminary reports 1985, *Curr Ther Res Clin Exp* 38: 23-29
- Houslay, MD: Underpinning compartmentalised cAMP signalling through targeted cAMP breakdown 2010, *Trends Biochem Sci* 35: 91-100

- Houslay, MD, Adams, DR: PDE4 cAMP phosphodiesterases: modular enzymes that orchestrate signalling cross-talk, desensitization and compartmentalization 2003, *Biochem J* 370: 1–18
- Houslay, MD, Schafer, P, Zhang, KY: Keynote review: phosphodiesterase-4 as a therapeutic target 2005, *Drug Discov Today* 10: 1503-1519
- Howland, BE: Effect of short periods of fasting and time of day on serum levels of gonadotropins, testosterone and glucose in male rats 1975, *Horm Metab Res* 7: 40-43
- Hsu, DS, Zhao, X, Zhao, S, Kazantsev, A, Wang, RP, Todo, T, Wei, YF, Sancar, A: Putative human blue-light photoreceptors hCRY1 and hCRY2 are flavoproteins 1996, *Biochemistry* 35: 13871-77
- Illnerova, H., Vanecek, J: Two-oscillator structure of the pacemaker controlling the circadian rhythm of N-acetyltransferase in the rat pineal gland 1982, *J Comp Physiol (A)* 145: 539-548
- Imaki, T, Shibasaki, T, Masuda, A, Imaki, J, Demura, H, Shizume, K, Ling, N: Corticotropin-releasing factor reverses the effect of pentobarbital through a β -noradrenergic mechanism in rats 1988, *Life Sci* 43: 813-20
- Iredale, PA, Alvaro, JD, lee, Y, Terwilliger, R, Chen, YL, Duman, RS: Role of corticotropin-releasing factor receptor-1 in opiate withdrawal 2000, *J Neurochem* 74: 199-208
- Itoh, T, Abe, K, Tokumura, M, Horiuchi, M, Inoue, O, Ibi, N: Different regulation of adenylyl cyclase and rolipram-sensitive phosphodiesterase activity on the frontal cortex and hippocampus in learned helplessness rats 2003, *Brain Res* 991: 142-49
- Itoh, T, Abe, K, Zoghbi, SS, Inoue, O, Hong, J, Imaizumi, M, Pike, VW, Innis, RB, Fujita, M: PET Measurement of the In Vivo Affinity of ^{11}C -(R)-Rolipram and the Density of Its Target, Phosphodiesterase-4, in the Brains of Conscious and Anesthetized Rats 2009, *J Nucl Med* 50: 749–756
- Izikki, M, Raffestin, B, Klar, J, Hatzelmann, A, Marx, D, Tenor, H, Zadigue, P, Adnot, S, Eddahibi, S: Effects of Roflumilast, a Phosphodiesterase-4 Inhibitor, on Hypoxia- and Monocrotaline-Induced Pulmonary Hypertension in Rats 2009, *J Pharmacol Exp Ther* 33: 54-62
- Jacobitz, S, McLaughlin, MM, Livi, GP, Burman, M, Torphy TJ: Mapping the functional domains of human recombinant phosphodiesterase 4A: structural requirements for catalytic activity and rolipram binding 1996, *Mol Pharmacol* 50: 891-899
- Jacobs, BL: An animal behaviour model for studying central serotonergic synapses 1976, *Life Sci* 19: 777–85
- Janowsky, DS, El-Yousef, MK, Davis, JM, Sekerke, HJ: A cholinergic-adrenergic hypothesis of mania and depression 1972, *Lancet* 2: 632-35
- Jiang, HK, Wang, J-Y, Lin, J-C: The central mechanism of hypothalamic-pituitary-adrenocortical system hyperfunction in depressed patients 2000, *Psychiatry Clin Neurosci* 54: 227-34
- Jin, SL, Lan, L, Zoudilova, M, Conti, M: Specific role of phosphodiesterase 4B in lipopolysaccharide-induced signaling in mouse macrophages 2005, *J Immunol* 175: 1523–1531
- Jolin, T, Montes, A: Daily rhythm of plasma glucose and insulin levels in rats 1973, *Horm Res* 4, 153-56
- Jolles, J: Neuropeptides, brain membrane phosphorylation and grooming behaviour, *Proefschrift* 1980
- Jolles, J, Rompa-Barendregt, J, Gispen, WH: Novelty and grooming behaviour in the rat 1979a, *Behav Neural Biol* 25: 563-72
- Jolles, J, Rompa-Barendregt, J, Gispen, WH: ACTH-induced excessive grooming in the rat: the influence of environmental and motivational factors 1979b, *Horm Behav* 12: 60-72

- Jones, RL, McGreer, PL, Greiner, AC: Metabolism of exogenous melatonin in schizophrenic and non-schizophrenic volunteers 1969, *Clin Chim Acta* 26: 281-85
- Kajana, S, Goshgarian, HG: Administration of Phosphodiesterase Inhibitors and an Adenosine A1 Receptor Antagonist Induces Phrenic Nerve Recovery in High Cervical Spinal Cord Injured Rats 2008, *Exp Neurol* 210: 671-680
- Kalsbeek, A, Garidou, ML, Palm, IF, Van Der Vliet, J, Simonneaux, V, Pevet, P, Buijs, RM: Melatonin sees the light: blocking GABA-ergic transmission in the paraventricular nucleus of the hypothalamus elevate plasma melatonin levels 2000, *Eur J Neurosci* 12: 3146-54
- Kalsbeek, A, LaFleur, S, Van Heijningen, Buijs, RM: Suprachiasmatic GABAergic inputs to the paraventricular nucleus control plasma glucose concentrations in the rat via sympathetic innervation of the liver 2004, *J Neurosci* 24: 7604-13
- Kaminski, YG, Kosenko, EA: Diurnal rhythms in liver carbohydrate metabolism. Comparative aspects and critical review 1987, *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 86B: 763-84
- Karin, M, Smeal, T: Control of transcription factors by signal transduction pathways: the beginning of the end 1992, *Trends Biochem Sci* 17: 418-22
- Kappers, JA: The development, topographical relations and innervation of the epiphysis cerebri in the albino rat 1960, *Z Zellforsch Mikrosk Anat* 52: 163-215
- Kappers, JA (Hrsg.): Neurohormones and neurohumors, Structure and Function of Regulatory Mechanisms, Proceedings of the Symposium of the International Society for Neurovegetative Research Amsterdam 1967, *J Neurovisc Rel Suppl IX*, Wien 1969
- Kasckow, JW, Baker, D, Geraciotti, TD Jr: Corticotropin-releasing hormone in depression and post-traumatic stress disorder 2001, *Peptides* 22: 845-51
- Kaulen, P, Brüning, G, Schneider, HH, Sarter, M, Baumgarten, HG: Autoradiographic mapping of a selective cyclic adenosine monophosphate phosphodiesterase in rat brain with the antidepressant [3H] rolipram 1989, *Brain Res* 503: 229-45
- Kawasaki, H, Schlitz, L, Chiu, R, Itakura, K, Taira, K, Nakatani, Y, Yokoyama, KK: ATF-2 has intrinsic histone acetyltransferase activity which is modulated by phosphorylation 2000, *Nature* 405: 195-200
- Keck, ME, Holsboer, F: Hyperactivity of CRH neuronal circuits as a target for therapeutic interventions in affective disorders 2001, *Peptides* 22: 835-44
- Kehne, JH, Astrachan, DI, Astrachan, E, Tallman, JF, Davis, M: The role of spinal cord cAMP in the acoustic startle response in rats 1986, *J Neurosci* 6: 3250-57
- Kehr, W, Debus, G, Neumeister, R: Effects of rolipram, a novel antidepressant, on monoamine metabolism in rat brain 1985, *J Neural Transm* 63: 1-12
- Khaled, M, Levy, C, Fisher, DE: Control of melanocyte differentiation by a MITF-PDE4D3 homeostatic circuit 2010, *Genes Dev* 24: 2276-2281
- Kincaid, RL, Manganiello, VC, Odaya, CE, Osborne, JC, Stith, Coleman, IE, Danello, MA, Vaughan, M: Purification and properties of calmodulin-stimulated phosphodiesterase from mammalian brain 1984, *J Biol Chem* 259: 5158-66
- Kim, JS, Coon, SL, Blackshaw, S, Cepko, CL, Moller, M, Mukda, S, Zhao, WQ, Charlton, CG, Klein, DC: Methionine Adenosyltransferase: Adrenergic-cAMP mechanism regulates a daily rhythm in pineal expression 2005, *J Biol Chem* 280: 677-84
- Klein DC: Arylalkylamine N-acetyltransferase: "the timezyme" 2007, *J Biol Chem* 282: 4233-37

- Klein, DC: Circadian Rhythms in the pineal gland in Krieger, DT (Hrsg.): Endocrine Rhythms, Comprehensive Endocrinology Series, New York 1979, 203-23
- Klein, DC (Hrsg.): Melatonin Rhythm Generating System, Developmental Aspects, International Symposium on Developmental Neurobiology of the Melatonin Rhythm Generating System, Bethesda 1981, Basel 1982
- Klein, DC: Photoneural regulation of the mammalian pineal gland in Evered, D, Clark, S (Hrsg.): Photoperiodism, melatonin and the pineal, Ciba Foundation Symposium 117, London 1985
- Klein, DC, Moore, RY: Pineal N-acetyltransferase and hydroxyindole-O-methyltransferase: control by the retinohypothalamic tract and the suprachiasmatic nucleus 1979, Brain Res 174: 245-62
- Klein, DC, Sugden, D, Weller, JL: Postsynaptic α -adrenergic receptors potentiate the β -adrenergic stimulation of pineal serotonin N-acetyltransferase 1983b, Proc Natl Acad Sci USA 80: 599-603
- Klein, DC, Weller, JL: Indole metabolism in the pineal gland: a circadian rhythm in N-acetyltransferase 1970, Science 169: 1093-95
- Klein, DC, Weller, JL: Rapid light-induced decrease in pineal serotonin N-acetyltransferase activity 1972, Science 177: 532-33
- Kleven, MS, Sparber, SB: Modification of quasi-morphine withdrawal with serotonin agonists and antagonists: evidence for a role of serotonin in the expression of opiate withdrawal 1989, Psychopharmacology (Berl) 98: 231-35
- Ko, WC, Lin, LH, Shen, HY, Lai, CY, Chen, CM, Shih, CH: Biochanin A, a Phytoestrogenic Isoflavone with Selective Inhibition of Phosphodiesterase 4, Suppresses Ovalbumin-Induced Airway Hyperresponsiveness 2011, Evid Based Complement Alternat Med 2011: 635058. Epub 2011 Mar 14, doi: 10.1155/2011/635058
- Koch, B, Lutz-Bucher, B: Indirect relationship between vasopressin-induced secretion of ACTH and cyclic nucleotides in cultured anterior pituitary cells 1989, Eur J Pharmacol 159: 53-60
- Koch, M, Mauhin, V, Stehle, JH, Schomerus, C, Korf, HW: Dephosphorylation of pCREB by serine/threonine phosphatases is involved in inactivation of Aanat gene transcription in rat pineal gland 2003, J Neurochem 85: 170-79
- Koob, GF: Stress, corticotropin-releasing factor, and behaviour 1985, Perspect Behav Med 2: 39-52
- Koob, GF, Bloom, FE: Corticotropin-releasing factor and behaviour 1985, Fed Proc 44: 259-63
- Koob, GF: Corticotropin-releasing factor, norepinephrine, and stress 1999, Biol Psychiatry 46: 1167-80
- Korf, HW, von Gall, C, Stehle, J: The circadian system and melatonin: lessons from rats and mice 2003, Chronobiol Int 20: 697-710
- Krause, W, Kühne, G: Pharmacokinetics of rolipram in the rhesus and the cynomolgus monkeys, the rat and the rabbit. Studies on species differences 1988, Xenobiotica 18: 561-71
- Kreibich, AS, Blendy, JA: cAMP response element-binding protein is required for stress but not cocaine-induced reinstatement 2004, J Neurosci 24: 6686-92
- Krieger, DT: Rhythms in CRF, ACTH and corticosteroids in Krieger, DT (Hrsg.): Endocrine Rhythms, Comprehensive Endocrinology Series, New York 1979, 123-42
- Kuhn, R: Über die Behandlung depressiver Zustände mit einem Iminodibenzylderivat (G 22355) 1957, Schweiz Med Wochenschr 87: 1135-40
- Kumari, M, Cover, PO, Poyser, RH, Buckingham, JC: Stimulation of the hypothalamo-pituitary-adrenal axis in the rat by three selective type-4 phosphodiesterase inhibitors: in vitro and in vivo studies 1997, Br J Pharmacol 121: 459-68

