

# **Zelluläre und molekulare Regulationsmechanismen der Melatoninbiosynthese**

**Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Naturwissenschaften**

vorgelegt beim Fachbereich Biologie und Informatik  
der Johann Wolfgang Goethe-Universität  
in Frankfurt am Main

von  
Marco Koch  
aus Essen  
(DF1)

Frankfurt am Main 2003

Vom Fachbereich Biologie und Informatik der  
Johann Wolfgang Goethe-Universität als Dissertation angenommen.

Dekan: Prof. Dr. Heinz Dieter Osiewacz

Gutachter: Prof. Dr. Herbert Zimmermann

Prof. Dr. Horst-Werner Korf

Datum der Disputation: 16. 12. 2003

Für Nicole und meine lieben Eltern Doris und Wolfgang

## Inhaltsverzeichnis

<b>1 Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1 Biologische Rhythmik .....	1
1.2 Das photoneuroendokrine System und sein Hormon Melatonin.....	2
1.2.1 Zirkadiane Photorezeption .....	3
1.2.2 Der Nucleus suprachiasmaticus (SCN).....	4
1.2.3 Das Pinealorgan als neuroendokriner Effektor.....	5
1.3 Steuerung der Melatoninbiosynthese im Pinealorgan der Säugetiere .....	8
1.4 Zielsetzung der vorliegenden Arbeit .....	12
<b>2 Material und Methoden</b> .....	<b>15</b>
2.1 Versuchstiere .....	15
2.1.1 Ratte .....	15
2.1.2 Rind.....	15
2.2 Primärkulturen von Pinealozyten der Ratte.....	15
2.3 Primärkulturen von Pinealozyten des Rindes .....	16
2.4 Organkulturen von Pinealorganen der Ratte .....	16
2.5 Stimulationsbedingungen .....	17
2.6 Arbeiten mit RNA.....	18
2.6.1 Isolierung von RNA mit TRIzol <sup>TM</sup> Reagent .....	18
2.6.2 Konzentrationsbestimmung von RNA Lösungen.....	19
2.6.3 Elektrophorese von RNA im Formaldehyd-Agarosegel.....	19
2.6.4 Northern Blot-Technik .....	20
2.6.4.1 Herstellung der Sonde .....	20
2.6.4.2 RNA-Transfer und Hybridisierung .....	20
2.7 Immunzytochemie und Immunhistochemie.....	21
2.7.1 Verwendete Antikörper und Präadsorption .....	21
2.7.2 Vorbereitung der Präparate.....	23
2.7.2.1 Immunzytochemie .....	23
2.7.2.2 Immunhistochemie .....	23
2.7.3 Durchführung der Immunzytochemie/Immunhistochemie .....	24
2.7.3.1 ABC-Methode .....	24

2.7.3.2 Indirekte Immunfluoreszenz.....	25
2.7.4 Dokumentation der Ergebnisse mittels konfokaler Laserscanning- Mikroskopie (CLSM) .....	25
2.8 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE) und Immunoblot .....	25
2.8.1 Probenvorbereitung und Proteinbestimmung.....	26
2.8.2 SDS-PAGE .....	27
2.8.3 Immunoblot-Technik.....	28
2.8.4 Nachweis der Proteinbanden .....	30
2.9 Ko-Immunpräzipitation.....	30
2.10 Aktivitätsbestimmung der AANAT .....	32
2.10.1 Durchführung der Aktivitätsmessungen .....	32
2.10.2 Berechnung der AANAT Aktivität .....	33
2.11 ELISA (enzyme linked immunosorbent assay) .....	33
2.11.1 Probenvorbereitung.....	33
2.11.2 Durchführung .....	34
2.12 Semiquantitative Analyse durch Bildanalyse .....	34
2.13 Statistische Auswertung .....	35
<b>3 Ergebnisse .....</b>	<b>36</b>
3.1 Darstellung von regulatorischen Untereinheiten der Proteinkinase A und A Kinase Anker Proteinen (AKAP 95, 150) in Pinealozyten der Ratte.....	36
3.2 Die Bedeutung von EPAC für die Regulation der Melatoninbiosynthese im Pi- nealorgan der Ratte - Untersuchungen mit Hilfe des cAMP-Analogs 8-CPT-2'- O-Me-cAMP .....	42
3.2.1 Die Induktion von pCREB durch die cAMP-Analoga 8-CPT-2'-O-Me- cAMP und 8-Br-cAMP in kultivierten Pinealorganen der Ratte.....	42
3.2.2 Einfluss von 8-CPT-2'-O-Me-cAMP auf den AANAT-Proteingehalt und die Freisetzung von Melatonin aus kultivierten Pinealorganen der Ratte .....	44
3.2.2 Einfluss von 8-CPT-2'-O-Me-cAMP auf die Phosphorylierung der extrazellulär regulierten Kinasen (ERK) 1 und 2.....	46
3.3 Die gezielte Dephosphorylierung von pCREB spielt bei der Inaktivierung der <i>Aanat</i> Transkription in Pinealozyten der Ratte eine wichtige Rolle .....	49
3.3.1 Die nach NA-Entzug erfolgte pCREB Dephosphorylierung wird durch	

Zugabe von PSP-Inhibitoren verhindert.....	49
3.3.2 ICER wird weder durch Entzug des NA-Stimulus noch durch Appli- kation der PSP-Inhibitoren akut beeinflusst.....	51
3.3.3 PSP-Inhibitoren vermindern die durch NA-Entzug verursachte Abnahme der <i>Aanat</i> mRNA und des AANAT Proteingehalts.....	52
3.3.4 Nach NA-Entzug können die PSP-Inhibitoren die Abnahme der Melato- ninfreisetzung abschwächen.....	55
3.3.5 Die noradrenerge Stimulation bewirkt eine Umverteilung des PSP 1 Immunsignals.....	55
3.3.6 Die noradrenerge Stimulation beeinflusst die Phosphorylierung von DARPP-32 in kultivierten Pinealorganen der Ratte nicht.....	57
3.4 Vergleichende Untersuchungen zur Interaktion der AANAT mit dem Protein 14-3-3 in Pinealozyten der Ratte und des Rindes.....	59
3.5 Die funktionelle Bedeutung des Cannabinoidsystems für die Steuerung der Melatoninbiosynthese im Pinealorgan der Ratte.....	66
3.5.1 Immunhistochemischer- und immunchemischer Nachweis des Cannabinoid 1 und 2 Rezeptors im Pinealorgan der Ratte.....	66
3.5.2 Die Stimulation mit dem CB 1 und 2 Rezeptor-Agonisten THC hat keinen Einfluss auf die Phosphorylierung von CREB am Serin 133 in kultivierten Pinealozyten der Ratte.....	69
3.5.3 Die Stimulation mit dem CB 1 und 2 Rezeptor-Agonist THC hat keinen Einfluss auf den AANAT Proteingehalt in kultivierten Pinealorganen der Ratte.....	73
3.5.4 Die AANAT-Aktivität und die Melatoninfreisetzung werden in kultivierten Pinealorganen der Ratte durch die Behandlung mit THC gehemmt.....	74
<b>4 Diskussion.....</b>	<b>78</b>
4.1 Die Darstellung von R-Untereinheiten der PKA und deren Ankerproteine in Pinealozyten der Ratte.....	78
4.2 Das EPAC-spezifische cAMP-Analog 8-CPT-cAMP hat keinen Einfluss auf die Regulationsmechanismen der Melatoninbiosynthese.....	82
4.3 Die Dephosphorylierung von pCREB durch Phosphatasen ist an der Herab-regu- lation der <i>Aanat</i> Transkription und der Termination der Melatoninbio-synthese beteiligt.....	87

---

4.4 Die funktionelle Interaktion von AANAT und Protein 14-3-3 in Pinealozyten der Ratte und des Rindes.....	93
4.5 Das Cannabinoidsystem im Pinealorgan der Ratte und seine Bedeutung für die Steuerung der Melatoninbiosynthese .....	99
4.6 Ausblick .....	104
<b>5 Zusammenfassung.....</b>	<b>108</b>
<b>6 Abkürzungen.....</b>	<b>111</b>
<b>7 Literatur.....</b>	<b>114</b>
<b>8 Danksagung.....</b>	<b>134</b>

## 1 Einleitung

### 1.1 Biologische Rhythmik

Geophysikalische Parameter, wie die Rotation der Erde um die eigene Achse und in einem geneigten Winkel um die Sonne, bestimmen das gesamte Leben auf der Erde. Infolge dessen unterliegt das auf die Erde eintreffende Sonnenlicht einer räumlichen und zeitlichen Dynamik. Hieraus resultierende, periodisch wiederkehrende und somit voraussagbare Zeitstrukturen sind beispielsweise der Tag-Nacht-Zyklus (24 Stunden) und der Jahreszyklus (365,25 Tage). Die zeitlich geordnete, repetitive Abfolge von Licht und Dunkelheit erzeugt einen Rhythmus, dem alle Organismen unterworfen sind. Lebewesen, die sich regelmäßigen Veränderungen ihrer Umwelt anpassen oder diese sogar antizipieren können, besitzen einen Selektionsvorteil. Sämtliche Körperfunktionen und das Verhalten müssen demnach ständig mit der aktuellen Phasen- und Periodenlänge von Licht und Dunkelheit synchronisiert werden. Zur Anpassung an die täglich und saisonal wechselnden Lichtverhältnisse bedarf es einer Inneren Uhr. Diese Innere Uhr muss drei Grundbedingungen erfüllen: 1. Ein zentraler Oszillator generiert einen endogenen Rhythmus. 2. Die Periodenlänge dieses endogenen Rhythmus wird über die Rezeption von Lichtreizen mit der aktuellen Photoperiode synchronisiert. 3. Der endogene Oszillator vermittelt seinen Rhythmus dem gesamten Organismus, so dass zahlreiche Körperfunktionen diesem unterstellt werden. Dadurch ist ein Organismus in der Lage, die Länge der Hell- und Dunkelphasen zu erfassen und diese Umgebungsreize für die Synchronisation des endogenen Rhythmus bzw. der Inneren Uhr mit der aktuellen Photoperiode zu nutzen.

Die Periodenlänge dieser endogenen, biologischen Rhythmen kann dabei einen Zeitraum von Millisekunden bis Jahren umfassen. Ein unter dem Einfluss von periodisch wiederkehrenden externen Reizen (sog. Zeitgebern) generierter endogener Rhythmus wird als diurnal bezeichnet und in der Einheit ZT (*Zeitgeber time*) angegeben. Zur Generierung und Aufrechterhaltung eines endogenen Rhythmus bedarf es jedoch nicht unbedingt eines Zeitgebers. So wird, unabhängig von externen Reizen, ein der Tagesdauer von 24 Stunden ungefähr entsprechender endogener Rhythmus generiert. In diesen Fällen, in denen sich ein Organismus im Freilauf, d. h. ohne den Einfluss von Zeitgebern befindet, spricht man von einem zirkadianen (zirka

= ungefähr; dies = der Tag) Rhythmus. Dieser wird mit der Einheit CT (*circadian time*) bezeichnet.

Die zeitlich geordnete Ausrichtung sämtlicher Lebensprozesse, sowohl auf der Ebene von biochemischen und physiologischen Prozessen als auch auf der Ebene des gesamten Verhaltens eines Organismus, stellt eine Grundvoraussetzung für sein Überleben dar und ist somit unabdingbar. Durch die Innere Uhr wird die Generierung eines endogenen, zirkadianen Rhythmus und dessen Synchronisation mit der Umwelt gewährleistet. Bei Wirbeltieren (Vertebraten) werden diese Aufgaben durch einen spezifischen neuronalen Schaltkreis im Gehirn, das sogenannte photoneuroendokrine System, erfüllt.

## 1.2 Das photoneuroendokrine System (PNS) der Vertebraten und sein Hormon Melatonin

Im Jahre 1964 definierte Ernst Scharrer erstmalig ein Konzept für das photoneuroendokrine System (PNS). Demnach dienen photoneuroendokrine Systeme der Wahrnehmung und Umwandlung von Lichtinformationen in eine neuroendokrine Antwort (Scharrer 1964). Nach dem heute gängigen Konzept (zur Übersicht, siehe Korf et al. 1998) besteht das PNS aus drei Schlüsselkomponenten: 1. Photorezeptiven Zellen, die Lichtpulse aus der Umwelt wahrnehmen und weiterleiten, 2. Oszillatoren, die einen endogenen Rhythmus generieren und 3. neuroendokrinen Effektoren, die Signale von Photorezeptoren und Oszillatoren aufnehmen und diese in eine neurohormonelle Antwort umsetzen (siehe Abb. 1.1).

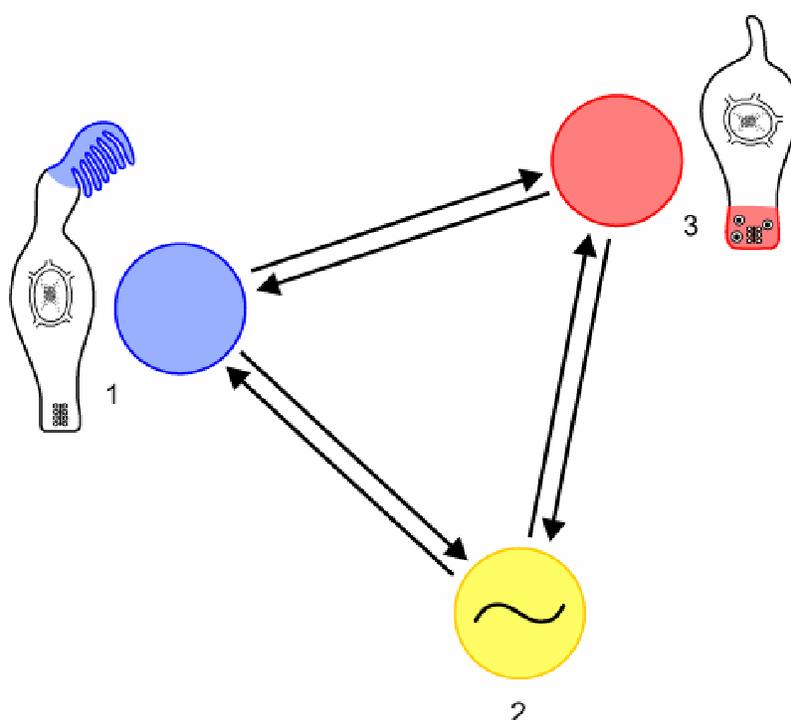


Abb. 1.1: Die drei Schlüsselkomponenten des Photoneuroendokrinen Systems (PNS) der Vertebraten (verändert nach Korf 1994). (1) Photorezeptorzellen, die bei Säugetieren in der Retina des Auges, bei Anamnia und einigen Sauropsida hingegen im Pinealorgan lokalisiert sind. (2) Endogener Oszillator, der bei Säugetieren im Nucleus suprachiasmaticus (SCN), bei Anamnia hingegen im Pinealorgan lokalisiert ist. (3) Neuroendokrine Effektoren, z. B. die Pinealozyten des Pinealorgans.

Diese drei Schlüsselkomponenten des PNS sind bei den Säugetieren auf unterschiedliche Areale des Gehirns verteilt: Die Photorezeptoren befinden sich in der Retina, der Oszillator im Nucleus suprachiasmaticus (SCN) des Hypothalamus und der neuroendokrine Effektor im Pinealorgan (siehe Abb. 1.2).

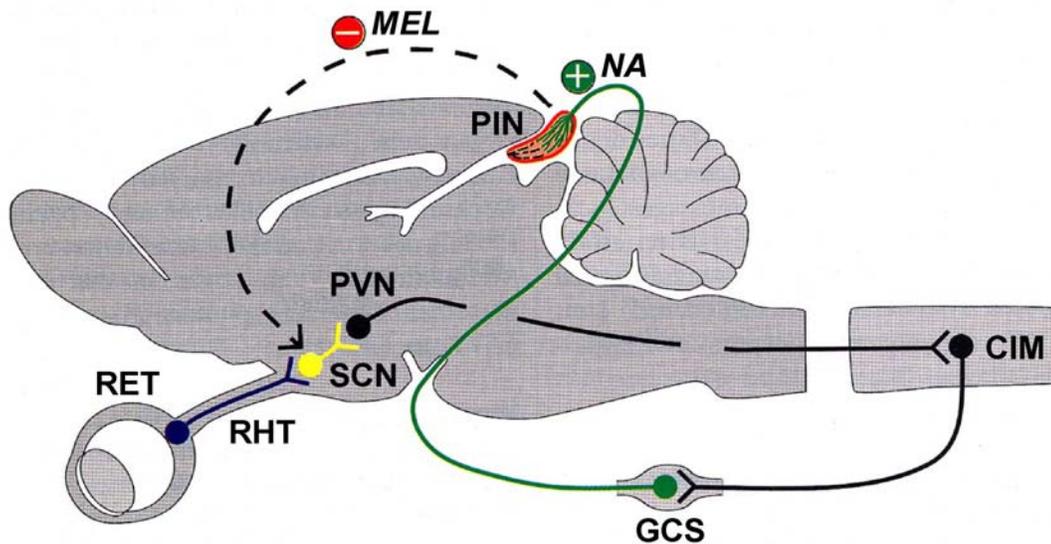


Abb. 1.2: Schematische Darstellung des Photoneuroendokrinen Systems der Ratte im mediosagittalen Schnitt (verändert nach Korf 1996). Die Retina (RET) empfängt Informationen zur aktuellen Photoperiode und leitet diese über den Retinohypothalamischen Trakt (RHT), einem gesonderten Anteil des Nervus opticus, zum endogenen Oszillator im Nucleus suprachiasmaticus (SCN) weiter. Von dort erfolgt u. a. die efferente Projektion zum Nucleus paraventricularis (PVN). Zwischen PVN und Ganglion cervicale superius (GCS) verläuft über die Columna intermediolateralis (CIM) eine bisynaptische Verbindung. Vom GCS ziehen schließlich sympathisch-postganglionäre Nervenfasern zum Pinealorgan (PIN), das nach Ausschüttung des Neurotransmitters Noradrenalin (NA) Melatonin produziert. Melatonin hemmt die neuronale Aktivität des SCN und bildet somit eine Rückkopplungsschleife im PNS aus.

### 1.2.1 Zirkadiane Photorezeption

Von der Retina des Auges werden Lichtreize der aktuellen Photoperiode wahrgenommen und in neuronale Signale umgewandelt. Bei der Umwandlung sind offenbar nicht nur die retinalen Stäbchen- und Zapfenzellen beteiligt. Vermutlich stellt eine Subpopulation retinaler Ganglienzellen, welche das Photopigment Melanopsin exprimieren, eine zusätzliche Gruppe von Lichtsinneszellen in der Retina dar. Diese üben wahrscheinlich die Funktion als spezifische zirkadiane Photorezeptorzellen aus (Berson et al. 2002; Hattar et al. 2002). Die Axone der retinalen Ganglienzellen projizieren direkt in die retino-rezidente Formation des Nucleus suprachiasmaticus (SCN), welcher sich im Hypothalamus befindet und den endogenen Oszillator des PNS beinhaltet (siehe 1.2.2). Die zwischen der Retina des Auges und dem SCN verlaufende direkte neuronale Verbindung wird als retinohypothalamischer Trakt

(RHT) bezeichnet (zur Übersicht, siehe Hannibal 2002). Diese monosynaptische, retinofugale neuronale Afferenz zum SCN ist notwendig, um die innere Uhr mit der aktuellen Photoperiode zu synchronisieren (Johnson et al. 1988). Die Axonterminale der retinalen Ganglienzellen enthalten die Neurotransmitter PACAP (*Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide*) und Glutamat (Gooley et al. 2001; Provenzio et al. 2000; Hannibal et al. 2000). Diese beiden Neurotransmitter spielen bei der Codierung von Lichtinformation aus der Retina in chemische neuronale Aktivität im SCN eine wichtige Rolle (zur Übersicht, siehe Ebling 1996). So scheint die Freisetzung von Glutamat im SCN das Signal für „Licht“ zu vermitteln, während PACAP die glutamaterge Signalkaskade moduliert (Kopp et al. 1999, 2001; Hannibal et al. 2002). Darüber hinaus kann durch zirkadiane Unterschiede in der Empfindlichkeit und im Antwortverhalten der SCN Neurone gegenüber den beiden Neurotransmittern die Wirkung von PACAP und Glutamat auf die betroffenen SCN Neurone reguliert werden.

### 1.2.2 Der Nucleus suprachiasmaticus (SCN)

Direkt dorsal zum Chiasma opticum und lateral zum 3. Ventrikel befindet sich im Hypothalamus ein paariges Kerngebiet, welches als Nucleus suprachiasmaticus (SCN) bezeichnet wird (Gurdjian 1927). Dieses Kerngebiet wurde als Sitz des übergeordneten zirkadianen Schrittmachers identifiziert. So konnte durch Läsionen im SCN ein Verlust zirkadianer Rhythmen erzielt werden (Moore und Eichler 1972; Stephan und Zucker 1972; Raisman und Braun-Grant 1977; Ibuka et al. 1977; van den Pol und Powley 1979). Die Oszillation des SCN und die dort stattfindende Generierung zirkadianer Rhythmen wurde sowohl *in vivo* als auch *in vitro* dargestellt (Schwartz und Gainer 1977; Schwartz et al. 1980; Inouye und Kawamura 1979, 1982; Groos und Hendriks 1982; Green und Gillette 1982; Shibata et al. 1982). Durch Transplantation von SCN-Gewebe aus Spendertieren in Tiere, die in Folge der Entfernung des SCN arrhythmisch waren, konnte deren zirkadiane Rhythmik wiederhergestellt werden, wobei die Periodenlänge jener des Spendertieres entsprach (Drucker-Colin et al. 1984; Sawaki et al. 1984; Lehmann et al. 1987; DeCoursey und Buggy 1989; Ralph et al. 1990). Die Rhythmogenese findet im endogenen Oszillator auf der Ebene einzelner SCN Neurone statt. Dabei übernehmen sogenannte Uhrengene eine entscheidende Funktion. Uhrengene stellen Transkriptionsfaktoren dar und sind an der Ausbildung negativer und positiver, miteinander verzahnter Rückkopplungsschleifen

auf transkriptionaler und translationaler Ebene beteiligt (zur Übersicht, siehe Reppert und Weaver 2002). Jedes der ungefähr 20.000 SCN Neurone ist mit einem Besatz an Uhrengenen ausgestattet. Aufgrund der lokal unterschiedlichen Ausstattung der SCN-Neurone mit Neuropeptiden sowie der unterschiedlichen neuronalen Verschaltung bestimmter SCN-Areale lässt sich der SCN jedoch in zwei topographische Untereinheiten gliedern. 1. Eine ventro-laterale Formation, die auch als *core* des SCN bezeichnet wird und 2. ein dorso-mediales, als *shell* bezeichnetes Areal. Die ventro-laterale Formation zeichnet sich u. a. durch Vasoaktives Intestinales Polypeptid (VIP)- sowie *gastrin releasing peptide* (GRP) positive Neurone aus (Card et al. 1981; Tanaka et al. 1993). Sie ist Zielgebiet direkter retinaler Afferenzen. Diese retinalen Afferenzen werden über den Retinohypothalamischen Trakt (RHT, siehe auch 1.2.1) direkt zum retino-rezipienten Anteil des SCN geleitet (Moore und Lenn 1972). Der dorso-mediale Anteil dagegen besitzt Arginin-Vasopressin (AVP)- und Somatostatin (SOM) positive Neurone (Moore et al. 1984; van den Pol und Tsujimoto 1985; Romijn et al. 1987; Biemans et al. 2002). Dieses dorso-mediale Areal erhält Afferenzen aus limbischen und hypothalamischen Kerngebieten sowie aus dem Hirnstamm (Moga und Moore 1997; Moore 1996). Efferente Projektionen ziehen vom dorso-medialen SCN vorwiegend in hypothalamische und thalamische Zentren (zur Übersicht, siehe Kalsbeek und Buijs 2002). So werden beispielsweise die vom SCN verarbeiteten Signale über einen multisynaptischen Weg an das Pinealorgan übermittelt, welches innerhalb des PNS als ein neuroendokrines Effektororgan fungiert.

### 1.2.3 Das Pinealorgan als neuroendokriner Effektor

Das Pinealorgan (Corpus pineale, Zirbeldrüse, Epiphysis cerebri) stellt im PNS die dritte Schlüsselkomponente dar. Die massive Umwandlung des PNS im Verlauf der Evolution zog innerhalb der Vertebraten bedeutende funktionelle und strukturelle Veränderungen des Pinealorgans und der Pinealozyten sowie ihrer neuronalen Verschaltungen nach sich (zur Übersicht, siehe Korf und Oksche 1986; Korf 1994; Korf 2000). Demnach werden aufgrund struktureller Kriterien drei Haupttypen von Pinealozyten unterschieden: 1. Die bei Anamnia (z. B. Hecht, Neunauge) vorzufindenden klassischen pinealen Photorezeptoren. 2. Die modifizierten pinealen Photorezeptoren der Sauropsida (z. B. Haussperling, Huhn) und 3. die Pinealozyten *sensu stricto* der Säugetiere (siehe Abb. 1.3). Beide erstgenannten Formen besitzen noch eine direkte

Lichtempfindlichkeit und können den endogenen Oszillator beinhalten. Dagegen hat der Pinealozyt der Säugetiere die direkte Lichtempfindlichkeit verloren.

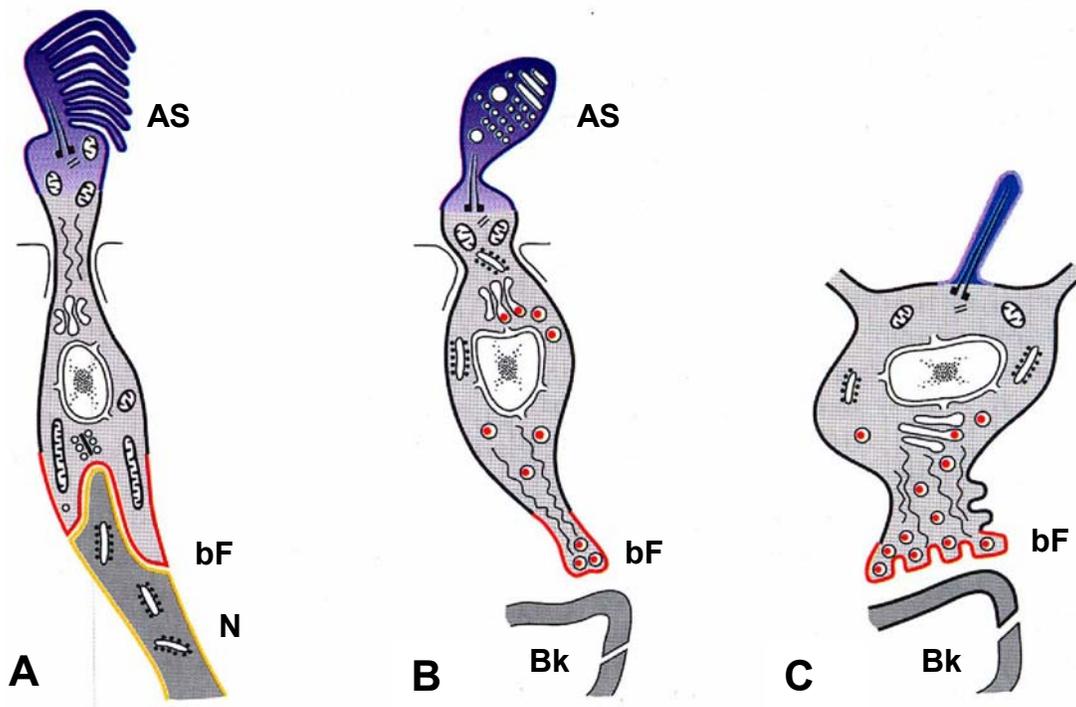


Abb. 1.3: Schematische Darstellung der drei unterschiedlichen Typen von Pinealozyten (verändert nach Korf 1998). **A:** Licht-wahnehmende, sich durch ein gut ausgebildetes Außensegment auszeichnende echte pineale Photorezeptorzelle. Neben der Steuerung der Melatoninsynthese beeinflusst hier die aktuelle Photoperiode auch die neuronale Aktivität des Pinealozyten, welche über nachgeschaltete Neurone weitergeleitet wird. **B:** Licht-wahnehmende und melatoninsynthetisierende, modifizierte pineale Photorezeptorzelle. Diese weist ein deutlich reduziertes Außensegment auf. **C:** Melatoninsynthetisierender Pinealozyt in Säugetieren vom Typ *sensu stricto*. Dieser besitzt ein rudimentäres Außensegment und hat die Fähigkeit zur direkten Wahrnehmung von Licht verloren. Der kurze basale Fortsatz des Pinealozyten endet in unmittelbarer Nähe zu Blutkapillaren (AS: Außensegment; bF: basaler Fortsatz; Bk: Blutkapillare; N: Neuron).

Die Innere Uhr im Pinealorgan ist phylogenetisch älter als die im SCN. Bei Anamnia sowie einigen Vögeln und Reptilien „tickt“ sie noch selbständig und steuert dort u. a. die zirkadiane Melatoninproduktion. Bei Säugetieren hingegen werden die tag-rhythmische Melatoninproduktion im Pinealorgan sowie alle anderen zirkadianen Rhythmen vom SCN im Hypothalamus gesteuert.

Das Pinealorgan produziert und sezerniert das Indolamin Melatonin rhythmisch als Antwort auf photoperiodische und vom endogenen, zirkadianen Oszillator stammende Signale. Dabei wird Melatonin ausschließlich in der Nacht produziert und sezerniert und zwar unabhängig davon, ob der entsprechende Organismus tag- (diurnal) oder nachtaktiv (nokturnal) ist. Die tägliche Schwankung des Melatoningehalts ist somit bei allen Wirbeltieren ein stark konserviertes Phänomen. Ein weiteres allgemeingültiges Prinzip der Melatoninfreisetzung ist die Tatsache, dass die nächtliche

Synthese und Sekretion von Melatonin durch Licht akut gehemmt wird. In Folge dessen ist Melatonin als ein Botenstoff für Dunkelheit und zugleich als ein „Zeithormon“ (timing hormone) anzusehen (Korf et al. 1998). Bei Säugetieren wird die Lichtinformation von der Retina wahrgenommen und über einen multisynaptischen Signalweg an das Pinealorgan vermittelt (siehe Abb. 1.2). Die vom zentralen Oszillator im SCN gesteuerte Freisetzung von Noradrenalin (NA) aus sympathischen postganglionären Nervenfasern des Ganglion cervicale superius stellt den entscheidenden Reiz zur nächtlichen Anhebung der Melatoninbiosynthese dar (zur Übersicht, siehe Klein 1985). Auch *in vitro* kann durch eine noradrenerge Stimulation die Synthese von Melatonin in isolierten Pinealozyten hervorgerufen werden (Axelrod 1974). Nach bisherigen Erkenntnissen wird das lipophile Melatonin nicht in den Pinealozyten gespeichert, sondern unmittelbar nach der Synthese in die Blutbahn bzw. in die Cerebrospinalflüssigkeit abgegeben (Korf et al. 1998). Die Sekretion von Melatonin wird somit über die eigene Syntheserate bestimmt. Der Abbau von Melatonin erfolgt nach Aufnahme in die Leber durch 6-Hydroxylierung und weitere enzymatische Modifikationen (Kopin et al. 1961; Iguchi et al. 1982; Arendt 1995). Da das Potenzial zum Melatoninabbau in der Leber konstant hoch bleibt, wird die Konzentration von Melatonin im Blutkreislauf ausschließlich über die Neusynthese im Pinealorgan gesteuert. Akute Veränderungen in der Melatoninbiosynthese- und sekretion wirken sich somit rapide auf die Melatoninkonzentration im Blutkreislauf aus. Autoradiographische Untersuchungen in Säugetieren wiesen weit mehr als 100 unterschiedliche Zielareale für Melatonin sowohl im ZNS als auch in peripheren Geweben nach (zur Übersicht, siehe Morgan et al. 1994). Hervorzuheben sind hier die Pars tuberalis in der Adenohypophyse sowie der SCN im Hypothalamus. Beide Areale weisen eine außerordentlich hohe Dichte an hochaffinen Melatoninbindungsstellen, den Melatoninrezeptoren, auf (Reppert et al. 1994, 1995, 1996; Morgan et al. 1990, 1994). Zahlreiche Körperfunktionen unterliegen einer zirkadianen Rhythmik, die vom endogenen Oszillator im SCN gesteuert wird. Viele der möglichen Zielareale erhalten jedoch keine neuronalen Projektionen vom SCN. Offenbar kann durch die vom SCN kontrollierte, zeitlich begrenzte Freisetzung von Melatonin die Steuerung diurnaler und jahreszeitlicher Rhythmen in sämtlichen Melatoninrezeptor-exprimierenden Geweben gewährleistet werden. Das Hormon Melatonin ist daher als ein humorales Signalmolekül in der Funktion eines endogenen Zeitgebers anzusehen.

### 1.3 Steuerung der Melatoninbiosynthese im Pinealorgan der Säugetiere

Im Jahre 1958 wurde Melatonin erstmalig aus dem Pinealorgan des Rindes isoliert (Lerner et al. 1958). In den folgenden Jahren konnten die an der Biosynthese beteiligten enzymatischen Schritte rasch aufgeklärt werden. Ausgehend von der Aminosäure Tryptophan, welche aus der Blutbahn in das Pinealorgan aufgenommen wird (Wurtman und Anton-Tay 1969), umfasst die Melatoninbiosynthese vier enzymatische Reaktionen. Durch die Tryptophanhydroxylase wird Tryptophan in 5-Hydroxy-tryptophan umgewandelt (Lovenberg et al. 1967). Die aromatische L-Aminosäure-decarboxylase katalysiert die Umwandlung von 5-Hydroxytryptophan zu Serotonin (5-Hydroxytryptamin) (Snyder et al. 1965). Das vorletzte Enzym der Melatoninbiosynthese, die Arylalkylamin *N*-acetyltransferase (AANAT), stellt das geschwindigkeitsbestimmende Enzym dieses Syntheseweges dar (siehe Abb. 1.4).

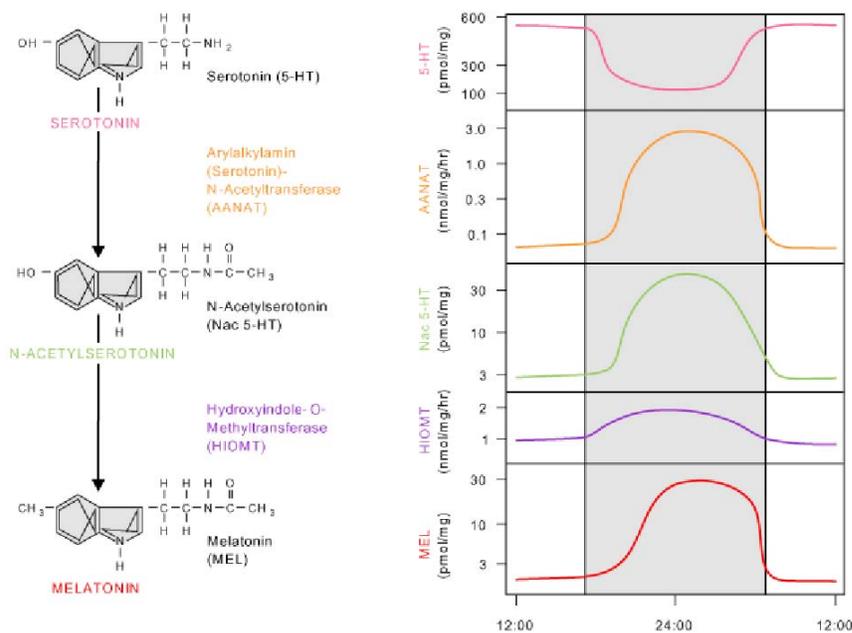


Abb. 1.4: Links sind die einzelnen Syntheseschritte der Melatoninbiosynthese, ausgehend von Serotonin, dargestellt. Rechts sind die diurnalen Schwankungen der Enzymaktivitäten von AANAT und HIOMT sowie der Substratkonzentrationen von Serotonin und N-Acetylserotonin, im Pinealorgan der Ratte aufgezeigt (modifiziert nach Klein 1985).

Hier greifen sämtliche regulatorische Mechanismen in den Syntheseweg ein, welche die Aktivität und Proteinmenge der AANAT und somit auch die gesamte Melatoninbiosynthese kontrollieren (s. u.). Daher ist die AANAT das Schlüsselenzym für die Synthese von Melatonin und stellt sozusagen das molekulare Interface der Melatoninbiosynthese dar. Das den letzten Schritt der Melatoninbiosynthese katalysierende

Enzym, die Hydroxyindol-O-methyltransferase (HIOMT), weist dagegen relativ kleine oder gar keine Schwankungen in der Proteinmenge sowie in der Enzymaktivität im Tagesverlauf auf (Wurtman et al. 1963; Klein und Lines 1969; Wartman et al. 1969; Klein 1974; Sugden und Klein 1983; Namboodiri et al. 1985; Ribelayga et al. 2000).

Die zu Beginn der Nacht in großen Mengen einsetzende Freisetzung von NA aus sympathischen Nervenendigungen in das Pinealorgan ist für die Steuerung der Melatoninbiosynthese von entscheidender Bedeutung. Dabei bewirkt NA über  $\alpha_1$ - und  $\beta$ -adrenerge Rezeptoren die Stimulation der AANAT (Klein et al. 1985). Die Aktivierung  $\beta$ -adrenerger Rezeptoren ruft eine cAMP vermittelte Aktivierung der Protein Kinase A (PKA) hervor, deren katalytische Untereinheiten daraufhin in den Zellkern translozieren und dort den aktivierenden Transkriptionsfaktor cAMP-response-element-binding protein (CREB) am Serin 133 phosphorylieren. Phosphoryliertes (p)CREB bindet an das CRE im Promotor des *Aanat* Gens und bewirkt dadurch die transkriptionale Aktivierung der AANAT, die eine Grundvoraussetzung für die nächtliche Aktivierung der AANAT im Pinealorgan der Nagetiere ist (Borjigin et al. 1995; Coon et al. 1995; Roseboom et al. 1996; Maronde et al. 1999a, 1999b, 2000). So kommt es nach NA Stimulation zu einem mehr als 150fachen Anstieg des *Aanat* Transkripts (Borjigin et al. 1995; Roseboom et al. 1996). Des weiteren befindet sich im Promoter des *Aanat* Gens ein funktionsfähiges, modifiziertes cAMP responsive element (CRE; Baler et al 1997) und die pCREB kontrollierte Transkription des *Aanat* Gens korreliert mit einem starken Anstieg des AANAT Proteingehalts sowie der AANAT Aktivität.

