



lacZ가 삽입된 PRV-Bartha 종의 신경친화성 및 무릎시상하부로 추적시 발현양상 분석

김진상 · 박은세 · 천송희 · 김민희 · 방현수 · 권영실 · 이봉희¹ · 김영철²
대구대학교 물리치료학과, ¹제주대학교 의과대학 해부학교실, ²계명대학교 공중보건학과

Neurotropism and Expression Pattern of lacZ Inserted PRV-Bartha in Geniculohypothalamic Tract Tracing

Jin-Sang Kim, Eun-se Park, Song-Hee Cheon, Min-Hee Kim, Hyun-Soo Bang,
Young-Shil Kwon, Bong-Hee Lee¹ and Young-Chul Kim²

Department of Physical Therapy, Daegu University, Daegu 705-033

¹Department of Anatomy, Cheju National University, Cheju 690-756

²Department of Public Health, Keimyung University, 704-701, Korea

Received November 22, 2006; Accepted December 26, 2006

ABSTRACT. To localize the connection between intergeniculate nucleus and suprachiasmatic nucleus through geniculohypothalamic tract in postnatal mongolian gerbil, we injected lacZ inserted PRV-Bartha strain into suprachiasmatic nucleus and tried to immunostain against it with Rb134 and mouse anti- β -galactosidase. The numbers of immunoreactive neurons in intergeniculate leaflet were 8 ± 3.2 in P1 period, 10 ± 4.1 in P3 period and 13 ± 6.2 in P7 period, and was statistically significant ($p < 0.05$) and had tendency to increase with time consuming. The results showed that intergeniculate leaflet had projected some axons into suprachiasmatic nucleus through geniculohypothalamic tract in postnatal mongolian gerbil. But we could not exclude the possibility of direct projections from dorsal and ventral geniculate nuclei into suprachiasmatic nucleus completely.

Keywords: Intergeniculate leaflet, Suprachiasmatic nucleus, geniculohypothalamic tract, lacZ, PRV-Bartha, Immunostain.

서 론

시각교차위핵(suprachiasmatic nucleus, SCN)은 망막 시상하부를 통한 망막으로부터의 직접적 빛 관련 신호 입력 뿐만아니라 무릎사이작은핵(intergeniculate leaflet, IGL)을 포함한 뇌의 여러 부분에서 직·간접적 신호를 입력 받아 일주기조절중추로서의 기능을 수행하고 있다(Biello, 1995; Akiyama *et al.*, 1999). 특히 무릎사이작은핵 유래 neuropeptide Y(NPY), orexin A 및 melatonin1(MT1) 등 여러 중개자들에 의한 시각교차위핵의 활동 억제 또는

증가는 일주기조절에 변화를 야기해 외부 빛의 변화에 적절히 대응하는 것으로 판단된다. 이런 일주기조절 관련 중개자들의 수준은 주산기 동안 무릎사이작은핵의 세포구축학적인 발달정도와 망막자극 입력에 따라 증가하며, 이는 시각교차위핵에 있는 수용기와 깊은 연관성을 지니고 있다(Biello *et al.*, 1994). 즉, 무릎사이작은핵에서는 eNOS를 함유하고있는 신경세포에서의 c-fos와 c-jun의 발현이 이루어지고 있으며, 5-hydroxytryptophan5A(5-HT_{5A})와 calbindin-D28K(CB)는 지속적 빛의 자극기 동안 일주기 통합에 관여한다는 보고가 있다(Challet *et al.*, 1998; Horikawa *et al.*, 2000). 이와 함께 NPY는 시각교차위핵의 활성에 억제적으로 작용하고 있다. 수면, 섭식 및 내분비조절에 관여하는 신경펩티드인 orexin A는 일주기 조절에는 전혀 영향을 미치지 않는다고 보고되고 있다.

Correspondence to: Jin-Sang Kim, Department of Physical Therapy, Daegu University, 2288 Daemyung Dong Nam Gu, Daegu 705-033, Korea
E-mail: jskim0@daegu.ac.kr

그러나 최근에 무릎사이작은핵 유래 orexin A 함유 신경 종말이 시각교차위핵의 배쪽외측부(ventrolateral portion)의 인접부에서 관찰되었다는 보고도 있다. 이에 따라 orexin A가 비광성 일주기조절에 관여할 것으로 시사되는 바가 크다(Wickland and Turek, 1994).