- Laemmel, K, Sastre, M: Rolipram as an antidepressant 1983, VIIth World Congress of Psychiatry Vienna, July 1983, 568, No. P 677 (Abstr)
- Landgraf, R, Wigger, A, Holsboer, F, Neumann, ID: Hyper-reactive hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis in rats bred for high-anxiety behaviour 1999, *J Neuroendocrinol* 11: 405-07
- Lapin, LP, Oxenkrug, GF: Intensification of the central serotonergic processes as a possible determinant of the thymoleptic effect 1969, *Lancet* 1: 132-36
- Laux, G, Becker, T, Kühne, G, Lesch, KP, Riederer, P, Beckmann, H: Clinical and biochemical effects of the selective phosphodiesterase inhibitor rolipram in depressed inpatients controlled by determination of plasma level 1988, *Pharmacopsychiatry* 21: 378-9
- Laux, G, Lesch, KP, Schwab, M: Psychotropic effects of corticotropin-releasing hormone stimulation in depressive patients 1988, *Neuropsychobiology* 19: 40-44
- Lazosky, AJ, Britton, DR: Effects of 5-HT-1A receptor agonists on CRF-induced behaviour 1991, *Psychopharmacology* 104: 132-36
- Leake, A, Griffiths, HW, Ferrier, IN: Plasma POMC, ACTH and cortisol following hCRH administration in major depression and dysthymia 1989, *J Affect Disord* 17: 57-64
- LeBlanc, J, Jobin, M, Cote, J, Samson, P, Labrie, A: Enhanced metabolic response to caffeine in exercise-trained human subjects 1985, *J Appl Physiol* 59: 832-37
- LeBlanc, J, Richard, D, Racotta, IS: Metabolic and hormone-related responses to caffeine in rats 1995, *Pharm Res* 32: 129-33
- Lee, HT, Chang, YC, Wang, LY, Wang, ST, Huang, CC, Ho, CJ: cAMP response element-binding protein activation in ligation preconditioning in neonatal brain 2004, *Ann Neurol* 56: 611-23
- Lelkes, Z, Alfoldi, P, Erdos, A, Benedek, K: Rolipram, an antidepressant that increases the availability of cAMP, transiently enhances wakefulness in rats 1998, *Pharmacol Biochem Behav* 60: 835-39
- Lemmer, B, Górká, Z, Gottheiner, H, Lang, PH: Effects of imipramine on circadian rhythms in the beta-receptor-effector system and in the motor activity of rats in Reinberg, A, Smolensky, M, Labrecque, MG (Hrsg.): Annual review of chronopharmacology, Volume 3, Biological rhythms and medications, Proceedings of the Second Montreux Conference of Chronopharmacology 1986, Oxford 1986
- Leonard BE: The immune system, depression and the action of antidepressants 2001, *Prog Neuro-Psychopharmacol Biol Psychiat* 25: 767-80
- Lewy, A, Sack, DS: The dim light melatonin onset (DLMO) as a marker for circadian phase position 1989, *Chronobiol Int* 6: 93-102
- Lewy, AJ, Sack, RL, Singer, CM: Melatonin, light and chronobiological disorders in Evered, D, Clark, S (Hrsg.): Photoperiodism, melatonin and the pineal, Ciba Foundation Symposium 117, London 1985
- Li, LX, Cheng, YF, Lin, HB, Wang, C, Xu, JP, Zhang, HT: Prevention of cerebral ischemia-induced memory deficits by inhibition of phosphodiesterase-4 in rats 2011b, *Metab Brain Dis* 26: 37-47
- Li, YF, Cheng, YF, Huang, Y, Conti, M, Wilson, SP, O'Donnell, JM, Zhang, HT: Phosphodiesterase-4D Knock-Out and RNA Interference-Mediated Knock-Down Enhance Memory and Increase Hippocampal Neurogenesis via Increased cAMP Signaling 2011a, *J Neurosci* 31: 172-183
- Li, YF, Huang, Y, Amsdell, SL, Xiao, L, O'Donnell, JM, Zhang, HT: Antidepressant- and anxiolytic-like effects of the phosphodiesterase-4 (PDE4) inhibitor rolipram on behaviour depend on cyclic AMP-response element binding protein (CREB)-mediated neurogenesis in the hippocampus 2009, *Neuropsychopharmacology* 34: 2404-2419

- Liang, KC, Lee, EHY: Intra-amygdala injections of corticotropin releasing factor facilitate inhibitory avoidance learning and reduce exploratory behaviour in rats 1988, *Psychopharmacology* 96: 232-36
- Liebsch, G, Landgraf, R, Gerstberger, R, Probst, JC, Wotjak, CT, Engelmann, M, Holsboer, F, Montkowski, A: Chronic infusion of a CRH₁ receptor antisense oligodeoxynucleotide into the central nucleus of the amygdala reduced anxiety-related behaviour in socially defeated rats 1995, *Regul Peptides* 59: 229-39
- Liebsch, G, Linthorst, ACE, Neumann, ID, Reul, JMHM, Holsboer, F, Landgraf, R: Behavioural, physiological, and neuroendocrine stress responses and differential sensitivity to diazepam in two Wistar rat lines selectively bred for high- and low-anxiety-related behaviour 1998, *Neuropsychopharmacology* 19: 381-96
- Lim, MC, Shipston, MJ, Antoni, FA: Posttranslational modulation of glucocorticoid feedback inhibition at the pituitary level 2002, *Endocrinology* 143: 3796-801
- Lin, MT, Chan, HK, Chen, CF, Teh, GW: Involvement of both opiate and catecholaminergic receptors in the behavioural excitation provoked by thyrotropin-releasing hormone: comparisons with amphetamine 1982a, *Neuropharmacology* 22: 465-71
- Lin, MT, Chen, CF, Chuang, KS: Both dopaminergic and adrenergic receptors in the brain are involved in the behavioural excitation induced by dibutyryl 3',5'- adenosine monophosphate and aminophylline in the rat 1984, *Neuropharmacology* 23: 129-35
- Lin, WJ, Yeh, WC: Implication of Toll-like receptor and tumor necrosis factor alpha signaling in septic shock 2005, *Shock* 24: 206-209
- Lin, C, Todo, T: The cryptochromes 2005, *Genome Biology* 6: 220.1-9
- Lincoln, GA, Ebling, FJP, Almeida, OFX: Generation of melatonin rhythms in Evered, D, Clark, S (Hrsg.): *Photoperiodism, melatonin and the pineal*, Ciba Foundation Symposium 117, London 1985
- Link, A, Selejan, S, Maack, C, Lenz, M, Böhm, M: Phosphodiesterase 4 inhibition but not beta-adrenergic stimulation suppresses tumor necrosis factor-alpha release in peripheral blood mononuclear cells in septic shock 2008, *Crit Care* 12: R159
- Livi, GP, Kmetz, P, McHale, MM, Cieslinski, LB, Sathe, GM, Taylor, DP, Davis, RL, Torphy, TJ, Balcarek, JM: Cloning and expression of cDNA for a human low-K_m, rolipram-sensitive cyclic AMP phosphodiesterase 1990, *Mol Cell Biol* 10: 2678-2686
- Lorenz, RJ, Vollmar, J (Hrsg.): *Grundbegriffe der Biometrie*, Stuttgart 1988
- Lourenco, CM, DaSilva, JN, Warsh, JJ, Wilson, AA, Houle, S: Imaging of cAMP-specific phosphodiesterase-IV: comparison of [11C] rolipram and [11C] Ro 20-1724 in rats 1999, *Synapse* 31: 41-50
- Lu, L, Liu, D, Ceng, X, Ma, L: Differential roles of corticotropin-releasing factor receptor subtypes 1 and 2 in opiate withdrawal and in relapse to opiate dependence 2000, *Eur J Neurosci* 12: 4398-404
- Lucki, I, Wieland, S: 5-Hydroxytryptamine_{1A} receptors and behavioural responses 1990, *Neuropsychopharmacology* 3: 481-93
- Lugnier, C: Cyclic nucleotide phosphodiesterase (PDE) superfamily: a new target for the development of specific therapeutic agents 2006, *Pharmacol Ther* 109: 366-398
- Lynch, HJ, Ozaki, Y, Wurtman, RJ: The measurement of melatonin in mammalian tissues and body fluids 1978, *J Neural Transm Suppl* 13: 251-64
- Lynch, HJ, Rivest, RW, Ronsheim, PM, Wurtman, RJ: Light intensity and the control of melatonin secretion in the rat 1981, *Neuroendocrinology* 33: 181-85