Die molekularen Grundlagen für die Abschaltung der Melatoninbiosynthese in der zweiten Hälfte der Nacht sind weniger gut erforscht. Zahlreiche experimentelle Daten weisen auf eine Beteiligung des inhibierenden Transkriptionsfaktors „inducible cAMP early repressor“ (ICER) hin (Stehle et al. 1993; Foulkes et al 1996; Maronde et al. 1999a; von Gall et al. 2000). Zunächst lässt sich ein Anstieg des ICER Proteingehalts in der zweiten Hälfte der Nacht in vivo sowie nach Stimulation mit NA für mehrere Stunden in vitro beobachten (Pfeffer et al. 1999). Gezeigt werden konnte ferner, dass ICER an das CRE im Promoter des *Aanat* Gens bindet (Maronde et al. 1999a). Möglicherweise wird dabei die Induktion von ICER über die eigene, durch pCREB induzierte Transkription betrieben, da im Promoterbereich des *Icer* Gens ebenso wie im Promoterbereich des *Aanat* Gens CREs vorzufinden sind (Molina et al. 1993).

Des Weiteren verursachte die noradrenerge Stimulation von kultivierten Pinealozyten, die zuvor mit einem *Icer* Antisense Konstrukt transfiziert wurden, einen erhöhten (disinhibierten) *Aanat* mRNA-Spiegel und die Amplitude des AANAT Rhythmus war in ICER-defizienten Mäusen stark erhöht (Pfeffer et al. 2000; Foulkes et al. 1996). Zugleich lässt sich ein rapider Abfall des pCREB Gehalts in der zweiten Hälfte der Nacht *in vivo* beobachten (Maronde et al. 1999a). Untersuchungen zur Dephosphorylierung von pCREB durch Protein Serin/Threonin Phosphatasen (PSPs) und deren mögliche Bedeutung für die Terminationskontrolle der Melatoninbiosynthese sollen deshalb u. a. Gegenstand der vorliegenden Arbeit sein (siehe auch 1.4).

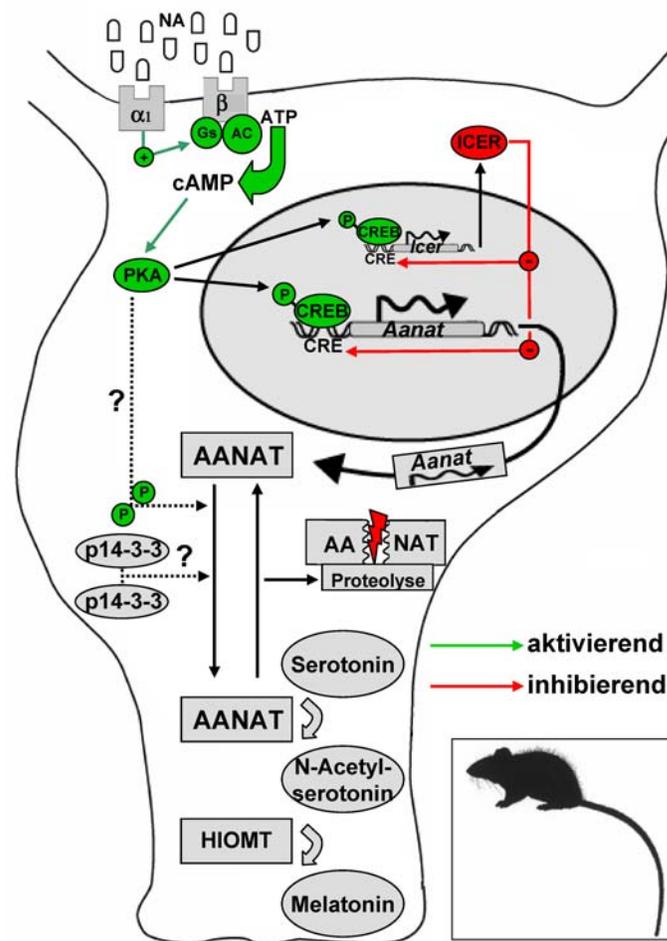


Abb. 1.5a: Schematische Darstellung der molekularen und zellulären Regulationsmechanismen der Melatoninbiosynthese in Pinealozyten der Ratte. Hervorzuheben ist die cAMP/PKA/pCREB-gesteuerte, transkriptionale Aktivierung der AANAT, die als Schlüsselmechanismus der nächtlichen Aktivierung der Melatoninbiosynthese in Nagetieren anzusehen ist. Für weitere Erläuterungen siehe auch Text unter 1.3 ( $\alpha_1$ ,  $\beta$ :  $\alpha_1$ - und  $\beta$ -adrenerger Rezeptor; AC: Adenylatcyclase; ATP: Adenosintri-phosphat; G<sub>s</sub>: aktivierendes G-Protein; p14-3-3: Protein 14-3-3).

Ein weiterer Regulationsmechanismus für die AANAT liegt auf posttranslationaler Ebene und beinhaltet die Steuerung der proteasomalen Proteolyse des AANAT Pro-

teins über eine Interaktionen der AANAT mit dem Protein 14-3-3 (Gastel et al. 1998; Schomerus et al. 2000; Iuvone et al. 2002; Falcon et al. 2001; Obsil et al. 2001; Ganguly et al. 2001). Im Gegensatz zu den Nagetieren wird die AANAT bei Huftieren (Ungulata, z. B. Schaf und Rind), Primaten und wahrscheinlich auch beim Menschen nicht über die transkriptionale Aktivierung gesteuert. Die *Aanat* mRNA zeigt bei diesen Spezies keine diurnalen Schwankungen und ist im Tagesverlauf tonisch erhöht (Coon et al. 1995, 2002; Craft et al. 1999; Schomerus et al. 2000). Die AANAT wird konstitutiv gebildet, am Tage jedoch unmittelbar nach der Translation proteolytisch abgebaut. Die zu Beginn der Nacht einsetzende Freisetzung von NA aus sympathischen Nervenfasern in das Pinealorgan führt über  $\beta$ -adrenerge Rezeptoren zu einer Erhöhung des intrazellulären cAMP Spiegels. Hierdurch kommt es zur Aktivierung der PKA. Die AANAT besitzt zwei potenzielle PKA Phosphorylierungsstellen: eine N-terminale Stelle am Threonin 31 sowie eine C-terminale Stelle am Serin 205 (zur Übersicht, siehe Klein et al. 1997). Die N-terminale Phosphorylierung durch die PKA am Threonin 31 ist dabei essenziell für die nächtliche Aktivierung der AANAT und erlaubt eine Interaktion mit dem Protein 14-3-3. Erste Hinweise auf eine mögliche Komplexbildung der AANAT mit dem Protein 14-3-3 ergaben sich bei der Aufreinigung der AANAT, als in einer Fraktion mit hoher AANAT-Aktivität die Isoformen  $\epsilon$  sowie  $\zeta$  des Proteins 14-3-3 nachgewiesen werden konnten (Roseboom et al. 1994). Neuere Untersuchungen mit aufgereinigter, heterolog exprimierter AANAT zeigen eine cAMP/PKA-vermittelte Komplexbildung zwischen der AANAT und dem Protein 14-3-3 (Obsil et al. 2001; Ganguly et al. 2001). Diese Interaktion ist für die nächtliche Aktivierung der AANAT entscheidend, da die AANAT hierdurch vor dem unmittelbaren proteolytischen Abbau geschützt ist. In dieser Arbeit soll die Interaktion von AANAT mit dem Protein 14-3-3 erstmalig und vergleichend in Pinealozyten des Rindes und der Ratte in Abhängigkeit vom noradrenergen Stimulus nachgewiesen werden.

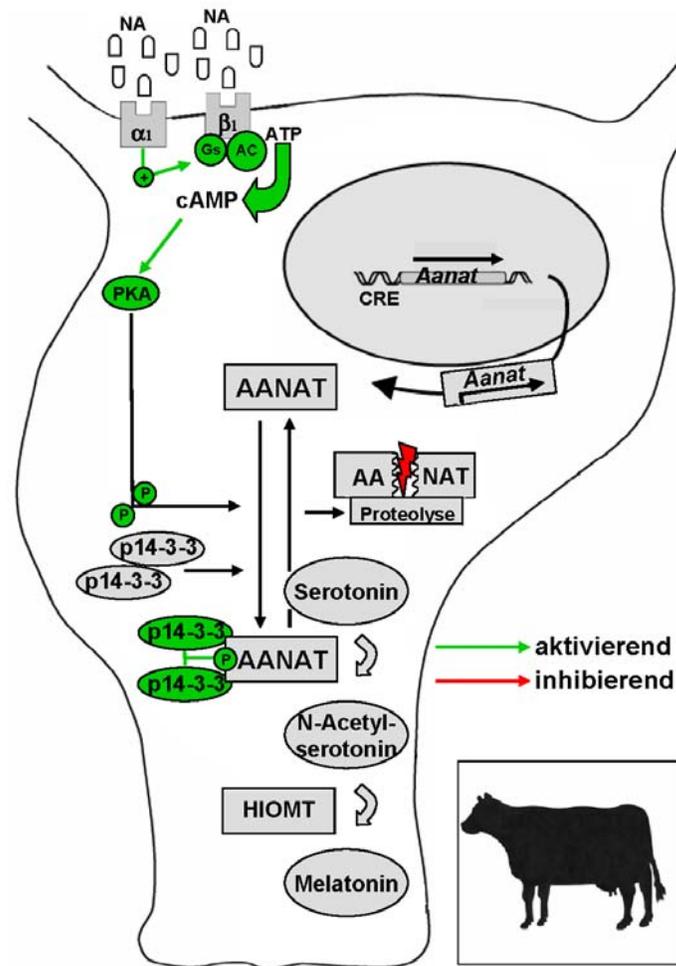


Abb. 1.5b: Schematische Darstellung der molekularen und zellulären Regulationsmechanismen der Melatoninbiosynthese in Pinealozyten des Rindes. Hervorzuheben ist die cAMP/PKA gesteuerte Aktivierung der AANAT über die Interaktion mit dem Protein 14-3-3, die als Schlüsselmechanismus der nächtlichen Aktivierung der Melatoninbiosynthese in Ungulaten anzusehen ist. Für weitere Erläuterungen siehe Text unter 1.3 ( $\alpha_1$ ,  $\beta$ :  $\alpha_1$ - und  $\beta$ -adrenerger Rezeptor; AC: Adenylatcyclase; ATP: Adenosin-triphosphat;  $G_s$ : aktivierendes G-Protein; p14-3-3: Protein 14-3-3).

#### 1.4 Zielsetzung der vorliegenden Arbeit

Die noradrenerge Signaltransduktionskaskade, welche für die Steuerung der Melatoninbiosynthese im Pinealorgan von Säugetieren verantwortlich ist, stand im Mittelpunkt dieser Arbeit. Sämtliche NA/cAMP/PKA-vermittelten Steuerungsprozesse greifen auf das Schlüsselenzym der Melatoninbiosynthese, die AANAT, zu. Ziel der Untersuchungen in dieser Arbeit war die Aufdeckung von zellulären und molekularen Mechanismen, welche an der Steuerung der AANAT und somit auch an der Regulation der Melatoninbiosynthese beteiligt sind. Das Pinealorgan der Ratte und des Rindes dient als ein gut untersuchtes Modellsystem zum Studium noradrenerger Signaltransduktionskaskaden, da hier Noradrenalinreize in ein definiertes, gut messbares Endprodukt, die Biosynthese und Sekretion von Melatonin, umgewandelt werden.

Die in der vorliegenden Arbeit aufgedeckten Signaltransduktionsprozesse bieten somit nicht nur neue Einblicke in die Regulationsprozesse der Melatoninbiosynthese, sondern dienen ebenso dem besseren Verständnis von Signalübertragungs- und Signalverarbeitungsprozessen in komplexeren neuronalen und neuroendokrinen Systemen. Folgende Fragestellungen wurden deshalb in dieser Arbeit bearbeitet:

- Die Funktion von A Kinase Anker Proteinen (AKAPs) bei der Regulation der Melatoninbiosynthese ist bisher vollkommen unbekannt. AKAPs interagieren mit den regulatorischen (R)-Untereinheiten der PKA und positionieren diese an bestimmte Zellkompartimente (zur Übersicht, siehe Feliciello et al. 2001). Dadurch wird die Effektivität und Spezifität der PKA am Wirkungsort erhöht. AKAPs sollen in Pinealozyten der Ratte nachgewiesen und das zelluläre Verteilungsmuster von AKAPs und der R-Untereinheiten der PKA untersucht werden.

- Der Austauschfaktor EPAC (*exchange protein directly activated by cAMP*) der monomeren GTPasen Rap 1 und 2 ist zur direkten Bindung von cAMP fähig. Durch die Bindung von cAMP verändert sich der Aktivitätszustand von EPAC (Kawasaki et al. 1998; de Rooij et al. 1998). Rap 1 und 2 gehören zur Ras Protein Superfamilie, die an einer großen Bandbreite von zellulären Signaltransduktionsprozessen beteiligt ist (zur Übersicht, siehe Shields et al. 2000; Campbell et al. 1998). Ras Proteine helfen in der Regel bei der Signalübertragung von der Zellmembran zum Zellkern, indem sie eine Schalterfunktion ausüben und zwischen zwei Konformationszuständen ständig hin und her wechseln. Dieser Vorgang wird u. a. durch Guanin Nukleotid Austauschfaktoren wie EPAC gesteuert. Aktivierte Ras Proteine wirken als Effektorproteine in zahlreichen Signalkaskaden innerhalb der Zelle. Hervorzuheben ist beispielsweise die Ras-vermittelte Aktivierung von Raf-1, einem wichtigen Bestandteil des MAPK- (Mitogen-aktivierte Proteinkinase) Signalweges (zur Übersicht, siehe Morrison and Cutler 1997). Mit dem neu entwickelten EPAC-spezifischen cAMP-Analog 8-(4-Chloro-phenylthio)-2'-O-methyladenosin-cAMP (8-CPT-2'-O-Me-cAMP; Enserink et al. 2002) soll eine mögliche funktionelle Beteiligung von EPAC 1 und 2 an der Regulation der Melatoninbiosynthese im Pinealorgan der Ratte untersucht werden. Durch die spezifische Aktivierung einer cAMP-bindenden Proteinfamilie kann somit erstmalig zwischen PKA- und EPAC-vermittelten Signalwegen in Pinealozyten unterschieden werden.

- Die Dephosphorylierung von pCREB und deren Bedeutung für die Abschaltung der Melatoninbiosynthese soll an kultivierten Pinealozyten und Pinealorganen der Ratte

untersucht werden. Dazu sollen die Protein Serin/Threonin Phosphatasen (PSP) 1 und 2A in Pinealozyten nachgewiesen und deren zelluläres Verteilungsmuster analysiert werden. Mit Hilfe von spezifischen PSP-Inhibitoren soll die funktionelle Bedeutung der pCREB Dephosphorylierung für die Regulation der Melatoninbiosynthese beleuchtet werden. Die Aktivität der PSPs wird über regulatorische Untereinheiten- und Proteine gesteuert. Ein gut charakterisiertes regulatorisches Protein der PSP 1 ist das *dopamine and adenosine 3',5'-monophosphate-regulated phosphoprotein*, 32 kDa (DARPP-32; zur Übersicht, siehe Greengard et al. 1998). Die Aktivität von DARPP-32 wird über eine cAMP/PKA vermittelte Phosphorylierung des Proteins gesteuert (Nishi et al. 1997). In dieser Arbeit soll das Vorkommen von DARPP-32 im Pinealorgan der Ratte aufgedeckt werden. Ebenso soll der Einfluss einer noradrenergen Stimulation auf den Phosphorylierungszustand von DARPP-32 untersucht werden.

- Mit Hilfe eines Ko-Immünpräzipitationsansatzes soll die NA/cAMP vermittelte Interaktion der AANAT mit dem Protein 14-3-3 vergleichend an Pinealozyten der Ratte und des Rindes untersucht werden.

- Endogene Cannabinoide (CBs) sind im ZNS als Modulatoren neuronaler und neuroendokriner Funktionen beschrieben worden (zur Übersicht, siehe Wilson und Nicoll 2002; Elphick und Egertova 2001). So ist beispielweise bekannt, dass die Applikation von  $\Delta^9$ -Tetra-hydrocannabinol (THC), einem potenten Agonisten der Cannabinoid (CB) 1 und 2 Rezeptoren, die Freisetzung zahlreicher Hormone wie der Gonadotropine Follikulotropin (FSH) und Luteinotropin (LH), Prolaktin und des Kortikotropins ACTH moduliert (zur Übersicht, siehe Murphy et al. 1998). Die rezeptorvermittelte Wirkung endogener CBs wird hauptsächlich über ein inhibitorisches G-Protein in der Zelle verarbeitet. Über das Vorkommen von CB Rezeptoren im Pinealorgan sowie über die Wirkung endogener CBs auf die Melatoninbiosynthese sind in der Literatur keine Daten vorzufinden. In dieser Arbeit sollen deshalb die CB 1 und 2 Rezeptoren im Pinealorgan der Ratte nachgewiesen und deren Verteilungsmuster analysiert werden. Ein möglicher Einfluss von CBs auf die Melatoninproduktion soll durch die Behandlung kultivierter Pinealorgane der Ratte mit dem CB Rezeptor-Agonisten THC untersucht werden.

## 2 Material und Methoden

Soweit nicht anders angegeben, wurden alle verwendeten Feinchemikalien von den Firmen Sigma-Aldrich (Schnelldorf) oder Roth (Karlsruhe) bezogen. Alle Chemikalien und Medien, die in der Zellkulturtechnik zum Einsatz kamen, wurden von der Firma Life Technologies (Eggenstein) geliefert.

### 2.1 Versuchstiere

#### 2.1.1 Ratte

Alle Tierexperimente erfolgten in Übereinstimmung mit den Richtlinien für Tierversuche nach Maßgabe der Europäischen Gemeinschaft (Direktive 86/609/EEC). Männliche Ratten (*Rattus norvegicus*) des Wistar Inzucht-Stamms (6 bis 8 Wochen alt, entsprechendes Körpergewicht von 170-200 g) wurden von der Firma Charles River (Sulzfeld) bezogen. Gruppen von 4-6 Tieren wurden in einem Hell/Dunkel-Rhythmus von 12 h Licht und 12 h Dunkelheit (12:12 LD, Beginn der Lichtphase um 6.00 h) für 1 bis 7 Tage gehalten. Den Tieren stand Futter (Altromin Zucht- und Diätfutter) und Leitungswasser *ad libitum* zur Verfügung.

#### 2.1.2 Rind

Für die Entnahme von Pinealorganen aus frisch geschlachteten Rindern lag eine Genehmigung des Regierungspräsidiums Darmstadt (Aktenzeichen II 25.3 – 19 d - 04) vor. Die Materialgewinnung von Pinealorganen des Rindes (*Bos taurus*) erfolgte zwischen 7.00 und 10.00 Uhr auf dem Schlachthof Färber in Giessen. Die Pinealorgane wurden 15 min nach dem Tod der Tiere von männlichen und weiblichen Tieren entnommen, die nicht älter als 24 Monate waren.

### 2.2 Primärkulturen von Pinealozyten der Ratte

Die Versuchstiere wurden zur Mitte der Lichtperiode (ZT05 bis ZT07) des Hell/Dunkelrhythmus mit Fluothan (Wirkstoff Halothan; Astra-Zeneca, Baltimore, MD, USA) betäubt und anschließend durch Dekapitation getötet. Nach Öffnung der Schädeldecke wurden die Pinealorgane entnommen, in mit 10 mM HEPES und 7 g/l Glukose supplementierte EBSS Lösung (*Earle's Balanced Salt Solution*) transferiert und auf Eis gestellt. Alle Organ- und primäre Zellkulturen wurden im CO<sub>2</sub>-Inkubator (5%

CO<sub>2</sub>; Heraeus, Hanau) bei 37° C gehalten. Die Dauer der Kulturen betrug 2 bis 5 Tage. Die Pinealorgane wurden dann mit einem Skalpell grob zerkleinert. Anschließend wurden die Pinealorgane sowohl enzymatisch in einer papainhaltigen EBSS Lösung (10 mM HEPES, 7 g/l Glukose, 1 mM Cystein, 0.5 mM EDTA, 20 U/ml Papain) für maximal 1 h bei 37° C als auch mechanisch durch wiederholtes, vorsichtiges Aufziehen mit einer Pipette dissoziiert. Nach kompletter Auflösung des Gewebeverbandes wurden die Zellen durch Zentrifugation für 5 min bei 300g und 4° C sedimentiert. Die Papainlösung im Überstand wurde verworfen und die Zellen wurden in EBSS Lösung resuspendiert, welche mit 10 mM HEPES, 7 g/l Glukose, 0.01% (w/v) Trypsin-Inhibitor und 0.1% (w/v) BSA versetzt war. Diese Zellsuspension wurde auf eine EBSS Gradientenlösung [10 mM HEPES, 7 g/l Glukose, 0.1% (w/v) Trypsin-Inhibitor, 1% (w/v) BSA] geladen und erneut für 10 min bei 150g und 4° C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die sedimentierten Zellen in Kulturmedium resuspendiert und gewaschen. Nach anschließender Zentrifugation für 5 min bei 300g und 4° C wurden die Zellen wieder in Kulturmedium aufgenommen. Die Zellen wurden entweder auf mit 0.01% (v/v) Poly-L-Lysin (PLL) beschichteten Deckgläser (10 µl Zellsuspension/Deckglas) oder in einer ebenfalls mit PLL beschichteten 96er Multischale (Nunc, Wiesbaden) ausplattiert und in Kulturmedium inkubiert [*Dulbecco's Modified Eagle Medium nutrient-Mix F12* (DMEM) Lösung mit 10 mM HEPES, 100 µg/ml Ascorbinsäure, 100 µg/ml Streptomycin/Penicillin, 2 mM Glutamin und 5% (v/v) inaktiviertes fötales Kälberserum]. Das gebrauchsfertige Kulturmedium wurde vor Benutzung auf 37° C erwärmt.

### 2.3 Primärkulturen von Pinealozyten des Rindes

Nach der Entnahme der Pinealorgane wurden diese in mit 10 mM HEPES und 7 g/l Glukose supplementierte EBSS Lösung gegeben und zum Transport in das Labor auf Eis gelagert. Dissoziations- und Kulturbedingungen für die Pinealozyten des Rindes entsprachen im Wesentlichen den unter 2.2 beschriebenen Bedingungen für die Anlegung von Primärkulturen von Rattenpinealozyten.

### 2.4 Organkulturen von Pinealorganen der Ratte

Bis zu 5 Pinealorgane der Ratte wurden in 2ml Kulturmedium (siehe 2.2) pro Vertiefung einer 24er Multischale (Nunc, Wiesbaden) kultiviert. Um eine ausreichende Versorgung des Gewebes mit Nährstoffen und Sauerstoff sowie eine bessere Penetrati-

on der später zum Einsatz kommenden Stimulantien zu erzielen, wurden die Pinealorgane vorher mit einem Skalpell angeschnitten.

## 2.5 Stimulationsbedingungen

Zur Untersuchung der dosis- und zeitabhängigen Wirkung unterschiedlicher Stimulantien auf die Regulationsmechanismen der Melatoninbiosynthese wurden die primären Pinealocyten- sowie Pinealorgankulturen nach der Präparation zunächst für 2 bis 5 Tage kultiviert. Einen Tag nach der Präparation und alle weiteren 2 Tage erfolgte ein Wechsel des Kulturmediums. In einigen Versuchen wurde 1 Stunde vor Stimulationsbeginn das normale Kulturmedium (siehe 2.2) gegen Kulturmedium ohne FCS ausgetauscht. In der folgenden Tabelle sind die in dieser Arbeit zum Einsatz gekommenen Stimulationen kurz charakterisiert sowie die entsprechenden Verdünnungen und die benutzten Lösungsmittel angegeben. Als Kontrollversuche wurden Zellpräparationen oder Organkulturen mit Lösungsmittel/Medium ohne Zusatz der entsprechenden Stimulantien behandelt.

**Tabelle 2.1** Liste aller verwendeten Stimulantien

Stimulanz	Beschreibung	Endkonzentration	Lösungsmittel
Noradrenalin (NA)	adrenerger Neurotransmitter	1 $\mu$ M	H <sub>2</sub> O
Phenylephrin	$\alpha_1$ -adrenerger Agonist	100 nM	H <sub>2</sub> O
Isoproterenol	$\beta$ -adrenerger Agonist	1 $\mu$ M	H <sub>2</sub> O
Calyculin A	zell-permeabler Inhibitor der Phosphatase 2A (IC <sub>50</sub> = 0.5-1.0 nM) und Phosphatase 1 (IC <sub>50</sub> = 2.0 nM)	1 $\mu$ M, 100 nM, 10 nM	DMSO
Microcystin-LR	zell-permeabler Inhibitor der Phosphatase 2A (IC <sub>50</sub> = 40 pM) und Phosphatase 1 (IC <sub>50</sub> = 1.7 nM)	1 $\mu$ M, 100 nM, 10 nM	DMSO
Okadainsäure	zell-permeabler Inhibitor der Phosphatase 2A (IC <sub>50</sub> = 0.1 nM) und Phosphatase 1 (IC <sub>50</sub> = 10-15 nM)	1 $\mu$ M, 100 nM, 10 nM	DMSO
$\Delta^9$ -Tetrahydrocannabinol (THC)	Agonist der Cannabinoid (CB) 1 und 2 Rezeptoren	7.3 $\mu$ M, 730nM, 73 nM, 7.3 nM	DMSO, EtOH
8-Br-cAMP	cAMP-Agonist	5 mM, 500 $\mu$ M	H <sub>2</sub> O
8-(4-Chlorophenylthio)-2'-	EPAC-spezifischer cAMP-Agonist	100 $\mu$ M, 10 $\mu$ M, 1 $\mu$ M, 100 nM	H <sub>2</sub> O

O-methyladenosin-cAMP			
Forskolin	Aktivator der Adenylatzyklase	10 $\mu$ M	H <sub>2</sub> O

## 2.6 Arbeiten mit RNA

RNA ist ständig der Gefahr ausgesetzt, von RNasen enzymatisch abgebaut zu werden. Da RNasen äußerst stabil sind und sie im Gegensatz zu den verwandten DNasen keine Cofaktoren wie z. B. Mg<sup>2+</sup> für ihre katalytische Aktivität benötigen, muß vor allen Arbeiten mit RNA eine Kontamination mit RNasen vermieden bzw. müssen RNasen inaktiviert werden. Zur Inaktivierung von RNasen wurden alle Lösungen ausschließlich in 0.1% (v/v) Diethylpyrocarbonat (DEPC) versetztem H<sub>2</sub>O angesetzt. Glaswaren und alle anderen hitzstabilen Gerätschaften wurden für 4 h auf 180° C erhitzt. Alle anderen Utensilien wurden vor dem Gebrauch mit 1M NaOH und anschließend mit DEPC-H<sub>2</sub>O gespült.

### 2.6.1 Isolierung von RNA mit TRIzol™ Reagent

Die am häufigsten verwendete Methode zur Isolierung von RNA, die sogenannte single-step Methode nach Chomczynski und Sacchi (1987), basiert auf der Grundlage, dass das Gewebe in einer Guanidinisothiocyanatlösung lysiert und dabei sehr effektiv Proteine samt RNasen denaturiert werden. Im sauren Milieu des zugegebenen Phenols sammeln sich Proteine und kleinere DNA- Fragmente, wobei größere DNA-Moleküle sich nach der Zentrifugation in der Interphase befinden. Die RNA ist in der wässrigen Oberphase vorhanden und kann durch Zugabe von Alkohol gefällt werden. In dieser Arbeit wurde RNA mit dem TRIzol™ Reagenz (Life Technologies, Eggenstein) isoliert, dessen Funktionsweise auf oben beschriebener Methode beruht. Im Folgenden sind die einzelnen Arbeitsschritte der RNA-Isolierung kurz aufgeführt.

1. Das TRIzol™ Reagenz (Lagerung bei 4°C) wurde vor Gebrauch auf Raumtemperatur (RT) gebracht.
2. 1 ml TRIzol™ Reagent/100 mg Gewebe wurden mit einem Ultra-Turrax T8, Aufsatz S8N-5G (IKA, Staufen) homogenisiert und das Lysat für 5 min bei RT inkubiert.
3. Nach Zugabe von 0.2 ml Chloroform/1 ml TRIzol™ Reagent wurde das Lysat für 15 sec kräftig auf einem Vortex-Apparat geschüttelt und zwecks Phasentrennung nach 2 minütiger Inkubation bei RT für 10 min bei 12.000g und 4° C zentrifugiert.

4. Die obere (wässrige) Phase wurde vorsichtig abgenommen und mit 0.5 ml Iso-  
propanol/1 ml TRIzol™ Reagenz für 10 min bei RT gefällt. Nach 15 minütiger  
Zentrifugation bei 12.000g und 4° C wurde der Überstand verworfen und die pel-  
letierte RNA mit 75% EtOH gewaschen (Zentrifugation für 10 min bei 12.000g und  
4° C).
5. Der Überstand wurde verworfen und die RNA an der Luft getrocknet.
6. Nach dem Trocknen wurde die RNA in RNase-freiem H<sub>2</sub>O durch mehrfaches Auf-  
ziehen mit einer Pipette gelöst. Kurzzeitig läßt sich die RNA-Lösung bei -20° C  
lagern; langfristig sollte sie jedoch bei -80° C gelagert werden.

### 2.6.2 Konzentrationsbestimmung von RNA Lösungen

Die Konzentrationsbestimmung von RNA-Lösungen erfolgte über die Messung der optischen Dichte bei einer Wellenlänge von 260 nm. Die Konzentration ließ sich aus der OD bei 260 nm, der Verdünnung und einem RNA-spezifischen Multiplikationsfaktor von  $OD_{260\text{ nm}} = 40\ \mu\text{g/ml}$  berechnen. Zusätzlich wurde die OD bei einer Wellenlänge von 280 nm bestimmt, um aus dem Quotienten von  $OD_{260\text{ nm}}/OD_{280\text{ nm}}$  den Reinheitsgrad der RNA-Lösung zu bestimmen und eine Aussage über Proteinkontaminationen treffen zu können.

### 2.6.3 Elektrophorese von RNA im Formaldehyd-Agarosegel

Da RNA leicht zur Ausbildung von Sekundärstrukturen neigt, welche die Laufeigenschaften im Gel beeinflussen, wurden zur Auftrennung der RNA nach Größe denaturierende Agarosegele verwendet. Vor dem Gießen der Gele wurden die Gelkammer, der Gelschlitten und die Gelkämme mit 1 M NaOH und mit DEPC-H<sub>2</sub>O gespült, um RNAsen zu inaktivieren.

Als Standardgele wurden 1.5% (w/v) Agarose in MOPS Puffer (5 mM MOPS, 5 mM Natriumacetat, 1 mM EDTA, 10 mM NaOH, pH 7.0) verwendet. Der Agaroselösung wurden 18% (v/v) Formaldehyd zugefügt. Hierzu wurden 0.75 g Agarose in 36 ml DEPC-H<sub>2</sub>O in der Mikrowelle geschmolzen und die Agaroselösung auf 65° C abgekühlt. Anschließend wurde 5 ml 10x MOPS Puffer und 9 ml Formaldehyd zugegeben und das Gel zügig gegossen. Die RNA wurde lyophilisiert und im Anschluß mit 9 µl Probenpuffer (100 µl 10x MOPS Puffer, 500 µl Formamid, 178 µl Formaldehyd, 222 µl DEPC-H<sub>2</sub>O) bei 65° C für 10 min wieder gelöst. Nach der Zugabe von 1 µl Blau-marker [60% (v/v) Glycerin, 0.1% (w/v) Bromphenolblau, 10 mM EDTA] wurden die

Proben auf das Gel geladen und die Elektrophorese in MOPS Puffer für 4 h bei 50 V durchgeführt.

#### 2.6.4 Northern Blot-Technik

Ziel der Northern Blot-Technik ist es, die zuvor in der Gelelektrophorese entsprechend ihrer Länge aufgetrennten RNA-Moleküle auf einer Membran zu fixieren, um später mit markierten Sonden einzelne RNA-Moleküle durch Hybridisierung nachweisen zu können.

##### 2.6.4.1 Herstellung der Sonde

Zur Untersuchung der Expression des *Aanat* Transkripts wurde aus einer kompletten Ratten *Aanat* cDNA (Coon et al. 1995) ein *EcoRI-HindIII*-Fragment herausgeschnitten, welches die Nukleotide +1 bis +658 der *Aanat* umfasst. Dieses Fragment wurde mit Hilfe der *random primed labelling* Technik (Feinberg und Vogelstein 1983) markiert. Hierzu wurde das North2South<sup>TM</sup> biotin random prime kit (Pierce, Rockford, IL, USA) benutzt. Heptanukleotid-Primer, die alle theoretisch möglichen Sequenzabfolgen umfassen, wurden an das denaturierte *Aanat*- Fragment (100 ng) gebunden und biotinylierte dNTPs (Biotin-N<sup>4</sup>-dCTP) durch die DNA Polymerase (Klenow Fragment, 3'-5' exo-) in den neu synthetisierten Strang eingebaut.

##### 2.6.4.2 RNA-Transfer und Hybridisierung

Die gelelektrophoretisch aufgetrennten RNA Moleküle (siehe 2.3.2) wurden über einen Kapillarblot auf eine Biodyne<sup>TM</sup> B Nylon Membran (Pierce, Rockford, IL, USA) übertragen und die RNA durch UV-Licht fixiert. Vor der Hybridisierung wurden die Membranen angefärbt. Hierzu wurden diese in 5% (v/v) Essigsäure für 15 min vorinkubiert und im Anschluß in der Färbelösung [0.5 M Natriumacetat, 0.04% (w/v) Methylblau in DEPC-H<sub>2</sub>O, pH 7.4] für 10 min inkubiert. In 20% (v/v) Ethanol wurden die Membranen wieder entfärbt und danach zur Dokumentation mit einem Flachbettscanner (MFS 1200SP; Mustek, Neuss) in einen Computer eingelesen. Anhand der ribosomalen 28S- und 18S RNA Banden konnte überprüft werden, ob gleiche Mengen an RNA gegeneinander aufgetragen wurden. Die Hybridisierung der Membranen und der RNA-Nachweis erfolgten mit dem North2South<sup>TM</sup> chemiluminescent nucleic acid hybridization and detection kit (Pierce, Rockford, IL, USA). Zunächst wurden die Membranen für 6 h bei 55° C prähybridisiert. Im Anschluß erfolgte die Inkubation mit

der biotinylierten Sonde (30 ng Sonde/ml Hybridisierungslösung) über Nacht bei 55° C. Nach den stringenten Waschschritten bei 55° C erfolgte der Nachweis der Proben mittels stabilisiertem Streptavidin-Meerrettichperoxidase (HRP)-Konjugat und Chemilumineszenz. Die semiquantitative Auswertung der Signale wurde durch Ermittlung ihrer SUMDENS Werte, das Produkt aus optischer Dichte und Fläche, nach dem Verfahren von Wicht et al. (1999) vorgenommen.

## 2.7 Immunzytochemie und Immunhistochemie

Mit Hilfe der Immunzytochemie/Immunhistochemie ist es möglich, die spezifische Lokalisation von antigenen Molekülen wie Peptiden oder Proteinen *in situ* nachzuweisen. Es wurde ausschließlich die indirekte Methode zum Nachweis von Antigenen angewendet. Dabei erfolgt zunächst die Detektion des Antigens durch einen mono- oder polyklonalen Antikörper (sog. Primärantikörper). Die Visualisierung der Antigen-Antikörper-Komplexe erfolgt durch anti-IgG Antikörper aus einer heterologen zweiten Spezies (sog. Sekundärantikörper). Die Sekundärantikörper können direkt an ein fluoreszierendes Farbstoffmolekül wie Alexa Fluor<sup>®</sup> 488 oder CY<sup>TM</sup>3 konjugiert sein oder als Brückenantikörper für einen dritten Antikörper dienen, wie bei der ABC-Methode (Avidin-Biotin-Komplex). Dieser Methode liegt die Reduktion von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> durch eine Peroxidase zugrunde, wodurch gleichzeitig 3,3-Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid (DAB) oxidiert wird und einen braunen Niederschlag bildet.

### 2.7.1 Verwendete Antikörper und Präadsorption

Alle in der Immunzytochemie/Immunhistochemie zum Einsatz gekommenen Antikörper (AK) sind in den entsprechenden Verdünnungen in den beiden folgenden Tabellen dargestellt.

**Tabelle 2.2** Liste aller verwendeten Primärantikörper

Antikörper gegen	Aus	Verdünnung	Bezugsquelle
A Kinase Anker Protein (AKAP) 95	Ziege	1:500	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA
AKAP150	Ziege	1:300	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA
CB 1 Rezeptor	Kaninchen	1:100	Chemicon, Temecula, CA, USA
CB 2 Rezeptor	Kaninchen	1:50	Cayman, Carlsbad, CA,

			USA
ICER	Kaninchen	1:25.000	Dr. C.A. Molina, UMDNJ, NJ, USA
pCREB	Kaninchen	1:250	New England Biolabs, Beverly, MD, USA
$\alpha$ -katalytische Untereinheit der Protein Serin/Threonin Phosphatase (CSU-PSP) 1	Kaninchen	1:250	Upstate biotechnology, Lake Placid, NY, USA
CSU-PSP 2A	Maus	1:100	BD Transduction Laboratories, CA, USA
Protein 14-3-3 (interne Bezeichnung 8C3)	Maus	1:100	Dr. D.C. Klein, NIH, Bethesda, MD, USA
Regulatorische (R) RI $\alpha$ Untereinheit der PKA	Kaninchen	1:1000	Dr. K. Tasken, Institute of Medical Biochemistry, University of Oslo, Norway
RI $\alpha$	Kaninchen	1:250	Dr. K. Tasken, Institute of Medical Biochemistry, University of Oslo, Norway
RI $\beta$	Kaninchen	1:500	Dr. K. Tasken, Institute of Medical Biochemistry, University of Oslo, Norway
RII $\beta$	Kaninchen	1:250	Dr. K. Tasken, Institute of Medical Biochemistry, University of Oslo, Norway

**Tabelle 2.3** Liste aller verwendeten Sekundärantikörper

Antikörper	Aus	Verdünnung	Bezugsquelle
anti-Kaninchen IgG Alexa Fluor <sup>®</sup> 488	Ziege	1:200	Molecular Probes, Eugene, OR, USA
anti-Ziege IgG Alexa Fluor <sup>®</sup> 488	Esel	1:200	Molecular Probes, Eugene, OR, USA
anti-Maus IgG Alexa Fluor <sup>®</sup> 488	Ziege	1:200	Molecular Probes, Eugene, OR, USA
anti-Kaninchen IgG Alexa Fluor <sup>®</sup> 488	Esel	1:200	Molecular Probes, Eugene, OR, USA
anti-Kaninchen IgG CY <sup>TM</sup> 3	Ziege	1:500	Dianova, Hamburg
anti-Ziege IgG CY <sup>TM</sup> 3	Esel	1:500	Dianova, Hamburg
anti-Maus IgG CY <sup>TM</sup> 3	Ziege	1:500	Dianova, Hamburg
anti-Maus IgG CY <sup>TM</sup> 3	Esel	1:500	Dianova, Hamburg
anti-Kaninchen IgG Biotin konjugiert	Ziege	1:100	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
anti-Maus IgG Biotin konjugiert	Ziege	1:100	Sigma-Aldrich, Schnelldorf

Die Überprüfung der Spezifität des jeweiligen Antikörpers wurde mittels Immunoblotverfahren (siehe 2.8.3) oder durch eine Präinkubation des AK mit dem zur Immuni-

sierung verwendeten Peptid überprüft. Zur Präinkubation wurde der AK mit dem antigenen Peptid, welches gegenüber dem AK 10-100fach höher konzentriert eingesetzt wurde, in 1% (w/v) BSA in PBS (154 mM NaCl, 16 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 4 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7.4) unter leichtem Schütteln für 1.5 h bei RT inkubiert. Anschließend wurden fixierte Zellen oder Schnitte (s. u.) mit dieser Lösung inkubiert.