처음 연구자들은 빛의 차단, 자율신경계 변화, 호르몬 측정을 이용하여 신경화학물질의 주사에 대한 외측무릎핵 내부와 주변의 반응을 검사하였다. 이러한 연구 접근결과 무릎사이작은핵내 신경전달물질인 NPY, 5-HT_{5A}, orexin A, CB, enkephalin(ENK), substance P(SP) 및 MT1 등이 비광성 일주기조절에 관여하고 있는 것이 증명되었다. 또한 이들 신경전달물질에 대한 중추신경회로망의 요소들이 형성되기 시작했으나 비광성 일주기조절의 안정성에 대하여는 아직도 밝혀지지 않은 부가적인 분자적 중개자와 조절 경로가 있을 것으로 추정되고 있다(Huhman and Albers, 1994; Yannielli and Harrington, 2000; Fukuhara *et al.*, 2001; McKinley *et al.*, 2002). 이 연구의 일환으로 무릎사이작은핵이 일주기조절의 중추인 시각교차위핵의 비광성 일주기조절에 중요한 구조라는 주장이 제기되고 있다.

대부분의 연구의 실험동물 모델에서 일주기조절장애는 섭식과 생식 등 행동양식에 변화를 야기할 수 있다. 이에 대한 두 가지 주요 기전은 망막을 통해 시각교차위핵으로 전달하는 망막시상하부의 전달체계의 결함과 무릎사이작은핵 유래 NPY, 5-HT_{5A}, orexin A, 및 CB 등 신경전달 중개자의 피드백을 포함한 통합장애로 알려지고 있다. 이러한 결함이 존재한다는 것은 무릎사이작은핵이 비광성 일주기조절에 깊게 관여한다는 것인데 그 직접적 연결에 대한 기전은 밝혀지지 않고 있었다(Pickard, 1982; Wickland and Turek, 1994; Morin and Blanchard, 1996; Moga and Moore, 1997; Morin and Blanchard Morin, 1998; Morin and Blanchard, 2001). 무릎사이작은핵에서 유래되는 여러 신경로 중 배쪽투사로(ventral projection)의 일부인 무릎시상하부(geniculohypothalamic tract, GHT)는 NPY, 5-HT_{5A}, orexin A, 및 CB 등의 신경전달물질을 함유하는 신경종말이 시각교차위핵에서 신경연접을 이루어 비광성 일주기조절 신경로로 추정되고 있으나 이에 대한 정확한 신경로 추적의 연구가 필요하였다.

본 연구는 일주기조절 중추인 시각교차위핵의 조절자로서 기능을 수행하는 무릎사이작은핵에서 유래하여 시각교차위핵에 중지하는 무릎시상하부를 lacZ 유전자가 삽입된 PRV-Bartha 종을 이용하여 규명코자하였다. 바이러스를 시각교차위핵내에 주입 후 시간경과에 따라 역행성으로 추적하여 모래쥐 주산기 동안 무릎시상하부의 발현양상을 분석하고자 계획되었다. 즉, 일주기조절 중추인 시

각교차위핵과 무릎사이작은핵의 직접연결을 신경친화성이 있고 신경연접을 건널 수 있는 탁월한 신경로 추적자인 lacZ 유전자가 삽입된 PRV-Bartha 종을 이용하여 확인함으로써 무릎사이작은핵의 일주기조절과 관련성을 형태학적으로 분석하기 위해 수행되었다.

재료 및 방법

실험동물 및 실험설계

본 실험에서는 주산기의 수컷 모래쥐(체중 15~45 gm) 60마리를 사용하였다. 실험군은 1일군, 3일군 및 7일군으로 분류하였으며 각 군당 20마리씩 배정하였다. 모래쥐는 한림대학교 실험동물센터에서 분양받아 교배시켜 본 실험에서 필요로 하는 주산기의 모래쥐를 얻었다. 사료와 물은 자유로이 공급하되 주산기임을 감안하여 모체와 함께 사육하였다. 모래쥐는 흰쥐 또는 마우스와 형태학적 및 행동양상적 특이성이 있다. 이를 이용해 최근 많은 연구