- Lynch, HJ, Wurtman, RJ, Ronsheim, P: Activity and melatonin rhythms among rats with recourse to dark burrows 1982, *Prog Clin Biol Res* 92: 75-82
- MacKenzie, KF, Wallace, DA, Hill, EV, Anthony, DF, Henderson, DJP, Houslay, DM, Arthur, JSC, Baillie, GS, Houslay, MD: Phosphorylation of cyclic AMP phosphodiesterase-4A5 (PDE4A5) by MK2 (MAPKAPK2) attenuates its activation through PKA phosphorylation 2011, *Biochem J* 435: 755-69
- MacNaughton, KW, Sathasivam, P, Vallerand, AL, Graham, TE: Influence of caffeine on metabolic responses of men at rest in 28 and 5 °C 1990, *J Appl Physiol* 68: 1889-95
- Maj, J, Przegalinski, E, Mogilnicka, E: Hypothesis concerning the mechanism of action of antidepressant drugs 1984, *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 100: 1-74
- Manganiello, VC, Taira, M, Degerman, E, Belfrage, P: Type III cGMP-inhibited cyclic nucleotide phosphodiesterases (PDE 3 gene family) 1995, *Cell Signal* 7: 445-55
- Mangas, A, Coveñas, R, Geffard, M: New drug therapies for multiple sclerosis 2010, *Curr Opin Neurol* 23: 287-292
- Marko, D, Pahlke, G, Merz, KH, Eisenbrand, G: Cyclic 3',5'-nucleotide phosphodiesterases: potential targets for anticancer therapy 2000, *Chem Res Toxicol* 13: 944-948
- Martin, C, Goggel, R, Dal Piaz, V, Vergelli, C, Giovannoni, P, Ernst, M, Uhlig, S: Airway relaxant and antiinflammatory properties of a PDE4 inhibitor with low affinity for the high-affinity rolipram binding site 2002, *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 365: 284-289
- Martinez, I, Puerta, C, Redondo, C, Garcia-Merino, A: Type IV phosphodiesterase inhibition in experimental allergic encephalomyelitis of Lewis rats: sequential gene expression analysis of cytokines, adhesion molecules and the inducible nitric oxide synthase 1999, *J Neurol Sci* 164: 13-23
- Mason, R, Brooks, A: The electrophysiological effects of melatonin and a putative melatonin antagonist (N-acetyltryptamine) on rat suprachiasmatic neurones in vitro 1988, *Neurosci Lett* 95: 296-301
- Masumoto, KH, Fujioka, A, Nakahama, K, Inouye, ST, Shigeyoshi, Y: Effect of phosphodiesterase type 4 on circadian clock gene *Per1* transcription 2003, *Biochem Biophys Res Comm* 306: 781-85
- Matsumo, T, Kobayashi, T, Kamata, K: Phosphodiesterases in the vascular system 2003, *J Smooth Muscle Res* 39: 67-86
- Matsuzaki, I, Takamatsu, Y, Moroji, T: The effects of intracerebroventricularly injected corticotropin-releasing factor (CRF) on the central nervous system: behavioural and biochemical studies 1989, *Neuropeptides* 13: 147-55
- Matussek, N: Neuroendokrinologische Untersuchungen bei depressiven Syndromen 1978, *Nervenarzt* 49: 569-75
- Matussek, N: Stoffwechselfathologie der Zykllothymie und Schizophrenie in Kisker, KP, Meyer, JE, Müller, C, Strömgen, E (Hrsg.): *Psychiatrie der Gegenwart*, Bd. I/2, Berlin 1980
- McCann, FE, Palfreeman, AC, Andrews, M, Perocheau, DP, Inglis, JJ, Schafer, P, Feldmann, M, Williams, RO, Brennan, FM: Apremilast, a novel PDE4 inhibitor, inhibits spontaneous production of tumour necrosis factor alpha from human rheumatoid synovial cells and ameliorates experimental arthritis 2010, *Arthritis Res Ther* 12: R10
- McGuire, RA, Rand, WM, Wurtman, AJ: Entrainment of the body temperature rhythms in rats: effect of colour and intensity on environmental light 1973, *Science* 181: 956-57
- Mefford, IN, Chang, P, Klein, DC, Namboodiri, MAA, Sugden, D, Barchas, J: Reciprocal day/night relationship between serotonin oxidation and N-acetylation products in the rat pineal gland 1983, *Endocrinology* 113: 1582-86
- Menaker, M (Hrsg.): *Biochronometry*, Proceedings of a symposium Friday Harbor, Washington 1969, National Academy of Sciences Washington, D.C. 1971

- Menaker, M: Eyes - the second (and) third pineal glands? in Evered, D, Clark, S (Hrsg.): Photoperiodism, melatonin and the pineal, Ciba Foundation Symposium 117, London 1985
- Mendlewicz, J, Linkowski, P, Branchey, L, Weinberg, U, Weitzman, ED, Branchey, M: Abnormal 24 hour pattern of melatonin secretion in depression 1979, *Lancet* 2: 1362
- Mendlewicz, J, van Praag, HM (Hrsg.): Biological Rhythms and Behaviour, *Advances in Biological Psychiatry*, Vol. 11, Basel 1983
- Menetrey, D, Basbaum, AI: Spinal and trigeminal projections to the nucleus of the solitary tract: a possible substrate for somatovisceral and viscerovisceral reflex activation 1987, *J Comp Neurol* 255: 439-50
- Merchenthaler, I, Vigh, S, Petrusz, P, Schally, AV: The paraventriculo-infundibular corticotropin releasing factor (CRF) pathway as revealed by immunocytochemistry in long-term hypophysectomized or adrenalectomized rats 1983, *Regul Pept* 5: 295-305
- Merchenthaler, I, Vigh, S, Schally, AV, Stumpf, WE, and Arimura, A: Immunocytochemical localization of corticotropin releasing factor (CRF)- like immunoreactivity in the thalamus of the rat 1984, *Brain Res* 323:119-22
- Messing, RB: The sensitivity of albino rats to lights of different wavelength: a behavioural assessment 1972, *Vision Res* 12: 753-61
- Meya, U, Fichte, K: Antidepressiver Wirkeintritt von Rolipram, einem Antidepressivum mit einem neuen Wirkmechanismus, im Vergleich zu Imipramin 1991, *Nervenarzt* 62: 288-91
- Meyers, JA, Taverna, J, Chaves, J, Makkinje, A, Lerner, A: PDE4 inhibitors augment levels of glucocorticoid receptor in B cell chronic lymphocytic leukemia but not in normal circulating hematopoietic cells 2007, *Clin Cancer Res* 13: 4920-4927
- Mikkelsen, JD, Hay-Schmidt, A, Kiss, A: Serotonergic stimulation of the rat hypothalamo-pituitary-adrenal axis: Interaction between 5-HT_{1A} and 5-HT_{2A} receptors 2004, *Ann N Y Acad Sci* 1018: 65-70
- Milara, J, Navarro, A, Almodéver, P, Lluch, J, Morcillo, EJ, Cortijo, J: Oxidative stress-induced glucocorticoid resistance is prevented by dual PDE3/PDE4 inhibition in human alveolar macrophages 2011, *Clin Exp Allergy* 41: 535-546
- Millar, JK, Pickard, BS, Mackie, S, James, R, Christie, S, Buchanan, SR, Malloy, MP, Chubb, JE, Huston, E, Baillie, GS, Thomson, PA, Hill, EV, Brandon, NJ, Rain, JC, Camargo, LM, Whiting, PJ, Houslay, MD, Blackwood, DH, Muir, WJ, Porteous, DJ: DISC1 and PDE4B are interacting genetic factors in schizophrenia that regulate cAMP signaling 2005, *Science* 310: 1187-1191
- Millard, WJ, Reppert, SM, Sagar, SM, Martin, JB: Light-dark entrainment of the growth hormone ultradian rhythm in the rat is mediated by the arcuate nucleus 1981, *Endocrinology* 108: 2394-96
- Minneman, KP, Iversen, LL: Diurnal rhythm in rat pineal cyclic nucleotide phosphodiesterase activity 1976, *Nature* 260: 59-61
- Miro, X, Perez-Torres, S, Puigdomenech, P, Palacios, JM, Mengod, G: Differential distribution of PDE4D splice variant mRNAs in rat brain suggests association with specific pathways and presynaptical localization 2002, *Synapse* 15: 259-69
- Miyamoto, Y, Sancar, A: Vitamin B2-based blue-light receptors in the retinohypothalamic tract as the photoactive pigments for setting the circadian clock in mammals 1998, *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 6097-6102
- Modell, S, Yassouridis, A, Huber, J, Holsboer, F: Corticosteroid receptor function is decreased in depressed patients 1997, *Neuroendocrinology* 65: 216-22
- Möller, HJ, Laux, G, Deister, A: *Psychiatrie und Psychotherapie*, Stuttgart 2001

- Moore, RY: Neural control of pineal function in mammals and birds 1978b, *J Neural Transm Suppl* 13: 47-58
- Moore-Ede, MC, Sulzman, FM, Fuller, CA: *The Clocks That Time Us, Physiology of the Circadian Timing System*, Cambridge 1982
- Morita, T, Tokura, H: The influence of different wavelengths of light on human biological rhythms 1998, *Appl Human Sci* 17: 91-96
- Morozov, A, Muzzio, IA, Bourcholadze, R, Van-Strien, N, Lapidus, K, Yin, DQ, Winder, DG, Adams, JP, Sweatt, JD, Kandel, ER: Rap1 couples cAMP signaling to a distinct pool of p42/44 MAPK regulating excitability, synaptic plasticity, learning, and memory 2003, *Neuron* 39: 309-325
- Müller, MB, Holsboer, F, Keck, ME: Genetic modification of corticosteroid receptor signalling: Novel insights into pathophysiology and treatment strategies of human affective disorders 2002, *Neuropeptides* 36: 117-31
- Müller, MB, Zimmermann, S, Sillaber, I, Hagemeyer, TP, Deussing, JM, Timpl, P, Kormann, MSD, Droste, SK, Kühn, R, Reul, JM, Holsboer, F, Wurst, W: Limbic corticotrophin-releasing hormone receptor 1 mediates anxiety-related behaviour and hormonal adaptation to stress 2003, *Nat Neurosci* 6: 1100-07
- Munshi, A, Kaul, S: Genetic basis of stroke: An overview 2010, *Neurol India (serial online)* 58: 185-90
- Nakagawa, S, Kim, JE, Lee, R, Malberg, JE, Chen, J, Steffen, C, Zhang, YJ, Nestler, EJ, Duman, RS: Regulation of neurogenesis in adult mouse hippocampus by cAMP and the cAMP response element-binding protein 2002, *J Neurosci*: 3673-3682
- Nakamura, TJ, Shinohara, K, Funabashi, T, Mitsushima, D, Kimura, F: Circadian and photic regulation of cryptochrome mRNAs in the rat pineal gland 2001, *Neurosci Res* 41: 25-32
- Nemeroff, CB: The role of corticotropin-releasing factor in the pathogenesis of major depression 1988, *Pharmacopsychiatry* 21:76-82
- Nemeroff, CB, Widerlov, E, Bissette, G, Walleus, H, Karlsson, I, Eklund, K, Kilts, CD, Loosen, PT, Vale, W: Elevated concentrations of corticotropin-releasing factor-like immunoreactivity in depressed patients 1984, *Science* 226: 1342-44
- Nemoz, G, Prigent, AF, Moueqqit, M, Fougier, S, Macovschi, O, Pacheco, H: Selective inhibition of one of the cyclic AMP phosphodiesterases from rat brain by the neurotropic compound rolipram 1985, *Biochem Pharmacol* 34: 2997-3000
- Nemoz, G, Moueqqit, M, Prigent, AF, Pacheco, H: Isolation of similar rolipram-inhibitible cyclic-AMP-specific phosphodiesterases from rat brain and heart 1989, *Eur J Biochem* 184: 511-20
- Nibuya, M, Nestler, EJ, Duman, RS: Chronic antidepressant administration increases the expression of cAMP response element binding protein (CREB) in rat hippocampus 1996, *J Neurosci* 16: 2365-72
- Niesink, RJ, van Ree, JM: Short term isolation increases social interactions of male rats in a parametric analysis 1982, *Physiol Behav* 29: 819-25
- Nikolarakis, KE, Pfeiffer, A, Stalla, GK, Herz, A: Facilitation of ACTH secretion by morphine is mediated by activation of CRF releasing neurons and sympathetic neuronal pathways 1989, *Brain Res* 498: 385-88
- Nikulina, E, Tidwell, JL, Dai, HN, Bregman, BS, Filbin, MT: The phosphodiesterase inhibitor rolipram delivered after a spinal cord lesion promotes axonal regeneration and functional recovery 2004, *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 8786-8790
- Norambuena, A, Metz, C, Vicuña, L, Silva, A, Pardo, E, Oyanadel, C, Massardo, L, González, A, Soza, A: Galectin-8 Induces Apoptosis in Jurkat T Cells by Phosphatidic Acid-mediated ERK1/2 Activation Supported by Protein Kinase A Down-regulation 2009, *J Biol Chem*. 284: 12670-12679