## 2.7.2 Vorbereitung der Präparate

### 2.7.2.1 Immunzytochemie

Zellen haften nur unzureichend auf Glas. Um in den nachfolgenden Arbeitsschritten nicht alle Zellen (zur Präparation der Zellen, siehe 2.2) von den Deckgläsern (1cm Durchmesser) abzuspülen, wurden die Deckgläser mit Poly-L-Lysin beschichtet. Hierzu wurde je ein Deckglas in eine Petrischale gelegt, 25 µl einer 0.01% (v/v) Poly-L-Lysin-Lösung mittig auf die Deckgläser appliziert und diese für 1 Stunde im Inkubator stehen gelassen. Im Anschluß wurde das Poly-L-Lysin verworfen und die Deckgläser 3x 5 min mit sterilem Millipore H<sub>2</sub>O gewaschen. Die Deckgläser wurden bis zum Trocknen offen in den Petrischalen in der Sterilbank stehengelassen.

Vor Durchführung der Immunzytochemie wurden die Zellen entweder mit Methanol bzw. einem Gemisch aus Methanol/Aceton (1:1) für 7 min bei -20° C oder mit 4% (w/v) Paraformaldehyd (PFA) in PBS bzw. 2.5% (v/v) Glutaraldehyd in PBS für 10 min bei RT immersionsfixiert. Nach der Fixierung wurde zusätzlich ein Detergenz in Form von 0.3% (v/v) Triton X-100 in PBS zugegeben, um die Zellmembran für die Antikörper hinreichend permeabel zu machen und eine Markierung intrazellulärer Epitope zu ermöglichen. Bei einer sich anschließenden Immunfluoreszenz durfte kein Glutaraldehyd eingesetzt werden, da dieses autofluoreszierende Eigenschaften besitzt.

### 2.7.2.2 Immunhistochemie

Für die Immunhistochemie wurden Ratten zu den Zeitpunkten ZT05 - ZT07 mit 4% (w/v) PFA in PBS oder 1% (v/v) Glutaraldehyd in PBS perfusionsfixiert. Hierzu wurden die Tiere mit einer Überdosis Fluothan getötet, das Herz freipräpariert und über eine Kanüle, welche in die linke Herzkammer eingeführt wurde, ca. 150-300 ml einer mit 2000 IE unfraktioniertem Heparin versetzten 0.9%igen (w/v) NaCl-Lösung infundiert. Zum Abfluss des venösen Bluts wurde parallel dazu das rechte Herzohr geöffnet. Anschließend erfolgte die Infusion des Fixativs. Nach Dekapitation wurden die

Gehirne entnommen und im entsprechenden Fixativ für 24 h nachfixiert. Zur Kryoprotektion wurden die Gehirne in unterschiedlich konzentrierten Saccharoselösungen [10%, 20% und 30% (w/v) in PBS] für jeweils ungefähr 24 h inkubiert und dann in Isopentan schockgefroren. Mit Hilfe eines Kryostaten (Microm, Walldorf) wurden 20 µm dicke koronale Schnitte angefertigt, die auf Gelatine-beschichteten Objektträgern [0.5% (w/v) Gelatine, 0.05% (w/v) Chromalaun in Aqua dest.] aufgefangen wurden.

### 2.7.3 Durchführung der Immunzytochemie/Immunhistochemie

Im folgenden sind die einzelnen Schritte zur Durchführung der Immunzytochemie/Immunhistochemie aufgeführt.

#### 2.7.3.1 ABC-Methode

Alle Inkubationsschritte erfolgten bei RT:

1. Blockierung endogener Peroxidasen mit 0.5% (v/v) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in Methanol für 10 min
2. Spülen in PBS für 3x 5 min
3. Vorinkubation mit Ziegen Serum [1:10 in 0.3% (v/v) Triton X-100 in PBS] für 45 min
4. Inkubation mit dem Primärantikörper [in 1% (w/v) BSA, 0.3% (v/v) Triton X-100 in PBS] über Nacht
5. Spülen in PBS für 3x 5 min
6. Inkubation mit dem Sekundärantikörper (Biotin-konjugierte anti-Kaninchen/Maus Antikörper [in 0.3% (v/v) Triton X-100 in PBS] für 60 min
7. Spülen in PBS für 3x 5 min
8. Inkubation mit ExtrAvidin<sup>®</sup> konjugierter Peroxidase [1:100 in 0.3% (v/v) Triton X-100 in PBS] für 60 min
9. Spülen in PBS für 5 min, dann in 0.05 M Tris/HCl pH 7.4 für 2 x 5 min
10. Inkubation mit 0.05% (v/v) DAB, 0.02% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in 0.05 M Tris/HCl pH 7.4 für maximal 10 min
11. Spülen in 0.05 M Tris/HCl pH 7.4 für 3x 5 min
12. Spülen in A. bidest.
- 13.a Immunzytochemie: Eindeckeln mit Kaisers Glyceringelatine (Merck, Darmstadt).
- 13.b Immunhistochemie: Entwässern in Alkohollösungen (50-100%) und abschließend in Xylol, Eindeckeln mit Entellan (Merck, Darmstadt).

### 2.7.3.2 Indirekte Immunfluoreszenz

Alle Inkubationsschritte erfolgten bei RT:

1. Vorinkubation mit Ziegen-oder Eselserum [1:10 in 0.3% (v/v) Triton X-100 in PBS] für 45 min
2. Inkubation mit dem Primärantikörper [in 1% (w/v) BSA, 0.3% (v/v) Triton X-100 in PBS] über Nacht
3. Spülen in PBS für 3x 5 min
4. Inkubation mit dem Sekundärantikörper [Fluoreszenzfarbstoff-konjugierte anti-Ziege/Kaninchen/Maus Antikörper in 0.3% (v/v) Triton X-100 in PBS] für 60 min
5. Spülen in PBS für 3x 5 min
6. Spülen in A. bidest.
7. Eindeckeln in DAKO<sup>®</sup> Fluorescent Mounting Media (DAKO, Carpinteria, CA, USA)

### 2.7.4 Dokumentation der Ergebnisse mittels konfokaler Laserscanning-Mikroskopie (CLSM)

Zur Dokumentation der immunzytochemischen/immunhistochemischen Ergebnisse kam neben dem konventionellen Lichtmikroskop (Axioplan; Zeiss, Jena), ausgestattet mit Durchlicht und Aufsichtfluoreszenz, ein CLSM (LSM 500/Axiovert 100; Zeiss, Jena) zum Einsatz. Zum Nachweis des Alexa Fluor<sup>®</sup> 488 Farbstoffs wurde dieser mit monochromatischem Licht der Wellenlänge 488 nm angeregt, wobei der Lichtstrahl durch einen Farbteiler (FT 488) und einen Emissionsbandpassfilter (BP 505-530) geleitet wurde. Um das Fluorochrom CY<sup>TM</sup>3 anzuregen, wurde monochromatisches Licht der Wellenlänge 543 nm verwendet, welches durch einen Farbteiler (FT 543) und einen Emissionsbandpassfilter (BP 580-615) geleitet wurde. Die Immunfluoreszenzbilder wurden mit einer Auflösung von 8 bit (1024 x 1024 Bildpunkte) dokumentiert und gespeichert.

### 2.8 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE) und Immunoblot

Die gelelektrophoretische Auftrennung von Proteingemischen erfolgte im Wesentlichen nach dem von Lämmli (1970) entwickelten System. Das Detergenz Natriumdocylsulfat (SDS) bindet an die meisten Proteine in nahezu konstantem Ladungs-Massen-Verhältnis und maskiert deren ursprüngliche Ladung. Durch zusätzliche Reduktion mit  $\beta$ -Mercaptoethanol werden Protein-Protein Interaktionen unterbunden, so daß sich die negativ geladenen SDS-Protein-Komplexe nur noch in ihrer Größe un-

terscheiden. Nach Anlegen eines elektrischen Feldes wandern diese in einer porösen Polyacrylamidmatrix zur Anode, wobei die Laufstrecke der SDS-Protein-Komplexe umgekehrt proportional zu ihrer relativen Molekülmasse ist. Die entsprechend ihrer Größe aufgetrennten Proteine lassen sich dann von der Gelmatrix auf eine Nitrozellulosemembran übertragen (blotten). Durch den Einsatz von spezifischen Antikörpern kann somit ein einzelnes Antigen (Peptidsequenz, Protein) in einem Proteingemisch identifiziert werden.

### 2.8.1 Probenvorbereitung und Proteinbestimmung

Die Pinealozyten bzw. die Pinealorgane wurden in Eppendorfreaktionsgefäße überführt und einmal mit PBS (9.1mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 1.7mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 150mM NaCl, pH 7.4) gespült. Im Anschluß wurde das Gewebe in RIPA Puffer [9.1mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 1.7mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 150mM NaCl, 0.5% (w/v) NaDeoxycholate, 0.5% (v/v) NP40, pH 7.4], dem Protease-Inhibitoren (*Complete protease inhibitor cocktail*, Roche, Mannheim) sowie Phosphatase-Inhibitoren (1mM  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ , 1mM NaF, 1mM  $\text{Na}_2\text{MoO}_4$ ) zugeben wurden, aufgenommen und mit einem Ultraschall-Desintegrator (Sonoplus HD 70, Bandelin, Berlin) homogenisiert. Es folgte eine Zentrifugation für 30 min bei 12.000 g und 4° C. Die Überstände (das Gesamtproteinextrakt) wurde in neue Eppendorfreaktionsgefäße überführt.

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte nach Bradford (1976) und beruht auf der Verschiebung des Absorptionsmaximums des Farbstoffes Coomassie brilliant blue G-250 (Pierce, Rockford, IL, USA). Nach der Bindung des Farbstoffes an Proteine verschiebt sich dessen Absorptionsmaximum von 465 nm (ungebundener Zustand) zur Wellenlänge von 595 nm (mit gebundenen Proteinen). Die Zunahme der Absorption bei 595 nm ist ein Maß für die Proteinkonzentration in der Lösung und wurde mit einem Photometer (Spectronic Genesys 5, Milton Roy; Pont-Saint-Pierre, Frankreich) ermittelt. Anhand einer Eichreihe mit bekannten Mengen an BSA konnte die Proteinkonzentrationen in den Proben ermittelt werden.

Nach der Proteinbestimmung wurden die Homogenate 1:1 (v/v) mit Probenpuffer [25 mM Tris/HCl, 5% (v/v) Glycerin, 1% (w/v) SDS, 1% (v/v)  $\beta$ -Mercaptoethanol, 0.05% (w/v) Bromphenolblau, pH 6.8] versetzt und für 5 min bei 95° C gekocht.

### 2.8.2 SDS-PAGE

Polyacrylamidgele wurden aus einer Mischung von Acrylamid und dem quervernetzenden Reagenz N,N'-Methylenbisacrylamid [37:1 (v/v)] mittels radikalischer Polymerisation hergestellt. Dabei wurde die Reaktion mit N,N,N',N'-Tetramethyldiamin (TEMED) gestartet und mit Ammoniumpersulfat (APS) katalysiert. Entsprechend der Größe der aufzutrennenden Proteine wurde die Porengröße der Trenngele durch Variation der Acrylamid-Konzentration angepaßt. Die folgende Tabelle liefert eine Übersicht über die Zusammensetzung der unterschiedlich prozentigen Trenngele.

**Tabelle 2.4** Anteile (in ml) der einzelnen Komponenten an einem Endvolumen von 15 ml in unterschiedlich prozentigen Trenngele.

Komponenten	7.5%	10.0%	12.5%	15%
Millipore-H <sub>2</sub> O	8.2	7.25	6.3	5.4
10% (w/v) SDS	0.150	0.150	0.150	0.150
40 % Acrylamid/Bisacrylamid (37:1)	2.8	3.75	4.7	5.6
1.5 M Tris/HCl pH 8.9	3.75	3.75	3.75	3.75
10% (w/v) Ammoniumpersulfat (APS)	0.075	0.075	0.075	0.075
N,N,N',N'-Tetramethyldiamin (TEMED)	0.01	0.01	0.015	0.015

Die Trenngele wurden in die Vorrichtungen der Gelapparatur (Protean II Minigel/Blot Kammer; Biorad, München) gegossen und mit Isobutanol überschichtet. Nach Beendigung der Polymerisation wurde das Isobutanol verworfen und die Sammelgele auf die Trenngele geschichtet. Folgende Tabelle zeigt die Zusammensetzung der verwendeten Sammelgele.

**Tabelle 2.5** Anteile (in ml) der Komponenten am Gesamtvolumen (5.5 ml) der Sammelgele.

Komponenten	Sammelgel 5%
Millipore-H <sub>2</sub> O	1.9
0.1% (w/v) Bromphenolblau	1.0
10% (w/v) SDS in Millipore-H <sub>2</sub> O	0.05
40% Acrylamid/Bisacrylamid (37:1)	0.75
0.5 M Tris/HCl pH 6.8	0.875
0.5 M Imidazol pH 6.8	0.875
10% (w/v) Ammoniumpersulfat (APS)	0.05
N,N,N',N'-Tetramethyldiamin (TEMED)	0.01

Die Gele wurden in der mit Lämmli-Puffer [25 mM Tris/HCl, 200 mM Glycin, 0.1% (w/v) SDS, pH 8.2] gefüllten Gelkammer in der Regel mit 20-40 µg Gesamtprotei-

nextrakt pro Geltasche und einem Größenstandard beladen. Die Proteingemische wurden zunächst bei einer elektrischen Spannung von 80V und nach dem Verlassen des Sammelgels bei einer Spannung von 120 V elektrophoretisch aufgetrennt.

### 2.8.3 Immunoblot-Technik

Zum Transfer der entsprechend ihrer Größe aufgetrennten Proteine aus der Gelmatrix auf eine Nitrozellulosemembran (0.2 µm Schichtdicke; Biorad, München) wurde im Wesentlichen die von Towbin et al. (1979) entwickelte Methode angewendet. Dabei wandern die negativ geladenen SDS-Proteinkomplexe in einem elektrischen Feld ortstreu vom Gel in Richtung Anode auf die Nitrozellulosemembran und werden dort durch hydrophobe Wechselwirkungen zwischen den Proteinen und der Membran gebunden. Hierzu wurde die Transfereinheit, bestehend aus drei Lagen Whatmanfilterpapier, Gel, Nitrozellulosemembran und wiederum 3 Lagen Whatmanpapier, schichtweise aufgebaut und mit Transferpuffer [20% (v/v) Methanol, 1.5% (v/v) Ethanolamin, 40 mM Glycin] befeuchtet. Beim Zusammenbau der Transfereinheit mussten Luftblasen entfernt werden. Der Transfer erfolgte für 1 h in der mit Transferpuffer gefüllten Transferkammer bei 125 V auf Eis. Nach dem Transfer wurden die Gele in einer Färbelösung [0.01% (w/v) *Coomassie brilliant blue*, 25% (v/v) Methanol, 10% (v/v) Eisessig] für mindestens 1h angefärbt und im Anschluß mit Methanol/Eisessig wieder entfärbt. Anhand des Proteinbandenmusters konnte qualitativ überprüft werden, ob die elektrophoretische Auftrennung erfolgreich verlaufen war und ob gleiche Mengen an Protein gegeneinander aufgetragen wurden. Die Nitrozellulosemembran wurde zweimal kurz in Tris-gepufferter Salzlösung [TBST; 50 mM Tris, 0.15 mM NaCl, 0.1% (v/v) Tween-20, pH 7.5] gewaschen und dann für 1h in der für den Antikörper spezifischen Blockierungslösung (in TBST; siehe Tabelle 2.6) bei RT präinkubiert. Die Inkubation mit den primären AK erfolgte über Nacht unter Schütteln bei 4° C. Nach 3x 10 min Spülen wurde die Membran mit dem Sekundärantikörper für 1.5 h unter Schütteln bei RT inkubiert.

**Tabelle 2.6** Liste der im Immunoblot verwendeten Antikörper

Antikörper	aus	Verdünnung	Bezugsquelle
AANAT (AS 2500)	Kaninchen	1:100.000 in 5% (w/v) BSA	Dr. D.C. Klein, NIH, Bethesda, MD, USA
AANAT (AS 3314)	Kaninchen	1:100 in 5% (w/v) BSA	Dr. D.C. Klein, NIH, Bethesda, MD, USA

AANAT (AS 3343)	Kaninchen	1:5000 in 5% (w/v) BSA	Dr. D.C. Klein, NIH, Bethesda, MD, USA
AKAP 95	Ziege	1:2500 in 3% (w/v) BSA/5% (w/v) Trockenmilchpulver	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA
AKAP 150	Ziege	1:2500 in 3% (w/v) BSA/5% (w/v) Trockenmilchpulver	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA
CB 1 Rezeptor	Kaninchen	1:1250 in 5% (w/v) BSA	Chemicon, Temecula, CA, USA
CB 2 Rezeptor	Kaninchen	1:2000 in 5% (w/v) BSA	Cayman, Carlsbad, CA, USA
CREB	Kaninchen	1:1000 in 5% (w/v) BSA	New England Biolabs, Beverly, MD, USA
pCREB	Kaninchen	1:1000 in 5% (w/v) BSA	New England Biolabs, Beverly, MD, USA
CSU-PSP 1	Kaninchen	1:2000 in 5% (w/v) Trockenmilchpulver	Upstate biotechnology, Lake Placid, New York, USA
CSU-PSP 2A	Maus	1:1000 in 5% (w/v) Trockenmilchpulver	BD Transduction Laboratories, , CA, USA
ERK ½	Kaninchen	1:3.000 in 5% (w/v) BSA	New England Biolabs, Beverly, MD, USA
pERK ½	Maus	1:1.000 in 5% (w/v) BSA	New England Biolabs, Beverly, MD, USA
CSU-PSP 1	Kaninchen	1:2000 in 5% (w/v) Trockenmilchpulver	Upstate biotechnology, Lake Placid, New York, USA
CSU-PSP 2A	Maus	1:1000 in 5% (w/v) Trockenmilchpulver	BD Transduction Laboratories, , CA, USA
Protein 14-3-3 (AS A274)	Kaninchen	1:1.500 in 10% (w/v) Trockenmilchpulver	Dr. D.C. Klein, NIH, Bethesda, MD, USA
anti-Kaninchen IgG HRP-konjugiert	Ziege	1:25.000	New England Biolabs, Beverly, MD, USA
anti-Maus IgG HRP-konjugiert	Ziege	1:25.000	New England Biolabs, Beverly, MD, USA
anti-Ziege IgG HRP-konjugiert	Rind	1:2000	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA

Um die Nitrozellulosemembran für den Nachweis eines weiteren Antigens zu nutzen, wurde diese nach dem Nachweis des ersten Antigens (siehe 2.5.4) in TBST kurz gewaschen und für 30 min in Elutionspuffer [1% (w/v) SDS, 0.685% (v/v)  $\beta$ -Mercaptoethanol, 62.5 mM Tris/HCl, pH 6.8] unter Schütteln bei 56° C inkubiert. Im Anschluß wurde die Membran 3x 5 min mit Millipore-H<sub>2</sub>O sowie 3x 5 min mit TBST gespült und für 1 h in der Blockierungslösung (Rotiblock; Roth, Karlsruhe) unter

Schütteln bei RT inkubiert. Daraufhin konnte die Membran für einen weiteren immunchemischen Nachweis benutzt werden.

#### 2.8.4 Nachweis der Proteinbanden

Der Nachweis der antigenen Proteinbanden erfolgte mittels *enhanced chemiluminescence* (ECL). Hierbei erfolgt die Oxidation von Luminol bei gleichzeitiger Reduktion von  $H_2O_2$  durch eine Meerrettichperoxidase (HRP), welche an den Sekundärantikörper konjugiert ist (siehe 2.5.3). Dadurch wird Luminol in einen angeregten Zustand versetzt. Beim Übergang zurück in den Grundzustand wird diese Energie in Form von Licht (Chemilumineszenz) freigesetzt. Durch das Auflegen eines Röntgenfilms (Biomax MR; Kodak, Stuttgart) konnte dieses Licht gemessen werden. In dieser Arbeit wurde das Super Signal<sup>®</sup> West Pico Chemiluminescent Substrate (Pierce, Rockford, IL, USA) verwendet. Dabei wurden die beiden Lösungen, Luminol/Enhancer Solution und Stable Peroxidase Solution, 1:1 gemischt und die Membran (0.125 ml Substratlösung/cm<sup>2</sup> Membran) für 10 min unter Lichtausschluß inkubiert. Im Anschluß wurde die Membran in Plastikfolie gelegt und in einer Filmkassette auf einen Röntgenfilm gelegt.

#### 2.9 Ko-Immunpräzipitation

Zur Darstellung von Protein-Protein-Interaktionen in einem Gesamtproteinextrakt wurde die Methodik der Ko-Immunpräzipitation angewendet. Hierbei wird ein Proteinextrakt aus dissoziierten Zellen hergestellt und anschließend mit einem Antikörper inkubiert, der gegen einen der beiden möglichen Interaktionspartner gerichtet ist. Die gebildeten Antigen-Antikörper-Komplexe werden dann durch spezielle, an magnetische Kügelchen (*magnetic beads*) gekoppelte Sekundärantikörper (MagnaBind<sup>™</sup> goat anti-rabbit IgG beads; Pierce Rockford, IL, USA) in einem magnetischen Feld sedimentiert und somit aus dem Proteinlysate isoliert. Die Analyse der Ko-Immunpräzipitation erfolgt im Anschluß mittels Immunoblotverfahren (siehe 2.5). Es werden neben den Präzipitaten zusätzlich die unbehandelten Proteinextrakte sowie der verdünnte, in der Präzipitation eingesetzte Primärantikörper zur Kontrolle aufgetragen. Die einzelnen Arbeitsschritte sind im folgenden kurz aufgeführt:

1. Die Pinealozyten wurden für 1 min bei 12.000 g und 4° C zentrifugiert und der Überstand verworfen. Zur Zellyse wurden die Zellen (Pellets) für 10 min auf

- Trockeneis schockgefroren, bei 4° C gelagert, in Präzipitationspuffer (0.1M Ammoniumacetat, pH 6.8), dem complete protease inhibitor cocktail sowie Phosphatase-Inhibitoren (siehe 2.5.1) zugegeben wurden, resuspendiert und mit einem Ultraschall-Desintegrator homogenisiert.
2. Zur Vorreinigung der *magnetic beads* wurden 100 µl der *magnetic beads* pro Ansatz 3x mit 200 µl Präzipitationspuffer gespült.
  3. Auf die sedimentierten *magnetic beads* wurde das Proteinextrakt (100-125 µg) geladen und mit Präzipitationspuffer auf 200 µl aufgefüllt.
  4. Die Proben wurden für 2h auf dem Überkopf-Schüttler (20rpm) bei 4°C inkubiert. Anschließend wurde der Überstand für die folgende Konjugation (siehe 6.) gewonnen.
  5. Zeitgleich erfolgte die Kopplung des primären AK an die magnetic beads. Dazu wurden 2-6µl AK auf 50-100µl zuvor gereinigte *magnetic beads* geladen, mit Präzipitationspuffer auf 200 µl aufgefüllt und für 2h auf dem Schüttler (20rpm) bei 4°C inkubiert.
  6. Zur Konjugation der vorgereinigten Lysate (siehe 4.) an den Komplex aus primären AK und *magnetic beads* wurden die gereinigten Lysate auf die sedimentierten Komplexe aus Primärantikörper und *magnetic beads* geladen und über Nacht auf dem Schüttler (20rpm) bei 4°C inkubiert.
  7. Am nächsten Tag wurde der Überstand verworfen, das Präzipitat 3x mit 200 µl Präzipitationspuffer gewaschen und in 17.5µl 2x Probenpuffer aufgenommen.

Für die Präzipitationsexperimente wurden die folgenden Antikörper eingesetzt:

**Tabelle 2.7** Liste der in der Ko-Immunpräzipitation verwendeten Antikörper

Antikörper gegen	aus	Verdünnung	Bezugsquelle
AANAT ( <i>Immunopurified</i> (IP) AS 3314)	Kaninchen	4 µl / 200 µl Präzipitationspuffer; 1:100 in 5% BSA	Dr. D.C. Klein, NIH, Bethesda, MD, USA
Protein 14-3-3 (IP A274)	Kaninchen	4 µl / 200 µl Präzipitationspuffer; 1:1.500 in 10% Trockenmilchpulver	Dr. D.C. Klein, NIH, Bethesda, MD, USA

## 2.10 Aktivitätsbestimmung der AANAT

Die Aktivitätsmessungen für die AANAT erfolgten in Homogenaten aus kultivierten Pinealorganen der Ratte. Die Bestimmung der Aktivität für die AANAT beruht dabei auf einer durch die AANAT katalysierten Bildung von  $^{14}\text{C}$ -radioaktiv markiertem  $^{14}\text{C}$ -N-Azetyl-tryptamin aus  $^{14}\text{C}$ -markiertem AzetylCoA und Tryptamin. Das radioaktiv markierte AzetylCoA wird zusammen mit dem Substrat Tryptamin im Überschuss dem Reaktionsansatz zugegeben. Nach Ablauf der Reaktion und dem anschließenden Auswaschen von nicht gebundenen  $^{14}\text{C}$ -AzetylCoA kann über die gebildete Menge von  $^{14}\text{C}$ -radioaktiv markiertem  $^{14}\text{C}$ -N-Azetyl-tryptamin auf die Aktivität der AANAT zurückgeschlossen werden.

### 2.10.1 Durchführung der Aktivitätsmessungen

Die Pinealorgane wurden nach Beendigung der Kultivierung entweder bei  $-80^\circ\text{C}$  gelagert oder sofort weiterverarbeitet. Dabei wurden alle Arbeitsschritte zügig und auf Eis durchgeführt. Zunächst wurden die Pinealorgane in  $27\ \mu\text{l}$   $0.1\ \text{M}$  Ammoniumazetatpuffer (pH 6.8), der vorher mit Protease-Inhibitoren (*Complete Protease Inhibitor Cocktail*, Roche, Mannheim) versetzt wurde, mit Hilfe eines Ultraschall-Desintegrators (Sonoplus HD 70, Bandelin, Berlin) homogenisiert und das Homogenat für 15 min bei  $12.000\ \text{g}$  und  $4^\circ\text{C}$  zentrifugiert.  $2\ \mu\text{l}$  des Überstandes wurden für die Proteinbestimmung nach Bradford bereitgestellt (siehe 2.5.1). Zu den verbleibenden  $25\ \mu\text{l}$  wurden im Anschluss  $10\ \mu\text{l}$  des Substrats Tryptamin (Endkonzentration  $40\ \text{mM}$ ) und  $7.5\ \mu\text{l}$   $^{14}\text{C}$  AzetylCoA ( $60\ \text{nCi/nmol}$  spezifische Aktivität; ICN, Eschwege) pipettiert. Die Reaktionsansätze wurden kurz auf dem Vortex-Gerät geschüttelt und herunterzentrifugiert. Die Inkubation der Reaktionsansätze erfolgte bei  $37^\circ\text{C}$  für 20 min. Um die Reaktion zu stoppen, wurden die Reaktionsansätze unverzüglich auf Eis gestellt und jeweils mit  $1\ \text{ml}$  Chloroform sowie  $200\ \mu\text{l}$  Ammoniumazetatpuffer versetzt. Von diesem Zeitpunkt an konnte bei RT weitergearbeitet werden. Nach 20 sekundigem Schütteln auf dem Vortex-Gerät erfolgte eine kurze Zentrifugation bei  $2700\ \text{g}$ . Die obere, wässrige Phase wurde vorsichtig abgesaugt. Nach zweimaligem Waschen mit  $200\ \mu\text{l}$  Ammoniumazetatpuffer wurden  $500\ \mu\text{l}$  der organischen Phase in Szintillationsgefäße pipettiert, wo das Chloroform verdampfte. Darauf erfolgte die Zugabe von  $5\ \text{ml}$  einer gebrauchsfertigen Szintillationsflüssigkeit (rotiszent eco plus) pro Röhrchen. Nach 10 sekundigem Schütteln auf dem Vortex-Gerät wurde die  $\gamma$ -Strahlung der Proben in einem Szintillationsmeßgerät (Liquid Scintillation Analyser

2500 TR, 2500 Tri-Carb; Canberra-Packard, Dreieich) gemessen. Über die resultierenden Dpm-Werte konnte mit Hilfe der in 2.10.2 angegebenen Formel die AANAT Aktivität berechnet werden. Dabei dienten zusätzlich Kontrollpräparationen, denen anstatt des Substrats Tryptamin Ammoniumazetatpuffer zugegeben wurden, als Hintergrundwerte. Diese Hintergrundwerte wurden später von den eigentlichen Messwerten sämtlicher Proben abgezogen. Um die Spezifität der Aktivitätsbestimmung für die AANAT zu überprüfen, wurden Kontrollmessungen an Proben unter Zugabe von 1  $\mu\text{M}$  Bisubstrat-Inhibitor (BSI), einem potenten Inhibitor für die AANAT, durchgeführt.

### 2.10.2 Berechnung der AANAT Aktivität

Die Angabe der Messwerte durch den  $\gamma$ -Zähler erfolgte in Dpm. Anhand eines Beispiels soll nun die genaue Berechnung der spezifischen Aktivität für die AANAT erläutert werden:

$$\frac{1000 \text{ Dpm} / 500 \mu\text{l Reaktionsansatz} - \text{Hintergrundwert (hier 50)} \times 2 \text{ (auf 1 ml Reaktionsansatz)} \times 3 \text{ (auf 1 h Inkubationszeit)}}{60 \text{ nCi/nmol (spezifische Aktivität des } ^{14}\text{C AzetylCoA)} \times 2220 \text{ Dpm/nCi (Umrechnungsfaktor der spezifischen Aktivität in Dpm)}}$$

Die Aktivität einer Probe wurde abschließend auf 1 mg Protein bezogen. Es ergab sich also die Aktivität der AANAT in:

$$\frac{\text{nmol}}{\text{h} \times \text{mg Protein.}}$$

### 2.11 ELISA (enzyme linked immunosorbent assay)

Der Gehalt von Melatonin im Kulturmedium wurde mit Hilfe eines Melatonin-spezifischen kompetitiven Enzymimmunoassays (Institut für Hormonforschung IHF, Hamburg) bestimmt, dessen Nachweisgrenze laut Hersteller bei 1.5-2 pg/ml liegt.

#### 2.11.1 Probenvorbereitung

Vor Beginn des Versuchs wurde bei allen Pinealozyten- sowie Organkulturen ein Mediumwechsel vorgenommen. Das frisch zugegebene Medium enthielt kein FCS, welches unter Umständen Spuren von Melatonin enthalten und somit die Ergebnisse des ELISAs beeinflussen kann. Nach der Abnahme des Zellkulturüberstands konnte dieser direkt verwendet oder für längere Zeit bei  $-20^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt werden. Um in

den spezifischen Meßbereich des ELISAs zu gelangen, wurden in Vorversuchen entsprechende Verdünnungsreihen der zu untersuchenden Proben hergestellt.

### 2.11.2 Durchführung

Mit (Ziege) anti-Kaninchen Antikörpern beschichtete Mikrotiterplatten wurden mit 50 µl der vorverdünnten Probe, 50 µl Melatonin/Biotin-Derivat (Tracer, 15 pg / ml) und 100 µl Melatonin Antiserum (aus Kaninchen; 1:100.000) bei 4 ° C über Nacht inkubiert. Dabei konkurriert das Melatonin aus der Probe mit dem biotinylierten Melatonin-Derivat um die Bindung an den anti-Melatonin Antikörper. Die Komplexe des anti-Melatoninantikörpers mit dem Melatonin aus der Probe sowie mit dem Melatonin/Biotin-Derivat binden an den immobilisierten (Ziege) anti-Kaninchen Antikörper. Nach Verwerfen des Überstandes und 3x 5 min spülen wurden 200 µl mit Meerettichperoxidase (HRP) konjugiertes Streptavidin (150 ng/ml) zugegeben und für 30 min bei 4° C mit dem biotinhaltigen, immobilisierten Immunkomplex inkubiert. Nach Verwerfen des Überstandes und 3x 5 min Spülen erfolgte die Detektion mittels chromogenhaltiger Substratlösung. Dabei wird Tetramethylbenzidin durch die HRP und in Anwesenheit von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> zu einem blauen Farbstoff umgesetzt. Die Reaktion wurde mit H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> gestoppt, wobei es zu einem gelben Farbumschlag kam. Die Intensität der Färbung ist proportional zur gebundenen HRP-Menge und somit umgekehrt proportional zur Menge an Melatonin in der Probe. Anhand einer parallel erstellten Eichkurve mit bekannten Mengen an Melatonin konnten die Melatoninkonzentrationen in den Proben ermittelt werden. Dies erfolgte photometrisch (ELISA-Photometer; Labsystems, Frankfurt am Main) bei einer Wellenlänge von 450 nm.

### 2.12 Semiquantitative Auswertung durch Bildanalyse

Mit Hilfe des VIDAS-Bildanalysesystems (KS400; Kontron, Eching) erfolgte die semiquantitative Auswertung aller Präparate. Die Signale aus den Northern- und Immunoblot-Analysen wurden nach dem Einlesen der Filme durch einen Flachbettscanner (MFS 1200SP; Mustek, Neuss) mit dem computergestützten Image-Analysesystem ausgewertet. Dabei wurden die Signalstärke sowie die Signalgröße erfaßt und die relative Größe und Intensität einer individuellen Bande durch Summation der entsprechenden Grauwertstufen quantifiziert. Die Ergebnisse wurden, nach dem Verfahren von Wicht et al. (1999), als SUMDENS-Werte angegeben. Immunzytochemische Daten wurden von einer Videokamera (AVT Horn; Aalen) erfasst, welche an ein Mi-

kroskop (Axioplan; Zeiss, Göttingen) angeschlossen war. Die ermittelten SUMDENS-Werte wurden gegen das entsprechende unspezifische Hintergrundsignal korrigiert und diese dann als corrSUMDENS (corrected sum of densities) bezeichnet.

### 2.13 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung von mindestens drei unabhängigen Experimenten erfolgte mit Hilfe des Computerprogramms Graph Pad Prism (Graph Pad, San Diego, CA, USA). Es wurde eine Einweganalyse der Varianz (one-way analysis of variance, ANOVA) mit einem Zusatztest nach Bonferroni oder Dunnet für mehrfache Vergleiche angewendet. Die Daten wurden als Mittelwert mit Standardfehler des Mittelwerts angegeben ( $\pm$ SEM).