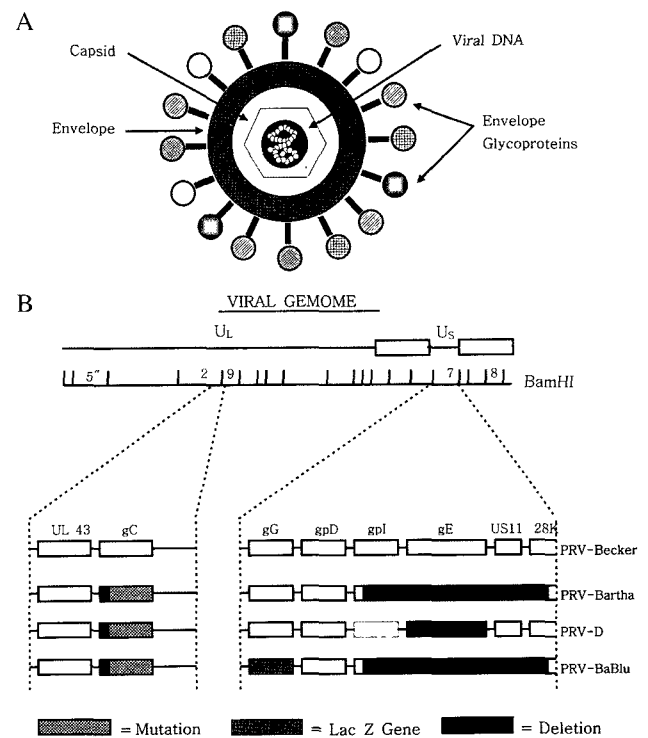


Fig. 1. Schematic representation of genomic organizations of pseudorabies virus (PRV) mutants. Four strains of PRV were shown. PRV-Becker, a wild type laboratory strain, PRV-Bartha, an attenuated vaccine strain, PRV-BaBlu, lacZ gene inserted strain into PRV-Bartha. In this study, the genetically modified PRV-BaBlu was used to investigate the neuronal circuitry between retinal ganglionic cell and intergeniculate leaflet in lateral geniculate body through retino-geniculate tract. A: PRV structure, B: Genomic map of PRV.

에서 실험동물로 사용하고 있다. 따라서 본 연구에서 규명하고자 하는 무릎사이작은핵과 시각교차위핵의 연결 회로망의 구조적 차이가 모래쥐에서 나타날 것으로 예상되어 모래쥐를 실험동물로 사용하였다. 사육조건은 밤낮주기(12시간 light/12시간 night)가 조절되며 실내온도는 22~25°C인 동물사육실에서 5마리씩 무리지어 사육하였다.

Pseudorabies 바이러스 제작

신경친화성이 있으며 역행성으로 시냅스를 통과하는 PRV를 무릎사이작은핵의 신경로 추적자로 사용하였다. 오제스키 바이러스의 백신형인 PRV-Bartha 종의 유전자 지도 중 gC 자리에 lacZ 유전자를 삽입하여 PRV-BaBlu를 얻었다. 이 바이러스는 β -galactosidase에 대한 항체를 이용해 면역조직화학적으로 검출할 수 있는 특징이 있다(Fig. 1).

Pseudorabies 바이러스 주입

Pseudorabies 바이러스(PRV)내 lacZ 유전자를 삽입하여 변형된 BRV-BaBlu(2.5×10^8) 2 μ l를 stereotaxic과 Hamilton syringe를 이용하여 실험동물 시각교차위핵 내로 주입한 후 12시간, 24시간 및 36시간 후 신경친화성 바이러스인 PRV의 신경로를 따른 이동을 관찰하여 무릎사이작은핵으로 유입되는 신경로를 관찰한 후 시각교차위핵과 무릎사이작은핵의 연결신경회로망을 구축하였다(Fig. 2).

조직처리

실험동물들은 각 해당시간에 ketamine hydrochloride (케타라, 50 mg/ml)와 xylazine(토펠, 20 mg/ml)을 체중 100 g당 0.15 ml 및 0.05 ml씩 섞어 복강내 주사하여 심마취시켰다. 흉강을 열고 심장의 왼쪽 심실을 통해 관류

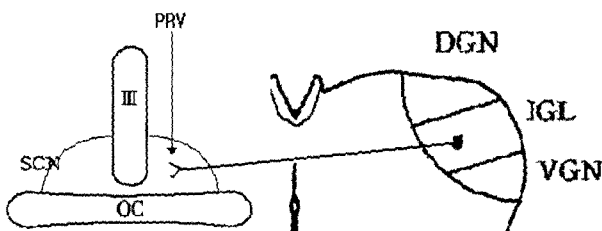


Fig. 2. Retrograde transneuronal infection of intergeniculate leaflet to innervate suprachiasmatic nucleus. The spatial sequence of retrograde transsynaptic infection of brain circuitry produced by injection of PRV into the suprachiasmatic nucleus. III: 3rd ventricle, SCN: suprachiasmatic nucleus, PRV: pseudorabies virus, DGN: dorsal geniculate nucleus, IGL: intergeniculate leaflet, VGN: ventral geniculate nucleus.

canula를 오름대동맥(ascending aorta)으로 삽입하여 4% paraformaldehyde-lysine-periodate(PLP)에 heparin (250 unit/ml)을 혼합한 용액으로 맑은 액체가 흐를 때까지 관류고정하였다. 관류수세 후 뇌를 적출하였으며, 적출된 뇌는 동일 고정액에 침적시켜 4°C에서 후고정을 시행하였다. 이어 20% sucrose(in phosphate buffered saline, pH 7.4)에 넣어 뇌가 완전히 가라 앉을 때까지 약 24시간 정도를 4°C에 보관한 다음 냉동절편기(Leica)를 이용하여 30 μ m 두께의 관상연속절편을 제작하여 6-well plate에 차례로 담아 보관하였다.