- O'Connor, TM, O'Halloran, DJ, Shanahan, F: The stress response and the hypothalamic-pituitary-adrenal axis: from molecule to melancholia 2000, *Q J Med* 93: 323-333
- Nonogaki, K: New insights into sympathetic regulation of glucose and fat metabolism 2000, *Diabetologica* 43: 533-49
- O'Donnell, JM: Antidepressant-like effects of rolipram and other inhibitors of cyclic adenosine monophosphate phosphodiesterase on behaviour maintained by differential reinforcement of low response rate 1993, *J Pharmacol Exp Ther* 264: 1168-78
- O'Donnell, JM, Frith, S: Behavioural effects of family-selective inhibitors of cyclic nucleotide phosphodiesterases 1999, *Pharmacol Biochem Behav* 63: 185-92
- O'Donnell, JM, Zhang, HT: Antidepressant effects of inhibitors of cAMP phosphodiesterase (PDE4) 2004, *Trends Pharmacol Sci* 25: 158-163
- Ortiz, JL, Cortijo, J, Valles, JM, Bou, J, Morcillo, EJ: Rolipram inhibits airway microvascular leakage induced by platelet-activating factor, histamine and bradykinin in guinea-pigs 1993, *J Pharm Pharmacol* 45: 1090-1092
- Owens, MJ, Bartolome, J, Schanberg, SM, Nemeroff, CB: Corticotropin-releasing factor concentrations exhibit an apparent diurnal rhythm in hypothalamic and extrahypothalamic brain regions: differential sensitivity to corticosterone 1990, *Neuroendocrinology* 52: 626-31
- Owens, MJ, Edwards, E, Nemeroff, CB: Effects of 5-HT_{1A} receptor agonists on hypothalamo-pituitary-adrenal axis activity and corticotropin-releasing factor containing neurons in the rat brain 1990, *Eur J Pharmacol* 190: 113-22
- Owens, MJ, Nemeroff, CB: Preclinical and clinical studies with corticotropin-releasing factor: implications for affective disorders 1988, *Psychopharmacology Bull* 24: 355-59
- Page, ME, Abercrombie, ED: Discrete local application of corticotrophin releasing factor increases locus coeruleus discharge and extracellular norepinephrine in rat hippocampus 1999, *Synapse* 33: 304-13
- Page, ME, Brown, K, Lucki, I: Simultaneous analyses of the neurochemical and behavioural effects of the norepinephrine reuptake inhibitor reboxetine in a rat model of antidepressant action 2003, *Psychopharmacology* 165: 194-201
- Page, ME, Detke, MJ, Dalvi, A, Kirby, LG, Lucki, I: Serotonergic mediation of the effects of fluoxetine, but not desipramine, in the rat forced swimming test 1999, *Psychopharmacology* 147: 162-67
- Paintlia, AS, Paintlia, MK, Singh, I, Singh, AK: Combined Medication of Lovastatin with Rolipram Suppresses Severity of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis 2008, *Exp Neurol* 214: 168-180
- Papanicolaou, DA: The pathophysiologic roles of interleukin-6 in human disease 1998, *Ann Intern Med* 128: 127-37
- Parker, JC, VanVolkenburg, MA, Ketchum, RJ, Brayman, KL, Andrews, KM: Cyclic AMP phosphodiesterases of human and rat islets of Langerhans: Contributions of types III and IV to the modulation of insulin secretion 1995, *Biochem Biophys Res Comm* 217: 916-23
- Pearse, DD, Pereira, FC, Marcillo, AE, Bates, ML, Berrocal, YA, Filbin, MT, Bartlett Bunge, M: cAMP and Schwann cells promote axonal growth and functional recovery after spinal cord injury 2004, *Nature Medicine* 10: 610-15
- Pérez-Torres, S, Miró, X, Palacios, JM, Cortés, R, Puigdoménech, P, Mengod, G: Phosphodiesterase type 4 isozymes expression in human brain examined by in situ hybridization histochemistry and [3H]rolipram binding autoradiography: comparison with monkey and rat brain 2000, *J Chem Neuroanat* 20: 349-374

- Perreux-Lenz, S, Pevet, P, Buijs, RM, Kalsbeek, A: The biological clock: the bodyguard of temporal homeostasis 2004, *Chronobiol Int* 21: 1-25
- Pettipher, ER, Labasi, JM, Salter, ED, Stam, EJ, Cheng, JB, Griffiths, RJ: Regulation of tumor necrosis factor production by adrenal hormones in vivo: insights into the antiinflammatory activity of rolipram 1996, *Br J Pharmacol* 117: 1530-4
- Philippe, J, Missotten, M: Functional characterization of a cAMP-responsive element of the rat insulin I gene 1990, *J Biol Chem* 265: 1465-69
- Pilkis, SJ, Claus, TH, Raafat El-Maghrabi, M: The role of cyclic cAMP in rapid and long-term regulation of gluconeogenesis and glycolysis 1988, *Adv Sec Mess Phosphoprot Res* 22: 175-91
- Pittendrigh, CS, Daan, S: A functional analysis of circadian pacemakers in nocturnal rodents. V. Pacemaker structure: a clock for all season 1976, *J Comp Physiol (A)* 106: 333-55
- Pliakas, AM, Carlson, RR, Neve, RL, Konradi, C, Nestler, EJ, Carlezon, WA Jr: Altered responsiveness to cocaine and increased immobility in the forced swim test associated with elevated cAMP response element-binding protein expression in nucleus accumbens 2001, *J Neurosci* 21: 7397-403
- Plotski, PM, Vale, W: Hemorrhage-induced secretion of corticotropin-releasing factor-like immunoreactivity into the rat hypophysial portal circulation and its inhibition by glucocorticoids 1984, *Endocrinology* 114: 164-69
- Plotski, PM, Cunningham Jr, ET, Widmaier, EP: Catecholaminergic of corticotropin-releasing factor and adrenocorticotropin secretion 1989, *Endocr Rev* 10: 437-58
- Pompili, M, Rihmer, Z, Innamorati, M, Lester, D, Girardi, P, Tatarelli, R: Assessment and treatment of suicide risk in bipolar disorders 2009, *Expert Rev Neurother*: 109-136
- Porsolt, RD: Animal model of depression 1979, *Biomedicine* 30: 139-40
- van Praag, HM: Towards a biochemical typology of depression? 1974, *Pharmacopsychiatria* 7: 281-92
- van Praag, HM: Depression, suicide, and the metabolism of serotonin in the brain 1982, *J Affect Disord* 4: 275-90
- van Praag, H, Schinder, AF, Christie, BR, Toni, N, Palmer, TD, Gage, FH: Functional neurogenesis in the adult hippocampus 2002, *Nature* 415: 1030-1034
- Prabhakar, U, Lipshutz, D, Bartus, JO, Sliviak, MJ, Smith III, EF, Lee, JC, Esser, KM: Characterization of cAMP-dependent inhibition of LPS-induced TNF α production by rolipram, a specific phosphodiesterase IV (PDE IV) inhibitor 1994, *Int J Immunopharmacol* 10: 805-16
- Prusky, GT, Douglas, RM: Vision in Wishaw, IQ, Kolb, B (Hrsg.): The behaviour of the laboratory rat, Oxford Press, New York, 2005
- Przegalinski, E, Baran, L, Siwanowicz, J, Nowak, G, Antkiewicz-Michaluk, L, Vetulani, J: Chronic treatment with the potential antidepressant drug rolipram: the effect on the behavioural responses to adrenergic and dopaminergic receptor agonists with some biochemical correlates 1985, *J Neural Transm* 64: 211-26
- Przegalinski, E, Bigajska, K: Antidepressant properties of some phosphodiesterase inhibitors 1983, *Pol J Pharmacol Pharm* 35: 233-40
- Przegalinski, E, Bigajska, K, Lewandowska, A: The central action of rolipram 1980, *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol Suppl* 313: R30, No. 117 (Abstr.)
- Przegalinski, E, Bigajska, K, Lewandowska, A: The influence of rolipram on the central serotonergic system 1981, *Pharmacopsychiatria* 14: 162-6

- Przegalinski, E, Siwanowicz, J, Baran, L: Effect of repeated administration of antidepressant drugs on the isoprenaline-induced drinking in rats 1988, *Pol J Pharmacol Pharm* 40: 251-6
- Przewlocki, R, Lason, W, Majeed, Przewlocka, B: Antidepressants and endogenous opioid peptide systems 1985, *Neuropeptides* 5: 575-78
- Racagni, G, Brunello, N: Transsynaptic mechanisms in the action of antidepressant drugs 1984, *Trends Pharmacol Sci* 5: 527-31
- Rahn, T, Ridderstrale, M, Tornqvist, H, Manganiello, V, Frederikson, G, Belfrage, P, Degerman, E: Essential role of phosphatidylinositol 3-kinase in insulin-induced activation and phosphorylation of the cGMP-inhibited cAMP phosphodiesterase in rat adipocytes: Studies using the selective inhibitor wortmannin 1994, *FEBS Lett* 350: 314-18
- Randt, CT, Judge, ME, Bonnet, KA, Quartermain, D: Brain cyclic AMP and memory in mice 1982, *Pharmacol Biochem Behav* 17: 677-680
- Redman, J, Armstrong, S, Ng, KT: Free-running activity rhythms in the rat: entrainment by melatonin 1983, *Science* 219: 1089-91
- Reinberg, A, Halberg, F (Hrsg.): *Chronopharmacology, Proceedings of the Satellite symposium of the 7th International Congress of Pharmacology, Paris 1978, New York 1979*
- Reisine, T: Biological and behavioural reactions to stress 1985, *Psychopharmacol Bull* 21: 438-42
- Reiter, RJ: Melatonin: clinical relevance 2003, *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 17: 273-85
- Reppert, SM, Weaver, DR: Coordination of circadian timing in mammals 2002, *Nature* 418: 935-41
- Richelle, M, Lejeune, H: *Time in Animal Behaviour*, Pergamon International Library of Science, Technology, Engineering and Social Studies, Oxford 1980
- Richter, HG, Torres-Farfan, C, Rojas-Garcia, PP, Campino, C, Torrealba, F, Seron-Ferre, M: The circadian timing system: making sense of day/night gene expression 2004, *Biol Res* 37: 11-28
- Riederer, P und Laux, G: Definition, Einteilung, *Chemie in Riederer, P, Laux, G, Pödlinger, W (Hrsg.): Neuro-Psychopharmaka, Bd. 3, Wien 1993*
- Rivier, C, Vale, W, Brown, M: In the rat, interleukin-1 alpha and beta stimulate adrenocorticotropin and catecholamine release 1989, *Endocrinol* 125: 3096-102
- Rivest, RW, Aubert, ML, Lang, U, Sizonenko, PC: Puberty in the rat: Modulation by Melatonin and Light 1986, *J Neur Transm, Suppl* 21: 81-108
- Roesler, R, Schröder, N: Cognitive enhancers: Focus on modulatory signaling influencing memory consolidation 2011, *Pharmacol Biochem Behav* 99: 155-163
- Rollag, MD, Niswender, GD: Radioimmunoassay of serum concentrations of melatonin in sheep exposed to different lighting regiments 1976, *Endocrinology* 98: 482-89
- Romero, JA, Axelrod, J: Regulation of sensitivity to β -adrenergic stimulation in induction of pineal N-acetyl-transferase 1975, *Proc Natl Acad Sci USA* 72: 1661-65
- Romero, JA, Zatz, M, Axelrod, J: β -adrenergic stimulation of pineal N-acetyltransferase: adenosine 3',5'-cyclic monophosphate stimulates both RNA and protein synthesis 1975a, *Proc Natl Acad Sci USA* 72: 2107-2111
- Roseboom, PH, Klein, DC: Norepinephrine stimulation of pineal cyclic AMP response element-binding protein phosphorylation: involvement of a beta-adrenergic/cyclic AMP mechanism 1995, *Mol Pharmacol* 47: 439-49