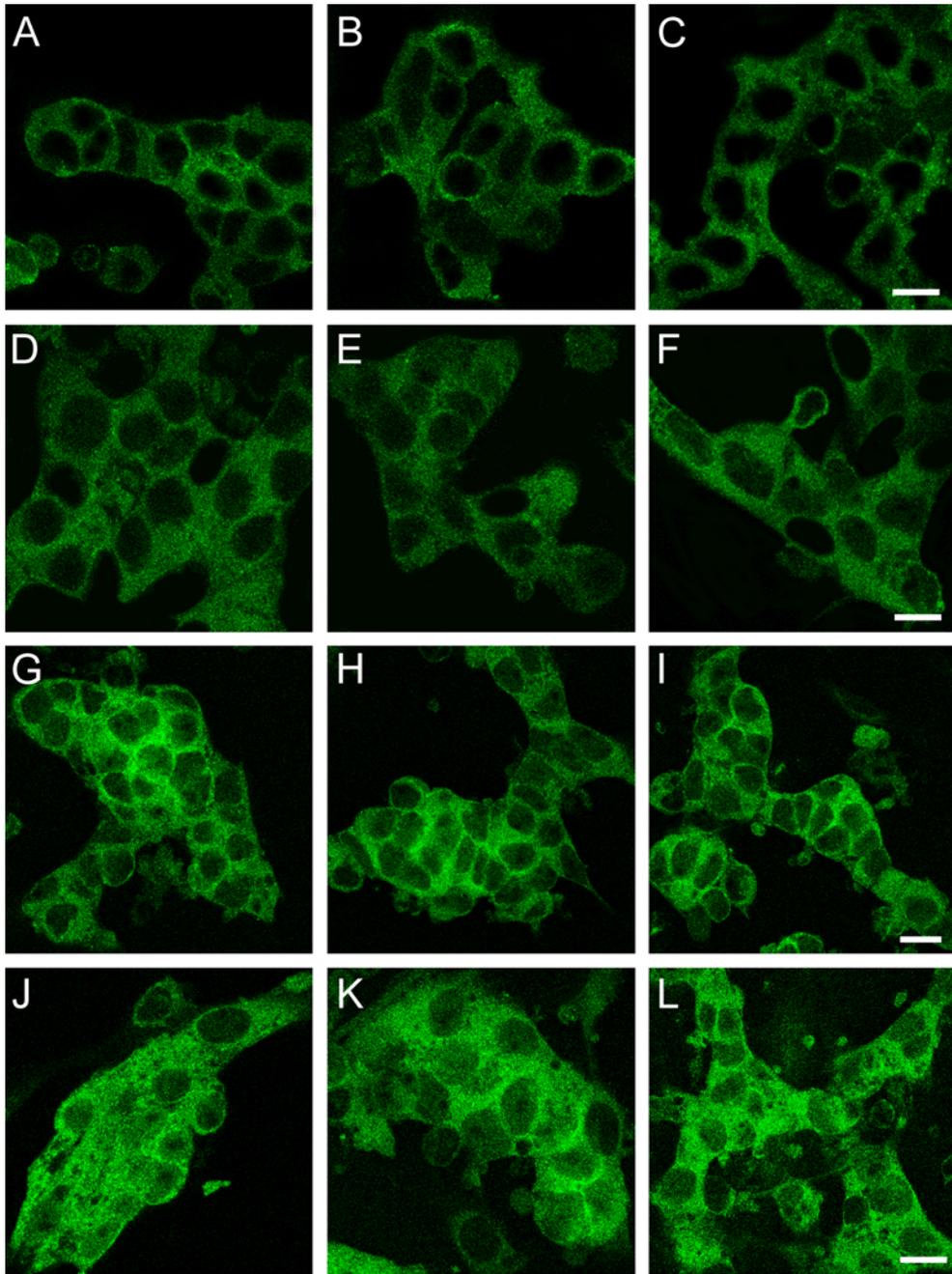
## Ergebnisse

### 3.1 Darstellung von regulatorischen Untereinheiten der Proteinkinase A und deren Ankerproteinen AKAP 95 und 150 in Pinealozyten der Ratte

Mit Hilfe der indirekten Immunfluoreszenz konnten die regulatorischen (R)-Untereinheiten  $\alpha$  und  $\beta$  der Protein Kinase A (PKA) Typ I ( $RI\alpha$ ,  $RI\beta$ ) sowie Typ II ( $RII\alpha$ ,  $RII\beta$ ) in fast sämtlichen dissoziierten Pinealozyten der Ratte nachgewiesen werden (Abb. 3.1). Die Immunreaktivitäten (IRs) sind fein granuliert und gleichmäßig im gesamten Zytoplasma der Pinealozyten verteilt. Die Zellkerne waren durchweg nicht angefärbt (immunnegativ). Die Lokalisation und die Intensität der Immunsignale für sämtliche R-Untereinheiten variierten nicht in Pinealozyten, die entweder unstimuliert oder mit 1  $\mu$ M Noradrenalin (NA) für 1 h bzw. 6 h ( $RI\alpha$ : Abb. 3.1A-C;  $RI\beta$ : Abb. 3.1D-F;  $RII\alpha$ : Abb. 3.1G-I;  $RII\beta$ : Abb. 3.1J-L) stimuliert wurden. Generell waren die IRs von  $RI\alpha$  (Abb. 3.1A-C) und  $RI\beta$  (Abb. 3.1D-F) weniger intensiv als die Immunsignale für  $RII\alpha$  (Abb. 3.1G-I) und  $RII\beta$  (Abb. 3.1J-L).

---

Abb. 3.1: Immunzytochemische Darstellung der regulatorischen (R)-Untereinheiten der Proteinkinase A (PKA) mittels Alexa Fluor 488-konjugierten sekundären Antikörpern. Die R-Untereinheiten  $\alpha$  und  $\beta$  der PKA Typ I und II waren in fast allen Pinealozyten nachweisbar ( $RI\alpha$ : **A-C**;  $RI\beta$ : **D-F**;  $RII\alpha$ : **G-I**;  $RII\beta$ : **J-L**). In unstimulierten Pinealozyten sind die IRs für sämtliche R-Untereinheiten fein granuliert und gleichmäßig im gesamten Zytoplasma verteilt. Der Zellkern war stets immunnegativ ( $RI\alpha$ : **A**;  $RI\beta$ : **D**;  $RII\alpha$ : **G**;  $RII\beta$ : **J**). Nach Stimulation mit 1  $\mu$ M NA für 1 h ( $RI\alpha$ : **B**;  $RI\beta$ : **E**;  $RII\alpha$ : **H**;  $RII\beta$ : **K**) bzw. 6 h ( $RI\alpha$ : **C**;  $RI\beta$ : **F**;  $RII\alpha$ : **I**;  $RII\beta$ : **L**) blieben die IRs hinsichtlich Intensität und Lokalisation unverändert. Der Maßstab entspricht 10  $\mu$ m.



Fast sämtliche Rattenpinealozyten wiesen ebenso deutliche IRs für die A Kinase Anker Proteine (AKAP) 95 und 150 auf (Abb. 3.2). Im Gegensatz zu den R-Untereinheiten der PKA I und II waren die AKAP-IRs ungleichmäßig in den Zellen verteilt. Die AKAP 150-IR war ausschließlich zytoplasmatisch und in der Nähe der Zellmembran besonders intensiv (Abb. 3.2A-C). Die AKAP 95-IR war demgegenüber ausschließlich nukleär. Eine starke nukleäre AKAP 95-IR konnte in fast sämtlichen Pinealozyten nachgewiesen werden. Die Nukleoli zeigten keine AKAP 95-IR (Abb. 3.2D-F). Die Stimulation der Zellen mit 1  $\mu$ M NA für 1 h bzw. 6 h beeinflusste weder

die Intensität noch das Verteilungsmuster der AKAP 150– (Abb. 3.2A-C) und AKAP 95–IR (Abb. 3.2D-F).

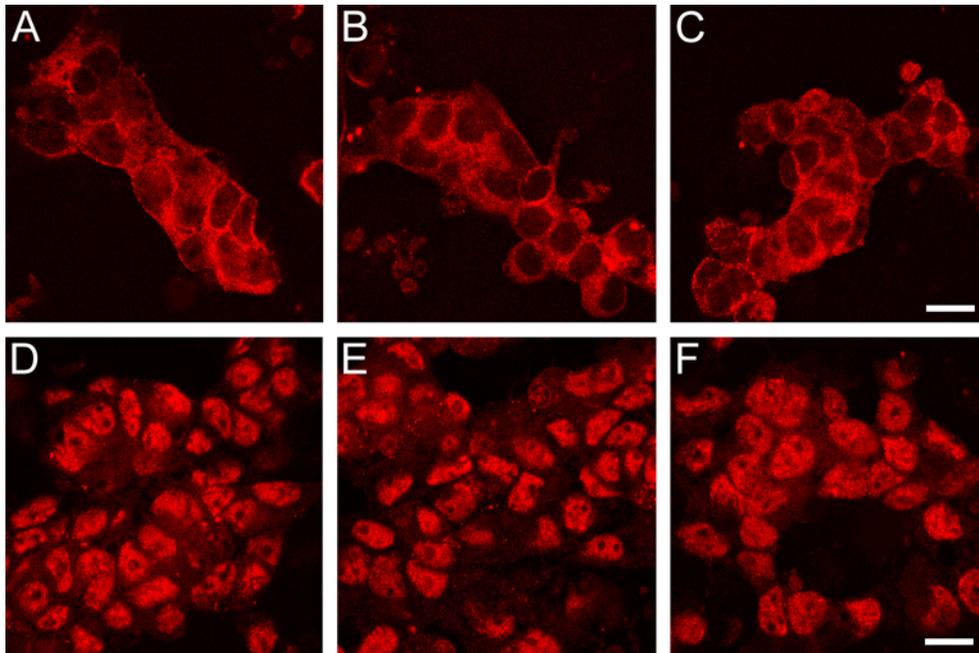


Abb. 3.2: Immunzytochemische Darstellung von AKAP 150 (**A-C**) und AKAP 95 (**D-F**) mittels CY3-konjugierten Sekundärantikörpern in isolierten Pinealozyten der Ratte. Die Zellen blieben unstimuliert (AKAP 150: **A**; AKAP 95 **D**) oder wurden für 1 h (AKAP 150: **B**; AKAP 95: **E**) oder 6 h (AKAP 150: **C**; AKAP 95: **F**) mit 1  $\mu$ M NA stimuliert. Für AKAP 150 (**A-C**) konnte in zahlreichen Pinealozyten eine distinkte Immunreaktivität (IR) in der Nähe der Zellmembran gefunden werden. Die Zellkerne waren durchweg immunnegativ. Im Gegensatz dazu war die AKAP 95-IR ausschließlich nukleär (**D-F**). Die Nukleoli waren nicht gefärbt. Die Intensität und Lokalisation der IRs sowohl von AKAP 150 als auch von AKAP 95 waren nach Stimulation mit 1  $\mu$ M NA konstant (1 h: **B** und **E**; 6 h: **C** und **F**). Der Maßstab beträgt 10  $\mu$ m.

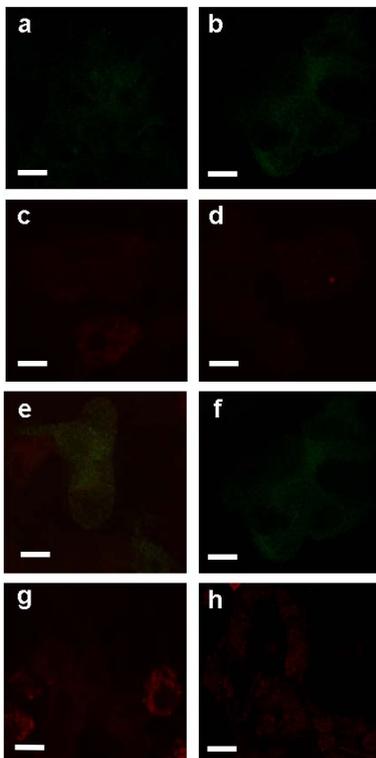


Abb. 3.3: Kontrollen zur Untersuchung der Spezifität sämtlicher in dieser Arbeit in der Immunzytochemie eingesetzten Sekundärantikörper. Die Präparationen wurden an Stelle der primären AK für den gleichen Zeitraum entweder mit normalen Esel- (**a-d**) oder Ziegenserum (**e-h**) inkubiert und anschließend wie im Methodenteil beschrieben mit den entsprechenden Sekundärantikörpern behandelt. (Esel) anti-Ziege IgG Alexa Fluor<sup>®</sup> 488: **a**; (Esel) anti-Kaninchen IgG Alexa Fluor<sup>®</sup> 488: **b**; (Esel) anti-Ziege IgG CY<sup>™</sup>3: **c**; (Esel) anti-Maus IgG CY<sup>™</sup>3: **d**; (Ziege) anti-Kaninchen IgG Alexa Fluor<sup>®</sup> 488: **e**; (Ziege) anti-Maus IgG Alexa Fluor<sup>®</sup> 488: **f**; (Ziege) anti-Kaninchen IgG CY<sup>™</sup>3: **g**; (Ziege) anti-Maus IgG CY<sup>™</sup>3: **h**). Der Maßstab entspricht 10  $\mu$ m.

Keine IR konnte hingegen in Kontrollpräparationen nachgewiesen werden, die anstatt mit den gegen AKAP 150 bzw. AKAP 95 gerichteten primären Antikörpern (AK) mit normalem Esel- oder Ziegenserum inkubiert wurden (Abb. 3.3).

Die Spezifität der AK gegen AKAP 150 und 95 wurde im Immunoblotverfahren getestet. Hier zeigte sich, dass die AK gegen AKAP 150 und AKAP 95 jeweils ein einzelnes Immunsignal mit einem Molekulargewicht (MG) von 150 kDa bzw. 95 kDa in Homogenaten aus Rattenpinealorganen hervorrufen (Abb. 3.4). In Übereinstimmung mit den immunzytochemischen Daten zeigte sich auch im Immunoblot, dass die Signale für AKAP 150 und 95 nach noradrenerger Stimulation unverändert blieben (Abb. 3.4).

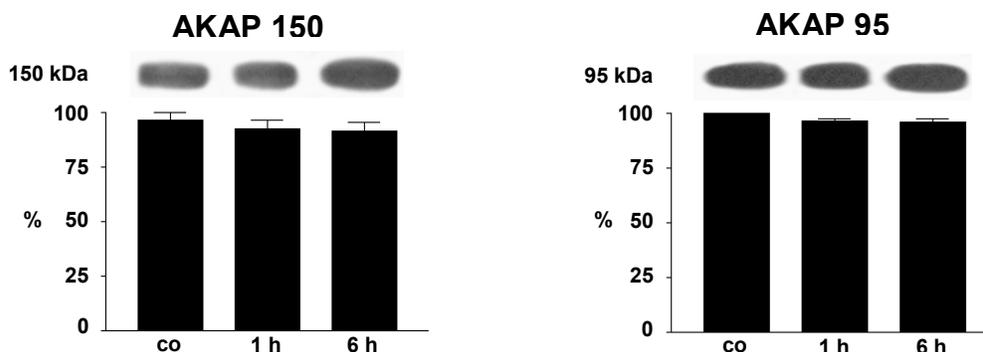


Abbildung 3.4: Immunchemische Untersuchung von AKAP 150 und AKAP 95 in kultivierten Pinealorganen der Ratte. Die Organe waren unbehandelt (co) oder mit  $1\mu\text{M}$  NA für 1 h bzw. 6 h stimuliert. Die Immunsignale aus drei voneinander unabhängigen Präparationen wurden semiquantitativ durch Bestimmung ihrer SUMDENS-Werte ermittelt. Die SUMDENS-Werte der unstimulierten Präparationen (co) wurden als 100% festgelegt. Die Stimulation mit NA verursachte keine signifikanten Veränderungen in den SUMDENS-Werten für beide untersuchten AKAP Isoformen.

In Immunfluoreszenz-Doppelfärbungen zeigte sich, dass die AKAP 150-IR nur partiell mit der IR von  $\text{RI}\alpha$  (Abb. 3.5A-C) und  $\text{RI}\beta$  (Abb. 3.5D-F) überlappt. Eine weitgehende Kolokalisation konnte dagegen für die AKAP 150-IR und den Immunsignalen für  $\text{RII}\alpha$  (Abb. 3.5G-I) bzw.  $\text{RII}\beta$  (Abb. 3.5J-L) nachgewiesen werden. Das Verteilungsmuster dieser Kolokalisationen variierte nicht zwischen unstimulierten- und NA-stimulierten Pinealozyten.

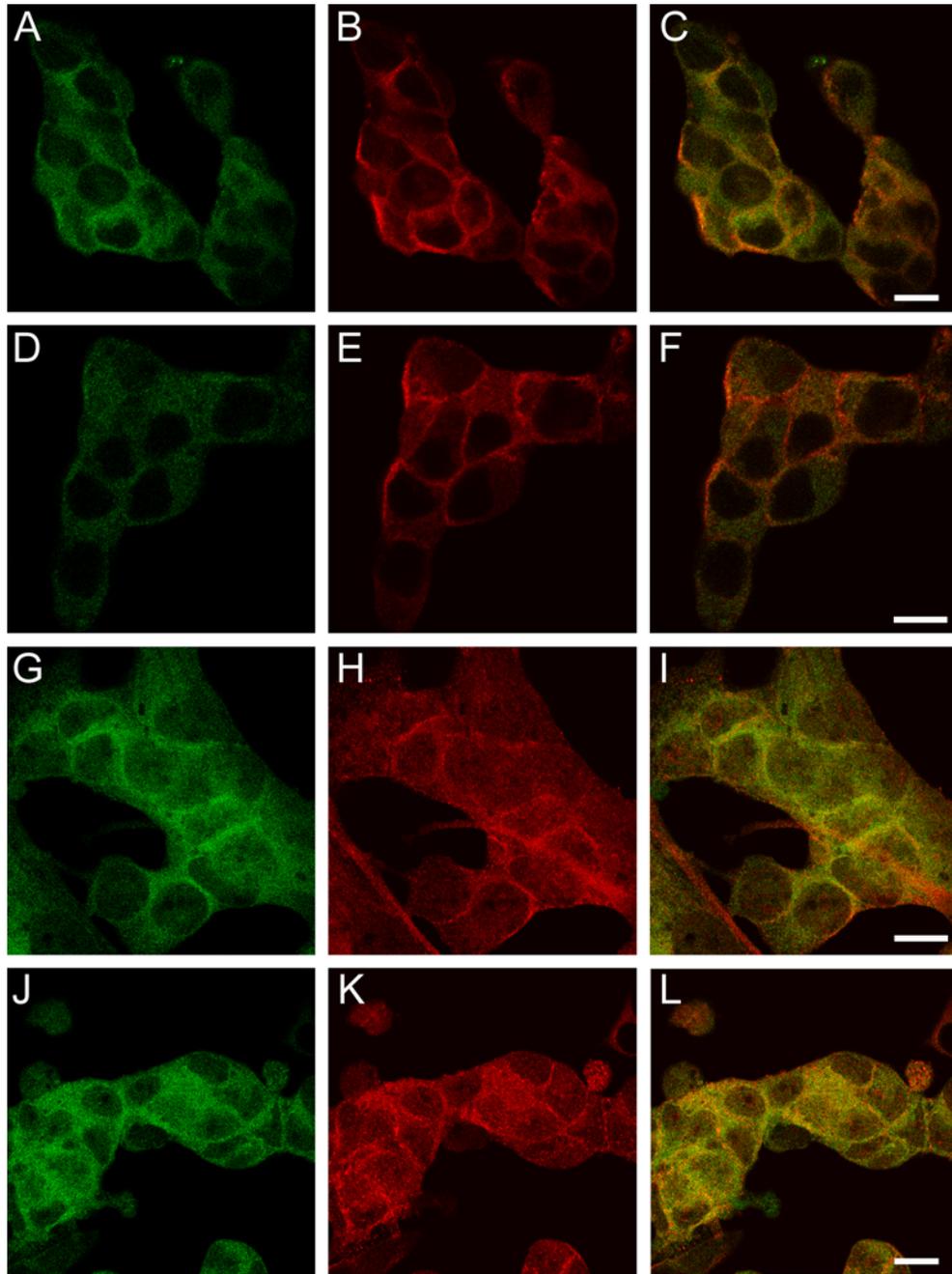


Abb. 3.5: Doppelimmunfluoreszenz von AKAP 150 und den regulatorischen (R)-Untereinheiten der Proteinkinase A (PKA) in isolierten Pinealozyten der Ratte nach einstündiger Behandlung mit  $1\mu\text{M}$  NA. Die R-Untereinheiten werden durch den Alexa Fluor 488-konjugierten Sekundärantikörper dargestellt (RI $\alpha$ : **C**, RI $\beta$ : **F**, RII $\alpha$ : **I**, RII  $\beta$ : **L**). AKAP 150 wird durch den CY3-markierten Sekundärantikörper dargestellt (**B**, **E**, **H** und **K**). In den Überlagerungen ist zu erkennen, dass die RI $\alpha$ -(**C**) und RI $\beta$  (**F**)-IRs nur geringfügig mit der AKAP 150-IR kolokalisieren. Hingegen sind für die IR von AKAP 150 und RII $\alpha$  (**G-I**) bzw. von AKAP 150 und RII $\beta$  (**J-L**) deutliche Kolokalisationen in den Überlagerungen zu erkennen. Intensität und Lokalisation dieser Kolokalisationen blieben im Verlauf der noradrenergen Stimulation unverändert (Daten nicht gezeigt). Der Maßstab entspricht  $10\mu\text{m}$ .

Die AKAP 95-IR im Zellkern der Pinealozyten war zu keinem Zeitpunkt mit den IRs aller R-Untereinheiten der PKA kolokalisiert (Abb.3.6).

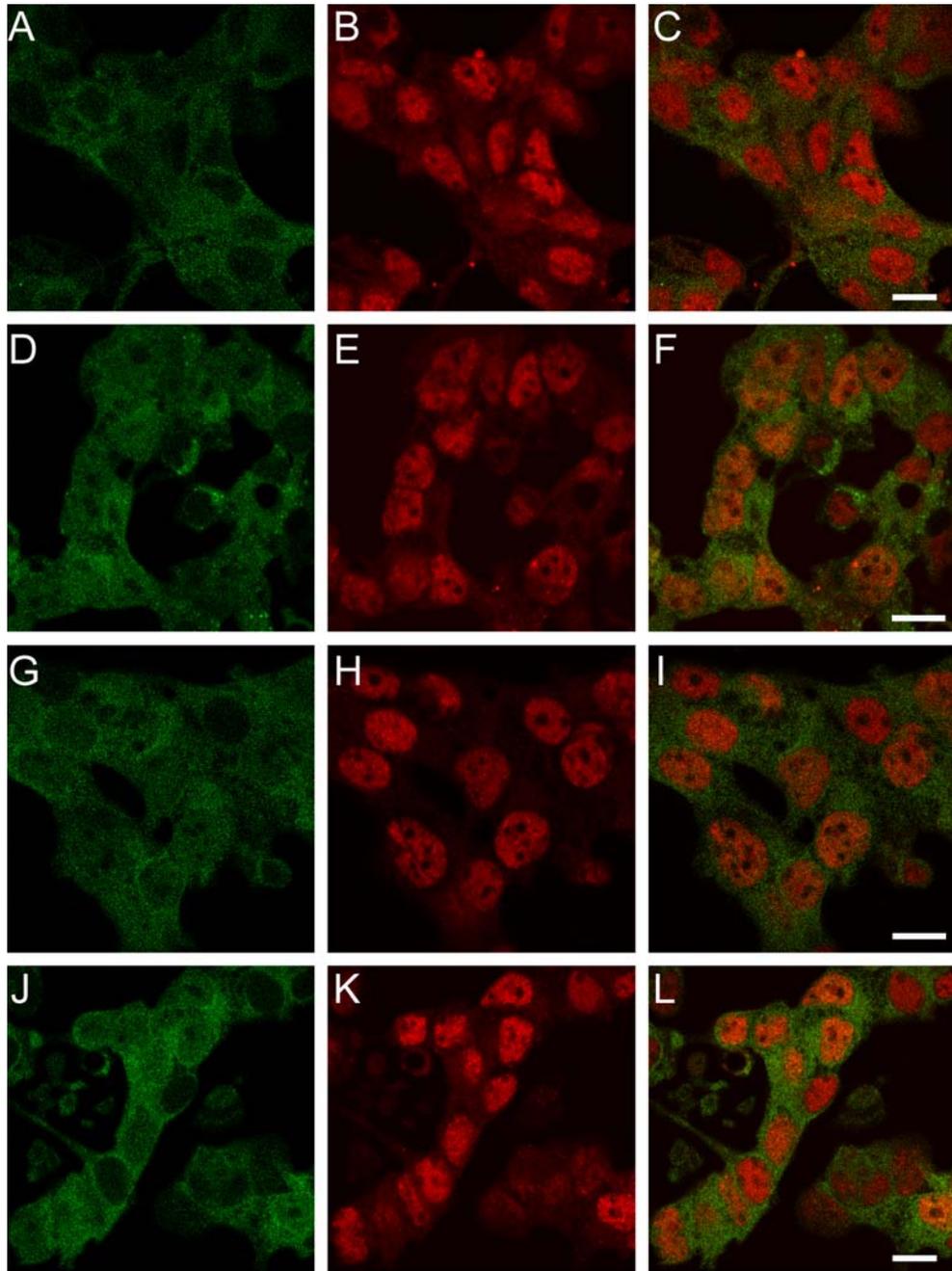


Abb. 3.6: Doppelimmunfluoreszenz von AKAP 95 und den regulatorischen (R)-Untereinheiten der Proteinkinase A (PKA) in isolierten, mit 1  $\mu$ M NA für 1 h stimulierten Pinealozyten der Ratte. Die R-Untereinheiten sind durch den Alexa Fluor 488-konjugierten Sekundärantikörper dargestellt (RI $\alpha$ : **A**; RI $\beta$ : **D**; RII $\alpha$ : **G**; RII $\beta$ : **J**). AKAP 95 wird durch den CY3-gekoppelten Antikörper dargestellt (**B**, **E**, **H** und **K**). Die Immunsignale von AKAP 95 und sämtlichen R-Untereinheiten liegen niemals kolokalisiert vor, wie in den Überlagerungen beider Kanäle zu erkennen ist (RI $\alpha$  mit AKAP 95: **C**; RI $\beta$  mit AKAP 95: **F**; RII $\alpha$  mit AKAP 95: **I**; RII $\beta$  mit AKAP 95: **L**). Der Maßstab beträgt 10  $\mu$ m.

### 3.2 Die Bedeutung von EPAC für die Regulation der Melatoninbiosynthese im Pinealorgan der Ratte - Untersuchungen mit Hilfe des cAMP-Analogs 8-CPT-2'-O-cAMP

Mit dem neu entwickelten EPAC-spezifischen cAMP-Analog 8-(4-Chloro-phenylthio)-2'-O-methyladenosin-cAMP (8-CPT-2'-O-cAMP; Enserink et al. 2002) sollte eine mögliche funktionelle Beteiligung von EPAC (*exchange protein directly activated by cAMP*) 1 und 2 an der Regulation der Melatoninbiosynthese im Pinealorgan der Ratte untersucht werden. Im Gegensatz zu 8-CPT-2'-O-cAMP handelt es sich bei 8-Br-cAMP um ein unspezifisches cAMP-Analog. Daher wurden die Wirkungsweisen der beiden cAMP-Analoga im Vergleich untersucht.

#### 3.2.1 Die Induktion von pCREB durch die cAMP-Analoga 8-CPT-2'-O-cAMP und 8-Br-cAMP in kultivierten Pinealorganen der Ratte

Mit Hilfe der Immunoblot-Technik wurde die Wirkungsweise der beiden cAMP-Analoga 8-CPT-2'-O-cAMP und 8-Br-cAMP auf die Phosphorylierung von CREB am Serin 133 in kultivierten Pinealorganen der Ratte untersucht. Abb. 3.7a zeigt exemplarisch die immunchemische Darstellung von phospho (p)CREB (oben). Zur Überprüfung, ob gegeneinander gleiche Mengen an Protein aufgetragen wurden, wurde der pCREB AK von den Membranen entfernt, um diese dann mit einem AK zu inkubieren, der phosphoryliertes und unphosphoryliertes CREB (totalCREB) erkennt. (Abb. 3.7a, unten). Nach einstündiger Stimulation mit 1  $\mu$ M NA konnten mit dem AK gegen pCREB zwei starke Immunsignale detektiert werden: eine obere Bande mit einem MG von 42 kDa, die zuvor als pCREB identifiziert werden konnte (Schomerus et al. 1996) sowie eine 40 kDa große Bande, die aufgrund von Interaktionen des pCREB Antikörpers mit der phosphorylierten Form des aktivierenden Transkriptionsfaktors 1 (ATF-1; siehe hierzu auch: Cell Signaling Technology Produktkatalog 2002, Beverly, MD, USA; Seite 179) zustande kommt. In unstimulierten Präparationen (Kontrolle) war nur ein sehr schwaches pCREB Signal nachweisbar. Im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle führte eine Stimulation mit 5 mM sowie 500  $\mu$ M 8-Br-cAMP für 1 h zu einer starken Zunahme der pCREB-IR. Hingegen kam es durch die Stimulation mit 10  $\mu$ M 8-CPT-2'-O-cAMP für 1 h im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle nur zu einer mäßigen, mit 1  $\mu$ M 8-CPT-2'-O-cAMP für 1 h zu keiner

Induktion der pCREB-IR. In Abb. 3.7b ist die semiquantitative Analyse der pCREB-IR dargestellt. Angegeben sind die SUMDENS-Werte der einzelnen pCREB-Immunsignale. Die pCREB-IR nach einstündiger Stimulation mit 1  $\mu$ M NA wurde als 100% festgesetzt. Die SUMDENS-Werte von pCREB wurden gegen den entsprechenden Wert von totalCREB normalisiert.

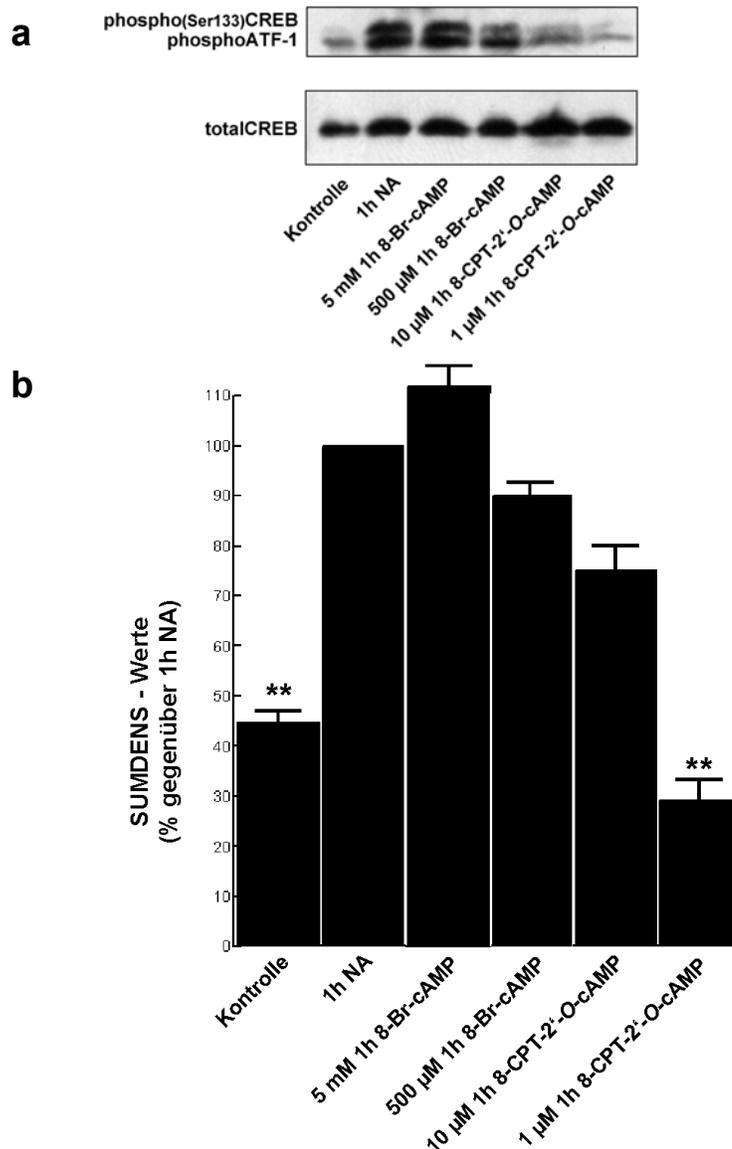


Abb. 3.7: (a) Immunchemische Darstellung von phospho (p)CREB (oben) sowie totalCREB (unten) in kultivierten Pinealorganen der Ratte. Die Organe waren entweder unbehandelt (Kontrolle) oder mit 1  $\mu$ M NA bzw. mit den cAMP-Analoga 8-Br-cAMP (5mM oder 500  $\mu$ M) bzw. 8-CPT-2'-O-cAMP (10  $\mu$ M oder 1  $\mu$ M) für 1 h stimuliert worden. Nach einstündiger Stimulation mit 1  $\mu$ M NA kam es zu einer starken Induktion der pCREB- und pATF-1-IR. In den Kontrollen war die pCREB-IR kaum, die pATF-1-IR nur schwach nachweisbar. Die Stimulation mit 5 mM oder 500  $\mu$ M 8-Br-cAMP induzierte sowohl ein starkes Immunsignal für pATF-1 als auch für pCREB. Hingegen induzierte die Stimulation mit 10  $\mu$ M 8-CPT-2'-O-cAMP sowohl eine schwache pATF-1- als auch pCREB-IR; mit 1  $\mu$ M 8-CPT-2'-O-cAMP konnte weder eine pATF-1- noch eine pCREB-IR induziert werden. (b) Semiquantitative Analyse der Immunoblotdaten (n = 3). Die SUMDENS-Werte der mit 1  $\mu$ M NA für 1 h stimulierten Präparationen wurden als 100% festgelegt. Die statistische Analyse erfolgte durch ANOVA mit anschließendem Zusatztest nach Bonferroni.



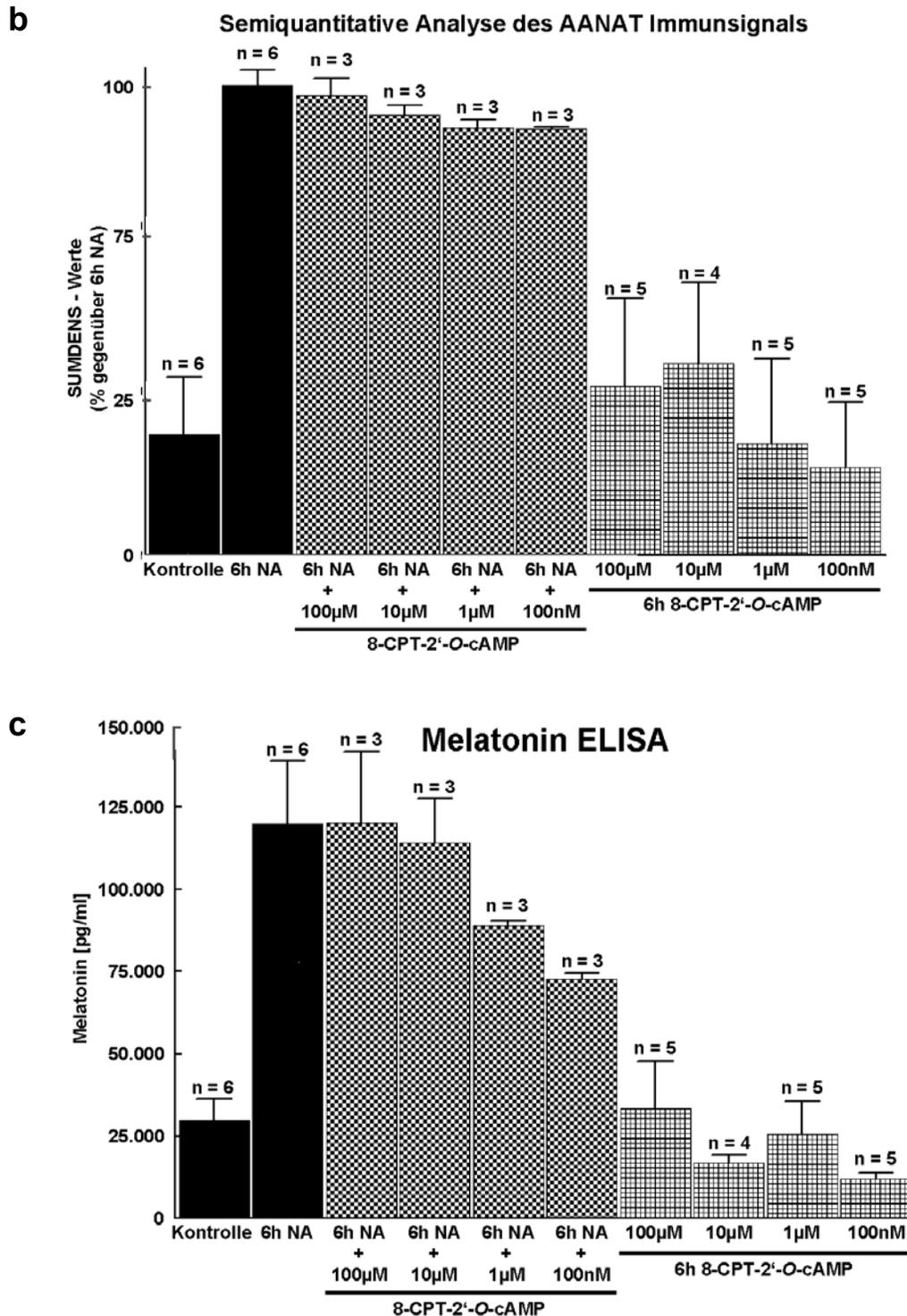


Abb. 3.8: (a) Repräsentativer Immunoblot für die AANAT in kultivierten Pinealorganen der Ratte. Nach Stimulation mit 1 µM NA für 6 h kam es zu einer starken Induktion der AANAT-IR, die in unstimulierten Kontrollen nicht nachweisbar war. Die Stimulation mit dem EPAC-spezifischen cAMP-Analog 8-CPT-2'-O-cAMP in 4 verschiedenen Konzentrationen (100 µM, 10 µM, 1 µM oder 100 nM) führte zu keiner Induktion der AANAT-IR. Die Koapplikation von 1 µM NA mit 8-CPT-2'-O-cAMP verursachte eine ebenso starke Induktion der AANAT-IR wie in den Präparationen, welche ausschließlich mit 1 µM NA behandelt wurden. (b) Darstellung der semiquantitativen Analyse der AANAT-IR. Die SUNDENS-Werte für die sechsstündige Stimulation mit 1 µM NA wurden als 100% festgelegt. Die statistische Auswertung erfolgte durch ANOVA mit anschließendem Zusatztest nach Bonferroni. (c) Melatonin-

Bestimmung im Kulturmedium von Pinealorganen der Ratte. Nach sechsständiger Stimulation mit 1  $\mu\text{M}$  NA kam es zu einer etwa 5fach erhöhten Freisetzung von Melatonin in das Kulturmedium. Eine Behandlung mit 4 unterschiedlichen Konzentrationen an 8-CPT-2'-O-cAMP (100  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{M}$  oder 100 nM) führte gegenüber der unbehandelten Kontrolle zu keiner Erhöhung der Melatoninfreisetzung. Die Koapplikation von 1  $\mu\text{M}$  NA mit 1  $\mu\text{M}$  bzw. 100 nM 8-CPT-2'-O-cAMP verursachte eine leichte Abnahme der Melatoninsekretion gegenüber der ausschließlich mit 1  $\mu\text{M}$  NA stimulierten Präparationen. Diese Abnahme war in der statistischen Auswertung jedoch nicht signifikant (ANOVA mit anschließendem Zusatztest nach Bonferroni).