면역조직화학염색

면역조직화학염색은 free-floating method를 이용하였다. 6-well plate에 차례로 담겨있는 뇌조직 절편들은 0.1 M phosphate buffer(pH 7.4)로 수세한 다음 조직내 endogenous peroxidase를 제거하기 위해 1% H_2O_2 (in 0.1 M phosphate buffer)로 처리하였다. 이후 조직내 비특이적 반응을 차단하고 조직투과성을 높이기 위해 0.1 M phosphate buffer에 0.3% Triton X-100, 1% normal goat serum 및 1% bovine serum albumin을 섞어 조성된 용액에 1시간 반응시켰다. 1차항체는 Rb134와 mouse anti- β -galactosidase을 1:1000으로 희석하여 실온에서 24시간 반응시켰다. 조직절편을 실온에서 10분간 3회 0.1 M phosphate buffer(pH 7.4)로 세척한 후 2차항체인 biotinylated goat anti-rabbit IgG(Vector)에 실온에서 1시간 반응시켰다. 그 후 0.1 M phosphate buffer로 15분간 3회 세척한 뒤 3차항체인 ABC 용액에 실온에서 1시간 반응시켰다. 이후 3'-3', diaminobenzidine (DAB, Sigma)을 0.1 M phosphate buffer(pH 7.4)에 0.004% 되게 녹인 용액에 침적한 뒤 H_2O_2 가 0.005% 되게 첨가하여 정색반응을 실시하였다. 반응이 끝난 조직들은 gelatin이 coating된 slide glass 위에 올려 통상적으로 탈수, 투명화과정을 거친 뒤 permount로 봉입한 다음 영구표본을 제작하여 광학현미경(Nikon)으로 관찰하였다. 광학현미경하에서 PRV-BaBlu에 감염되어 갈색반응을 보인 무릎사이작은핵내 신경세포들을 Image-Pro analyzer를 이용해 pixel 단위로 계수하였다.

통계처리

실험결과 자료의 통계처리는 SPSS-PC ver10.0⁺ for windows 프로그램을 이용하여 일원배치분산분석(one-way ANOVA)을 실시하였고, 각 군 간의 차이를 검증하기 위하여 Duncan's multiple range test를 이용하여 사후 분석을 실시하였다. 본 연구의 통계학적 유의수준은 $p < 0.05$ 로 하였다.

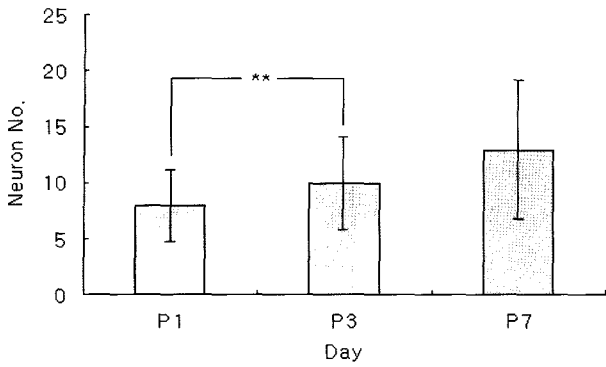


Fig. 3. lacZ gene inserted PRV-Bartha strain infected neurons in intergeniculate leaflet after its injection into suprachiasmatic nucleus in perinatal Mongolian gerbil. P1: first day in postnatal period, P3: third day in postnatal period, P7: seventh day in postnatal period, ** < 0.05.

결 과

주산기 모래쥐의 무릎사이작은핵과 시각교차위핵의 연결을 확인하기 위해 lacZ 유전자가 삽입된 PRV-Bartha 종 2 μl를 stereotaxic을 이용하여 시상하부의 시각교차위핵내로 주입한 후 12시간, 24시간 및 36시간 경과 후 신경친화성 바이러스인 PRV의 신경로를 따른 이동을 관찰하여 무릎사이작은핵과 시각교차위핵이 연결되는 신경회로망을 구축하였다.

시각교차위핵내 lacZ가 삽입된 PRV-arthra 종 주입 후 무릎시상하부로 구축

무릎시상하부로를 통한 시각교차위핵과 무릎사이작은핵의 연결을 동정하기 위하여 PRV-BaBlu 2 μl를 시각교차위핵에 주입한 뒤 12시간, 24시간 및 36시간 경과 후 면역조직화학염색을 실시한 후 무릎사이작은핵내 면역양성 반응을 보인 신경원을 개수한 바 P1 시기에 8 ± 3.2개, P3 시기에 10 ± 4.1개 및 P7 시기에 13 ± 6.2개였으며 통계학적 유의성도 관찰되었다(Fig. 3). 또한 시각교차위핵의 비광성 조절로 무릎사이작은핵에서 시각교차위핵으로 투사하는 신경종말이 lacZ가 삽입된 PRV-Bartha 종을 이용한 신경로 추적에서 확인되었으나 시간이 경과함에 따라 등쪽무릎핵(dorsal geniculate nucleus, DGN)과 배쪽무릎핵(ventral geniculate nucleus, VGN)에서 lacZ가 삽입된 PRV-Bartha 종에 양성 반응을 보인 신경세포도 관찰됨으로써 등쪽무릎핵과 배쪽무릎핵에서 시각교차위핵으로의 직접투사도 배제할 수 없었다(Fig. 4).