- Ross, CE, Toon, S, Rowland, M, Murray, GH, Meya, U: A study to assess the anticholinergic activity of rolipram in healthy elderly volunteers 1988, *Pharmacopsychiatry* 21: 222-5
- Rothwell, NJ: Central effects of CRF on metabolism and energy balance 1990, *Neurosci Biobehav Rev* 14: 263-271
- Roosendaal, B: Glucocorticoids and the regulation of memory consolidation 2000, *Psychoneuroendocrinology* 25: 213-238
- Rutten, K, Van Donkelaar, EL, Ferrington, L, Blokland, A, Bollen, E, Steinbusch, HWM, Kelly, PAT, Prickaerts, JHHJ: Phosphodiesterase Inhibitors Enhance Object Memory Independent of Cerebral Blood Flow and Glucose Utilization in Rats 2009, *Neuropsychopharmacology* (2009) 34, 1914-1925
- Santarelli, L, Saxe, M, Gross, C, Surget, A, Battaglia, F, Dulawa, S, Weisstaub, N, Lee, J, Duman, R, Arancio, O, Belzung, C, Hen, R: Requirement of hippocampal neurogenesis for the behavioural effects of antidepressants 2003, *Science* 301: 805-809
- Sanz, MJ, Cortijo, J, Taha, MA, Cerdá-Nicolás, M, Schatton, E, Burgbacher, B, Klar, J, Tenor, H, Schudt, C, Issekutz, AC, Hatzelmann, A, Morcillo, EJ: Roflumilast inhibits leukocyte-endothelial cell interactions, expression of adhesion molecules and microvascular permeability 2007, *Br J Pharmacol* 152: 481-492
- Sasaki, T, Kitagawa, K, Omura-Matsuoka, ER, Todo, K, Terasaki, Y, Sugiura, S, Hatazawa, J, Yagita, Y, Hori, M: The Phosphodiesterase Inhibitor Rolipram Promotes Survival of Newborn Hippocampal Neurons After Ischemia 2007, *Stroke* 38: 1597-1605
- Satinoff, E: Thermoregulation in: Wishaw, IQ, Kolb, B (Hrsg.): *The behaviour of the laboratory rat*, New York 2005
- Sato, M, Kubota, Y, Malbon, CC, Tohyama, M: Immunochemical evidence that most rat corticotrophs contain beta-adrenergic receptors 1989, *Neuroendocrinology* 50: 577-83
- Sawchenko, PE: Central connections of the sensory and motor nuclei of the vagus nerve 1983, *J Auton Nerv Syst* 9: 13-26
- Sawchenko, PE, Swanson, LW, Vale, WW: Corticotropin-releasing factor: co-expression in distinct subsets of oxytocin -, vasopressin - and neurotensin-immunoreactive neurons in the hypothalamus of the male rat 1984, *J Neurosci* 4: 1118-29
- Sawchenko, PE, Swanson, LW: Localization, colocalization and plasticity of corticotropin-releasing factor immunoreactivity in rat brain 1985, *Fed Proc* 44: 221-27
- Schildkraut, JJ: The catecholamine hypothesis of affective disorders: a review of supporting evidence 1965, *Am J Psychiatry* 122: 509-22
- Schlegel, N, Waschke, J: VASP is involved in cAMP-mediated Rac 1 activation in microvascular endothelial cells 2009, *Am J Physiol Cell Physiol* 296: C453-C462
- Schmiechen, R, Schneider, HH, Wachtel, H: Close correlation between behavioural response and binding in vivo for inhibitors of the rolipram-sensitive phosphodiesterase 1990, *Psychopharmacology (Berl)* 102: 17-20
- Schmitz-Pfeifer, C, Reeves, ML, Denton, RM: Characterization of the cyclic nucleotide phosphodiesterase isoenzymes present in rat epididymal fat cells 1992, *Cell Signal* 4: 37-49
- Schneider, BF, Norton, S: Circadian and sex differences in hyperactivity produced by amphetamine in rats 1979, *Physiol Behav* 22: 47-51
- Schneider, HH: Brain cAMP response to phosphodiesterase inhibitors in rats killed by microwave irradiation or decapitation 1984, *Biochem Pharmacol* 33: 1690-93
- Schneider, HH, Schmiechen, R, Brezinski, M, Seidler, J: Stereospecific binding of the antidepressant rolipram to brain protein structures 1986, *Eur J Pharmacol* 127: 105-15

- Schomerus, C, Korf, HW, Laedtke, E, Weller, JL, Klein, DC: Selective adrenergic/cyclic AMP-dependent switch-off of proteasomal proteolysis alone switches on neural signal transduction: an example from the pineal gland 2000, *J Neurochem* 75: 2123-32
- Schultz, JE, Schmidt, BH: Rolipram, a stereospecific inhibitor of calmodulin-independent phosphodiesterase, causes beta-adrenoceptor subsensitivity in rat cerebral cortex 1986, *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 333: 23-30
- Scott, AI, Perini, AF, Shering, PA, Whalley, LJ: In-patient major depression: is rolipram as effective as amitriptyline? 1991, *Eur J Clin Pharmacol* 40: 127-9
- Scuvée-Moreau, J, Giesbers, I, Dresse, A: Effect of rolipram, a phosphodiesterase inhibitor and potential antidepressant, on the firing rate of central monoaminergic neurons in the rat 1987, *Arch Int Pharmacodyn Ther* 288: 43-9
- Seasholtz, AF, Thompson, RC, Douglass, JO: Identification of a cyclic adenosine monophosphate-responsive element in the rat corticotropin-releasing hormone gene 1988, *Mol Endocrinol* 2: 1311-19
- Sekut, L, Yarnall, D, Stimpson, SA, Noel, LS, Bateman-Fite, R, Clark, RL, Brackeen, MF, Menius Jr, JA, Connolly, KM: Anti-inflammatory activity of phosphodiesterase (PDE) –IV inhibitors in acute and chronic models of inflammation 1995, *Clin Exp Immunol* 100:126-32
- Sengupta, R, Sun, T, Warrington, NM, Rubin, JB: Treating brain tumors with PDE4 inhibitors 2011, *TIPS* 32: 337–344
- Serafini, G, Pompili, M, Innamorati, M, Giordano, G, Tatarelli, R, Lester, D, Girardi, P, Dwivedi, Y: Glycosides, Depression and Suicidal Behaviour: The Role of Glycoside-Linked Proteins 2011, *Molecules*: 2688-2713
- Serezani, CH, Ballinger, MN, Aronoff, DM, Peters-Golden, M: Cyclic AMP: Master regulator of innate immune cell function 2008, *Am J Respir Cell Mol Biol* 39: 127–132.
- Shafiee-Nick, R, Pyne, NJ, Furman, BL: Effects of type-selective phosphodiesterase inhibitors on glucose-induced insulin secretion and islet phosphodiesterase activity 1995, *Br J Pharmacol* 115: 1486-92
- Shaw, PJ, Cirelli, C, Greenspan, RJ, Tononi, G: Correlates of sleep and waking in *Drosophila melanogaster* 2000, *Science* 287: 1834-37
- Shelton, RC, Manier, DH, Sulser, F: cAMP-dependent protein kinase activity in major depression 1996, *Am J Psychiat*: 1037-1042
- Shivanna, M, Srinivas, SP: Elevated cAMP opposes (TNF- α)-induced loss in the barrier integrity of corneal endothelium 2010, *Mol Vis* 16: 1781-1790
- Shors, TJ, Miesegaes, G, Beylin, A, Zhao, M, Rydel, T, Gould, E: Neurogenesis in the adult is involved in the formation of trace memories 2001, *Nature* 410: 372–376
- Silverman, HJ, Penaranda, R, Orens, JB, Lee, NH: Impaired beta-adrenergic receptor stimulation of cyclic adenosine monophosphate in human septic shock: association with myocardial hyporesponsiveness to catecholamines 1993, *Crit Care Med* 21: 31-39
- Silverman, P: *Animal behaviour in the laboratory*, Chapman and Hall, London 1978
- Simonneaux, V, Poirel, VJ, Garidou, ML, Nguyen, D, Diaz-Rodriguez, E, Pevet, P: Daily rhythm and regulation of clock gene expression in the rat pineal gland 2004, *Mol Brain Res* 120: 164-72
- Simonneaux, V, Ribelayga, C: Generation of the melatonin endocrine message in mammals: A review of the complex regulation of melatonin synthesis by norepinephrine, peptides, and other pineal transmitters 2003, *Pharmacol Rev* 55: 325-395