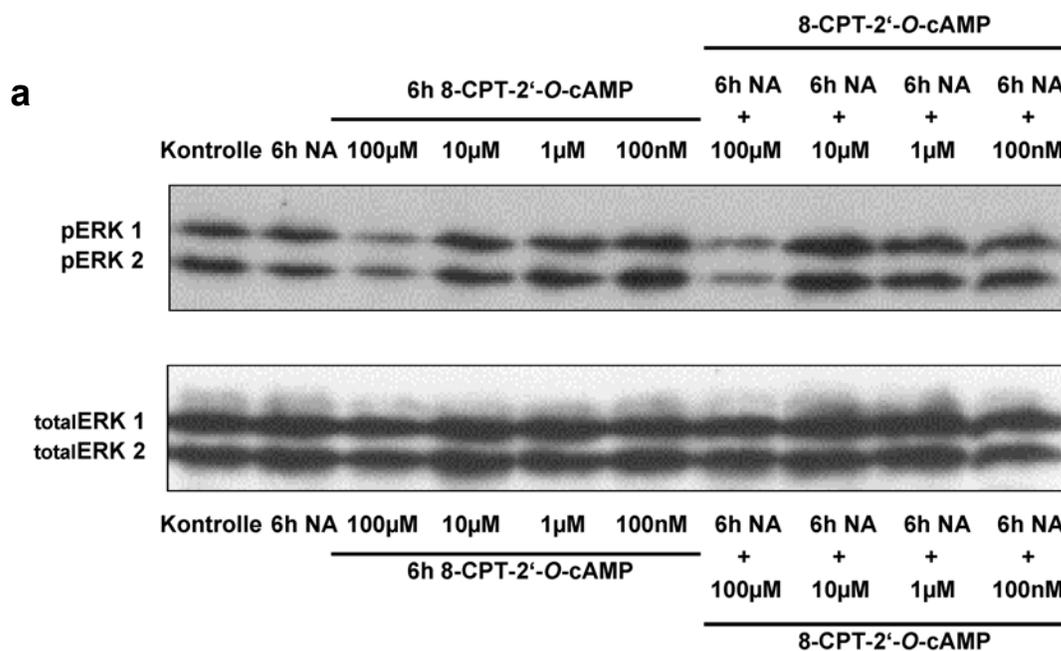
Die Melatoninfreisetzung aus kultivierten Pinealorganen der Ratte wurde mit Hilfe eines kompetitiven ELISAs bestimmt. Im Vergleich zu unstimulierten Kontrollpräparaten kam es nach sechsständiger Stimulation mit 1  $\mu\text{M}$  NA zu einem ungefähr 5fachen Anstieg in der Melatoninfreisetzung (Abb. 3.8c). Durch Koapplikation von 1  $\mu\text{M}$  NA mit 8-CPT-2'-O-cAMP in vier unterschiedlichen Konzentrationen (100  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{M}$  oder 100 nM) für 6 h kam es gegenüber der unstimulierten Kontrolle ebenfalls zu einem deutlichen Anstieg in der Melatoninfreisetzung. Im Vergleich zur alleinigen Stimulation der Pinealorgane mit 1  $\mu\text{M}$  NA war dieser Anstieg jedoch niedriger. Die statistische Auswertung (ANOVA mit anschließendem Zusatztest nach Bonferroni) erbrachte allerdings keinen signifikanten Unterschied in der Abnahme der Melatoninfreisetzung. Die ausschließliche Behandlung der Pinealorgane mit 8-CPT-2'-O-cAMP zeigte gegenüber den unstimulierten Kontrollpräparationen keinen signifikanten Unterschied in der Melatoninfreisetzung.

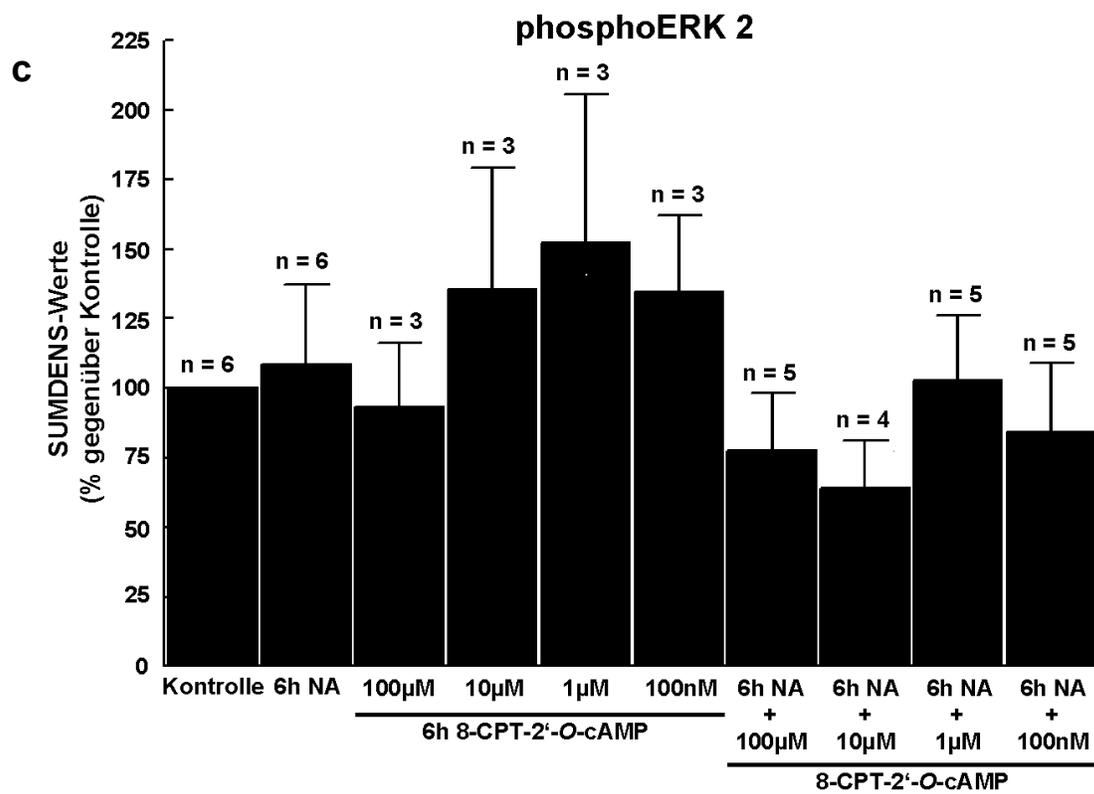
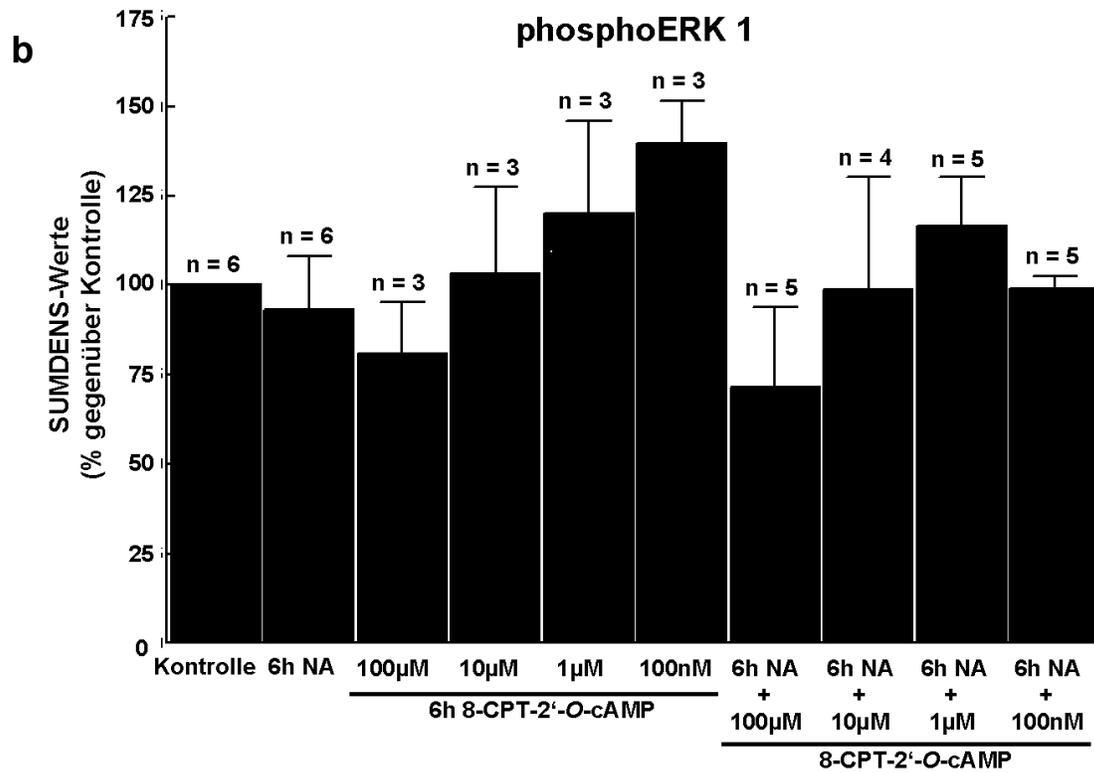
### 3.2.3 Einfluss von 8-CPT-2'-O-cAMP auf die Phosphorylierung der extrazellulär regulierten Kinasen (ERK) 1 und 2

In Abb. 3.9a ist ein exemplarischer Immunoblot für die extrazellulär regulierten Kinasen (ERK) 1 und 2 dargestellt. Im oberen Teil der Abbildung wird jeweils die aktivierte, d. h. die am Threonin 202 und Tyrosin 204 phosphorylierte (p) Form der ERK 1 (pERK 1, obere Bande, 44 kDa) sowie ERK 2 (pERK 2, untere Bande, 42 kDa) dargestellt. Im unteren Teil der Abbildung ist dieselbe Membran nach Entfernung des AK gegen die phosphorylierte Form und einer anschließenden Inkubation mit einem AK, welcher die ERK 1 und 2 unabhängig vom Phosphorylierungszustand detektiert, zu erkennen (totalERK 1, obere Bande, 44 kDa; totalERK 2, untere Bande, 42 kDa). Die Banden für pERK 1 und 2 wurden in der semiquantitativen Auswertung (pERK 1, Abb. 3.9b; pERK 2, 3.9c) gegen das entsprechende Immunsignal für totalERK 1 und 2 normalisiert. In nicht-stimulierten Präparationen waren zwei starke Immunsignale

mit den korrespondierenden MGs von 44 kDa bzw. 42 kDa für pERK 1 bzw. pERK 2 nachweisbar (Abb. 3.9a). Die Intensität dieser Immunsignale wurde für die semi-quantitative Analyse als 100% festgelegt. Die Stimulation mit 1  $\mu$ M NA für 6 h hatte keinen Effekt auf die Intensität beider IR. Ebenso erzielte die Stimulation mit 8-CPT-2'-O-cAMP (100  $\mu$ M, 10  $\mu$ M, 1  $\mu$ M oder 100 nM) weder für pERK 1 noch für pERK 2 eine signifikante Veränderung in der Signalstärke. Eine Koapplikation von 1  $\mu$ M NA mit 8-CPT-2'-O-cAMP (100  $\mu$ M, 10  $\mu$ M, 1  $\mu$ M oder 100 nM) induzierte ebenfalls keine signifikanten Veränderungen in der Signalstärke von pERK 1 und 2, wie aus der semi-quantitativen Analyse für pERK 1 (Abb. 3.9b) und pERK 2 (Abb. 3.9c) hervorgeht.

Abb. 3.9: (a) Repräsentativer Immunoblot für pERK 1 und 2 (oben) sowie totalERK 1 und 2 (unten) in kultivierten Pinealorganen der Ratte. (a) In den unstimulierten Kontrollen ist sowohl für pERK 1 (44 kDa, obere Bande) als auch für pERK 2 (42 kDa, untere Bande) eine starke IR zu erkennen. Die sechsstündige Stimulation mit 1  $\mu$ M NA hatte keinen Einfluss auf die Intensität dieser IRs. Die alleinige Applikation hoher Konzentrationen an 8-CPT-2'-O-cAMP (100  $\mu$ M) verursachte eine geringfügige Abnahme des Immunsignals. Dieser Effekt war ebenso bei einer Koapplikation von 100  $\mu$ M 8-CPT-2'-O-cAMP mit 1  $\mu$ M NA nachweisbar. Unter keiner der Stimulationsbedingungen kam es zu einer Veränderung der Signalstärke für totalERK 1 und 2. Deren Immunsignale wurden zur Normalisierung der korrespondierenden pERK 1- und 2-IR in der semiquantitativen Analyse herangezogen. (b) Semiquantitative Auswertung der pERK 1-IR. (c) Semiquantitative Auswertung der pERK 2-IR. Die SUMDENS-Werte der unstimulierten Kontrollen wurden als 100% festgesetzt. Die statistische Analyse ergab keine signifikanten Veränderungen in der Intensität von pERK 1 und 2 während des Stimulationsverlaufs (ANOVA mit anschließendem Zusatztest nach Bonferroni).





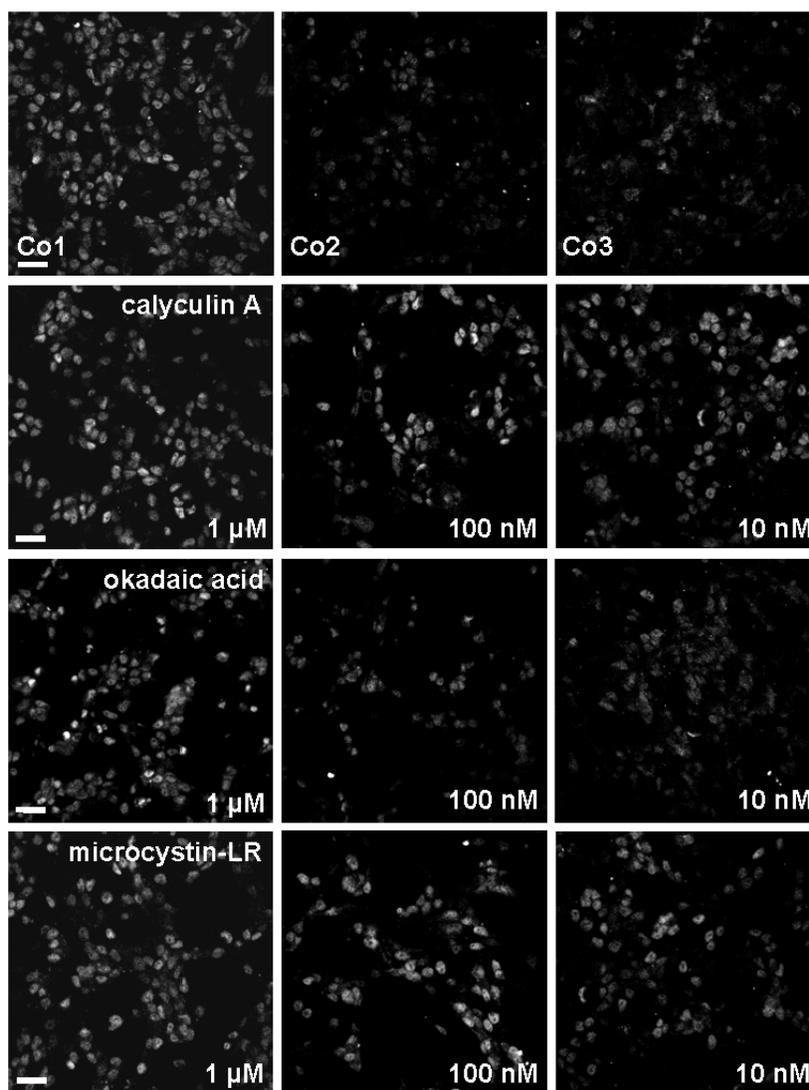
### 3.3 Die gezielte Dephosphorylierung von pCREB spielt bei der Inaktivierung der *Aa-nat* Transkription in Pinealozyten der Ratte eine wichtige Rolle

#### 3.3.1 Die nach NA-Entzug erfolgte pCREB Dephosphorylierung wird durch Zugabe von PSP-Inhibitoren verhindert

Immunzytochemische Studien zeigten eine starke Induktion der nukleären pCREB-IR nach 30minütiger Stimulation mit 1  $\mu$ M NA (Kontrolle (Co) 1, Abb. 3.10) im Vergleich zu einer basalen pCREB-IR in nicht-stimulierten Rattenpinealozyten (Co 3, Abb. 3.10). Nach Entzug des NA-Stimulus (durch zweimaliges Wechseln des Kulturmediums) kam es innerhalb von 30 min zu einer rapiden Abnahme des pCREB-Immunsignals (Co2, Abb. 3.10). Die Abnahme der pCREB-IR konnte durch die unmittelbar nach Entzug des NA-Stimulus erfolgte Zugabe von Protein Serin/Threonin Phosphatase (PSP)-Inhibitoren blockiert werden. Dabei kamen die PSP-Inhibitoren Calyculin A (Caly A), Microzystin-LR (Micro-LR) und Okadainsäure (OA) in jeweils drei unterschiedlichen Konzentrationen (1  $\mu$ M, 100 nM oder 10 nM) zum Einsatz. Diese Inhibitoren besitzen gegenüber der PSP Typ 1 und 2A unterschiedlich selektive Potenzen für deren Inhibierung. Alle drei Inhibitoren konnten die Abnahme der nukleären pCREB-IR dosis-abhängig abschwächen; jedoch zeigte sich, dass Konzentrationen von 100 nM oder 10 nM Caly A sowie Micro-LR die Dephosphorylierung von pCREB stärker inhibierten als gleich hohe Konzentrationen von OA (Abb. 3.10).

---

Abb. 3.10: Einfluss von Protein Serin/Threonin Phosphatase (PSP)-Inhibitoren auf die pCREB-IR in Pinealozyten der Ratte: Immunzytochemische Darstellung. Die Stimulation mit 1  $\mu$ M NA für 30 min evozierte ein starkes nukleäres Immunsignal (*co1*) im Vergleich zu unstimulierten Zellen (*co3*). Nach Entzug des Stimulus kam es innerhalb von 30 min zu einer rapiden Abnahme der pCREB-IR bis hin zur basalen pCREB-IR in unstimulierten Zellen (*co2*). Die PSP-Inhibitoren *Calyculin A*, *Okadainsäure* und *Microzystin-LR* verursachten eine dosisabhängige Inhibierung der pCREB Dephosphorylierung. Dabei zeigte sich, dass bei Konzentrationen von 100 nM oder 10 nM *Calyculin A* und *Microzystin-LR* die Dephosphorylierung von pCREB effektiver hemmten als zu gleichen Konzentrationen eingesetzte Okadainsäure. Der Maßstab beträgt 10  $\mu$ m.



Diese Beobachtungen konnten in immunchemischen Untersuchungen bekräftigt werden (Abb. 3.11). In Präparationen, die mit 1 μM NA für 30 min stimuliert wurden, konnten zwei starke Immunsignale detektiert werden: eine Bande, die zuvor als pCREB identifiziert werden konnte (Schomerus et al. 1996) sowie eine 40 kDa Bande, die auf Interaktionen des pCREB Antikörpers mit einem pCREB-verwandten Antigen, vermutlich der phosphorylierten Form des aktivierenden Transkriptionsfaktors 1 (ATF-1; siehe hierzu auch: Cell Signaling Technology Produktkatalog 2002, Beverly, MD, USA; Seite 179) beruht. In nicht-stimulierten Präparationen sind diese beiden Banden wesentlich schwächer (Co 3, Abb. 3.11). Die unmittelbare Applikation von Caly A oder Micro-LR (beide zu 10 nM) nach Entzug des NA-Stimulus konnte die Dephosphorylierung von pCREB im Vergleich zu Präparationen, die nach Entfernung des noradrenergen Stimulus im Anschluss ebenfalls für 30 min in Kulturmedium ohne PSP Inhibitoren inkubiert wurden (Co 2),

signifikant hemmen (Abb. 3.11). Im Gegensatz dazu war die Wirkung von OA auf die Inhibierung der pCREB Dephosphorylierung ausschließlich bei einer höheren Konzentration von 1  $\mu\text{M}$  signifikant (Abb. 3.11).

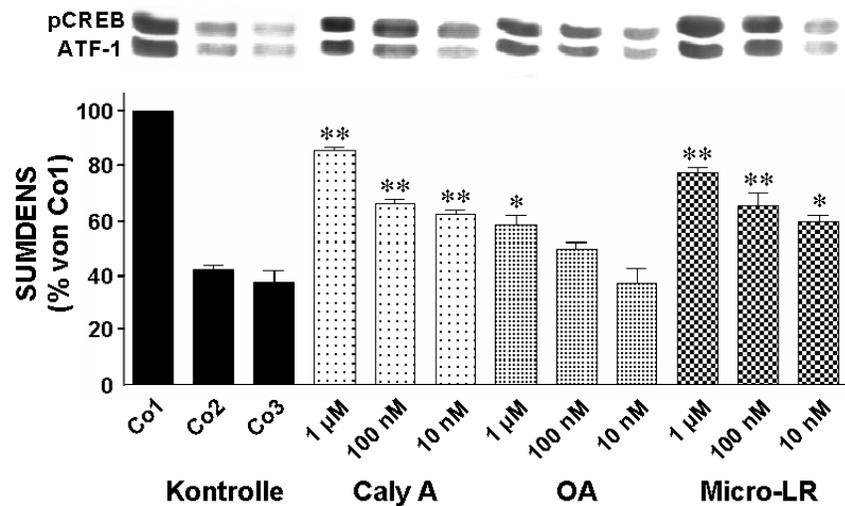


Abb. 3.11: Einfluss von PSP-Inhibitoren auf die pCREB-IR in Pinealorganen der Ratte: Immunchemische Darstellung. (oben) Die Stimulation mit 1  $\mu\text{M}$  NA für 30 min führte zu einer starken Induktion des pCREB- sowie pATF-1-Immunsignals (Co1) im Vergleich zu unstimulierten Präparationen (Co3). Nach Entzug des Stimulus nahm die pCREB-IR innerhalb von 30 min bis zu den basalen pCREB-Werten in unstimulierten Präparationen ab (Co2). Die Behandlung mit PSP-Inhibitoren direkt nach Entfernung des Stimulus führte zur dosisabhängigen Inhibierung der pCREB Dephosphorylierung. Besonders zu beachten ist, dass Calyculin A und Microzystin-LR bei Konzentrationen von 100 nM oder 10 nM die Dephosphorylierung von pCREB effektiver als equimolare Konzentrationen an Okadainsäure inhibierten. (unten) Semiquantitative Analyse der Immunoblotdaten (n = 4). Die pCREB SUMDENS-Werte der Präparationen, welche für 30 min mit NA stimuliert wurden (Co1), sind als 100% festgelegt worden (\*\*p < 0.001, \* < 0.05 gegenüber Co2).

3.3.2 ICER wurde weder durch Entzug des NA-Stimulus noch durch Applikation der PSP-Inhibitoren akut beeinflusst

Immunzytochemische Untersuchungen wiesen eine moderate ICER-IR im Zellkern unstimulierter Pinealozyten der Ratte nach (Co3, Abb. 3.12). Die Behandlung mit 1  $\mu\text{M}$  NA für 6 h verstärkte die nukleäre ICER-IR signifikant um das zwei- bis dreifache (Co1, Abb. 3.12). Nach Entfernung des NA-Stimulus kam es innerhalb von 30 min zu keiner signifikanten Veränderung der ICER-IR (Co2, Abb. 3.12). Ebenso beeinflusste die Anwendung der PSP-Inhibitoren Calyculin A sowie Okadainsäure unmittelbar nach Entzug des noradrenergen Stimulus nicht die ICER-IR im Vergleich zur ICER-IR in Pinealozyten nach sechsstündiger Stimulation mit 1  $\mu\text{M}$  NA (Co 1, Abb. 3.12).

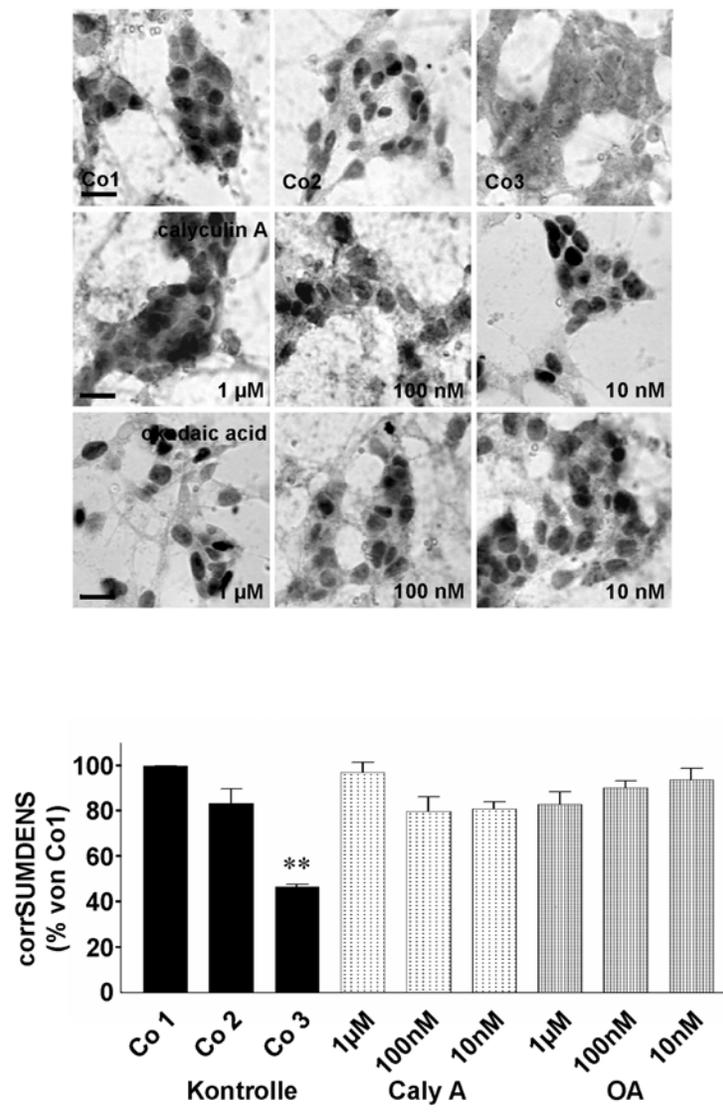


Abb. 3.12: Die PSP-Inhibitoren hatten keinen Einfluss auf die ICER-IR in Pinealozyten der Ratte. (oben) Die Stimulation mit 1  $\mu\text{M}$  NA führte nach 6 h zu einer starken Induktion des ICER Immunsignals in den Zellkernen der Rattenpinealozyten (Co1) im Vergleich zu moderaten Immunsignalen in unstimulierten Zellen (Co3). Der Entzug des NA-Stimulus beeinflusste nicht die nukleäre ICER-IR innerhalb von 30 min (Co2) verglichen mit Co1. Die Anwendung der PSP-Inhibitoren Calyculin A und Okadainsäure unmittelbar nach Stimulusentzug beeinflusste ebenso nicht die ICER-IR. (unten) Semi-quantitative Analyse der immunzytochemischen Daten ( $n = 3$ ). Die corrSUMDENS-Werte von Co1 wurden als 100% festgelegt (\*\* $p < 0.001$  gegenüber Co3). Der Maßstab beträgt 10  $\mu\text{m}$ .

### 3.3.3 PSP-Inhibitoren vermindern die durch NA-Entzug verursachte Abnahme der *Aanat* mRNA und des AANAT-Proteingehalts

In Northern Blot Experimenten wurde der Einfluss von PSP-Inhibitoren auf den *Aanat* mRNA-Gehalt in Pinealozyten der Ratte untersucht (Abb. 3.13A). In unstimulierten Präparationen (Co3, Abb 3.13A) war nahezu keine *Aanat* mRNA nachweisbar. Nach sechsstündiger Stimulation mit 1  $\mu\text{M}$  NA konnte ein starkes mRNA-Signal detektiert

werden, welches der zu erwartenden Größe für die *Aanat* mRNA entsprach (639 bp; Co1, Abb. 3.13A). Der Entzug des NA-Stimulus führte innerhalb von 30 min zu einer Abnahme der *Aanat* mRNA (Co2, Abb. 3.13A). Die Abnahme des *Aanat* mRNA-Gehalts konnte durch Zugabe von 1  $\mu$ M des PSP-Inhibitors Calyculin A unmittelbar nach Entzug von NA komplett gehemmt werden. Im Gegensatz dazu konnte 1  $\mu$ M Okadainsäure die Abnahme nur vermindern.

Mit Hilfe des Immunoblotverfahrens konnte gezeigt werden, dass die PSP-Inhibitoren ebenso den AANAT-Proteingehalt beeinflussten. Ein schwaches Immunsignal konnte für die AANAT in unstimulierten Präparationen nachgewiesen werden (Co3, Abb. 3.13B). Nach sechsstündiger Stimulation mit 1  $\mu$ M NA erfolgte eine starke Induktion der AANAT (Co1). Nach Entzug des Stimulus kam es innerhalb von 30 min zu einem rapiden Abfall des AANAT-Proteingehalts (Co2). Dieser Abfall konnte durch die Zugabe von 1  $\mu$ M Calyculin A oder 1  $\mu$ M Microcystin-LR unmittelbar nach NA-Entzug vollständig verhindert werden. Bei einer Applikation von 100 nM Calyculin, 100 nM Microcystin-LR oder 1  $\mu$ M Okadainsäure wurde der Abfall des AANAT-Proteingehalts signifikant vermindert.

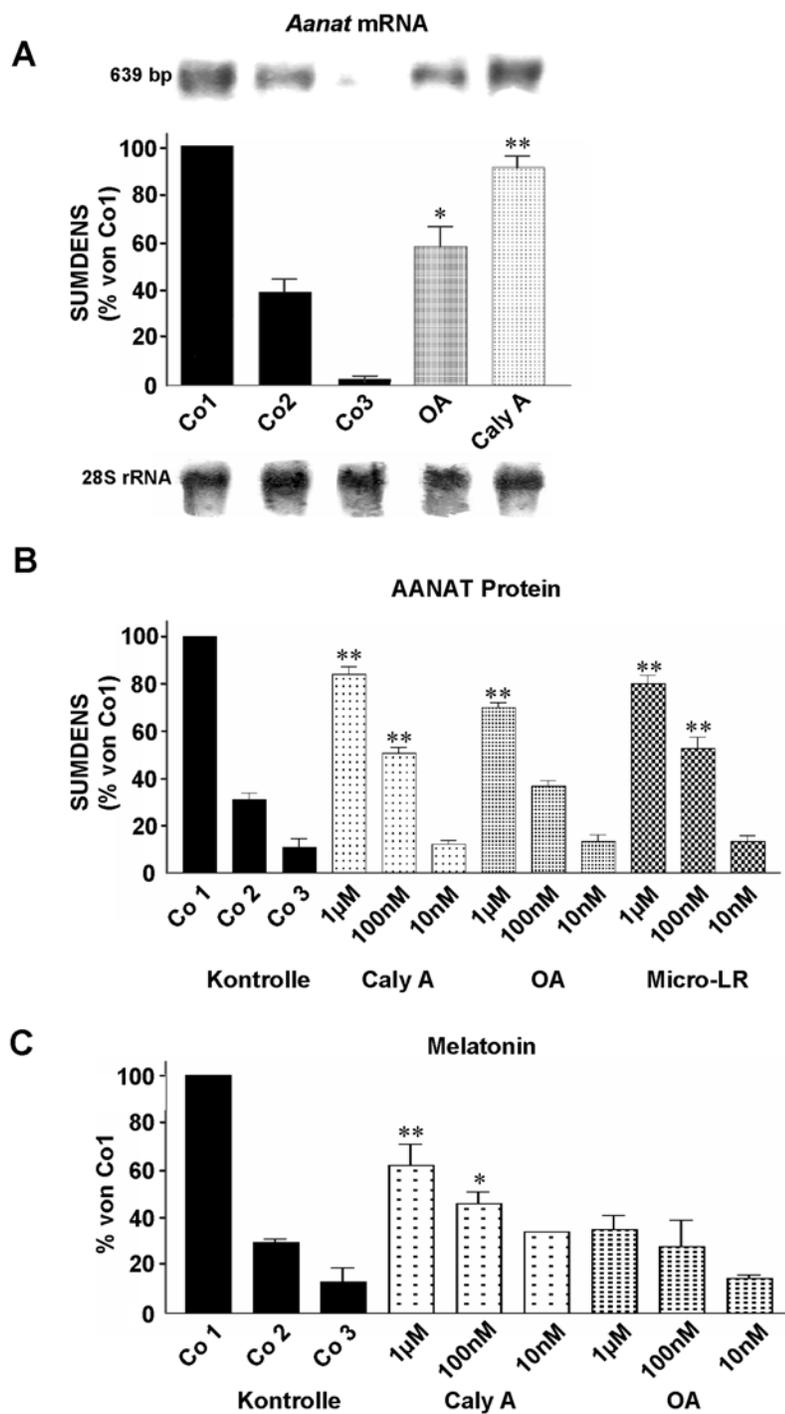


Abb. 3.13: Der Einfluss von NA und PSP-Inhibitoren auf die *Aanat* mRNA (A), den AANAT-Proteingehalt (B) sowie die Melatonin synthese (C) in kultivierten Pinealorganen der Ratte. (A) Repräsentativer Northern Blot und semiquantitative Auswertung der *Aanat* mRNA-Werte. Die Stimulation mit 1 µM NA für 6 h induzierte ein 639 bp großes Signal, welches der bekannten Größe der *Aanat* mRNA entsprach (Co1). In nicht-stimulierten Präparationen war die *Aanat* mRNA nahezu nicht nachweisbar (Co3). Nach Entzug von NA kam es innerhalb von 30 min zu einer deutlichen Abnahme der *Aanat* mRNA (Co2). Diese Abnahme konnte durch die Applikation von Calyculin A (Caly A; 1µM) blockiert und durch die Zugabe von Okadaïnsäure (OA; 1µM) abgeschwächt werden. Zur semiquantitativen Auswertung wurden die *Aanat* mRNA Werte (n = 3) gegen das korrespondierende Signal für die 28S

rRNA normalisiert. Der Gehalt von Co1 wurde als 100% festgelegt (\*\*p < 0.001, \*p < 0.05 gegenüber Co2). (B) Im Vergleich zu unstimulierten Pinealorganen (Co3) verursachte die Stimulation mit 1  $\mu$ M NA für 6 h eine starke Zunahme des AANAT-Proteingehalts (Co1). Nach Entzug von NA kam es innerhalb von 30 min zu einer starken Abnahme des AANAT-Proteingehalts (Co2). Diese Abnahme wurde durch 1  $\mu$ M Calyculin A (Caly A) oder 1  $\mu$ M Microzystin – LR (Micro – LR) komplett gehemmt. Durch die Applikation von 1  $\mu$ M Okadainsäure (OA), 100 nM Calyculin A (Caly A) oder 100 nM Microzystin – LR (Micro – LR) konnte die Abnahme des AANAT-Proteingehalts abgeschwächt werden (\*\*p < 0.001 gegenüber Co2). Zur semiquantitativen Analyse wurden die Werte von Co1 als 100% festgesetzt. (C) Im Vergleich zu unstimulierten Pinealorganen (Co3) verursachte die Stimulation mit 1  $\mu$ M NA einen Anstieg der Melatoninfreisetzung. Zunächst wurden die Präparationen mit 1  $\mu$ M NA für 6 h behandelt. Darauf erfolgte ein Wechsel des Kulturmediums. Die Kulturen wurden dann entweder für 30 min mit 1  $\mu$ M NA (Co1), ohne NA (Co2) oder unmittelbar nach NA-Entzug mit Calyculin A (Caly A) bzw. Okadainsäure (OA) in jeweils drei unterschiedlichen Konzentrationen behandelt. Die Abnahme der Melatoninsekretion wurde durch die Applikation von 1  $\mu$ M und 100 nM Calyculin A (Caly A) blockiert und durch die Zugabe von Okadainsäure abgeschwächt (OA). Für die semiquantitative Analyse wurden die Melatonin-Werte von Co1 als 100% festgesetzt (\*\*p < 0.001, \*p < 0.05 gegenüber Co2).

---

### 3.3.4 Nach NA-Entzug können die PSP-Inhibitoren die Abnahme der Melatoninfreisetzung abschwächen

Um den Einfluss von PSP-Inhibitoren auf die Melatoninfreisetzung zu untersuchen, wurden Pinealorgankulturen zunächst mit 1  $\mu$ M NA für 6 h inkubiert. Darauf erfolgte ein Wechsel des Kulturmediums. Unmittelbar nach Entzug des NA-Stimulus wurden Organkulturen entweder für weitere 30 min mit 1  $\mu$ M NA (Co1, Abb. 3.13C), ohne NA (Co2) oder mit den PSP-Inhibitoren Calyculin A bzw. Okadainsäure in jeweils drei verschiedenen Konzentrationen inkubiert. Kontrolle 3 (Co3) stellt Präparationen dar, die zu keinem Zeitpunkt der Untersuchungen mit NA behandelt wurden. Nach Entzug des NA-Stimulus kam es innerhalb von 30 min zu einer deutlichen Abnahme der Melatoninfreisetzung (Co2). Durch die Zugabe von 1  $\mu$ M Okadainsäure oder 100 nM Calyculin A konnte diese Abnahme signifikant verringert werden (Abb. 3.13C).

### 3.3.5 Die noradrenerge Stimulation bewirkt eine Umverteilung des PSP 1-Immunsignals

In Pinealorganen der Ratte wurden die  $\alpha$ -katalytischen Untereinheiten der PSP 1 und PSP 2A (CSU-PSP 1, CSU-PSP 2A) mit Hilfe des Immunoblotverfahrens und der Immunzytochemie charakterisiert. In Homogenaten aus Rattenpinealorganen erkannte der gegen die CSU-PSP 1 gerichtete AK eine Bande von 34 kDa Größe. Diese Bande entsprach dem bekannten MG für die CSU-PSP 1. Die Intensität des PSP 1-Immunsignals blieb während der Stimulation mit 1  $\mu$ M NA für 1 h, 6 h und 8 h im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle unverändert (Abb. 3.14A). Der AK gegen die

CSU-PSP 2A erkannte eine Bande von 36 kDa Größe. Dies entsprach der bekannten Molekülgröße der CSU-PSP 2A. Die Signalstärke blieb im Verlauf der noradrenergen Stimulation unverändert (Abb. 3.14B).

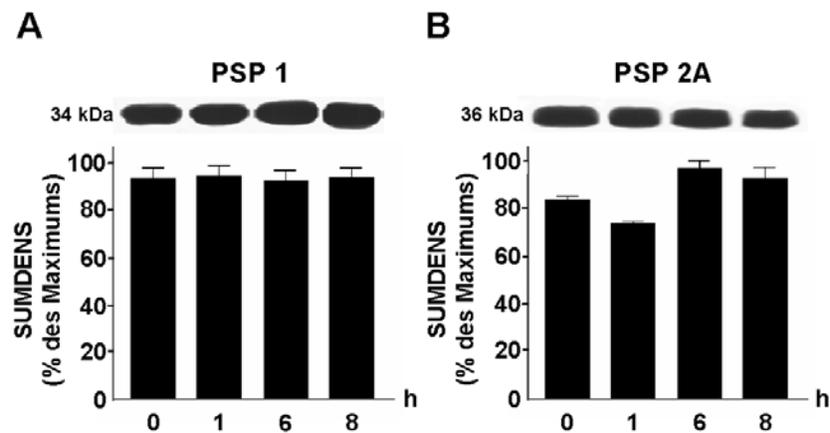


Abb. 3.14: Immunchemische Darstellung der CSU-PSP 1 (A) und CSU-PSP 2A (B) in Homogenaten aus kultivierten Pinealorganen der Ratte. Die Intensität der IRs für CSU-PSP 1 und CSU-PSP 2A blieb während des noradrenergen Stimulationsverlaufs unverändert. Im oberen Abschnitt der Abb. ist ein repräsentativer Immunoblot für CSU-PSP 1 und 2A dargestellt. Im unteren Abschnitt ist die semiquantitative Analyse der korrespondierenden IRs aufgeführt. Der maximale SUMDENS-Wert in jedem einzelnen Experiment ( $n = 3$ ) wurde als 100% festgelegt.