고 찰

포유류의 신경발달에 있어서 신경연접의 정밀한 패턴들은 초기의 흐트러진 투사(projection)로부터 섬세한 연결로 발달되어 진다. 일주기조절 관련 신경원의 활성화는 시각교차위핵에 대한 두 눈 사이의 경쟁을 유발하는 것으로

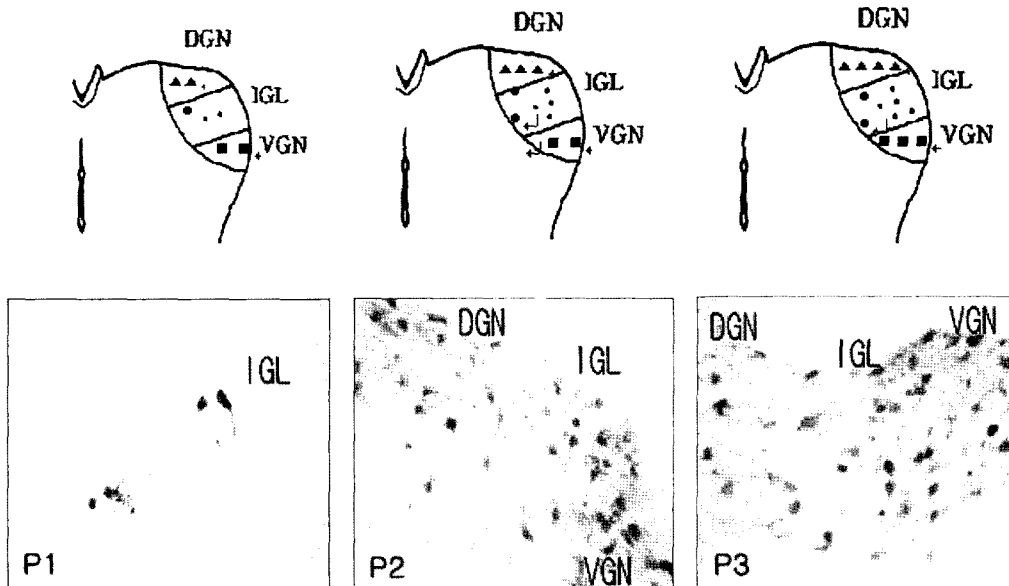


Fig. 4. lacZ gene inserted PRV-Bartha strain infected neurons in intergeniculate leaflet in lateral geniculate body through geniculohypothalamic tract after its injection into suprachiasmatic nucleus. The number of lacZ gene inserted PRV-Bartha strain infected neurons in intergeniculate leaflet had tendency to increase following time consuming, and were significant statistically between P1 and P2 period. DGN: dorsal geniculate nucleus, IGL: Intergeniculate leaflet, VGN: ventral geniculate nucleus, P1: first day in postnatal period, P3: third day in postnatal period, P7: seventh day in postnatal period.

이론화되어 왔다 또한 한쪽 눈에서의 활성차단은 시각교차위핵과 관련된 시각투사가 이루어지는 동측의 시각교차위핵에서 많은 세포구축학적 영역의 상실을 초래한다고 보고되고 있다(Arvidsson *et al.*, 1995; Bilsky *et al.*, 1995; Ebling, 1996; Bobrzynska and Mrosovsky, 1998; Byku and Gannon, 2000). 그러나 선행 연구들은 신경원 활성의 제거에 의존하여 이루어 졌기 때문에 신경원 활성의 역치 수준에 대한 필요조건과 순수한 망막신경절세포의 활성에 기초한 상호경쟁 사이의 구별이 불가능하였다(George *et al.*, 1994; Hastings *et al.*, 1998; Edelstein and Amir, 1999; Hall *et al.*, 1999). 다시 말하면 신경원 활성은 단지 임의적인데 망막신경절세포에 특이적인 시각교차위핵의 활성을 규정하는 신경분자생물학적 실마리를 해결하고, 무릎사이작은핵의 시각교차위핵 조절을 규명하기 위하여 주산기 모래쥐의 무릎시상하부를 통한 무릎사이작은핵에서 시각교차위핵으로 투사되는 초기 축삭돌기들을 추적할 필요가 있었다(Mrosovsky, 1991; Mead *et al.*, 1992; Janik and Mrosovsky, 1994; Morin and Blanchard, 1995; Morin, 1999; Maywood and Mrosovsky, 2001; Maywood *et al.*, 2002). 따라서 본 연구에서는 주산기 모래쥐를 이용하여 무릎시상하부로 발달의 특수한 시공간적인 패턴을 관찰하였다.