- Sirinathsinghji, DJS, Rees, LH, Rivier, J, Vale, W: Corticotropin-releasing factor is a potent inhibitor of sexual receptivity in the female rat 1983, *Nature* 305: 232-35
- Skutella, T, Probst, JC, Renner, U, Holsboer, F, Behl, C: Corticotropin-releasing hormone receptor (type 1) antisense targeting reduces anxiety 1998, *Neuroscience* 85: 795-805
- Small, BJ, Mobly, JL, Laukka, EJ, Jones, S, Backman, L: Cognitive deficits in preclinical Alzheimer's disease 2003, *Acta Neurol Scand* 179: 29-33
- Smith, DL, Pozueta, J, Gong, B, Arancio, O, Shelanski, M: Reversal of long-term dendritic spine alterations in Alzheimer disease models 2009, *PNAS* 106: 16877-16882
- Smith, RS: The macrophage theory of depression 1991, *Med Hypoth* 35: 298-306
- Södersten, P, Hansen, S, Srebro, B: Suprachiasmatic lesions disrupt the daily rhythmicity in the sexual behaviour of normal male rats and of male rats treated neonatally with antioestrogen 1981, *J Endocrinol* 88:125-30
- Sollberger, A (Hrsg.): *Biological Rhythm Research*, Amsterdam 1965
- Sommer, N, Löschmann, PA, Northoff, GH, Weller, M, Steinbrecher, A, Steinbach, JP, Lichtenfels, R, Meyermann, A, Riethmüller, A, Fontana, A, Dichgans, J, Martin, R: The antidepressant rolipram suppresses cytokine production and prevents autoimmune encephalomyelitis 1995, *Nat Med* 1: 244-48
- Sousa, LP, Lopes, F, Silva, DM, Tavares, LP, Vieira, AT, Rezende, BM, Carmo, AF, Russo, RC, Garcia, CC, Bonjardim, CA, Alessandri, AL, Rossi, AG, Pinho, V, Teixeira, MM: PDE4 inhibition drives resolution of neutrophilic inflammation by inducing apoptosis in a PKA-PI3K/Akt-dependent and NF- κ B-independent manner 2010, *J Leukoc Biol* 87: 895-904
- Spadaro, F, Berridge, CW, Baldwin, HA, Dunn, AJ: Corticotropin-releasing factor acts via a third ventricle site to reduce exploratory behaviour in rats 1990, *Pharmacol Biochem Behav* 36: 305-309
- Spear, LP: The use of psychopharmacological procedures to analyse the ontogeny of learning and retention: issues and concern in: Spear, NE, Campbell, BA (Hrsg.): *Ontogeny of learning and memory*, Erlbaum, Hillsdale, New Jersey 1979
- Spindler, V, Waschke, J: Beta-Adrenergic Stimulation Contributes to Maintenance of Endothelial Barrier Functions under Baseline Conditions 2011, *Microcirculation* 18: 118-127
- Spruijt, BM, van Hooff, J.A.R.A.M., Gispen, WH: Ethology and neurobiology of grooming behaviour 1992, *Physiol Rev* 72: 825-52
- Stefan, E, Wiesner, B, Baillie, GS, Mollajew, R, Henn, V, Lorenz, D, Furkert, J, Santamaria, K, Nedvetsky, P, Hundsrucker, C, Beyermann, M, Krause, E, Pohl, P, Gall, I, MacIntyre, AN, Bachmann, S, Houslay, MD, Rosenthal, W, Klusmann, E: Compartmentalization of cAMP-Dependent Signaling by Phosphodiesterase-4D Is Involved in the Regulation of Vasopressin-Mediated Water Reabsorption in Renal Principal Cells 2007, *JASN* 18: 199-212
- Stehle, JH, Foulkes, NS, Molina, CA, Simonneaux, V, Pévet, P, Sassone-Corsi, P: Circadian regulation of CREM: adrenergic signals direct rhythmic expression of a transcriptional repressor in the pineal gland 1993, *Nature* 265: 314-20
- Stehle, JH, von Gall, C, Schomerus, C, Korf, HW: Of rodents and ungulates and melatonin: creating a uniform code for darkness by different signalling mechanisms 2001, *J Biol Rhythms* 16: 312-25
- Stephan, K, Dorow, R: The influence of the new antidepressant rolipram on alertness, performance and mood in healthy volunteers varied with time of day and diurnal type of subject in Reinberg, A, Smolensky, M, Labrecque, MG (Hrsg.): *Annual review of chronopharmacology, Volume 3, Biological rhythms and medications, Proceedings of the Second Montreux Conference of Chronopharmacology* 1986, Oxford 1986

- Strada, S, Klein, DC, Weller, J, Weiss, B: Norepinephrine stimulation of cyclic adenosine monophosphate in cultured pineal glands 1972, *Endocrinology* 90: 1470-75
- Strubbe, JH, Alingh Prins, AJ, Bruggink, J, Steffens, AB: Daily variation of food-induced changes in blood glucose and insulin in the rat and the control by the suprachiasmatic nucleus and the vagus nerve 1987, *J Auton Nerv Syst* 20: 113-19
- Strubelt, O: The influence of reserpine, propranolol, and adrenal medullectomy on the hyperglycemic actions of theophylline and caffeine 1969, *Arch Int Pharmacodyn Ther* 179: 215-24
- Suda, M, Hayaishi, O, Nakagawa, H (Hrsg.): *Biological Rhythms and their Central Mechanism*, A Naito Foundation Symposium, Amsterdam 1979
- Sugden, D: Comparison of circadian expression of tryptophan hydroxylase isoform mRNAs in the rat pineal gland using real-time PCR 2003, *J Neurochem* 86: 1308-11
- Sulser, F: Functional aspects of the norepinephrine receptor coupled adenylate cyclase system in the limbic forebrain and its modification by drugs which precipitate or alleviate depression: molecular approaches to an understanding of affective disorders 1978, *Pharmakopsychiatr Neuropsychopharmakol* 11: 43-52
- Sutton, RE, Koob, GF, Le Moal, M, Rivier, J, Vale, W: Corticotropin releasing factor produces behavioural activation in rats 1982, *Nature* 297: 331-33
- Suttorp, N, Ehreiser, P, Hippenstiel, S, Fuhrmann, M, Krüll, M, Tenor, H, Schudt, C: Hyperpermeability of pulmonary endothelial monolayer: protective role of phosphodiesterase isoenzymes 3 and 4 1996, *Lung* 174: 181-194
- Suttorp, N, Weber, U, Welsch, T, Schudt, C: Role of phosphodiesterases in the regulation of endothelial permeability in vitro 1993, *J Clin Invest* 91: 1421-1428
- Szafarczyk, A, Malaval, F, Laurent, A, Gibaud, R, Assenmacher, I: Further evidence for a central stimulatory action of catecholamines on adrenocorticotropin release in the rat 1987, *Endocrinology* 121: 883-892
- Takekida, S, Yan, L, Maywood, ES, Hastings, MH, Okamura, H: Differential adrenergic regulation of the circadian expression of the clock genes *Period1* and *Period2* in the rat pineal gland 2000, *Eur J Neurosci* 12: 4557-4561
- Teixeira, MM, Gristwood, RW, Cooper, N, Hellewell, PG: Phosphodiesterase (PDE) 4 inhibitors: anti-inflammatory drugs of the future? 1997, *Trends Pharmacol Sci* 18: 164-71
- Teixeira, MM, Rossi, AG, Williams, TJ, Hellewell, PG: Effects of phosphodiesterase inhibitors on cutaneous inflammation in guinea-pig 1994, *Br J Pharmacol* 112: 332-40
- Temel, Y, Helmy, A, Pinnock, S, Herbert, J: Effect of serotonin depletion on the neuronal, endocrine and behavioural responses to corticotropin-releasing factor in the rat 2003, *Neurosci Lett* 338: 139-42
- Thompson, BE, Sachs, BD, Kantak, KM, Cherry, JA: The type IV phosphodiesterase inhibitor rolipram interferes with drug-induced conditioned place preference but not immediate early gene induction in mice 2004, *Eur J Neurosci* 19: 2561-68
- Thompson, CL, Rickman, CB, Shaw, SJ, Ebright, JN, Kelly, U, Sancar, A, Rickman, DW: Expression of the blue-light receptor cryptochrome in the human retina 2003, *Invest Ophthalmol Vis Sci* 44: 4515-21
- Thompson, CL, Sancar, A: Photolyase/cryptochrome blue-light photoreceptors use photon energy to repair DNA and reset the circadian clock 2002, *Oncogene* 21: 9043-56
- Tinbergen, N: Die Übersprungsbewegung 1940, *Z Tierpsychol* 4: 1-40

- Torphy, TJ, Livi, GP, Balcarek, JM, White, JR, Chilton, FH, Udem, BJ: Therapeutic potential of isoenzyme-selective phosphodiesterase inhibitors in the treatment of asthma 1992, *Adv Second Messenger Phosphoprotein Res* 25: 289-305
- Tralau-Stewart, CJ, Williamson, RA, Nials, AT, Gascoigne, M, Dawson, J, Hart, GJ, Angell, ADR, Solanke, YE, Lucas, FS, Wiseman, J, Ward, P, Ranshaw, LE, Knowles, RG: GSK256066, an Exceptionally High-Affinity and Selective Inhibitor of Phosphodiesterase 4 Suitable for Administration by Inhalation: In Vitro, Kinetic, and In Vivo Characterization 2011, *J Pharmacol Exp Ther* 337: 145-154
- Tricklebank, MD: The behavioural response to 5-HT receptor agonists and subtypes of the central 5-HT receptor 1985, *Trends Pharmacol Sci* 6: 403-407
- Trulson, ME, Eubanks, EE, Jacobs, BL: Behavioural evidence for supersensitivity following destruction of central serotonergic nerve terminals by 5,7-dihydroxytryptamine 1976, *J Pharmacol Exp Ther* 198: 23-32
- Turek, FW, Swann, J, Earnest, DJ: Role of the circadian system in reproductive phenomena 1984, *Recent Prog Horm Res* 40: 143-83
- Tyson, EK, Smith, R, Read, M: Evidence that Corticotropin-Releasing Hormone Modulates Myometrial Contractility during Human Pregnancy 2009, *Endocrinology* 150: 5617-5625
- Udelsman, R, Harwood, JR, Millan, MA, Chrousos, GP, Goldstein, DS, Zimlichman, R, Catt, KJ, Aguilera, G: Functional corticotropin releasing factor receptors in the primate peripheral sympathetic nervous system 1986, *Nature* 319: 147-50
- Ukponmwan, OE, vd Poel-Heisterkamp, AL, Dzoljic, MR: REM sleep deprivation decreases the grooming and shaking behaviour induced by enkephalinase inhibitor or opiate withdrawal 1985, *Pharmacol Biochem Behav* 23: 385-89
- Usdin, E, Snyder, SH (Hrsg.): *Frontiers in Catecholamine Research*, New York 1973
- Vale, W, Spiess, J, Rivier, C, Rivier, J: Characterization of a 41-residue ovine hypothalamic peptide that stimulates secretion of corticotropin and β -endorphin 1981, *Science* 213: 1394-97
- Valentino, RJ, Foote, SL, Aston-Jones, G: corticotropin-releasing factor activates noradrenergic neurons of the locus coeruleus 1983, *Brain Res* 270: 363-67
- Vaughan, GM, Pelham, RW, Pang, SF, Laughlin, LL, Wilson, KM, Sandock, KL, Vaughan, MK, Koslow, SH, Reiter, RJ: Nocturnal elevation of plasma melatonin and urinary 5-hydroxy-indoleacetic acid in young men: attempts at modification by brief changes in environmental lighting and sleep and by autonomic drugs 1976, *J Clin Endocrinol Metab* 42: 752-64
- Vecsey, CG, Baillie, GS, Jaganath, D, Havekes, R, Daniels, A, Wimmer, M, Huang, T, Brown, KM, Li, X, Descalzi, G, Kim, SS, Chen, T, Shang, Y, Zhuo, M, Houslay, MD, Abel, T: Sleep deprivation impairs cAMP signaling in the hippocampus 2009, *Nature* 461: 1122-1125
- Vetulani, J, Bednarczyk, B, Reichenberg, K, Rokosz, A: Head twitches induced by LSD and quipazine: similarities and differences 1980, *Neuropharmacology* 80: 155-58
- Vollrath, L: Chronoendokrinologia – Quo vadis? 2002, *Ann Anat* 184: 583-93
- Vrang, N, Larsen, PJ, Mikkelsen, JD: Direct projection from the suprachiasmatic nucleus to hypophysiotropic corticotropin-releasing factor immunoreactive cells in the paraventricular nucleus of the hypothalamus demonstrated by means of Phaseolus vulgaris-leucagglutinin tract tracing 1995, *Brain Res* 684: 61-69
- Wachtel, H: Characteristic behavioural alterations in rats induced by rolipram and other selective adenosine cyclic 3', 5'-monophosphate phosphodiesterase inhibitors 1982, *Psychopharmacology (Berl)* 77: 309-16