Das subzelluläre Verteilungsmuster beider CSU-PSPs wurde mit Hilfe der Immunfluoreszenz und der konfokalen Laserscanning Mikroskopie (CLSM) untersucht. In unstimulierten Pinealozyten konnte für die CSU-PSP 1 eine moderate IR im Nukleus und eine schwache Immunfärbung im Zytoplasma nachgewiesen werden. Die fein granulierten zytoplasmatische IR lag gleichmäßig verteilt vor (Abb. 3.15A). In nahezu sämtlichen Pinealozyten kam es mit fortlaufender Stimulationsdauer zur Zunahme der nukleären PSP 1-IR und erreichte ein Maximum nach achtstündiger Stimulation mit 1  $\mu$ M NA (Abb. 3.15C). Zeitgleich kam es zu einer Abnahme der zytoplasmatischen CSU-PSP 1-IR (Abb. 3.15C). Die grob granulierten CSU-PSP 2A-IR lag gleichmäßig im Zytoplasma verteilt vor. Die Zellkerne waren nicht angefärbt (immunnegativ). Das Verteilungsmuster für die CSU-PSP 2A-IR blieb während des noradrenergen Stimulationsverlaufs unverändert (Abb. 3.15D-F).

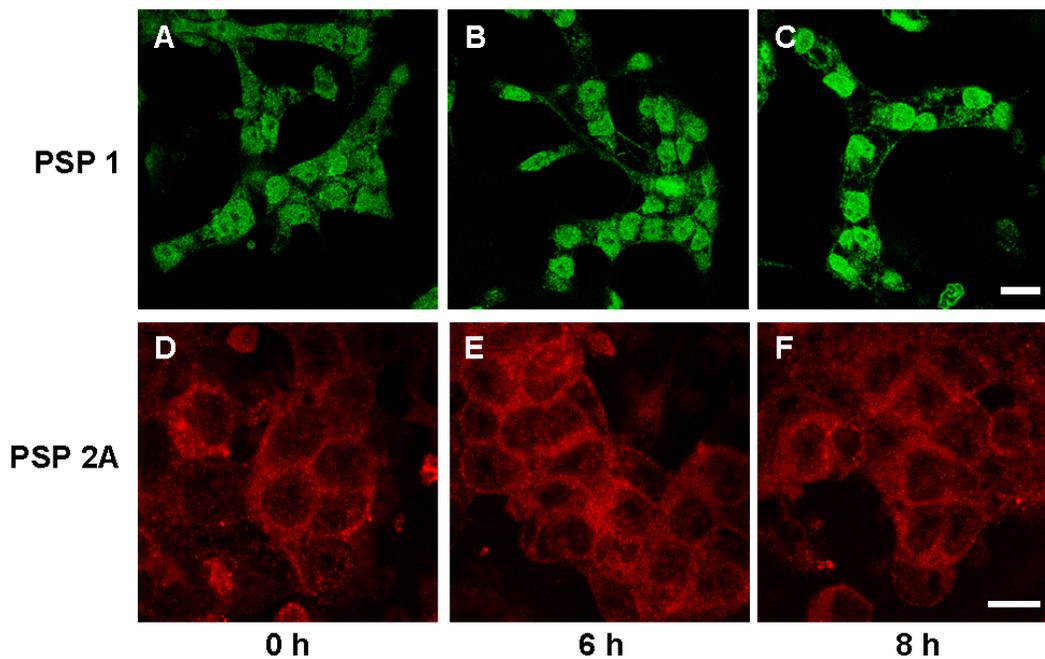


Abb. 3.15: Darstellung der IRs für die CSU-PSP 1 (A-C) und CSU-PSP 2A (D-F) in kultivierten Pinealocyten der Ratte. Die Stimulation mit 1  $\mu$ M NA verursachte eine zeitabhängige Zunahme der Intensität des nukleären CSU-PSP 1-IR. Die Zunahme des nukleären Signals wurde von einer Abnahme der zytoplasmatischen CSU-PSP 1-IR begleitet. Die grob granulierte CSU-PSP 2A-IR konnte gleichmäßig verteilt im Zytoplasma nachgewiesen werden. Die Zellkerne waren immunnegativ. Während des noradrenergen Stimulationsverlaufs blieben Intensität sowie Verteilungsmuster der CSU-PSP 2A-IR unverändert. Der Maßstab beträgt 10  $\mu$ m.

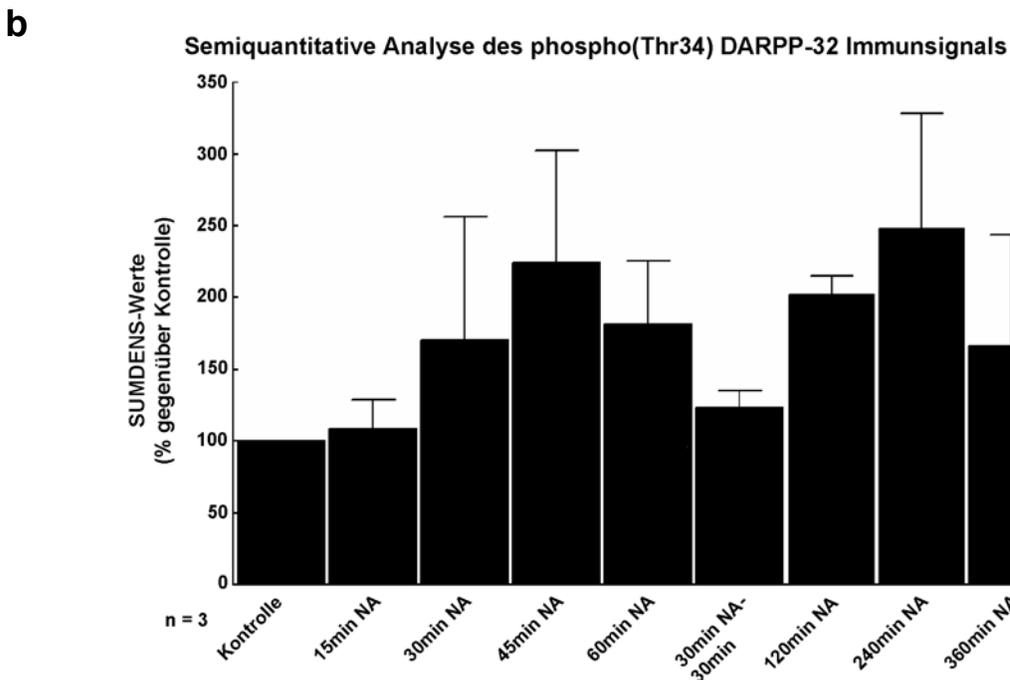
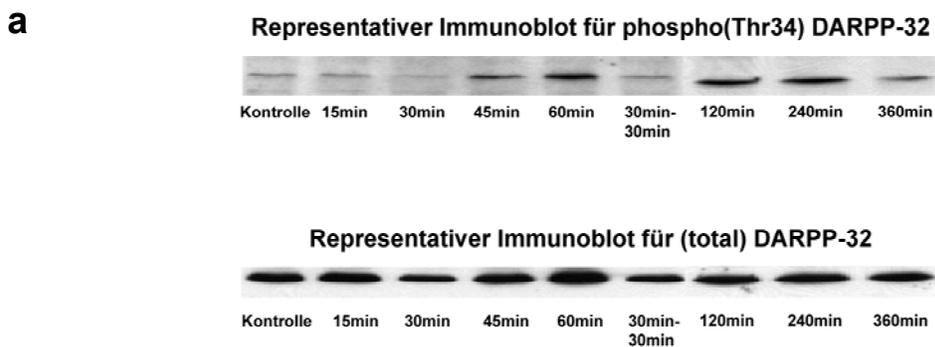
### 3.3.6 Die noradrenerge Stimulation beeinflusst die Phosphorylierung von DARPP-32 in kultivierten Pinealorganen der Ratte nicht

Die Wirkung einer noradrenergen Stimulation auf die Phosphorylierung von DARPP-32 (*dopamine and adenosine 3'-5'-monophosphate-regulated phosphoprotein*, 32 kDa) wurde in kultivierten Pinealorganen der Ratte mit Hilfe des Immunoblotverfahrens untersucht. Im oberen Abschnitt der Abb. 3.16a ist ein repräsentativer Immunoblot dargestellt, welcher mit einem AK gegen die am Threonin 34 phosphorylierte (phospho) Form des DARPP-32 Proteins behandelt wurde. Im unteren Abschnitt der Abb. 3.16a ist dieselbe Membran nach Entfernung des phospho(Thr34)DARPP-32 AK dargestellt. Die Membran wurde mit einem AK gegen DARPP-32 behandelt, welcher das DARPP-32 Protein unabhängig vom Phosphorylierungszustand erkennt (totalDARPP-32). Es wurde mit 1  $\mu$ M NA für 15 min, 30 min, 45 min, 60 min, 120 min, 240 min und 360 min stimuliert. Nach 30minütiger Stimulation erfolgte bei einigen Stimulationen der Entzug des NA-Stimulus und die Organkulturen wurden für zusätzliche 30 min ohne Stimulus kultiviert (30 min– 30 min). Beide AK wiesen ein Immun-

signal mit der für DARPP-32 entsprechenden Molekülgröße von 32 kDa nach. Die totalDARPP-32-IR war gegenüber der phospho(Thr34)DARPP-32-IR deutlich intensiver. Während des Stimulationsverlaufs kam es zu den Zeitpunkten 45 min und 240 min zu einem maximalen Anstieg der phospho(Thr34)DARPP-32-IR (Abb. 3.16a, oberer Abschnitt). Die Signalstärke der totalDARPP-32-IR blieb im Stimulationsverlauf nahezu unverändert (Abb. 3.16a, unterer Abschnitt). Abb. 3.16b zeigt die densitometrische Auswertung der phospho(Thr34)DARPP-32-IR. Die SUMDENS-Werte für die phospho(Thr34)DARPP-32-IR in unstimulierten Präparationen wurden als 100% festgesetzt. Die phospho(Thr34)DARPP-32-IR wurde gegen das entsprechende Immunsignal für totalDARPP-32 normalisiert. Die statistische Auswertung ergab keine signifikante Veränderung der phospho(Thr34)DARPP-32-IR im Verlauf der noradrenergen Stimulation (ANOVA mit anschließendem Bonferroni Zusatztest;  $n = 3$ ).

---

Abb. 3.16: (a) Immunchemische Darstellung von phospho(Thr34)DARPP-32 (oberer Abschnitt) und totalDARPP-32 (unterer Abschnitt) in kultivierten Pinealorganen der Ratte. (oben) Ein schwaches Immunsignal für phospho(Thr34)DARPP-32 ist in der unstimulierten Kontrolle zu erkennen. Zu den Stimulationszeitpunkten 45 min und 240 min kam es zu einer maximalen Zunahme der phospho(Thr34)DARPP-32-IR. (unten) Während des noradrenergen Stimulationsverlaufs blieb die totalDARPP-32-IR nahezu unverändert. (b) Semiquantitative Auswertung der phospho(Thr34)DARPP-32-IR ( $n = 3$ ). Die SUMDENS-Werte der unstimulierten Kontrollen wurden als 100% festgesetzt. Die phospho(Thr34)DARPP-32-IRs wurden gegen die korrespondierende totalDARPP-32-IRs normalisiert. Es konnten keine signifikante Veränderung in der Intensität der phospho(Thr34)DARPP-32-IR ermittelt werden (ANOVA mit anschließendem Bonferroni Zusatztest).



### 3.4 Vergleichende Untersuchungen zur Interaktion der AANAT mit dem Protein 14-3-3 in Pinealozyten der Ratte und des Rindes

Mit Hilfe eines Ko-Immunpräzitationsansatzes wurde die Interaktion von AANAT und Protein 14-3-3 in kultivierten Pinealozyten der Ratte untersucht (Abb. 3.17). Es wurde mit einem AK gegen die AANAT [*immunopurified* (IP) AS3314] präzipitiert. Die Analyse der Präzipitationen erfolgte mit Hilfe des Immunoblotverfahrens. Um eine erfolgreiche Präzipitation der AANAT zu überprüfen, wurden die Membranen mit dem in der Präzipitation eingesetzten AK behandelt (IP AS3314, Anti- AANAT). Dies galt als Nachweis einer erfolgreichen Immunpräzipitation. Ein Immunoblot für eine solche Präzipitation ist im linken Abschnitt der Abb. 3.17 exemplarisch dargestellt. Neben dem Präzipitat wurde aus demselben Gesamtproteinansatz 40 µg unbehandeltes Ly-sat aufgetragen. Es wurden sowohl unstimulierte Kontrollen als auch mit 1 µM NA für

6 h stimulierte Präparationen untersucht. Zur Darstellung der schweren und leichten Antikörperketten (IgG), welche sich in den Präzipitaten befanden, wurde eine verdünnte AK-Lösung aufgetragen. Nach sechsständiger Stimulation mit 1  $\mu$ M NA kam es gegenüber den unstimulierten Kontrollen zu einer starken Induktion eines Immunsignals von 24 kDa Größe (Lysate; Abb. 3.18, linker Abschnitt). Die Signalgröße entsprach der bekannten Molekülgröße für die AANAT. Der AK gegen die AANAT erkannte in den Lysaten zusätzlich eine unspezifische Bande. Die Intensität dieses Signals blieb während des Stimulationsverlaufs unverändert. In den aufgetragenen Präzipitaten konnte ein deutliches Immunsignal für die AANAT in den mit 1  $\mu$ M NA für 6 h stimulierten Präparationen nachgewiesen werden. In der unstimulierten Kontrolle war das AANAT Immunsignal nur moderat nachweisbar. In den Präzipitaten sind die schweren (55 kDa) und leichten (22 kDa) Ketten der AK zu erkennen. Diese waren nicht durchgängig in sämtlich durchgeführten Experimenten nachweisbar. Zur Überprüfung einer erfolgreichen Ko-Immünpräzipitation wurde dieselbe Membran nach Entfernung des AANAT-AK (IP AS3314) mit einem AK gegen das Protein 14-3-3 behandelt (IP A274, Anti- Protein 14-3-3). Dies diente zum Nachweis des AANAT/Protein 14-3-3-Komplexes. Ein Immunoblot einer solchen Präzipitation ist im rechten Abschnitt der Abb. 3.17 dargestellt. Sowohl in den unstimulierten Kontrollen als auch in den stimulierten Präparationen (1  $\mu$ M NA für 6 h) war eine Doppelbande zu erkennen (Lysate; Abb. 3.18, rechter Abschnitt). Die Größe der Banden von 30 kDa und 33 kDa entsprach dem bekannten MG für die Protein 14-3-3-Isoformen. In den Präzipitaten war in den unstimulierten Kontrollen keine Protein 14-3-3-IR nachweisbar. Dagegen war in der mit 1  $\mu$ M NA für 6 h stimulierten Präparation ein deutliches Signal von 30 kDa Größe und ein schwächeres Immunsignal von 33 kDa Größe nachweisbar. In den Präzipitaten waren die schweren Ketten der AK deutlich zu erkennen.

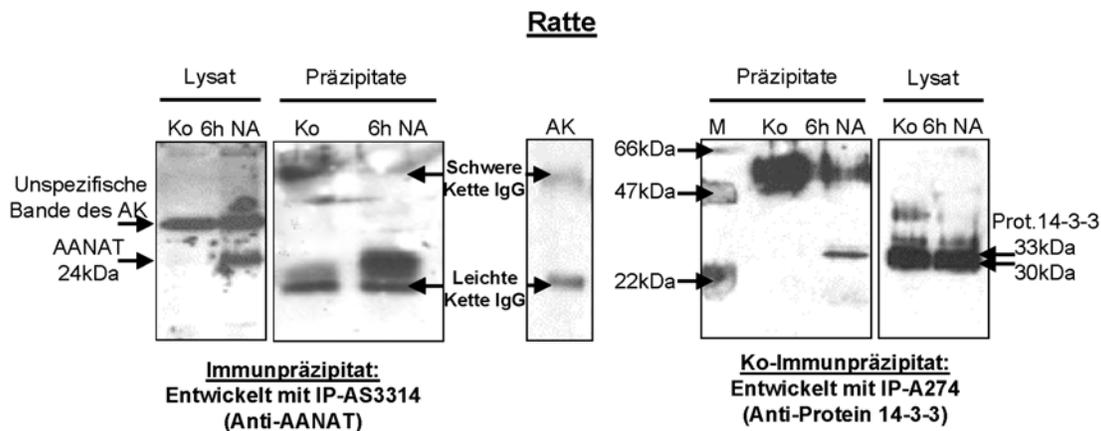
---

Abb. 3.17: Repräsentativer Immunoblot für eine Ko-Immünpräzipitation von AANAT und Protein 14-3-3 in immobilisierten Pinealozyten der Ratte. Es wurde mit einem AK gegen die AANAT (IP AS3314, Anti-AANAT) präzipitiert. Um eine erfolgreiche Immünpräzipitation nachzuweisen, wurde der Immunoblot zunächst mit dem AANAT-AK (IP AS3314, Anti- AANAT) behandelt (linker Abschnitt). Im Anschluss wurde der Anti-AANAT AK von der Membran entfernt und diese mit einem AK gegen das Protein 14-3-3 behandelt (IP A274, Anti- Protein 14-3-3; rechter Abschnitt). Dies galt als Nachweis einer erfolgreichen Ko-Immünpräzipitation. Als Kontrolle wurden neben den Präzipitaten 40  $\mu$ g des unbehandelten Gesamtproteinextrakts (Lysat) aufgetragen. Zur Darstellung der schweren und leichten Ketten der AK (IgG) wurde eine verdünnte AK-Lösung aufgetragen. Nach sechsständiger Stimulation mit 1  $\mu$ M NA konnte eine deutliche AANAT-IR nachgewiesen werden (Lysat; linker Abschnitt). Diese IR war in der unstimulierten Kontrolle (Ko) nicht nachweisbar. Im Präzipitat lag in der unstimulierten Präparation eine moderate AANAT-IR vor. Nach sechsständiger Stimulation mit 1  $\mu$ M NA kam es zu

einer deutlichen Induktion der AANAT-IR. Die leichten (22 kDa) und- schweren Kette (55 kDa) der AK war in den Präzipitaten ebenso nachweisbar. Nach Entfernung des Anti- AANAT AK wurde die Membran mit dem AK gegen das Protein 14-3-3 behandelt (IP A274, Anti- Protein 14-3-3; rechter Abschnitt). In den Lysaten aus unstimulierten- und stimulierten Präparationen war deutlich eine Protein 14-3-3-IR nachweisbar. Kein Immunsignal für das Protein 14-3-3 konnte in den Präzipitaten der unstimulierten Kontrolle nachgewiesen werden. In den Präzipitaten aus den stimulierten Präparationen war dagegen eine moderate Protein 14-3-3-IR nachweisbar, wobei die 30 kDa große Bande deutlich intensiver als die 33 kDa große Bande war. Die schweren Antikörperketten (55 kDa) waren deutlich nachweisbar (M: Proteinstandard).

### Ko-Immunpräzipitation von AANAT und Protein 14-3-3

#### Präzipitiert mit IP AS3314 (Anti-ratAANAT)



Zur vergleichenden Untersuchung der Interaktion zwischen AANAT und Protein 14-3-3 wurden Homogenate aus Pinealozyten der Ratte und des Rindes mit einem AK gegen das Protein 14-3-3 präzipitiert (IP-A274, Anti- Protein 14-3-3). Die Analyse der Präzipitation erfolgte mit Hilfe des Immunoblotverfahrens. Neben unstimulierten und mit 1  $\mu$ M NA für 6 h stimulierten Zellpräparationen wurde zur Darstellung der schweren- und leichten Antikörperketten (IgG) eine verdünnte Lösung des Anti- Protein 14-3-3-AK aufgetragen. Im linken Abschnitt der Abb. 3.18a ist ein exemplarischer Immunoblot für eine Immunpräzipitation beim Rind dargestellt. Im rechten Abschnitt ist ein Immunoblot für eine Immunpräzipitation bei der Ratte dargestellt. Um eine erfolgreiche Immunpräzipitation nachzuweisen, wurden beide Membranen mit dem Anti-Protein 14-3-3-AK behandelt. In den Lysaten beider Spezies war sowohl in den unstimulierten Kontrollen als auch in den NA-stimulierten Präparationen deutlich eine Doppelbande nachweisbar. Die 30 kDa und 33 kDa großen Banden entsprachen dem bekannten MG für die Protein 14-3-3-Isoformen. In den Präzipitaten konnte die Doppelbande ebenso nachgewiesen werden. Das Signal für die 30 kDa große Bande war gegenüber dem 33 kDa großen Immunsignal deutlich stärker. Dies galt für beide

Spezies. Zum Nachweis einer erfolgreichen Ko-Immünpräzipitation wurden die Membranen nach Entfernung des Anti- Protein 14-3-3-AK mit einem AK gegen die AANAT des Rindes (IP AS3343, Anti- *bovine*AANAT, linker Abschnitt) bzw. mit einem AK gegen die AANAT der Ratte (IP AS3314, Anti- *rat*AANAT, rechter Abschnitt) behandelt. In unstimulierten Lysaten aus Pinealozyten des Rindes war eine schwache AANAT-IR nachweisbar. Die Bande von 24 kDa Größe korrespondierte mit dem bekannten MG für die AANAT. Nach sechsständiger Stimulation mit 1  $\mu$ M NA kam es zu einer deutlichen Induktion der AANAT-IR. In den Präzipitaten der unstimulierten Kontrollen war die AANAT-IR nicht nachweisbar. Nach sechsständiger Stimulation mit 1  $\mu$ M NA kam es zu einer deutlichen Induktion der AANAT-IR (Abb. 3.18b, linker Abschnitt). Die schweren (55 kDa) und leichten (22 kDa) Ketten der AK waren deutlich nachweisbar. In unstimulierten Lysaten aus Pinealozyten der Ratte war mit dem AK gegen die AANAT (IP AS3314, Anti- *rat*AANAT) kein Immunsignal von 24 kDa Größe nachweisbar. Ein deutliches 24 kDa großes Signal der AANAT-IR lag dagegen nach sechsständiger Stimulation mit 1  $\mu$ M NA vor (Abb. 3.18b, rechter Abschnitt). Der AK gegen die AANAT erkannte in den Lysaten zusätzlich eine unspezifische Bande. Die Intensität dieses Signals blieb während des Stimulationsverlaufs unverändert. In den Präzipitationen unstimulierter Präparationen konnte keine AANAT-IR nachgewiesen werden. Die sechsständige Stimulation mit 1  $\mu$ M NA führte zur Induktion der AANAT-IR. In den Präzipitaten waren die schweren Antikörperketten deutlich nachweisbar.

---

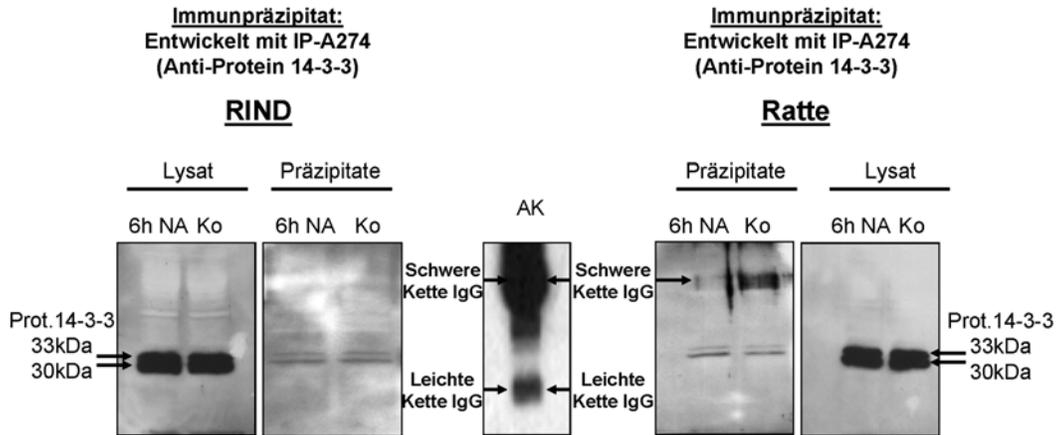
Abb. 3.18: (a) Darstellung der Ko-Immünpräzipitation in Homogenaten aus immobilisierten Pinealozyten des Rindes (linker Abschnitt) und der Ratte (rechter Abschnitt). Es wurde mit dem Anti- Protein 14-3-3-AK (IP A274) präzipitiert. Die Membranen wurden mit dem Anti- Protein 14-3-3-AK (IP A274) entwickelt. In den Lysaten der unstimulierten Kontrollen waren sowohl für das Rind (links) als auch für die Ratte (rechts) deutliche IRs von 30 kDa und 33 kDa Größe für die Protein 14-3-3-Isoformen zu erkennen. Die Intensität der Doppelbande blieb für beide Spezies während des Stimulationsverlaufs unverändert. In den Präzipitaten konnte die Protein 14-3-3-IR sowohl beim Rind (linker Abschnitt) als auch bei der Ratte (rechter Abschnitt) nachgewiesen werden. Gegenüber den Lysaten war in den Präzipitaten die Intensität der Protein 14-3-3-IR deutlich schwächer. Ebenso war die Intensität der 33 kDa großen Bande gegenüber der 30 kDa großen Bande deutlich schwächer. Die schweren Antikörperketten waren in den Präzipitaten bei beiden Spezies deutlich zu erkennen. (b) Nach Entfernung des Anti- Protein 14-3-3-AK wurden die Membranen mit einem AK gegen die AANAT des Rindes (IP AS3343, Anti-*bovine*AANAT; links) bzw. mit einem AK gegen die AANAT der Ratte (IP AS3314, Anti-*rat*AANAT; rechts) behandelt. In den unstimulierten Lysaten des Rindes war eine moderate IR für die AANAT nachweisbar. Nach sechsständiger Stimulation mit 1  $\mu$ M NA kam es zu einer deutlichen Induktion der AANAT-IR. In den Präzipitaten des Rindes war in den unstimulierten Präparationen eine nur schwache IR für die AANAT nachweisbar. Nach sechsständiger Stimulation mit 1  $\mu$ M NA kam es zu einer deutlichen Induktion der AANAT-IR (Abb. 3.18b, linker Abschnitt). Die Stimulation der immobilisierten Rattenpinealozyten induzierte sowohl in den entsprechenden Lysaten als auch in den korrespondierenden Präzipitaten eine deutliche AANAT-IR (Abb. 3.18b, rechter Abschnitt). In den unstimulierten Kontrollen war sowohl in den Lysaten als auch in den Präzipitaten keine AANAT-IR nach-

weisbar. In den Präzipitaten des Rindes waren die schweren und leichten Ketten deutlich zu erkennen. In den Präzipitationen der Ratte waren nur die schweren Ketten der AK deutlich zu erkennen.

### Ko-Immunpräzipitation von AANAT und Protein 14-3-3 I

**a**

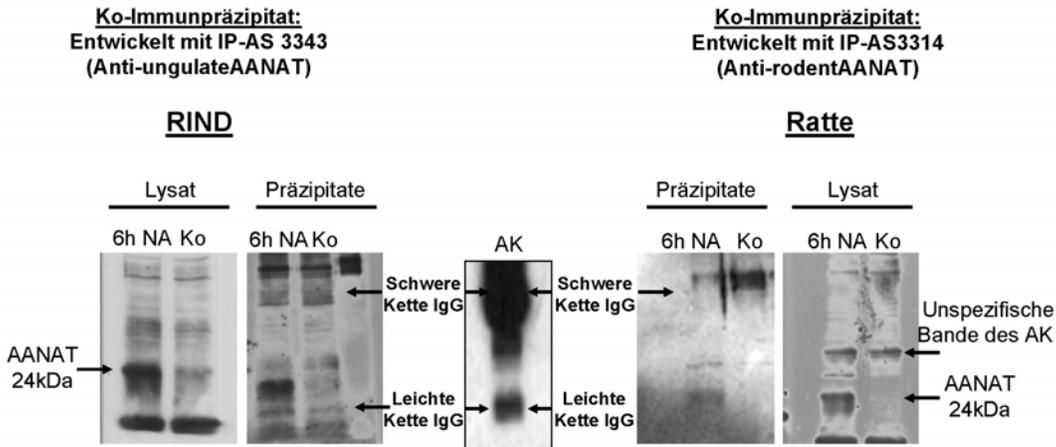
Präzipitiert mit IP A274 (Anti-Protein 14-3-3)



### Ko-Immunpräzipitation von AANAT und Protein 14-3-3 II

**b**

Präzipitiert mit IP A274 (Anti-Protein 14-3-3)



Das subzelluläre Verteilungsmuster des Proteins 14-3-3 in immobilisierten Pinealozysten der Ratte wurde mit Hilfe der Immunfluoreszenz und der konfokalen Laser-scanning Mikroskopie (CLSM) untersucht. Die Darstellung des Proteins 14-3-3 erfolgte mit Hilfe eines monoklonalen AK (8C3), dessen Spezifität ausreichend von Roseboom et al. (1994) beschrieben worden ist. Dieser AK erkennt ausschließlich die  $\epsilon$ -Isoform des Proteins 14-3-3. In fast sämtlichen Pinealozysten der Ratte lag eine grob granulierte, zytoplasmatische Protein 14-3-3-IR vor (Abb. 3. 19, **A**). Die Zellkerne waren durchweg immunnegativ. In nahezu sämtlichen Pinealozysten war an einem be-

stimmten Punkt im Zytoplasma eine Akkumulation der Protein 14-3-3-IR zu erkennen gewesen (siehe weiße Pfeile). Das Verteilungsmuster der Protein 14-3-3-IR blieb während der sechsstündigen Stimulation unverändert (Abb. 3.19, **B**).

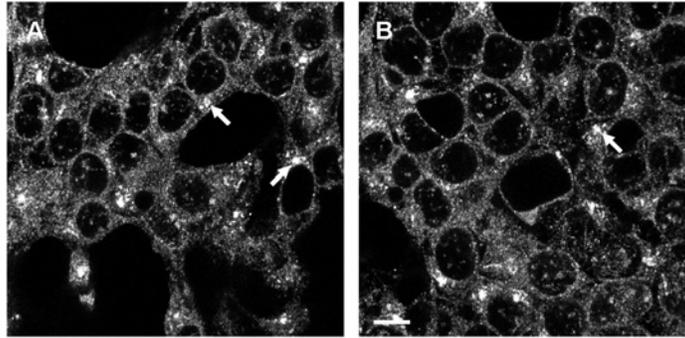


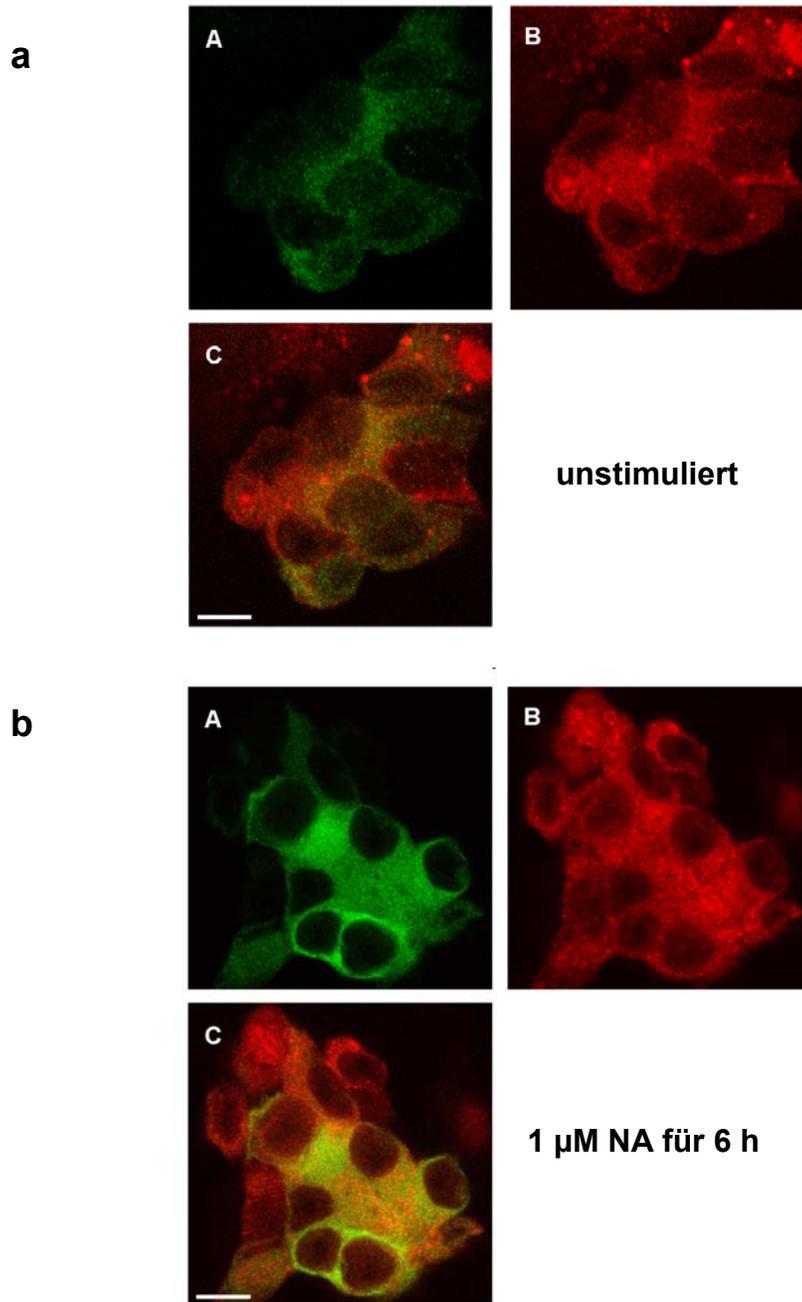
Abb. 3.19: Immunzytochemische Darstellung von Protein 14-3-3- $\epsilon$  in immobilisierten Pinealocyten der Ratte. In unstimulierten Präparationen (**A**) lag in fast sämtlichen Pinealocyten eine grob granulierte IR für das Protein 14-3-3- $\epsilon$  im Zytoplasma vor. Die Zellkerne waren durchweg immunnegativ. Im Zytoplasma war in nahezu sämtlichen Pinealocyten eine Akkumulation der Protein 14-3-3-IR in bestimmten Bereichen des Zytoplasmas zu erkennen (siehe weiße Pfeile). Das Verteilungsmuster der Protein 14-3-3-IR blieb während der sechsstündigen Stimulation mit 1  $\mu$ M NA unverändert (**B**). Der Maßstab entspricht 10  $\mu$ m.

Immunzytochemische Doppelmarkierungen für AANAT und Protein 14-3-3- $\epsilon$  wurden an immobilisierten Pinealocyten des Rindes mit Hilfe der Immunfluoreszenzmarkierung und des CLSM durchgeführt. In unstimulierten Präparationen war eine moderate Immunantwort für die AANAT in fast sämtlichen Pinealocyten nachweisbar. Die AANAT-IR wurde durch den Alexa 488-konjugierten Sekundärantikörper als grüne Fluoreszenz dargestellt (Abb. 3.20a, **A**, **C**). Die fein granulierte AANAT-IR lag gleichmäßig und ausschließlich im Zytoplasma der Pinealocyten verteilt vor. Für das Protein 14-3-3- $\epsilon$  konnte eine deutlich stärkere Immunantwort in fast sämtlichen Pinealocyten des Rindes erzielt werden (Abb. 3.20a, **B**, **C**). Die Protein 14-3-3-IR wurde durch den CY3-konjugierten Sekundärantikörper als rote Fluoreszenz dargestellt. Die fein granulierte Protein 14-3-3-IR lag gleichmäßig im Zytoplasma verteilt vor. Die Zellkerne waren immunnegativ. In der Überlagerung beider Kanäle war eine enge örtliche Nachbarschaft der AANAT-IR (grüne Fluoreszenz) zur Protein 14-3-3-IR (rote Fluoreszenz) zu erkennen (Abb. 3.20a, **C**). Nach sechsstündiger Stimulation mit 1  $\mu$ M NA kam es zu einer deutlichen Induktion der fein granulierten AANAT-IR in fast sämtlichen Pinealocyten. (Abb. 3.20b, **A**, **C**). Die Lokalisation der AANAT-IR blieb nach sechsstündiger Stimulation mit 1  $\mu$ M NA unverändert. Die Intensität und Lokalisation der Protein 14-3-3-IR blieb während des sechsstündigen Stimulationsverlaufs unverändert (Abb. 3.20b, **B**, **C**). Die AANAT-IR befindet sich in enger räumlicher

Nachbarschaft zur Protein 14-3-3-IR, wie in der Überlagerung beider Kanäle zu erkennen ist (Abb. 3.20b, **C**; grüne Fluoreszenz: AANAT-IR; rote Fluoreszenz: Protein 14-3-3-IR).

---

Abb. 3.20: Immunzytochemische Doppelmarkierung von AANAT und Protein 14-3-3- $\epsilon$  in immobilisierten Pinealozyten des Rindes. Die AANAT-IR ist durch den Alexa 488- konjugierten Sekundärantikörper dargestellt (grüne Fluoreszenz, **A**, **C**). Die Protein 14-3-3-IR ist durch den CY3-konjugierten Sekundärantikörper dargestellt (rote Fluoreszenz, **B**, **C**). (a) In unstimulierten Präparationen war ein schwaches Immunsignal für die AANAT nachweisbar. Für das Protein 14-3-3 lag eine deutlich stärkere IR vor. Beide IR lagen gleichmäßig im Zytoplasma verteilt vor. Die Zellkerne waren durchweg immunnegativ. In der Überlagerung (**C**) war eine enge räumliche Nachbarschaft der AANAT-IR zur Protein 14-3-3-IR zu erkennen. Der Maßstab entspricht 10  $\mu\text{m}$ . (b) Gegenüber den unstimulierten Kontrollen kam es nach sechsstündiger Stimulation mit 1  $\mu\text{M}$  NA zu einer deutlichen Induktion der AANAT-IR in fast sämtlichen Pinealozyten (**A**, **C**). Die Lokalisation der AANAT-IR blieb nach Stimulation mit 1  $\mu\text{M}$  NA unverändert. Die Intensität und Lokalisation der Protein 14-3-3-IR blieb im Verlauf der noradrenergen Stimulation unverändert (**B**, **C**). In der Überlagerung der Kanäle war eine enge örtliche Nachbarschaft der AANAT-IR zur Protein 14-3-3-IR zu erkennen (C). Der Maßstab entspricht 10  $\mu\text{m}$ .