본 연구는 무릎사이작은핵에서 유래되어 시각교차위핵으로 투사되는 무릎시상하부의 주산기 동안 발달 정도를 lacZ가 삽입된 신경친화성이 있으며, 신경연접을 건널 수 있는 PRV-Bartha 종을 이용하여 규명하였다. 또한 무릎사이작은핵에서 시각교차위핵으로 투사되는 신경전달물질의 추적을 통해 비광성 일주기조절에 관여하는 요인으로 무릎사이작은핵의 역할을 규명하기 위해 시도되었다. 본 연구에서 사용된 역행성 신경로 추적자인 PRV는 알파 Herpes 바이러스계에 속하는 DNA 바이러스이며 야생형인 PRV-Becker과 약독형인 PRV-Bartha종으로 대별된다. 최근 PRV-Bartha 종 계놈의 Us 구역 중 gC 자리에 lacZ 유전자를 삽입하여 유전자 변형시킨 PRV-BaBlu 종은 면역조직화화학적으로 검출할 수 있는 동일한 유전산물을 산출할 수 있도록 구성되었는데 β -galactosidase 발현은 이 바이러스에 감염된 신경원의 독특한 표시자로 나타났다(Babic *et al.*, 1993; Enquist *et al.*, 1994; Card *et al.*, 1995; Kim *et al.*, 1999).

본 연구에서 주산기 모래쥐의 시각교차위핵내에 주입한 lacZ 유전자가 삽입된 PRV-Bartha 종을 이용하여 무릎시상하부를 통한 시각교차위핵과 무릎사이작은핵의 연결을 동정하기 위하여 PRV-BaBlu 2 μ l를 시각교차위핵에 주입한 후 12시간, 24시간 및 36시간 경과 후 면역조직화화학염색을 실시한 후 무릎사이작은핵내 면역양성반응을

보인 신경원을 개수한 바 P1 시기에 8 ± 3.2 개, P3 시기에 10 ± 4.1 개 및 P7 시기에 13 ± 6.2 개였으며 통계학적 유의성도 관찰되었다($p < 0.05$)(Fig. 3). 또한 시각교차위핵의 비광성 조절로 무릎사이작은핵에서 시각교차위핵으로 투사하는 신경종말이 lacZ가 삽입된 PRV-Bartha 종을 이용한 신경로 추적에서 확인되었다. lacZ가 삽입된 PRV-Bartha이 주산기 모래쥐의 시각교차위핵의 신경세포들을 감염시킨 뒤 무릎시상하부의 축삭을 따라 역행성으로 이동하면서 무릎사이작은핵의 신경세포들을 감염시킨 것이 확인되었다. 이는 무릎사이작은핵이 시각교차위핵의 신경섬유들에 의해 연결되어 있다는 기존의 연구들과 일치하는 소견이 관찰되었다(Standish *et al.*, 1995; Hall *et al.*, 1999; Morin and Blanchard, 2001). 그러나 시간이 경과함에 따라 등쪽무릎핵(dorsal geniculate nucleus, DGN)과 배쪽무릎핵(ventral geniculate nucleus, VGN)에서 lacZ가 삽입된 PRV-Bartha 종에 양성 반응을 보인 신경세포도 관찰됨으로써 등쪽무릎핵과 배쪽무릎핵에서 시각교차위핵으로의 직접투사도 배제할 수 없었다. 무릎사이작은핵내에서 이 변종 바이러스에 대한 면역화학적 반응이 3'-3, diaminobenzidine에 갈색의 양성반응으로 표현되어 주산기 시간경과에 따라 감염된 신경세포의 수가 증가한 결과로 나타났다. 이는 lacZ가 삽입된 PRV-Bartha 종이 무릎시상하부의 동정에 탁월한 신경로추적자로서 PRV를 이용한 기존의 연구 결과와 일치하는 소견을 보였다. 특히 유전자조작을 통해 산출된 이 변종바이러스가 무릎시상하부의 기시점으로써 무릎사이작은핵의 면역조직화학적 동정에 탁월한 역행성 신경로 추적자임이 증명되었다. 따라서 본 연구를 통해 주산기 모래쥐의 무릎사이작은핵이 무릎시상하부를 통해 시각교차위핵의 일주기조절에 영향을 미치고 있음이 증명되어, 향후 다양한 신경전달물질의 일주기조절 중계역할에 대한 규명이 이루어 질 것으로 판단된다.