- Wachtel, H: Species differences in behavioural effects of rolipram and other adenosine cyclic 3H, 5H-mono-phosphate phosphodiesterase inhibitors 1983a, *J Neural Transm* 56: 139-52
- Wachtel, H: Potential antidepressant activity of rolipram and other selective cyclic adenosine 3',5'-monophosphate phosphodiesterase inhibitors 1983b, *Neuropharmacology*. 22: 267-72
- Wachtel, H: Involvement of adrenergic and opioid mechanisms in the head twitches caused by the selective cAMP phosphodiesterase inhibitor rolipram in rats and guinea pigs 1983c, *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol Suppl* 324: R24, No. 93
- Wachtel, H: The second-messenger displacement hypothesis of affective disorders 1990, *Pharmacopsychiatry* 23: 27-32
- Wachtel, H, Löschmann, PA: Effects of forskolin and cyclic nucleotides in animal models predictive of antidepressant activity: interactions with rolipram 1986, *Psychopharmacology* 90: 430-35
- Wachtel, H, Löschmann, PA, Pietzuch, P: Absence of anticholinergic activity of rolipram, an antidepressant with a novel mechanism of action, in three different animal models in vivo 1988, *Pharmacopsychiatry* 21: 218-21
- Wachtel, H, Löschmann, PA, Schneider, HH, Rettig, KJ: Effects of forskolin on spontaneous behaviour, rectal temperature and brain cAMP levels of rats: interaction with rolipram 1987, *Neurosci Lett* 76: 191-6
- Wachtel, H, Paschelke, G, Erhard, C: Neuroleptic like activity of rolipram a novel pyrrolidone derivative, in mice 1979, *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol Suppl* 308, R44, No.174 (Abstr.)
- Wachtel, H, Schlangen, M, Seltz, A : Potentiation of the motorstimulatory effect of the dopaminergic ergot derivative lisuride hydrogenmaleate (LHM) in rats by systemic or intracerebral administration of rolipram and other adenosine cyclic 3',5' -monophosphate (cAMP) phosphodiesterase (PDE) inhibitors 1980, *Progr Neuropsychopharmacol Suppl*: 350
- Wachtel, H, Schneider, HH: The antidepressant activity of rolipram does not depend on presynaptic release of monoamines 1985, *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol Suppl* 329: R92 No. 367 (Abstr.)
- Wachtel, H, Schneider, HH: Rolipram, a novel antidepressant drug, reverses the hypothermia and hypokinesia of monoamine-depleted mice by an action beyond postsynaptic monoamine receptors 1986, *Neuropharmacology*. 25: 1119-26
- Wald, G, Brown, PK: Synthesis and bleaching for rhodopsin 1956, *Nature* 177: 174-76
- Wanaka, A, Matsuyama, T, Yoneda, S, Kamada, T, Shibasaki, T, Hayakawa, T, Tohyama: Corticotropin-releasing factor-like immunoreactive nerve fibers in the rat superior cervical ganglion and their fine structures 1987, *Brain Res* 435: 91-96
- Wang, GQ, Du, YZ, Tong, J: Daily oscillation and photoresponses of clock gene, Clock, and clock-associated gene, arylalkylamine N-acetyltransferase gene transcriptions in the rat pineal gland 2007, *Chronobiol Int* 24: 9-20
- Weiss, B, Costa, E: Regional and subcellular distribution of adenylyl cyclase and 3',5'-cyclic nucleotide phosphodiesterase in brain and pineal gland 1968b, *Biochem Pharmacol* 17: 2107-2116
- Wetterberg, L: Melatonin and affective disorders in Evered, D, Clark, S (Hrsg.): *Photoperiodism, melatonin and the pineal*, Ciba Foundation Symposium 117, London 1985
- Whalin, ME, Garrett, RL Jr, Thompson, WJ, Strada, SJ: Correlation of cell-free brain cyclic nucleotide phosphodiesterase activities to cyclic AMP decay in intact brain slices 1988-89, *Second Messengers Phosphoproteins* 12: 311-25
- Wheler, GHT, Weller, JL, Klein, DC: Taurine: stimulation of pineal N-acetyltransferase activity and melatonin production via a beta-adrenergic mechanism 1979, *Brain Res* 166: 65-74

- Whitaker, CM, Beaumont, E, Wells, MJ, Magnuson, DSK, Hetman, M, Onifer, SM: Rolipram Attenuates Acute Oligodendrocyte Death in the Adult Rat Ventrolateral Funiculus following a Contusive Cervical Spinal Cord Injury 2008, *Neurosci Lett* 438: 200-204
- World Health Organization: The Global Burden of Disease: 2004, Update 2008, ISBN 978 92 4 156371 0 http://www.who.int/healthinfo/global_burden_disease/2004_report_update/en/index.html (zuletzt besucht am 09.09.2012)
- Witkamp, R, Monshouwer, M: Signal transduction in inflammatory process, current and future therapeutic targets: a mini review 2000, *Vet Q* 22: 11-16
- Wolfersdorf, M, Hole, G, Faust, F, Kopitke, W, Metzger, R, Straub, R, Studemund, B, Vock, B: Zur Ätiopathogenese depressiver Erkrankungen in Faust, V, Hole, G (Hrsg.): *Depressionen*, Stuttgart 1982
- Wollnik, F: Strain differences in the pattern and intensity of wheel running activity in laboratory rats 1991, *Experientia* 47: 593-98
- Wong, CC, Döhler, KD, Geerlings, H, von zur Mühlen, A: Influence of age, strain and season on circadian periodicity of pituitary, gonadal and adrenal hormones in the serum of male laboratory rats 1983, *Horm Res* 17: 202-15
- Wu, Y-H, Feenstra, MGP, Zhou, J-N, Liu, R-Y, Torano, JS, van Kan, HJM, Fischer, DF, Ravid, R, Swaab, DF: Molecular changes underlying reduced pineal melatonin levels in Alzheimer Disease: Alterations in preclinical and clinical stages 2003, *J Clin Endocrinol Metab* 88: 5898-906
- Wurtman, RJ, Waldhauser, F (Hrsg.): *Melatonin in humans*, J Neural Transm Suppl 21, Wien 1986
- Xiao, L, O'Callaghan, JP, O'Donnell, JM: Effects of repeated treatment with phosphodiesterase-4 inhibitors on cyclic AMP signaling, hippocampal cell proliferation, and behavior in the forced-swim test 2011, *J Pharmacol Exp Ther* 338: 641-647
- Yang, XM, Dunn, AJ: Central β 1-adrenergic receptors are involved in CRF-induced defensive withdrawal 1990, *Pharmacol Biochem Behav* 36: 847-51
- Yang, XM, Gorman, AL, Dunn, AJ: The involvement of central adrenergic systems and corticotropin-releasing factor in defensive-withdrawal behaviour in rats 1990, *J Pharmacol Exp Ther* 255: 1064-70
- Yehuda, R: Biology of posttraumatic stress disorder 2001, *J Clin Psychiatry* 62 (Suppl 17): 41-46
- Yuan, P, Tragon, T, Xia, M, LeClair, CA, Skoumbourdis, AP, Zheng, W, Thomas, CJ, Huang, R, Austin, CP, Chen, G, Guitart, X: Phosphodiesterase 4 inhibitors enhance sexual pleasure-seeking activity in rodents 2011, *Pharmacol Biochem Behav* 98: 349-355
- Zaluzny, SG, Chesher, GB, Jackson, DM, Malor, R: The attenuation by Δ 9-tetrahydrocannabinol and morphine of the quasi-morphine withdrawal syndrome in rats 1979, *Psychopharmacology* 61: 207-16
- Zatz, M. The Role of Cyclic Nucleotides in the Pineal Gland in Kebebian, JW, Nathanson, JA (Hrsg.): *Cyclic Nucleotides, Part II: Physiology and Pharmacology*, Chapter 33, Berlin 1982
- Zatz, M, Kebebian, JW, Romero, JA, Lefkowitz, RJ, Axelrod, J: Pineal β -adrenergic receptor: correlation of binding of ^3H -alprenolol with stimulation of adenylate cyclase 1976a, *J Pharmacol Exp Ther* 196: 714-22
- Zatz, M, Mullen, DA, Moskal, JR: Photoendocrine transduction in cultured chick cells: effects of light, dark, and potassium on the melatonin rhythm 1988, *Brain Res* 438: 199-215
- Zeller, E, Stief, HJ, Pflug, B, Sastre-y-Hernandez, M: Results of a phase II study of the antidepressant effect of rolipram 1984, *Pharmacopsychiatry* 17: 188-90

Zhang, HT, Huang, Y, Masood, A, Stolinski, LR, Li, Y, Zhang, L, Dlaboga, D, Jin, SL, Conti, M, O'Donnell, JM: Anxiogenic-like behavioral phenotype of mice deficient in phosphodiesterase 4B (PDE4B) 2008, *Neuropsychopharmacology* 33: 1611–1623

Zhang, HT, Zhao, Y, Huang, Y, Dorairaj, NR, Chandler, LJ, O'Donnell, JM: Inhibition of the phosphodiesterase 4 (PDE4) enzyme reverses memory deficits produced by infusion of the MEK inhibitor U0126 into the subregion of the rat hippocampus 2004, *Neuropsychopharmacology* 29: 1432–1439

Zhao, Y, Zhang, HT, O'Donnell, JM: Antidepressant-induced increase in high-affinity rolipram binding sites in rat brain: Dependence on noradrenergic and serotonergic function 2003, *J Pharmacol Exp Ther* 307: 246–253

Zhao, AZ, Zhao, H, Teague, J, Fujimoto, W, Beavo, JA: Attenuation of insulin secretion by insulin-like growth factor 1 is mediated through activation of phosphodiesterase 3B 1997, *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 3223-28

Zhu J, Mix E, Winblad B : The antidepressant and antiinflammatory effects of rolipram in the central nervous system 2001, *CNS Drug Rev* 7: 387-98

Zobel, AW, Nickel, T, Künzel, HE, Ackl, N, Sonntag, A, Ising, M, Holsboer, F: Effects of the high-affinity corticotropin-releasing hormone receptor antagonist R121919 in major depression: the first 20 patients treated 2000, *J Psychiatr Res* 34: 171-81

Zobel, AW, Yassouridis, A, Frieboes, RM, Holsboer, F: Prediction of medium-term outcome by cortisol response to the combined dexamethasone-CRH test in patients with remitted depression 1999, *Am J Psychiatry* 156: 949-51