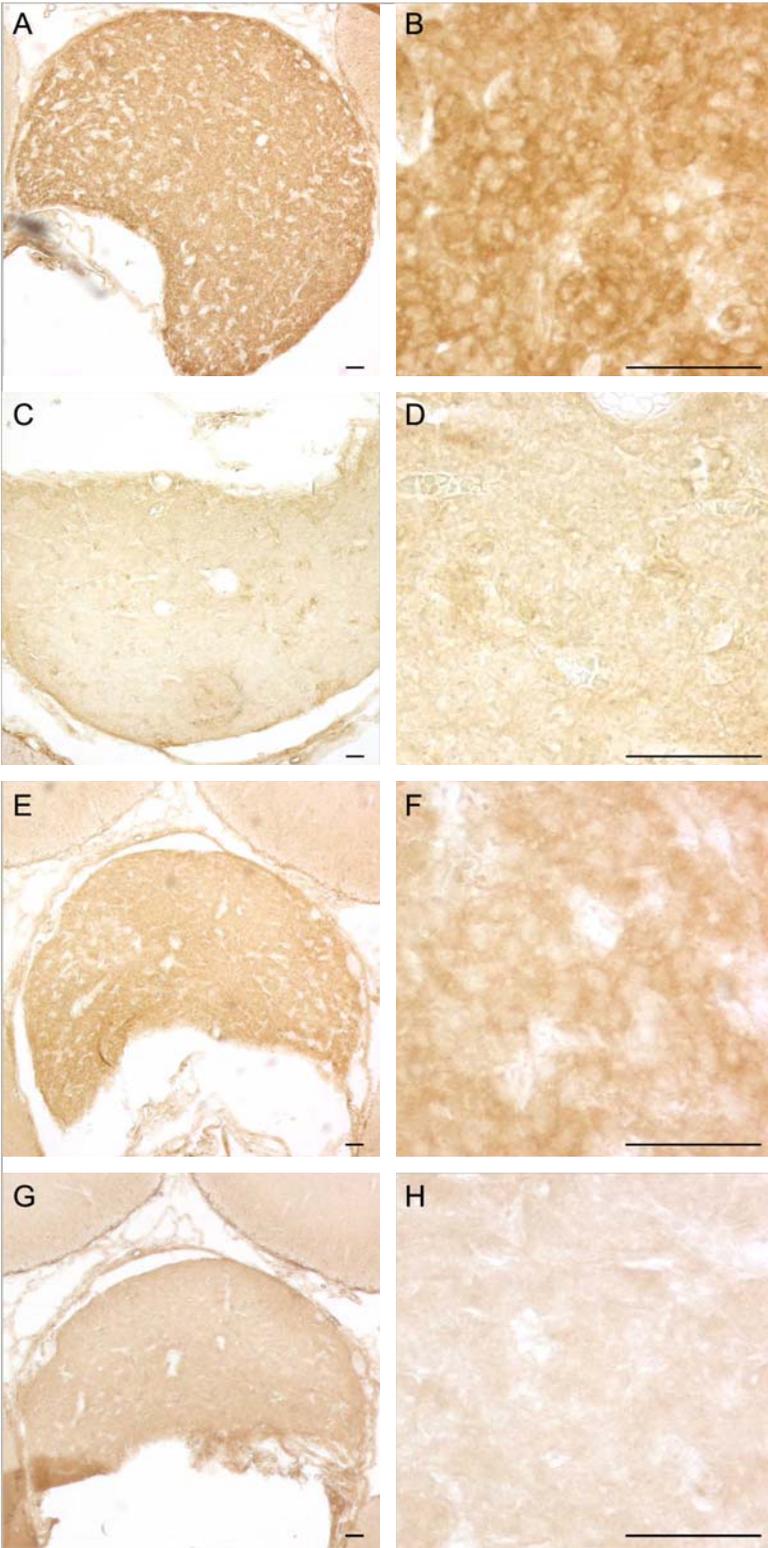
### 3.5 Die funktionelle Bedeutung des Cannabinoidsystems für die Steuerung der Melatoninbiosynthese im Pinealorgan der Ratte

#### 3.5.1 Immunhistochemischer- und immunochemischer Nachweis des Cannabinoid 1 und 2 Rezeptors im Pinealorgan der Ratte

Der Nachweis der Cannabinoid (CB) 1 und 2 Rezeptoren erfolgte sowohl in der Immunhistochemie (IHC) an perfusionsfixiertem Gewebe (Abb. 3.21a) als auch im Im-

munoblot aus Homogenaten kultivierter Pinealorgane der Ratte (Abb. 3.21b). Es wurden gegen den CB 1 und 2 Rezeptor jeweils drei unterschiedliche AK der Firmen Calbiochem (Darmstadt), Chemicon (Temescula, CA, USA) und Cayman (Carlsbad, CA, USA) getestet. In der IHC konnte ein spezifisches Immunsignal für den CB 1 Rezeptor ausschließlich mit dem AK der Firma Chemicon dargestellt werden (Abb. 3.21a, **A, B**). In nahezu sämtlichen Pinealozyten lag eine CB 1 Rezeptor-IR sowohl im Zytoplasma als auch an der Zellmembran vor. Die Zellkerne waren nicht angefärbt. Zur Überprüfung der Spezifität wurde der AK mit einem entsprechenden antigenen Peptid präadsorbiert (Abb. 3.21a, **C, D**) oder im Immunoblot getestet (Abb. 3.21b, **A**). Nach Präadsorption des gegen den CB 1 Rezeptor gerichteten AK (Chemicon) konnte das oben beschriebene Immunsignal nicht mehr nachgewiesen werden (Abb. 3.21a, **C, D**). In Homogenaten aus kultivierten Pinealorganen der Ratte konnte mit dem AK gegen den CB 1 Rezeptor (Chemicon) im Immunoblot ein Signal von 53 kDa, korrespondierend mit der bekannten Molekülgröße des CB 1 Rezeptors, nachgewiesen werden (Abb. 3.21b, **A**). Im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle blieb die Intensität des Immunsignals während des Stimulationsverlaufs unverändert. Neben den Homogenaten aus Pinealorganen wurden ebenso Gesamtproteinextrakte aus dem Kortex und dem Cerebellum untersucht. In diesen Geweben fand sich ebenfalls ein deutliches Immunsignal für den CB 1 Rezeptor. Für den CB 2 Rezeptor konnte in der IHC ein spezifisches Immunsignal mit den AK der Firmen Calbiochem (Daten nicht gezeigt) sowie Cayman erzielt werden (Abb. 3.21a, **E, F**). In nahezu sämtlichen Pinealozyten lag ein moderates Immunsignal für den CB 2 Rezeptor im Zytoplasma und an der Zellmembran vor. Die Zellkerne waren nicht angefärbt (immunnegativ). Nach Präadsorption des AK gegen den CB 2 Rezeptor mit einem entsprechenden antigenen Peptid konnte die oben beschriebene CB 2 Rezeptor-IR nicht mehr nachgewiesen werden (Abb. 3.21b, **G, H**). Im Immunoblot konnte für den CB 2 Rezeptor ein spezifisches Immunsignal mit den AK der Firmen Chemicon (Daten nicht gezeigt) und Cayman (Abb. 3.21b, **B**) nachgewiesen werden. In den Homogenaten aus Pinealorganen, dem Kortex und des Cerebellums lag jeweils ein starkes Immunsignal von 45 kDa Größe vor. Die Signalgröße entsprach dem bekannten MG des CB 2 Rezeptors. In den kultivierten Pinealorganen blieb die Intensität der CB 2 Rezeptor-IR nach sechsständiger NA-Stimulation unverändert.

a



b

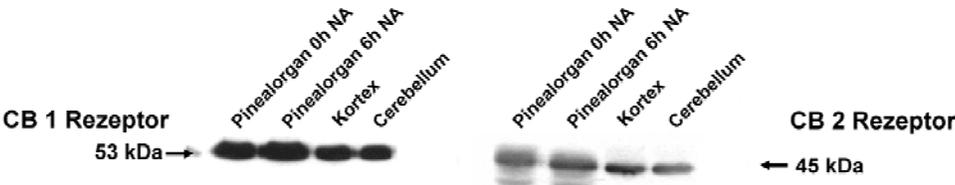
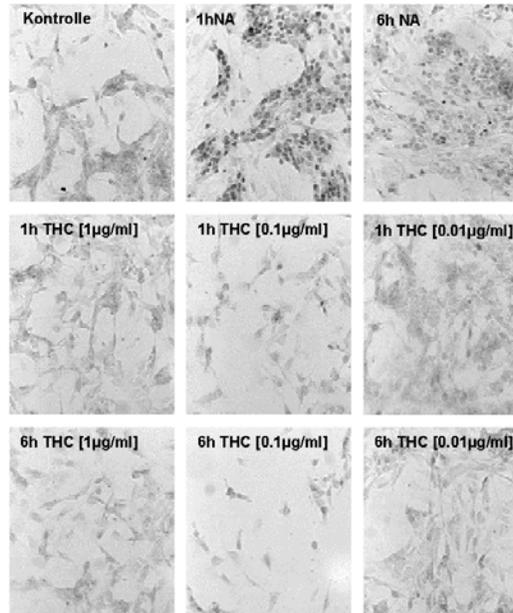
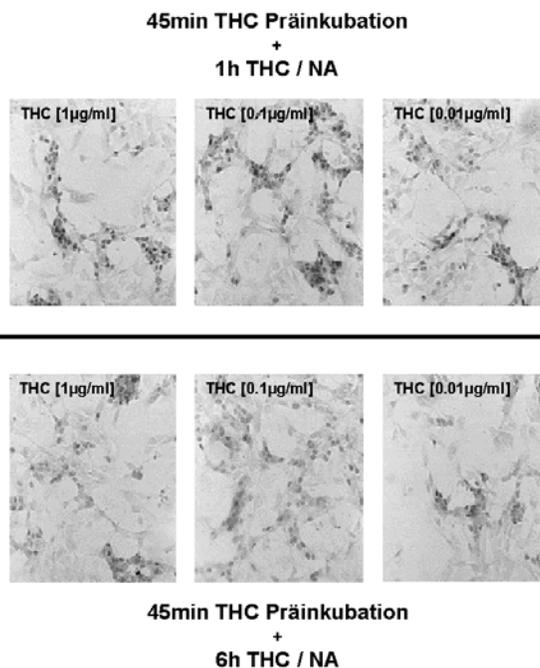


Abb. 3.21 Immunhistochemische und immunchemische Darstellung der Cannabinoid (CB) 1 und 2 Rezeptoren im Pinealorgan der Ratte. (a) Immunhistochemische Darstellung der CB 1 und 2 Rezeptoren in perfusionsfixierten Pinealorganen der Ratte. Für den CB 1 Rezeptor konnte ein spezifisches Immunsignal ausschließlich mit dem AK der Firma Chemicon erzielt werden (**A, B**). In nahezu sämtlichen Pinealozyten lag eine CB 1 Rezeptor-IR sowohl im Zytoplasma als auch an der Zellmembran vor. Die Zellkerne waren nicht angefärbt. Nach Präadsorption des Anti-CB 1 Rezeptor AK (Chemicon) konnte das beschriebene Immunsignal nicht mehr nachgewiesen werden (**C, D**). Für den CB 2 Rezeptor konnte ein spezifisches Immunsignal mit den AK der Firma Cayman erzielt werden (**E, F**). In nahezu sämtlichen Pinealozyten lag ein moderates Immunsignal für den CB 2 Rezeptor im Zytoplasma und an der Zellmembran vor. Die Zellkerne waren nicht angefärbt (immunnegativ). Nach Präadsorption des AK gegen den CB 2 Rezeptor mit einem entsprechenden antigenen Peptid konnte die beschriebene CB 2 Rezeptor-IR nicht mehr nachgewiesen werden (**G, H**). Der Maßstab beträgt 50 µm. (b) Immunchemische Darstellung der CB 1 und 2 Rezeptoren in Homogenaten von kultivierten Pinealorganen, Kortex und Cerebellum. In sämtlichen aufgetragenen Homogenaten war eine deutliche IR für den CB 1 Rezeptor nachweisbar (AK der Firma Chemicon). In den kultivierten Pinealorganen blieb die Intensität der CB 1 Rezeptor-IR nach sechsständiger Stimulation mit 1 µM NA unverändert. (b, linker Abschnitt) Eine deutliche CB 2 Rezeptor-IR konnte in den Homogenaten aus Pinealorganen, Kortex und Cerebellum nachgewiesen werden (AK der Firma Cayman). In den kultivierten Pinealorganen blieb die Intensität der CB 2 Rezeptor-IR nach sechsständiger Stimulation mit 1 µM NA unverändert (b, rechter Abschnitt).

### 3.5.2 Die Stimulation mit dem CB 1 und 2 Rezeptor-Agonisten THC hat keinen Einfluss auf die Phosphorylierung von CREB in kultivierten Pinealozyten der Ratte

Die Wirkung einer Stimulation mit  $\Delta^9$ -tetra-hydrocannabinol (THC), einem potenten Agonisten der CB 1 und 2 Rezeptoren, auf die Phosphorylierung von CREB am Serin 133 wurde an immobilisierten Pinealozyten bzw. kultivierten Pinealorganen der Ratte mit Hilfe der Immunzytochemie und des Immunoblotverfahrens untersucht. In unstimulierten Präparationen war eine nukleäre pCREB-IR nahezu nicht nachweisbar (Abb. 3.22a). Die einstündige Stimulation der Pinealozyten mit 1 µM NA induzierte eine starke nukleäre pCREB-IR. Nach sechsständiger Stimulation lag eine moderate pCREB-IR vor. In Präparationen, die für 1 h bzw. 6 h mit jeweils drei unterschiedlich hohen Dosen an THC (2.9 µM, 290 nM oder 29 nM) stimuliert wurden, konnte wie in den unstimulierten Kontrollen nahezu keine pCREB-IR nachgewiesen werden. Eine Präinkubation der Pinealozyten für 45 min mit drei unterschiedlichen Konzentrationen an THC (2.9 µM, 290 nM oder 29 nM) und eine darauf folgende Koapplikation mit 1 µM NA für 1 h induzierte eine starke nukleäre pCREB-IR (Abb. 3.22b). Die Intensität der pCREB-IR war vergleichbar mit der nukleären pCREB-IR in Präparationen, welche ausschließlich mit 1 µM NA für 1 h stimuliert wurden (Abb. 3.22a). Ein dosisabhängiger Effekt von THC auf die pCREB-IR konnte nicht nachgewiesen werden. Gleiches galt für Präparationen, die für 45 min mit jeweils drei unterschiedlichen Konzentrationen an THC (2.9 µM, 290 nM oder 29 nM) vorbehandelt und im An-

schluss mit 1  $\mu\text{M}$  NA für 6 h koappliziert wurden (Abb. 3.22b). Die Intensität der nukleären pCREB-IR dieser Präparationen war derjenigen vergleichbar, die für 6 h ausschließlich mit 1  $\mu\text{M}$  NA stimuliert wurden (Abb. 3.22a). Eine Koapplikation von 1  $\mu\text{M}$  NA mit jeweils drei unterschiedlichen Konzentrationen an THC (2.9  $\mu\text{M}$ , 290 nM oder 29 nM) für 1 h bzw. 6 h hatte denselben Effekt auf die nukleäre pCREB-IR wie in den mit THC präinkubierten Präparationen (Abb. 3.22c).

**a****b**

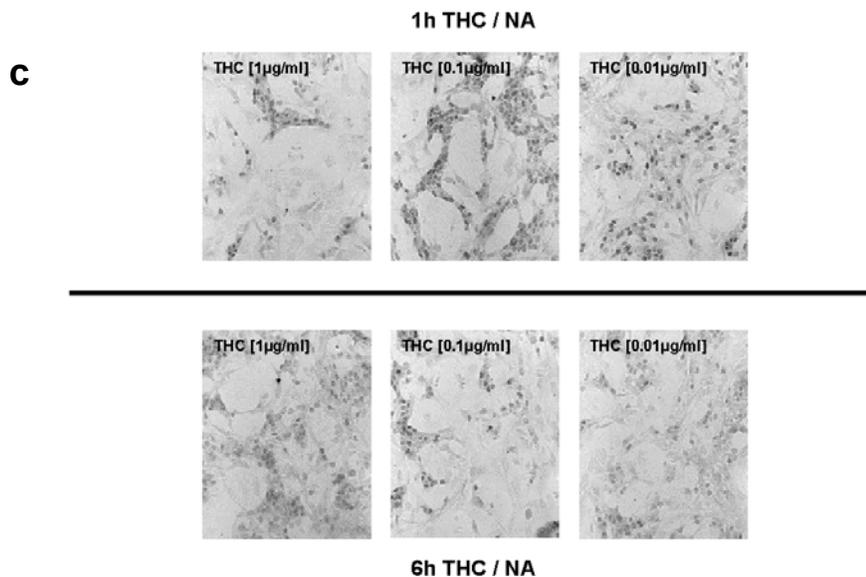


Abb. 3.22: Einfluss von THC auf die pCREB-IR in immobilisierten Pinealozyten der Ratte: Immunzytochemische Darstellung. (a) Gegenüber den unstimulierten Kontrollen, in denen nahezu keine pCREB-IR nachweisbar war, kam es durch die Stimulation mit 1  $\mu$ M NA für 1 h bzw. 6 h zu einer starken Induktion der pCREB-IR. Die Intensität der pCREB-IR war nach einstündiger Stimulation gegenüber der sechsstündigen Stimulation höher. Die Behandlung der Pinealozyten mit 2.9  $\mu$ M, 290 nM oder 29 nM THC hatte keinen Einfluss auf die pCREB-IR. (b) Die 45minütige Präinkubation mit 2.9  $\mu$ M, 290 nM oder 29 nM THC und einer anschließenden Koapplikation mit 1  $\mu$ M NA für 1 h bzw. 6 h induzierte deutlich eine nukleäre pCREB-IR. Die Intensität der pCREB-IR war nach einstündiger Stimulation stärker als in den 6 h stimulierten Präparationen. (c) Die einstündige bzw. sechsstündige Koapplikation von 2.9  $\mu$ M, 290 nM oder 29 nM THC mit jeweils 1  $\mu$ M NA induzierte eine starke nukleäre pCREB-IR. Die Intensität war derjenigen in ausschließlich NA-stimulierten Präparationen vergleichbar. Der Maßstab entspricht 10  $\mu$ m.

Diese Befunde konnten in immunchemischen Untersuchungen bekräftigt werden. In unstimulierten Pinealorganen konnten zwei schwache Immunsignale mit einem AK gegen die am Serin 133 phosphorylierte Form von CREB nachgewiesen werden (Abb. 3.23a): Eine 42 kDa große Bande, welche zuvor als pCREB identifiziert wurde (Schomerus et al. 1996) und eine 40 kDa große Bande, welche auf Interaktionen des AK mit dem pCREB-verwandten Antigen, der phosphorylierten Form des aktivierenden Transkriptionsfaktors 1 (ATF-1; siehe hierzu auch: Cell Signaling Technology Produktkatalog 2002, Beverly, MD, USA; Seite 179) zurückzuführen ist. Die sechsstündige Stimulation mit 1  $\mu$ M NA induzierte eine starke pCREB-IR. Durch eine sechsstündige Koapplikation von 1  $\mu$ M NA mit jeweils vier unterschiedlichen Konzentrationen an THC (7.3  $\mu$ M, 730 nM, 73 nM und 7.3 nM) konnte ebenfalls eine starke pCREB-IR induziert werden. Eine Präinkubation von Pinealorganen mit jeweils vier unterschiedlichen Konzentrationen an THC (7.3  $\mu$ M, 730 nM, 73 nM oder 7.3 nM) und eine darauf folgende sechsstündige Koapplikation mit 1  $\mu$ M NA verursachte eine ebenso starke Induktion der pCREB-IR. Die semiquantitative Analyse der

pCREB-IR ergab keine signifikante Veränderung der pCREB-IR durch die Behandlung mit THC. Die pCREB-IR der ausschließlich mit 1  $\mu$ M NA stimulierten Präparationen wurde als 100% festgesetzt (Abb. 3.23b; ANOVA mit anschließendem Zusatztest nach Bonferroni;  $n = 3$ ).

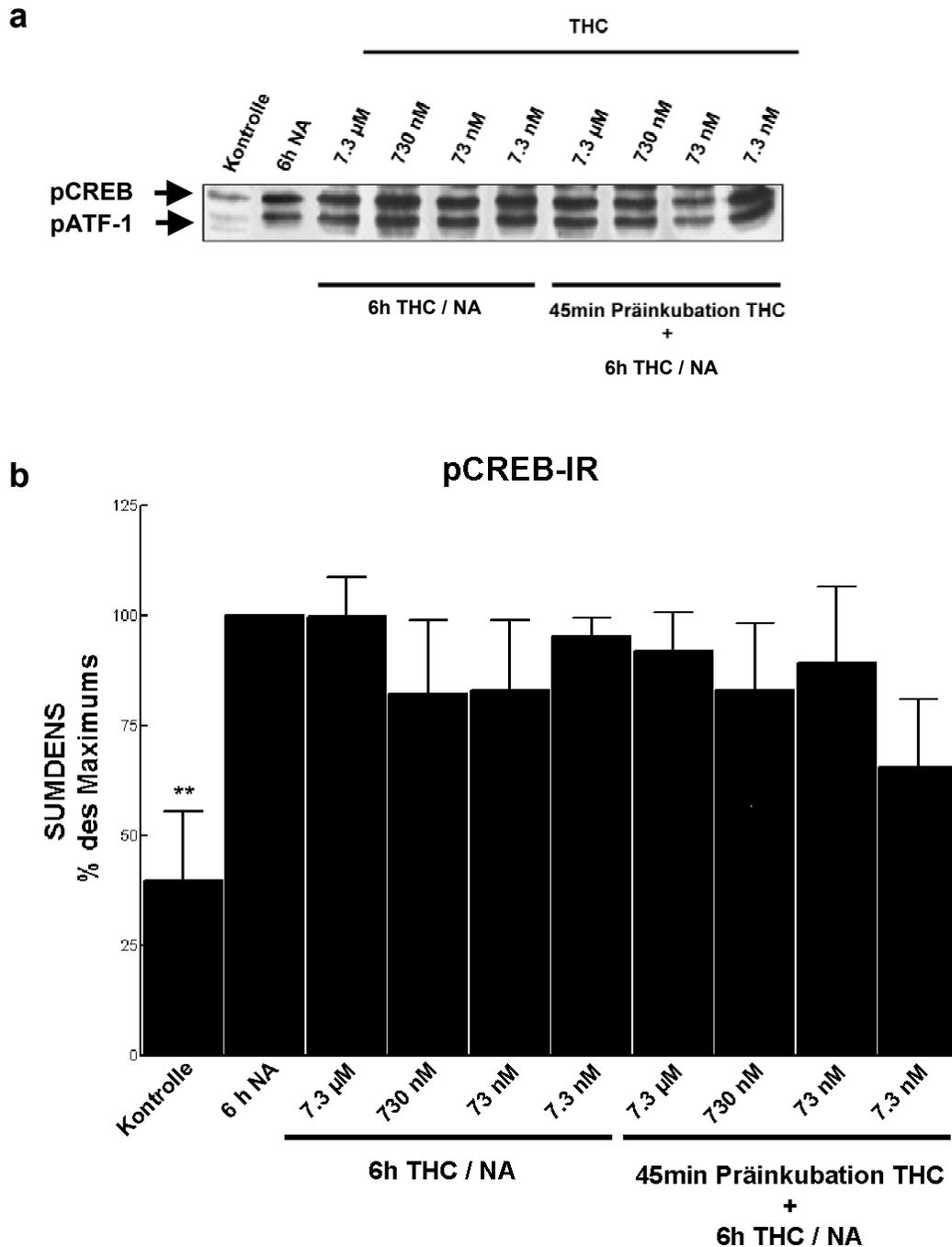


Abb. 3.23: Einfluss von THC auf die pCREB-IR in kultivierten Pinealorganen der Ratte: Immunchemische Darstellung. (a) Gegenüber den unstimulierten Kontrollen führte die sechsstündige Stimulation mit 1  $\mu$ M NA zu einer starken Induktion der pCREB-IR (obere Bande) und pATF-1-IR (untere Bande) IR. Eine Koapplikation von 7.3  $\mu$ M, 730 nM, 73 nM oder 7.3 nM THC mit 1  $\mu$ M NA für 6 h bzw. eine 45 minütige Präinkubation mit THC (7.3  $\mu$ M, 730 nM, 73 nM oder 7.3 nM THC) und eine darauf folgende Koapplikation mit 1  $\mu$ M NA für 6 h induzierte ebenso eine starke pCREB-IR. (b) Semiquantitative

Auswertung der pCREB-IR. Die SUMDENS-Werte der Präparationen, die ausschließlich mit 1  $\mu\text{M}$  NA für 6 h stimuliert wurden, wurden als 100% festgesetzt. Die statistische Auswertung erbrachte keine signifikanten Veränderungen der pCREB-IR nach THC-Behandlung (ANOVA mit anschließendem Posttest nach Bonferroni,  $n = 3$ , \*\*  $p=0.01$  gegenüber 6 h NA).

### 3.5.3 Die Stimulation mit dem CB 1 und 2 Rezeptor-Agonist THC hat keinen Einfluss auf den AANAT Proteingehalt in kultivierten Pinealorganen der Ratte

Die Wirkung einer THC-Stimulation auf den AANAT-Proteingehalt in kultivierten Pinealorganen der Ratte wurde mit Hilfe der Immunoblottechnik analysiert. In unstimulierten Präparationen konnte nur ein geringer AANAT-Proteingehalt nachgewiesen werden (Abb. 3.24). Nach sechsstündiger Stimulation mit 1  $\mu\text{M}$  NA nahm der AANAT-Proteingehalt deutlich zu. Die sechsstündige Koapplikation von 1  $\mu\text{M}$  NA mit jeweils vier unterschiedlichen Konzentrationen an THC (7.3  $\mu\text{M}$ , 730 nM, 73 nM oder 7.3 nM) induzierte ebenso eine deutliche Zunahme des AANAT-Proteingehalts. Diese wurde auch in Präparationen beobachtet, die vor der sechsstündigen Koapplikation für 45 min mit jeweils vier unterschiedlichen Konzentrationen an THC (7.3  $\mu\text{M}$ , 730 nM, 73 nM oder 7.3 nM) präinkubiert wurden. Die statistische Auswertung ergab keine signifikanten Veränderungen im AANAT-Proteingehalt nach THC-Behandlung. Die ausschließlich mit 1  $\mu\text{M}$  NA stimulierten Präparationen wurden als 100% festgesetzt. Die statistische Analyse erfolgte durch ANOVA mit einem anschließendem Zusatztest nach Bonferroni ( $n = 3$ ).

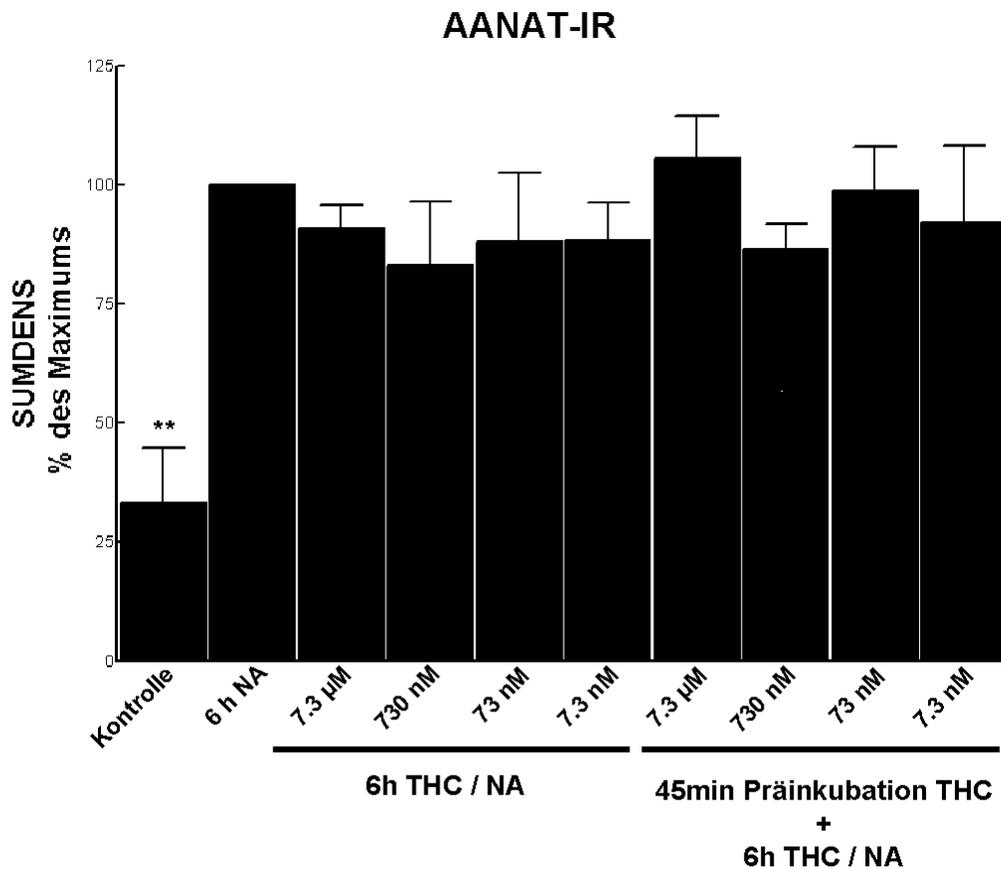


Abb. 3.24: Darstellung der semiquantitativen Analyse der AANAT-IR nach Behandlung kultivierter Pinealorgane der Ratte mit THC. Die sechsstündige Stimulation mit 1  $\mu\text{M}$  NA verursachte gegenüber den unstimulierten Kontrollen eine starke Zunahme des AANAT-Proteingehalts. Nach sechsstündiger Koapplikation von 7.3  $\mu\text{M}$ , 730 nM, 73 nM oder 7.3 nM THC mit jeweils 1  $\mu\text{M}$  NA für 6 h kam es ebenfalls zu einer starken Zunahme des AANAT-Proteingehalts. Dies galt auch für Präparationen, die vor der sechsstündigen Koapplikation mit vier unterschiedlichen Konzentrationen an THC (7.3  $\mu\text{M}$ , 730 nM, 73 nM oder 7.3 nM THC) präinkubiert wurden. Die statistische Auswertung ergab keine signifikanten Veränderungen des AANAT-Proteingehalts nach THC-Behandlung. Die SUMDENS-Werte der ausschließlich mit 1  $\mu\text{M}$  NA stimulierten Präparationen wurden als 100% festgesetzt (ANOVA mit anschließendem Posttest nach Bonferroni,  $n = 3$ , \*\*  $p=0.01$  gegenüber 6 h NA).

#### 3.5.4 Die AANAT-Aktivität und die Melatoninfreisetzung werden in kultivierten Pinealorganen der Ratte durch die Behandlung mit THC gehemmt

Die Bestimmung der AANAT-Aktivität in Homogenaten aus kultivierten Pinealorganen der Ratte erfolgte durch die AANAT katalysierte Bildung von  $^{14}\text{C}$ -radioaktiv markiertem  $^{14}\text{C}$ -N-Acetyl-tryptamin aus den Substraten  $^{14}\text{C}$ -markiertes AcetylCoA und Tryptamin. Pinealorgane wurden mit 1  $\mu\text{M}$  NA für 1 h, 2 h, 3 h oder 6 h stimuliert. Parallel dazu wurden Pinealorgane für 45 min mit 0.73  $\mu\text{M}$  THC präinkubiert und unmittelbar im Anschluß mit 0.73  $\mu\text{M}$  THC und 1  $\mu\text{M}$  NA für 1 h, 2 h, 3 h oder 6 h behandelt. In Abb. 3.25 sind auf der Abszisse die Messzeitpunkte und auf der Ordinate

die AANAT-Aktivität in nmol /  $\mu\text{g}$  Protein x h angegeben. In unstimulierten Kontrollpräparationen war nahezu keine AANAT-Aktivität nachweisbar. Mit zunehmender Stimulationsdauer kam es zu einem parallel verlaufenden Anstieg der AANAT-Aktivität in ausschließlich NA-stimulierten Präparationen und in den NA/THC behandelten Präparationen. Die AANAT-Aktivität war in den ausschließlich NA-stimulierten Präparationen gegenüber den NA/THC behandelten Präparationen deutlich erhöht. Beim Messzeitpunkt von 6 h konnte ein signifikanter Unterschied in der AANAT-Aktivität zwischen den unterschiedlich behandelten Proben ermittelt werden. Dazu wurden jeweils 3 unabhängige Versuche, in denen jeder einzelne Messzeitpunkt doppelt bestimmt wurde, ausgewertet (ANOVA mit einem anschließendem Zusatztest nach Bonferroni,  $n = 3$ , \*\*  $p=0.01$  gegenüber der 6 h NA/THC behandelten Präparation).

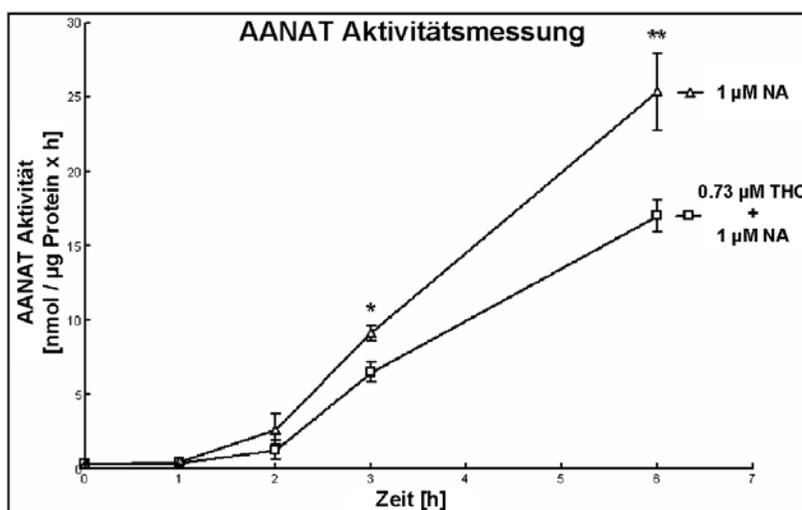


Abb. 3.25: Einfluss von THC auf die AANAT-Aktivität in Homogenaten aus kultivierten Pinealorganen der Ratte: Darstellung der AANAT-Aktivität (in nmol /  $\mu\text{g}$  Protein x h). In unstimulierten Kontrollen war eine AANAT-Aktivität nahezu nicht nachweisbar. Die AANAT-Aktivität stieg mit zunehmender Stimulationsdauer stetig an. Dabei war die AANAT-Aktivität in ausschließlich mit NA-stimulierten Präparationen gegenüber den NA/THC behandelten Präparationen deutlich erhöht. Die statistische Auswertung ergab für den 6 h Messzeitpunkt einen signifikanten Unterschied in der AANAT Aktivität zwischen ausschließlich-NA stimulierten und NA/THC behandelten Präparationen (ANOVA mit anschließendem Posttest nach Bonferroni,  $n = 3$ , \*\*  $p=0.01$  gegenüber der 6 h NA/THC behandelten Präparation).

Die Melatoninkonzentration im Kulturmedium von kultivierten Pinealorganen der Ratte wurde mit Hilfe eines ELISAs bestimmt. Nach sechsständiger Stimulation mit 1  $\mu\text{M}$  NA kam es im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle zu einem 4-5 fachen Anstieg der Melatoninfreisetzung (Abb. 3.26). Eine sechsständige Koapplikation von 1  $\mu\text{M}$  NA

mit jeweils vier unterschiedlichen Konzentrationen an THC (7.3  $\mu\text{M}$ , 730 nM, 73 nM oder 7.3 nM) führte zu einer deutlich reduzierten Melatoninfreisetzung im Vergleich zu ausschließlich NA-stimulierten Präparationen. Eine 45minütige Präinkubation mit THC in jeweils vier unterschiedlichen Konzentrationen an THC (7.3  $\mu\text{M}$ , 730 nM, 73 nM oder 7.3 nM) und eine direkt im Anschluss erfolgte sechsstündige Koapplikation mit 1  $\mu\text{M}$  NA reduzierten ebenso die Melatoninfreisetzung. Die statistische Auswertung der Messdaten erbrachte für sämtliche mit THC behandelten Proben gegenüber den ausschließlich NA-stimulierten Präparationen eine signifikant verminderte Melatoninfreisetzung. Die ausschließlich NA-stimulierten Präparationen wurden als 100% festgesetzt. Die Abnahme der Melatoninfreisetzung war nicht von der eingesetzten THC -Konzentration abhängig (ANOVA mit anschließendem Posttest nach Dunnet,  $n = 6$ , \*\*  $p=0.01$ ; \*  $p=0.05$  gegenüber 1  $\mu\text{M}$  NA für 6 h).