감사의 글

"이 논문은 2003-2005년도 정부재원(교육인적자원부 학술연구조성사업비)으로 한국학술진흥재단의 지원을 받아 연구되었음(KRF-2003-200145)."

참고문헌

- Akiyama, M., Kouzu, Y., Takahashi, S., Wakamatsu, H., Moriya, T., Maetani, M., Watanabe, S., Tei, H., Sakaki, Y. and Shibata, S. (1999): Inhibition of light- or glutamate-induced mper1 expression represses the phase shifts into the mouse circadian locomotor and suprachiasmatic fir-

- ing rhythms. *J. Neurosci.*, **19**, 1115-1121.
- Arvidsson, U., Riedl, M., Chakrabarti, S., Vulchanova, L., Lee, J.H., Nakano, A.H., Lin, X., Loh, H.H., Law, P.Y., Wessendorf, M.W. and Elde, R. (1995): The μ -opioid receptor is primarily postsynaptic: combined immunohistochemical localization of the receptor and endogenous opioids. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**, 5062-5066.
- Babic, N., Mettenleiter, T.C., Flamand, A. and Ugolini, G. (1993): Role of essential glycoprotein gII and gp50 in transneuronal transfer of pseudorabies virus from hypoglossal nerve of mice. *J. Virol.*, **67**, 4421-4426.
- Biello, S.M. (1995): Enhanced photic phase shifting after treatment with antiserum to neuropeptide Y. *Brain Res.*, **673**, 25-29.
- Biello, S.M., Janik, D. and Mrosovsky, N. (1994): Neuropeptide Y and behaviorally induced phase shifts. *Neuroscience*, **62**, 273-279.
- Bilsky, E.J., Calderon, S.N., Wang, T., Bernstein, R.N., Davis, P., Hruby, V.J., McNutt, R.W., Rothman, R.B., Rice, K.C. and Porreca, F. (1995): SNC 80, a selective, nonpeptidic and systemically active opioid delta agonist. *J. Pharm. Exp. Therap.*, **273**, 359-366.
- Bobrzynska, K.J. and Mrosovsky, N. (1998): Phase shifting by novelty-induced running: activity dose-response curves at different circadian times. *J. Comp. Physiol. A.*, **182**, 251-258.
- Byku, M. and Gannon, R.L. (2000): Opioid induced nonphotic phase shifts of hamster circadian activity rhythms. *Brain Res.*, **873**, 189-196.
- Card, J.P., Dubin, J.R., Whealy, M.E. and Enquist, L.W. (1995): Influence of infectious dose upon productive replication and transsynaptic passage of pseudorabies virus in rat central nervous system. *J. Neurovirol.*, **1**, 349-358.
- Challet, E., Scarbrough, K., Penev, P.D. and Turek, F.W. (1998): Roles of suprachiasmatic nuclei and intergeniculate leaflets in mediating the phase-shifting effects of a serotonergic agonist and their photic modulation during subjective day. *J. Biol. Rhythms*, **13**, 410-421.
- Ebling, F.J. (1996): The role of glutamate in the photic regulation of the suprachiasmatic nucleus. *Prog. Neurobiol.*, **50**, 109-132.
- Edelstein, K. and Amir, S. (1999): The role of the intergeniculate leaflet in entrainment of circadian rhythms to a skeleton photoperiod. *J. Neurosci.*, **19**, 372-380.
- Enquist, L.W., Dubin, J., Whealy, M.E. and Card, J.P. (1994): Complementation analysis of pseudorabies virus gE and gI mutants in retinal ganglion cell neurotropism. *J. Virol.*, **68**, 5275-5279.
- Fukuhara, J., McKinley, B., Dirden, J.C., Bittman, E., Tosini, G. and Harrington, M.E. (2001): Neuropeptide Y rapidly reduces Period1 and Period2 mRNA levels in the hamster suprachiasmatic nucleus. *Neurosci. Lett.*, **314**, 119-122.
- George, S.R., Zastawny, R.L., Briones-Urbina, R., Cheng, R., Nguyen, T., Heiber, M., Kouvelas, A., Chan, A.S. and O'Dowd, B.F. (1994): Distinct distribution of μ , δ and κ opioid receptor mRNA in rat brain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **205**, 1438-1444.
- Hall, A.C., Earle-Cruickshanks, G. and Harrington, M.E. (1999): Role of membrane conductances and protein synthesis in subjective day phase advances of the hamster circadian clock by neuropeptide Y. *Eur. J. Neurosci.*, **11**, 1-9.
- Hastings, M.H., Duffield, G.E., Smith, E.J., Maywood, E.S. and Ebling, F.J. (1998): Entrainment of the circadian system of mammals by nonphotic cues. *Chronobiol. Int.*, **15**, 425-445.
- Horikawa, K., Yokota, S., Fuji, K., Akiyama, M., Moriya, T., Okamura, H. and Shibata, S. (2000): Nonphotic entrainment by 5-HT_{1A/7} receptor agonists accompanied by reduced per1 and per2 mRNA levels in the suprachiasmatic nuclei. *J. Neurosci.*, **20**, 5867-5873.
- Huhman, K.L. and Albers, H.E. (1994): Neuropeptide Y microinjected into the suprachiasmatic region phase shifts circadian rhythms in constant darkness. *Peptides*, **15**, 1475-1478.
- Janik, D. and Mrosovsky, N. (1994): Intergeniculate leaflet lesions and behaviorally-induced shifts of circadian rhythms. *Brain Res.*, **651**, 174-182.
- Kim, J.S., Enquist, L.W. and Card, J.P. (1999): Circuit-specific coinfection of neurons in the rat central nervous system with two pseudorabies virus recombinants. *J. Virology*, **73**(11), 9521-9531.
- Maywood, E.S. and Mrosovsky, N. (2001): A molecular explanation of interactions between photic and non photic circadian clock resetting stimuli. *Gene Expr. Patterns*, **1**, 27-31.
- Maywood, E.S., Okamura, H. and Hastings, M.H. (2002): Opposing actions of neuropeptide Y and light on the expression of circadian clock genes in the mouse suprachiasmatic nuclei. *Eur. J. Neurosci.*, **15**, 216-220.
- McKinley, B., Yannielli, P.C. and Harrington, M.E. (2002): Neuropeptide Y differentially suppresses per1 and per2 mRNA induced by light in the suprachiasmatic nuclei of the golden hamster. *J. Biol. Rhythms.*, **17**, 28-39.
- Mead, S., Ebling, F.J., Maywood, E.S., Humby, T., Herbert, J. and Hastings, M.H. (1992): A nonphotic stimulus causes instantaneous phase advances of the light-entrainable circadian oscillator of the Syrian hamster but does not induce the expression of c-fos in the suprachiasmatic nuclei. *J. Neurosci.*, **12**, 2516-2522.
- Meyer-Bernstein, E.L. and Morin, L.P. (1996): Differential serotonergic innervation of the suprachiasmatic nucleus and the intergeniculate leaflet and its role in circadian rhythm modulation. *J. Neurosci.*, **16**, 2097-2111.
- Meyer-Bernstein, E.L. and Morin, L.P. (1998): Destruction of serotonergic neurons in the median raphe nucleus blocks circadian rhythm phase shifts to triazolam but not to novel wheel access. *J. Biol. Rhythms.*, **13**, 494-505.
- Moga, M.M. and Moore, R.Y. (1997): Organization of neural inputs to the suprachiasmatic nucleus in the rat. *J. Comp. Neurol.*, **389**, 508-534.
- Morin, L.P. and Blanchard, J.H. (2001): Neuromodulator content of hamster intergeniculate leaflet neurons and their projection to the suprachiasmatic nucleus or visual midbrain. *J. Comp. Neurol.*, **437**, 79-90.
- Morin, L.P. (1999): Serotonin and the regulation of mammalian circadian rhythmicity. *Ann. Med.*, **31**, 12-33.