Abkürzungen

AAAD	Aromatic Amino Acid Decarboxylase (Aromatische Aminosäuren-Decarboxylase)
AA-NAT	Arylalkylamin-N-Acetyl-Transferase
A β	Amyloid β
AC	Adenylat-Cyclase
ACh	Acetylcholin
ACTH	Adrenocorticotropes Hormon
AD	Antidepressiva
AMPT	α -Methyl-p-Tyrosin
ANOVA	Analysis Of Variance, Varianzanalyse
ANP	amplifying neural progenitors Verstärkende neurale Vorläufer(-zellen)
APP	Amyloid precursor protein Amyloid Vorläuferprotein
ATP	Adenosintriphosphat
AVP	Arginin-Vasopressin
B	Breite
BDZ	Benzodiazepine
BDNF	brain-derived neurotrophic factor, vom Gehirn abgeleiteter neurotropher Faktor
Bmal1 gene	“brain and muscle aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator (ARNT)-like protein 1” Gen
B-Raf	beschreibt eine Serin/ Threonin-Protein Kinase B-Raf, abgeleitet aus Rapidly Accelerated Fibrosarcoma
C	Celsius
Ca ²⁺	Calcium-Ion
CaM	Calmodulin
CaMKinase	Calmodulin-Kinase
cAMP	Cyclic (zyklisches) Adenosin-3',5'-Monophosphat
8-Br-cAMP	8-Bromo-cAMP
db-cAMP	Dibutyryl-cAMP
cDNA	Core (Kern) DNA
cGMP	Cyclic (zyklisches) Guanosin-3',5'-Monophosphat
Clock gene	“circadian locomotor output cycles kaput” Gen
COPD	chronic obstructive pulmonary disease chronisch obstruktive Lungenerkrankung)
COR	Corticosteron
CR	circadianer Rhythmus
CRE	cAMP Response Element
CREB	cAMP Response Element Binding (Bindungs) Protein
CREM	cAMP Response Element Modulator
CRH	Corticotropin-Releasing-Hormone
CRH-R	CRH-Rezeptor
Cry gene	„Cryptochrome“-Gen
d	Dezi (10 ⁻¹)
D ₁ -Subtyp	Dopaminrezeptorsubtyp 1

DA	Dopamin
6-OHDA	6-Hydroxy-Dopamin
DG	Diacylglycerin
DI	Digging
DISC-1	Disrupted-in-schizophrenia 1
dl	Dezi-Liter (10 ⁻¹)
DL-Übergang	Dunkel/Licht- Übergang
DNA	Deoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
DOPA	3,4-Dihydroxy-Phenylalanin
D-Phase	Dunkelphase
DSM	Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders
β-EP	β-Endorphin
Epac1	exchange protein directly activated by cAMP 1 (Austauschprotein 1, das durch cAMP direkt aktiviert wird)
ERK	extracellular-signal-regulated kinase, auch: klassische MAP-Kinase (Kinase, die durch extrazelluläre Signale reguliert wird)
FN	Fußnote
FPS	Forepaw shaking
FST	Forced Swimming Test
GABA	γ- Aminobuttersäure (acid)
GGR	Genital Grooming
GK	Gluko-Kinase
GIR	Glukokortikoidrezeptor
GMP	Guanosin-mono-phosphat
GR	Grooming
G _s	G-Protein (stimulierend)
GRE	Glucocorticoid-Responsive Element (Glukokortikoid-empfindliches Element)
GTPase	Guanosintriphosphatase
H	Höhe
HAB	High Anxiety-related Behaviour (Ratten)
HAT	Histon-Acetyl-Transferase
HIAA	Hydroxy-Indol-Acetic-Acid (Essigsäure)
HIOMT	Hydroxy-Indol-O-Methyl-Transferase
HPA-Achse	Hypothalamo-Pituitary-Adrenocortical-Axis (Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse)
HSP	Heat Shock Protein (Hitzeschock-Protein)
5-HT	5-Hydroxy-Tryptamin
HARBS	High Affinity Rolipram Binding Site (Hochaffine Rolipram-Bindungsstelle)
HTOH	Hydroxy-Tryptophol
HTW	Head twitches
IBMX	Iso-Butyl-Methyl-Xanthin
ICER	Inducible cAMP Early Repressor (früher Hemmer der cAMP-induzierbaren (Gen-) Transkription)
i.c.v.	Intracerebroventrikulär
ICD	International Classification of Diseases
IEG	Immediate Early Genes
IGF-1	Insulin-like (ähnlicher) Growth (Wachstums-) Factor 1

IL	Interleukin
i.p.	intraperitoneal
IP	Inositol-(tri)-Phosphat
i.v.	intravenös
K	Kontrolle
KT	Körpertemperatur
l	Liter
LAB	Low Anxiety-related Behaviour (Ratten)
LC	Locus Coeruleus
LD-Zyklus	Licht-Dunkel-Zyklus
LHP-Achse	Limbic System-Hypothalamo-Pituitary-Axis (Limbisches System-Hypothalamus-Hypophysen-Achse)
LHPA-Achse	Limbic System-Hypothalamo-Pituitary-Adrenal-Axis (Limbisches System-Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse)
β -LPH	β - Lipotropin
LSD	Lyserg-Säure-Diethylamid
LTP	Long term potentiation
m	Milli - (10^{-3})
MAP-Kinase (MAPK)	Mitogen-activated protein kinase (Mitogen-aktivierte Proteinkinase)
MAO	Monoaminoxidase
MAO-Hemmer (MAOH)	Mono-Amin-Oxidase-Hemmer
Mean \pm SEM	Mean \pm Standard Error of the Mean (Mittelwert \pm Standardabweichung des Mittelwerts)
MEL	Melatonin
MFB	Medial Forebrain Bundle, Mediales Vorderhirnbündel
μ	Mikro - (10^{-6})
mg	Milligramm
ml	Milliliter
MR	Mineralokortikoidrezeptor
m-RNA	Messenger (Boten)- Ribonucleic Acid (Ribonukleinsäure)
MSH	Melanozyten-Stimulierendes Hormon
MWS	Morphin-Withdrawal-Syndrom
n	Nano - (10^{-9})
nm	Nanometer
NA	Noradrenalin
N-Ac5HT	N-Acetyl-Serotonin
NAT	N-Acetyl-Transferase
NE	Norepinephrin (Noradrenalin)
NF κ B	Nuclear Factor (Kernfaktor) κ B
NNM	Nebennierenmark
NNR	Nebennierenrinde
N-POMC	N-terminales Pro-Opio-Melanocortin
NT	Nervii terminales
OHThp	Hydroxy-Tryptophan
p	pico - (10^{-12})
PACAP	Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Peptide (Hypophysen-Adenylatcyclase-aktivierendes Peptid)

PCPA	p-Chloro-Phenylalanin
P-CREB	Phospho-CREB
PDE	Phosphodiesterase
PEPCK	Phospho-Enol-Pyruvat-Carboxy-Kinase
pg	Pico-Gramm
pmol	Pico-Mol
PI	Phospho-Inositol
PI-System	Phosphoinositol-System
PK	Pyruvat-Kinase
PKA	Protein-Kinase A
PKC	Protein-Kinase C
PLC	Phospho-Lipase C
POMC	Proopiomelanocortin
PT	Pelvic thrust
PT-Zellen	pars tuberalis (hypophysii) - Zellen
PVC	Poly-Vinylchlorid
PVN	paraventricular nucleus (Nucleus paraventricularis hypothalami)
QMWS	Quasi-Morphin-Withdrawal-Syndrom
R	Rolipram
Rap1	Ras-related protein 1, Ras-verwandtes Protein
Ras protein	Rat sarcoma protein, Rattensarkom-Protein
RCH	Retrochiasmatischer Hypothalamus
RHT	Retino-Hypothalamischer Trakt
RIA	Radio-Immuno-Assay
RIMA	Reversible Inhibitor (reversibler Hemmer) der MAO-(Typ) A
RM	Rückenmark
RpcAMPS	Rp-Diastereomer von cyclischem Adenosinmonophosphothioat = PK A - Inhibitor
(SpcAMPS)	(Sp-Diastereomer.....= das zweite Diastereomer = PK A Aktivator)
SAM	Sympathoadrenal Medullary System (sympathoadrenerges medulläres System)
s.c.	subcutan
SCG	superior cervical ganglion (oberes Halsganglion)
SCN	Suprachiasmatic Nucleus/Nuclei (Nucleus/Nuclei suprachiasmaticus/tici)
SCR	Scratching
5-HT	Serotonin
SL	Sleeping
SLE	Systemischer Lupus Erythematodes
SN	Sniffing
SNAT	Serotonin-N-Acetyl-Transferase
SOX2	SRY (sex determining region Y)-box 2
SPF	specific pathogen free
SSRI	Serotonin Selective (Serotonin-selektiver) Reuptake Inhibitor (Wiederaufnahme-Hemmer)
T	Tiefe
Trp	Tryptophan
TH	Tyrosin-Hydroxylase

THC	Δ^9 -Tetrahydrocannabinol
TMWS	True-Morphin-Withdrawal-Syndrom
TNF	Tumor Nekrose Faktor
TNO	Nederlandse Organisatie voor Toegepast Natuurwetenschappelijk Onderzoek Niederländische Organisation für Angewandte Naturwissenschaftliche Forschung
TrH	Tryptophan-Hydroxylase
TTFL	Transcriptional/ (post-) Translational Feedback Loop
U/min	Umdrehungen pro Minute
UCR	Upstream Conserved Regions
UV	Ultraviolett
VASP	vasodilator activated phosphoprotein (Vasodilator-aktiviertes Phosphoprotein)
VK	Variationskoeffizient
VMT	ventrales mesencephales Tegmentum
WHO	World Health Organisation (Weltgesundheitsorganisation)
YAW	Yawning
ZNS	Zentrales Nervensystem
ZTH	Zentrale Tierhaltung

Erklärung

„Ich, Jeannot Andreas Zimmer, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: Rolipram und tageszeitliche Rhythmen an Ratten selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

09. September 2012

Jeannot Andreas Zimmer

Danksagungen

Ich danke ganz herzlich Herrn Prof. Stock für die Überlassung des Themas und die langandauernde Unterstützung bei der Anfertigung der Dissertation.

Bei Herrn Dr. Wachtel, meinem Betreuer in der Schering AG, Abteilung Neuropsychopharmakologie, bedanke ich mich für die herzliche und motivierende Unterstützung bei der Durchführung der Untersuchungen und den vielen, fruchtbaren Diskussionen über die Ergebnisse.

Bei den übrigen Mitarbeitern der Schering AG in dieser Abteilung - allen voran Herrn Rettig, Frau Schulze, Herrn Schneider und Herrn Dr. Löschmann- danke ich für die freundliche Unterstützung und die guten Tipps bei der Durchführung der Untersuchungen.

Bei ihren Kollegen der Abteilung für Statistik und den Mitarbeitern des Instituts für Biometrie der FU Berlin bedanke ich mich ganz herzlich für ihre Hinweise und Unterstützung bei der statistischen Planung, Bearbeitung und Auswertung.

Bei meiner Schwester für die Motivation und die Aufmunterungen, wenn es gerade einmal nicht so richtig voran ging.

Zu guter Letzt möchte ich mich ganz besonders bei meiner Mutter bedanken, die mir nicht nur immer verständnisvoll zur Seite gestanden hat, sondern auch alles Mögliche auf sich genommen hat mich so zu unterstützen, dass ich diese Arbeit abschließen konnte.

Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.