- Morin, L.P. and Blanchard, J. (1995): Organization of the hamster intergeniculate leaflet: NPY and ENK projections to the suprachiasmatic nucleus, intergeniculate leaflet and posterior limitans nucleus. *Vis. Neurosci.*, **12**, 57-67.
- Morin, L.P. and Blanchard, J.H. (2001): Modulator content of hamster intergeniculate leaflet neurons and their projection to the suprachiasmatic nucleus or visual midbrain. *J. Comp. Neurol.*, **437**, 79-90.
- Mrosovsky, N. (1991): Double-pulse experiments with non-photic and photic phase-shifting stimuli. *J. Biol. Rhythms.*, **6**, 167-179.
- Pickard, G.E. (1982): The afferent connections of the suprachiasmatic nucleus of the golden hamster with emphasis on the retinohypothalamic projection. *J. Comp. Neurol.*, **211**, 65-83.
- Standish, A., Enquist, L.W., Escardo, J.A. and Schwaber, J.S. (1995): Dendritic morphology of cardiac related medullary neurons defined by circuit specific infection by a recombinant pseudorabies virus expressing β -galactosidase. *J. Neurovirol.*, **1**, 359-368.
- Wickland, C. and Turek, F.W. (1994): Lesions of the thalamic intergeniculate leaflet block activity-induced phase shifts in the circadian activity rhythm of the golden hamster. *Brain Res.*, **660**, 293-300.
- Yannielli, P.C. and Harrington, M.E. (2000): Neuropeptide Y applied *in vitro* can block the phase shifts induced by light *in vivo*. *NeuroReport*, **11**, 1587-1591.