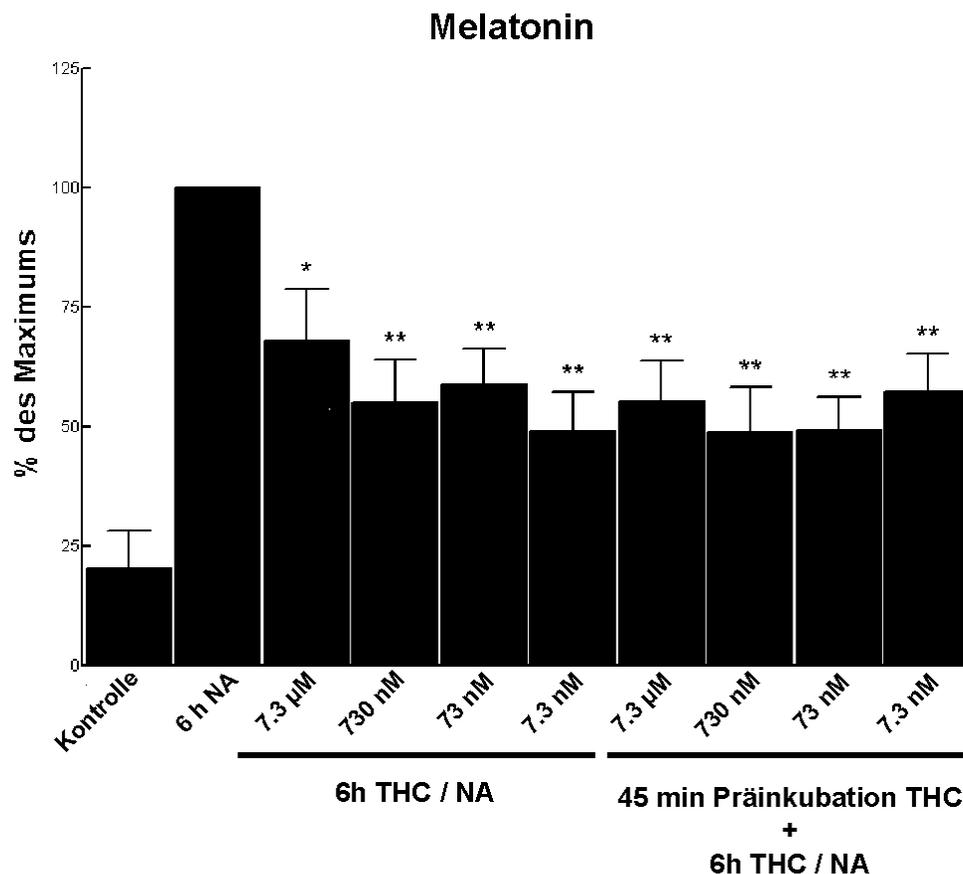


Abb. 3.26: Die sechsstündige Stimulation kultivierter Rattenpinealorgane mit 1  $\mu\text{M}$  NA induzierte gegenüber der unstimulierten Kontrollpräparation einen 4-5 fachen Anstieg in der Melatoninfreisetzung. Die sechsstündige Koapplikation von 1  $\mu\text{M}$  NA mit vier unterschiedlichen Konzentrationen an THC (7.3  $\mu\text{M}$ , 730 nM, 73 nM oder 7.3 nM) verursachte eine verminderte Melatoninfreisetzung. Die Abnahme der Melatoninsekretion war nicht von der eingesetzten THC-Konzentration abhängig. Die Melatoninfreisetzung war in Präparationen, die mit vier unterschiedlichen Konzentrationen an THC (7.3  $\mu\text{M}$ , 730 nM, 73 nM oder 7.3 nM) THC für 45 min präinkubiert und darauf mit 1  $\mu\text{M}$  NA für 6 h koappliziert wurden, ebenfalls gegenüber der ausschließlich mit NA stimulierten Präparation signifikant ver-

mindert. Die statistische Analyse erfolgte durch ANOVA mit anschließendem Zusatztest nach Dunnet ( $n = 6$ ,  $**p < 0.01$ ,  $*p < 0.05$  gegenüber 6 h NA). Die Melatoninwerte der ausschließlich NA-stimulierten Präparationen wurden als 100% festgesetzt.

## 4 Diskussion

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Aufdeckung zellulärer und molekularer Mechanismen, welche die Regulation des Schlüsselenzyms der Melatoninbiosynthese, der Arylalkylamin *N*-acetyltransferase (AANAT), beeinflussen. Die Untersuchungen erfolgten an Pinealorganen von Ratte und Rind. Das Pinealorgan von Säugetieren stellt aufgrund seiner geringen Komplexität und morphologischen Geschlossenheit ein Modellsystem zum Studium prinzipieller Signalübertragungs- und Verarbeitungsprozesse dar. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit bieten somit einerseits grundlegende Einblicke in Noradrenalin (NA)-gesteuerte Signalkaskaden im Pinealorgan. Auf der anderen Seite liefern die am Pinealorgan erhobenen Ergebnisse experimentelle Ansatzpunkte zum besseren Verständnis von Signaltransduktionsprozessen in komplexeren neuronalen und neuroendokrinen Systemen. Daher sollen die vorliegenden Ergebnisse nicht nur vor dem Hintergrund ihrer Bedeutung für die Steuerung der Melatoninbiosynthese im Pinealorgan, sondern ebenso aufgrund ihrer Übertragbarkeit auf Signalprozesse in komplexeren neuronalen- und neuroendokrinen Systemen diskutiert werden.

### 4.1 Die Darstellung von R-Untereinheiten der PKA und deren Ankerproteine in Pinealozyten der Ratte

Die Proteinkinase A (PKA) Typ II übt bei der Steuerung der Melatoninbiosynthese im Pinealorgan eine Schlüsselfunktion aus (Maronde et al. 1999a, b, 2000). In der vorliegenden Arbeit wurde erstmalig das exakte Verteilungsmuster der regulatorischen (R)-Untereinheiten der PKA sowie deren Ankerproteine AKAP 95 und 150 in Pinealozyten der Ratte untersucht. Dadurch konnte die funktionelle Beteiligung der PKA an Signalprozessen in Pinealozyten bekräftigt und die PKA in Pinealozyten der Ratte weiterführend charakterisiert werden.

Immunzytochemische Untersuchungen der vorliegenden Arbeit belegen die Existenz der R-  $\alpha$  und  $\beta$  Untereinheiten der PKA Typ I und II in Pinealozyten der Ratte. In nahezu sämtlichen Pinealozyten konnten alle vier bekannten R-Untereinheiten nachgewiesen werden. Dadurch wird das Konzept, dass die PKA im Pinealorgan eine

Schlüsselfunktion in den noradrenergen Signalverarbeitungsprozessen spielt, weiter unterstützt (Roseboom und Klein 1995; Tamotsu et al. 1995; Maronde et al. 1999a, b, 2000; Ganguly et al. 2001). Die Immunsignale für die beiden R-Untereinheiten der PKA II waren gegenüber den Signalen der beiden R-Untereinheiten der PKA I wesentlich intensiver. Daraus kann auf einen höheren Proteinanteil der PKA II in Pinealozyten der Ratte geschlossen werden. In kultivierten Pinealozyten des Rindes konnte mit Hilfe der Immunzytochemie und Immunhistochemie ebenso ein deutliches Immunsignal für die R-Untereinheiten der PKA II nachgewiesen werden. Dagegen war kein Immunsignal für die R-Untereinheiten der PKA I nachweisbar (Maronde et al. 1997). Diese Unterschiede in der Signalstärke zwischen den R-Untereinheiten der PKA I und PKA II lassen auf eine wichtigere Funktion der PKA II gegenüber der PKA I in der Signaltransduktion in Pinealozyten von Säugetieren schließen. In der Tat belegen frühere Daten, dass die PKA II gegenüber der PKA I an der noradrenergen Regulation der Melatoninbiosynthese sowohl in der Ratte (Maronde et al. 1999a, b) als auch im Rind (Maronde et al. 1997) beteiligt ist. Allerdings läßt sich über den Proteingehalt der R-Untereinheiten keine direkte Verbindung mit ihrer tatsächlichen Funktion herstellen, da sich die biochemischen Eigenschaften der beiden R-Untereinheiten stark voneinander unterscheiden. Die Affinität der  $R_{I\alpha}$ -Untereinheit für cAMP ist in vivo viel höher als die von  $R_{II\alpha}$  und  $R_{II\beta}$  (Edelman et al. 1987; Taylor et al. 1992). Daher kann die PKA I schon durch schwach erhöhte cAMP-Werte aktiviert werden, wohingegen zur Aktivierung der PKA II länger andauernde und stark erhöhte cAMP-Spiegel benötigt werden (Stein et al. 1987). Diese Daten deuten an, dass PKA-Holoenzyme über die entsprechenden R-Untereinheiten das intrazelluläre cAMP-Signal dekodieren, welches sich in Dauer und Intensität unterscheiden kann.

Die Intensität der Immunsignale von allen vier R-Untereinheiten blieb während des noradrenergen Stimulationsverlaufs stets konstant. Diese Ergebnisse stehen im Einklang zu früheren immunchemischen Arbeiten von Maronde et al. (1999b). In diesen Untersuchungen blieben der Proteingehalt der R-Untereinheiten während eines noradrenergen Stimulationsverlaufs sowie über den Licht/Dunkelrhythmus hinaus unverändert. Die an Pinealozyten erzielten Ergebnisse stehen im Einklang mit immunchemischen Daten, die an einer Schilddrüsen-Zelllinie erhoben wurden (FRTL-5 Zellen; Armstrong et al. 1995). Dort blieb die Proteinmenge von allen vier R-Untereinheiten der PKA nach einer chronischen Erhöhung des cAMP-Spiegels, hervorgerufen durch eine dauerhafte Stimulation mit Forskolin, ebenfalls unverändert.

Im Gegensatz dazu wurde in einer primären Zellkultur von Lungenepithelzellen sowie in einer Primärkultur von Granularzellen des Ovars eine cAMP-vermittelte Erhöhung des Proteingehalts der RI- und RII Untereinheiten nachgewiesen (Lange-Carter und Malkinson 1991; Ratossh et al. 1987).

Die R-Untereinheiten der PKA II sind häufig mit subzellulären Strukturen, z. B. den perinukleären Zisiternen, dem Golgoapparat oder den dendritischen Zytoskelett-Elementen, assoziiert. Dagegen sind die regulatorischen Untereinheiten der PKA I vorwiegend in der zytosolischen Fraktion der Zellen vorzufinden (Glantz et al. 1992; Ludvig et al. 1990). In der vorliegenden Arbeit fand sich in den Pinealozyten der Ratte eine gleichmäßige Verteilung der fein granulierten Immunsignale von allen vier untersuchten R-Untereinheiten im Zytoplasma.

Die immunzytochemischen Untersuchungen für die R-Untereinheiten der PKA wurden durch die Analyse von A Kinase Anker Proteinen (AKAPs) komplettiert. Über die Bindung an die R-Untereinheiten positionieren AKAPs die PKA an bestimmte subzelluläre Kompartimente. Das PKA Holoenzym wird so in die unmittelbare Nähe zu möglichen Substraten und Effektorproteinen gebracht und cAMP-angetriebene Signalkaskaden werden dadurch verstärkt (zur Übersicht, siehe Feliciello et al. 2001). Durch die Verankerung der PKA an ein bestimmtes Areal in der Zelle können dort lokale und basal erhöhte cAMP-Spiegel vom verankerten PKA Holoenzym präziser dekodiert und hierdurch örtlich limitierte Dissoziationen des PKA Holoenzym hervorrufen werden (Ventra et al. 1996). AKAPs binden bevorzugt an die RII-Untereinheiten und positionieren daher hauptsächlich die PKA Typ II an spezifische intrazelluläre Bereiche. Es existieren jedoch ebenso AKAPs, welche die RI-Untereinheiten der PKA Typ I binden können (Dodge and Scott 2000). Zahlreiche AKAP-Isoformen konnten bisher identifiziert werden. In der vorliegenden Arbeit wurden die Isoformen AKAP 95 und 150 in Pinealozyten der Ratte mit Hilfe der Immunoblot-Technik und der Immunzytochemie untersucht. AKAP 150 ist ein bei Nagetieren stark konserviertes Protein. Zusammen mit AKAP 75 (Rind) und AKAP 79 (Mensch) bildet es eine neuronale AKAP-Familie, deren Mitglieder zahlreich im Gehirn vorzufinden sind (Bregman et al. 1989; Hirsch et al. 1992; Carr et al. 1992). Über diese neuronalen AKAPs wird die PKA Typ II an das postsynaptische Zytoskelett und an die Zellkerne in Neuronen positioniert (Carr et al. 1992). In primären Kulturen aus Körnerzellen des Cerebellums ist AKAP 75/150 im Perikaryon und dem Dendritenbaum lokalisiert (Glantz et al. 1992). In diesen Zellen verstärken AKAP75/150 cAMP-

vermittelte Signalprozesse im Zellkern, was anhand der Phosphorylierung von CREB und durch die Initiation der Transkription von Genen nachzuweisen ist (Feliciello et al. 1997; Paolillo et al. 1999). Mitglieder der AKAP 75/79/150 Familie werden ebenso in nicht-neuronalen Zellen vorgefunden, wo AKAP 75 im kortikalen Aktinzytoskelett akkumuliert und mit der Zellmembran assoziiert ist (Li et al. 1996).

In dieser Arbeit wurde in nahezu sämtlichen Pinealozyten der Ratte eine deutliche Akkumulation der AKAP 150-Immunreaktivität (IR) in der Nähe der Zellmembran vorgefunden. Sowohl das Verteilungsmuster als auch die Signalstärke der AKAP 150-IR blieb im Verlauf der noradrenergen Stimulation unverändert. In Doppelimmunfluoreszenz-Untersuchungen konnte eine substantielle Kolokalisation von AKAP 150-IR mit der RII $\alpha$ -IR und RII $\beta$ -IR, hauptsächlich in den peripheren Bereichen der Pinealozyten, nachgewiesen werden. Dieser Befund könnte bedeuten, dass AKAP 150 hauptsächlich die PKA Typ II in der unmittelbaren Nähe zur Zellmembran positioniert, möglicherweise um eine enge Assoziation mit der Adenylatzyklase herzustellen. Da AKAP 150 die Dissoziation des PKA Holoenzym beeinflusst, könnten die funktionellen Eigenschaften der PKA Typ II in Assoziation mit AKAP 150 in der Peripherie der Pinealozyten sich von den Eigenschaften der PKA Typ II in den zentraleren Regionen im Zytoplasma der Pinealozyten unterscheiden. Die immunzytochemischen Untersuchungen dieser Arbeit wiesen ebenso eine, wenn auch nur geringfügige, Kolokalisation der AKAP 150-IR mit der RI $\alpha$ - und RI $\beta$ -IR auf.

AKAP 95 konnte in vorherigen Untersuchungen im Zellkern nachgewiesen werden, wo es mit der DNA über zwei Zinkfinger motive interagiert. AKAP 95 besitzt, im Vergleich zur RII $\beta$ -Untereinheit der PKA, eine wesentlich höhere Bindungsaffinität zur RII $\alpha$ -Untereinheit (Coghlan et al. 1994; Hausken et al. 1996). Es wird vermutet, dass AKAP 95 die Verteilung der PKA II während der Zellteilung steuert (Coghlan et al. 1994). In der vorliegenden Arbeit wurde eine ausschließlich nukleäre AKAP 95-IR beobachtet. Diese war zu keinem Zeitpunkt mit den IR der R-Untereinheiten der PKA kolokalisiert. Daher dürfte eine Interaktion von AKAP 95 mit den R-Untereinheiten in Pinealozyten der Ratte auszuschließen sein. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit Immunpräzipitationsexperimenten an Fibroblasten, die belegen, dass AKAP 95 und RII $\alpha$  während der Interphase in zwei unterschiedlichen Zellkompartimenten vorzufinden sind. Dagegen sind AKAP 95 und RII $\alpha$  während der Mitose kolokalisiert (Eide et al. 1998). Untersuchungen mit einer humanen Lymphoblastom/Leukämie-Zelllinie

zeigten ebenfalls eine vom Zellzyklus abhängige Interaktion zwischen AKAP 95 und der PKA Typ II. Diese Interaktion wird über eine Phosphorylierung von RII $\alpha$  am Threonin 54 gesteuert (Landsverk et al. 2001). In der Ratte konnte hingegen bisher keine Interaktion von RII $\alpha$  mit AKAP 95 in vivo nachgewiesen werden. Im Gegensatz zur RII $\alpha$ -Untereinheit bei Mensch, Rind und Maus fehlt der RII $\alpha$ -Untereinheit der Ratte die für die Interaktion mit AKAP 95 essenzielle Phosphorylierungsstelle am Threonin 54.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass durch die immunzytochemischen und immunchemischen Untersuchungen zu den  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheiten der PKA Typ I und II sowie zu AKAP 95 und 150 die Bedeutung der PKA für Signaltransduktionsprozesse in Pinealozyten der Ratte bekräftigt werden konnte. Die deutliche Kollokalisierung der AKAP 150-IR mit den RII $\alpha$ - und RII $\beta$ -IR in der Nähe zur Zellmembran der Rattenpinealozyten könnte auf eine mögliche Interaktion der PKA Typ II und AKAP 150 in diesem Kompartiment hindeuten. Im Gegensatz zu AKAP 150 war AKAP 95 im Zellkern vorzufinden und lag niemals kollokalisiert mit den untersuchten R-Untereinheiten vor. Daher kann eine Interaktion zwischen AKAP 95 und den R $\alpha$ - und R $\beta$ -Untereinheiten der PKA Typ I und II ausgeschlossen werden. Die strikte nukleäre Lokalisation von AKAP 95 in den Pinealozyten der Ratte könnte eine Beteiligung von AKAP 95 an nukleären Signalprozessen andeuten, deren Partnermolekülen noch aufzuklären sind.

#### **4.2 Das EPAC-spezifische cAMP-Analog 8-CPT-2'-O-Me-cAMP hat keinen Einfluss auf die Regulationsmechanismen der Melatoninbiosynthese**

Um eine mögliche funktionelle Beteiligung des cAMP-regulierten Austauschfaktors EPAC und der monomeren GTPase Rap an der Steuerung der Melatoninbiosynthese zu untersuchen, wurden kultivierte Pinealorgane mit unterschiedlichen Konzentrationen an 8-(4-chloro-phenylthio)-2'-O-methyladenosin-cAMP (8-CPT-2'-O-Me-cAMP), einem EPAC-spezifischen cAMP-Analog, einzeln oder in Kombination mit Noradrenalin (NA), stimuliert. Anschließend wurden die Phosphorylierung von CREB am Serin 133, der AANAT Proteingehalt und die Freisetzung von Melatonin gemessen. Da bekannt ist, dass EPAC/Rap an der Regulation der extrazellulär regulierten Kinasen (ERKs) 1 und 2 beteiligt sind, wurde auch der Einfluss von 8-CPT-2'-O-Me-

cAMP auf die Phosphorylierung von ERK 1 und 2 im Pinealorgan der Ratte untersucht.

Seit Entdeckung des sekundären Botenstoffes cAMP konnte eine Vielzahl von Signalprozessen aufgedeckt werden, in denen die Protein Kinase A (PKA) das entscheidende Protein zur Verarbeitung und Weiterleitung von cAMP-Signalen darstellt. In den letzten Jahren wurden jedoch weitere Proteine identifiziert, die zur direkten Bindung von cAMP befähigt sind und über die cAMP-Bindung ihren Funktionszustand verändern. Eine seit längerer Zeit bekannte Gruppe von cAMP-bindenden Proteinen stellen die cAMP/cGMP-gesteuerten Ionenkanäle dar (zur Übersicht, siehe Buck 1992). Im Jahre 1998 wurde in den Laboren von Bos und Graybiel unabhängig voneinander eine dritte Klasse von cAMP-bindenden Proteinen charakterisiert: die sogenannten cAMP-regulierten Austauschfaktoren (de Rooij et al. 1998; Kawasaki et al. 1998). Diese wurden zunächst als cAMP-GEF-1 und 2 bezeichnet, später setzte sich jedoch die Bezeichnung EPAC (*guanosine nucleotide exchange factors directly activated by cAMP*) durch. Bei diesen Proteinen handelt es sich um Austauschfaktoren der monomeren GTPasen Rap 1 und 2 (de Rooij et al. 2000). Inaktives Rap liegt in der GDP-gebundenen Form vor. EPACs bewirken einen Austausch von GDP mit GTP, wodurch es über eine Konformationsänderung zur Aktivierung von Rap kommt (Rap-GTP). Neben einer homologen Domäne zum CDC25 Protein, dem ersten identifizierten Guanin-Nukleotid-Austausch Protein (Broek et al. 1987), besitzen die zwei bekannten EPAC-Isoformen eine cAMP-Bindestelle, deren Aminosäureabfolge streng homolog zu den R-Untereinheiten der PKA ist (de Rooij et al. 2000). Bei EPACs fungiert diese cAMP-Bindestelle als eine inhibitorische Domäne. Die Bindung eines cAMP-Moleküls führt zur Aufhebung der inhibitorischen Funktion und es kommt zur Aktivierung des EPAC Proteins, die zum Austausch von GDP zu GTP am Rap1 Protein führt (de Rooij et al. 2000). EPAC 2 besitzt eine zusätzliche N-terminale, jedoch physiologisch nicht aktive cAMP-Bindestelle (de Rooij et al. 2000). EPACs wurden bisher in nahezu sämtlichen Geweben nachgewiesen. EPAC 1 liegt besonders zahlreich in der Niere, in Ovarien und in der Schilddrüse vor. EPAC 2 wurde hingegen in großer Dichte im Gehirn und in der Nebenniere nachgewiesen (Kawasaki et al. 1998; de Rooij et al. 1998). Über das Vorkommen von EPACs im Pinealorgan sind in der Literatur keine Hinweise vorzufinden. Aufgrund der beschriebenen, nahezu

ubiquitären Verteilung von EPACs ist jedoch ebenso von ihrem Vorkommen im Pinealorgan auszugehen.

Die Funktion von Rap wird in der Literatur kontrovers diskutiert. Zunächst wurde Rap 1 als ein potenzieller Inhibitor Ras-vermittelter Transformationsprozesse charakterisiert, welche über den Mitogen-aktivierte Proteinkinase (MAPK)-Signalweg in der Zelle gesteuert werden (Kitayama et al. 1989). Daher wurde Rap 1 als ein Deaktivator von ERK bzw. ERK-vermittelten Signalprozessen beschrieben (Cook et al. 1993; Boussiotis et al. 1997). Dagegen wurde in anderen Arbeiten Rap 1 eine Funktion als Aktivator in der cAMP-vermittelten Aktivierung von ERKs zugesprochen (Vossler et al. 1997; Ohtsuka et al. 1996). An den beschriebenen Signalprozessen ist auch die PKA beteiligt, deren genaue funktionelle Beteiligung an den beschriebenen Rap 1-vermittelten Signalprozessen allerdings noch unklar ist. Um zwischen PKA-vermittelten cAMP-Effekten und PKA-unabhängigen, EPAC/Rap-vermittelten Signalverarbeitungsprozessen unterscheiden zu können, wurde das EPAC-spezifische cAMP-Analog 8-CPT-2'-O-Me-cAMP entwickelt (Enserink et al. 2002). Mit Hilfe des Analogs konnte eine spezifische Aktivierung einer Familie von cAMP-sensitiven Proteinen erzielt werden. Enserink et al. zeigten erstmalig, dass Rap und ERKs unabhängig voneinander reguliert werden. Weiterhin wurde gezeigt, dass die Wirkung von cAMP auf den MAPK Signalweg sich von Zelltyp zu Zelltyp unterscheiden kann. In einigen Zelllinien führte die Erhöhung des cAMP-Spiegels zur Aktivierung der extrazellulär regulierten Kinasen (ERKs) 1 und 2, wogegen in anderen Zelllinien ein erhöhter cAMP-Spiegel die ERKs entweder inhibierte oder ihren Aktivitätszustand nicht beeinflusste.

In der vorliegenden Arbeit konnte durch die Stimulation kultivierter Pinealorgane mit 8-CPT-2'-O-Me-cAMP erstmalig zwischen PKA- und EPAC/Rap vermittelten Signalwegen im Pinealorgan der Ratte unterschieden werden. Zunächst wurde der Einfluss von 8-Br-cAMP und 8-CPT-2'-O-Me-cAMP auf die Phosphorylierung von CREB am Serin 133 in kultivierten Pinealorganen der Ratte überprüft. 8-Br-cAMP ist ein unspezifisches cAMP-Analog und beeinflusst die Aktivität sämtlicher cAMP-bindender Proteine in der Zelle. Dagegen gilt das cAMP-Analog 8-CPT-2'-O-Me-cAMP in einem bestimmten Konzentrationsbereich als ein EPAC-spezifisches cAMP-Analog (Enserink et al. 2002). Mit Hilfe eines *in vitro* PKA Kinase Assays wurde gezeigt, dass 1  $\mu$ M 8-CPT-2'-O-Me-cAMP die PKA Aktivität nicht beeinflusst. Dagegen induzierten 10  $\mu$ M 8-CPT-2'-O-Me-cAMP die Aktivität der PKA Typ I um 15%, die der

PKA Typ II um 20%. Nach Applikation von 100  $\mu\text{M}$  8-CPT-2'-O-Me-cAMP kam es zur nahezu vollständigen Aktivierung von PKA Typ I und II. In EPAC 1 stabil-transfizierten Zellen (NIH3T3-A14-EPAC1 Zellen) induzierte 1 mM 8-Br-cAMP die Aktivierung von Rap 1 und die Phosphorylierung von CREB am Serin 133 (Enserink et al. 2002). Die Aktivierung von Rap 1 konnte ebenso durch die Applikation von 8-CPT-2'-O-Me-cAMP induziert werden, wogegen bis zu 100  $\mu\text{M}$  8-CPT-2'-O-Me-cAMP in diesen Zellen keinen Einfluss auf die Phosphorylierung von CREB am Serin 133 hatten. In der vorliegenden Arbeit induzierten 5 mM und 500  $\mu\text{M}$  8-Br-cAMP die pCREB-Immunreaktivität (IR) in kultivierten Pinealorganen deutlich. Die Behandlung der kultivierten Pinealorgane mit 10  $\mu\text{M}$  8-CPT-2'-O-Me-cAMP führte gegenüber NA-stimulierten Präparationen, deren pCREB-IR als 100% festgelegt wurde, zu einer 75%ig erhöhten pCREB-IR. Die Stimulation mit 1  $\mu\text{M}$  8-CPT-2'-O-Me-cAMP hatte allerdings keinen induktiven Effekt auf die pCREB-IR. Die hier nachgewiesene, durch 10  $\mu\text{M}$  8-CPT-2'-O-Me-cAMP hervorgerufene Phosphorylierung von CREB am Serin 133 in Pinealozyten steht im Gegensatz zu den Befunden von Enserink et al. (2002) und spricht dafür, dass 10  $\mu\text{M}$  8-CPT-2'-O-Me-cAMP eine partielle Aktivierung der PKA Typ II in kultivierten Pinealorganen hervorruft, da die PKA Typ II die Phosphorylierung von CREB am Serin 133 als Antwort auf einen erhöhten cAMP-Spiegel in Pinealozyten der Ratte steuert (Maronde et al. 1999b, 2000).

Sowohl auf den AANAT Proteingehalt als auch auf die Freisetzung von Melatonin hatte die Stimulation mit 8-CPT-2'-O-Me-cAMP keinen Einfluss. Die kultivierten Pinealorganen wurden entweder für 6 h mit einer Konzentration von 1  $\mu\text{M}$  NA und jeweils vier unterschiedlichen Konzentrationen an 8-CPT-2'-O-Me-cAMP oder allein mit vier unterschiedlichen Konzentrationen an 8-CPT-2'-O-Me-cAMP behandelt. Bei der alleinigen Stimulation von kultivierten Pinealorganen mit 100  $\mu\text{M}$  oder 10  $\mu\text{M}$  kam es zu einer geringfügigen, jedoch nicht signifikanten Zunahme der AANAT-IR. Dieser Effekt könnte, wie die nach Stimulation mit 10  $\mu\text{M}$  8-CPT-2'-O-Me-cAMP erfolgte Induktion der pCREB-IR, auf eine partielle Aktivierung der PKA durch 8-CPT-2'-O-Me-cAMP zurückzuführen sein. Niedrigere Dosen beeinflussten die AANAT-IR jedoch nicht. Somit konnte eine mögliche Beteiligung von EPAC/Rap an der Regulation der Melatoninbiosynthese im Pinealorgan der Ratte mit Hilfe eines EPAC-spezifischen cAMP-Analogs ausgeschlossen werden. Andererseits unterstützen die erhobenen Daten die wichtige funktionelle Bedeutung der PKA für die Steuerung der Melatoninbiosynthese.

An kultivierten Pinealorganen der Ratte wurde weiterhin der Einfluss von NA und 8-CPT-2'-O-Me-cAMP auf die Aktivierung, d. h. auf die Phosphorylierung von ERK 1 und 2 am Threonin 202 und Tyrosin 204 untersucht. Immunhistochemische Untersuchungen belegten ausschließlich die Existenz der ERK 1 in Pinealorganen der Ratte (Kiyama et al. 1994). In späteren immunchemischen Untersuchungen konnten dagegen ERK 1 und 2 und die am MAPK-Signalweg beteiligten Kinasen Raf 1 und MEK 1 nachgewiesen werden (Ho et al. 1999). Es wurde eine cGMP/PKG abhängige Aktivierung von ERK 1 und 2 im Pinealorgan der Ratte beschrieben, die nach 10minütiger Stimulation mit NA auftrat (Ho et al. 1999). Weitere Arbeiten beschrieben eine zeit- und konzentrationsabhängige Aktivierung von ERK 1 und 2 durch NA (Mackova et al. 2000; Ho et al. 2000). Dabei erfolgte eine maximale Aktivierung von ERK 1 und 2 nach 15minütiger Stimulation mit 10  $\mu$ M NA. Ein signifikanter Effekt von NA auf die Aktivierung von ERK 1 und 2 konnte maximal nach einstündiger Stimulation erzielt werden (Mackova et al. 2000). Die Aktivierung von ERK 1 und 2 war von einer gleichzeitigen Aktivierung  $\alpha_1$ - und  $\beta$ -adrenerger Rezeptoren abhängig. Im Gegensatz zu den beschriebenen Untersuchungen konnten in der vorliegenden Arbeit keine NA-abhängigen Effekte auf den Aktivitätszustand, d. h. auf die Phosphorylierung von ERK 1 und 2 am Threonin 202 und Tyrosin 204, erzielt werden. Die kultivierten Pinealorgane wurden für 6 h mit 1  $\mu$ M NA, dem adäquaten Reiz zur maximalen Induktion der Melatoninbiosynthese, stimuliert. Ebenso hatte die Applikation von 8-CPT-2'-O-Me-cAMP allein oder in Kombination mit NA keinen Einfluss auf den Aktivitätszustand von ERK 1 und 2. Ho und Mitarbeiter vermuten eine antagonistische Wirkung von cGMP und cAMP auf den Aktivitätszustand von ERK 1 und 2 in Pinealozyten der Ratte, da die Applikation eines unspezifischen cAMP-Analogs die cGMP-vermittelte Aktivierung von ERK 1 und 2 unterdrückte und dieser Effekt durch die Präinkubation mit H89, einem potenten Inhibitor der PKA wieder rückgängig gemacht werden konnte (Ho et al. 2000). In der vorliegenden Arbeit lag in unstimulierten Präparationen bereits ein relativ hoher Gehalt an aktivierter ERK 1 und 2 vor. Weder durch die sechsstündige Stimulation mit NA noch durch die Behandlung mit 8-CPT-2'-O-Me-cAMP konnte der Aktivitätszustand von ERK 1 und 2 beeinflusst werden. Die Aktivität von ERK 1 und 2 scheint somit in Pinealozyten der Ratte unabhängig von einer Erhöhung des intrazellulären cAMP-Spiegels reguliert zu werden.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit belegen, dass die Stimulation kultivierter Pinealorgane der Ratte mit 8-CPT-2'-O-Me-cAMP, einem EPAC-spezifischen

cAMP-Analog, weder den AANAT Proteingehalt noch die Freisetzung von Melatonin beeinflusst. Daraus lässt sich der Schluss ziehen, dass EPAC/Rap keine Funktion bei der Steuerung der Melatoninbiosynthese zu haben scheinen und die cAMP-vermittelte Aktivierung der Melatoninbiosynthese ausschließlich auf die PKA zurückzuführen ist. Im vorliegenden experimentellen Ansatz konnte auch kein Einfluss von NA und 8-CPT-2'-O-Me-cAMP auf den Aktivitätszustand der ERK 1 und 2 festgestellt werden. Die Ergebnisse legen somit nahe, dass eine Erhöhung des cAMP-Spiegels keinen Einfluss auf den Aktivitätszustand von ERK 1 und 2 im Pinealorgan der Ratte besitzt.

#### **4.3 Die Dephosphorylierung von pCREB durch Phosphatasen ist an der Herabregulation der *Aanat* Transkription und der Termination der Melatoninbiosynthese beteiligt**

Im Pinealorgan der Nagetiere hängt die Kontrolle der Melatoninbiosynthese von der NA/cAMP-angetriebenen Transkription des *Aanat* Gens ab (Stehle et al. 1993, 2001; Roseboom et al. 1996; Maronde et al. 1999a, b; Korf et al. 1996; 1998; von Gall et al. 2000). So wurde die Phosphorylierung von CREB am Serin 133 als essenzieller Mechanismus für die Initiation der Transkription des *Aanat* Gens und für die Stimulation der Melatoninbiosynthese zum Beginn der Nacht in vivo oder nach Applikation von Noradrenalin in vitro ausgemacht (siehe hierzu auch 1.3). In dieser Arbeit konnte belegt werden, dass die akute Dephosphorylierung von pCREB eine entscheidene Rolle bei der transkriptionalen Herabregulation der AANAT und der Beendigung der Melatoninbiosynthese spielt.

Innerhalb von 30 Minuten nach dem Entzug des NA-Stimulus kam es zu einer Abnahme der pCREB-Immunreaktivität (IR) im Zellkern der Pinealozyten, welche vergleichbar mit der basalen pCREB-IR in unstimulierten Präparationen war. Diese zeitlich scharf umrissene Reduktion der pCREB-IR spiegelt augenscheinlich die Aktivierung von Protein Serin/Threonin Phosphatasen (PSP) wider. Die pCREB Dephosphorylierung wurde durch die Applikation der PSP-Inhibitoren Calyculin A, Microcystin-LR und Okadainsäure verhindert oder abgeschwächt, wenn die PSP-Inhibitoren unmittelbar nach dem Entzug des NA Stimulus zugegeben wurden. Hohe Dosen an Calyculin A oder Microcystin-LR konnten die Abnahme der pCREB-IR effizienter abschwächen als äquivalente Dosen des PSP-Inhibitors Okadainsäure. Diese Unter-

schiede deuten an, dass die PSP 1 für die Dephosphorylierung von pCREB in Pinealocyten der Ratte verantwortlich ist. Frühere Studien haben gezeigt, dass 1 $\mu$ M Calyculin A oder 1 $\mu$ M Microcystin-LR die Aktivitäten sowohl der PSP 1- und 2A komplett hemmen (Craig et al. 1996). Dagegen hemmt Okadainsäure die Aktivität der PSP 2A effizienter als die Aktivität der PSP 1 (Haystead et al. 1989). Die unterschiedlichen Effekte der drei PSP Inhibitoren auf die Dephosphorylierung von pCREB waren für die Etablierung einer Korrelation zwischen der Abnahme der *Aanat* mRNA Spiegel und der pCREB Dephosphorylierung von Bedeutung.

30 Minuten nach Entzug des NA-Stimulus waren die *Aanat* mRNA-Spiegel signifikant reduziert. In diesem Zeitraum hatten auch die pCREB-Spiegel bis zu den basalen Werten in unstimulierten Präparationen abgenommen. Diese zeitliche Korrelation war ein erstes Indiz dafür, dass die nach dem Entzug des NA-Stimulus erfolgte Abnahme der *Aanat* Expression auf eine Dephosphorylierung von pCREB zurückzuführen ist. Diese Annahme wurde durch die Tatsache unterstützt, dass die Effekte von Calyculin A und Okadainsäure auf die *Aanat* mRNA-Spiegel quantitativ mit den Effekten auf die pCREB-Spiegel korrelierten. Die Applikation von Calyculin A verhinderte das Absinken der *Aanat* mRNA effektiver als Okadainsäure. Diese Ergebnisse implizieren, dass die Präsenz von pCREB für die Aufrechterhaltung der *Aanat* Expression unabdingbar ist und die pCREB Dephosphorylierung durch PSPs einen kritischen Mechanismus für die akute Herabregulation der *Aanat* Expression darstellt.

Frühere Untersuchungen belegen, dass die Abnahme der *Aanat* mRNA Spiegel mit einer Heraufregulation des inhibitorischen Transkriptionsfaktors ICER einhergeht (Maronde et al. 1999a). Der Quotient aus aktivierendem Transkriptionsfaktor pCREB und inhibierendem Transkriptionsfaktor ICER ist dabei ein wichtiger Faktor für die transkriptionale Steuerung des *Aanat* Gens, denn das Maximum des pCREB- und ICER Proteinspiegels wird nach Beginn der NA-Stimulation in unterschiedlichen Zeitintervallen erreicht: Der maximale pCREB-Proteingehalt wird in der frühen Phase, der maximale ICER-Proteingehalt in der späten Phase der NA-Stimulation induziert. Beide Transkriptionsfaktoren konkurrieren um das CRE im Promotor des *Aanat* Gens. Die dabei mögliche Ausbildung von inhibitorischen Heterodimeren zwischen pCREB und ICER konnte durch unterschiedliche experimentelle Ansätze jedoch nicht nachgewiesen werden (C. Heck, V. Mauhin und H.-W. Korf, unveröffentlichte Ergebnisse). Die Daten der vorliegenden Arbeit bestätigten, dass der ICER Protein-

gehalt nach sechsstündiger Stimulation mit NA um das zwei bis dreifache ansteigt. Interessanterweise wurde der erhöhte ICER Proteingehalt jedoch durch die experimentellen Manipulationen, welche sowohl die pCREB Dephosphorylierung als auch ein Absinken der *Aanat* mRNA Spiegel verursachten, nicht beeinflusst. So blieb der ICER Proteingehalt sowohl innerhalb von 30 Minuten nach Entzug des NA-Stimulus als auch durch die Applikation der PSP Inhibitoren, die unmittelbar nach dem Entzug des NA-Stimulus verabreicht wurden, unverändert. Diese Beobachtungen sind von entscheidender Wichtigkeit, denn sie belegen, dass rapide Veränderungen im pCREB/ICER Quotienten, welcher für die Kontrolle der akuten Inhibierung von cAMP-angetriebener Gen-expression verantwortlich ist, ausschließlich auf der Regulation des pCREB-Spiegels beruhen. Die Regulation des ICER Proteingehalts verläuft dagegen langsamer. Veränderungen im ICER Proteingehalt sorgen daher für einen Grundrhythmus in der Genexpression. Akute Stimuli wirken auf diesen Rhythmus durch Veränderungen des pCREB-Proteingehalts ein.

In Nagetieren ist die pCREB-regulierte *Aanat* Expression für die Kontrolle des AANAT Proteingehalts und der Melatoninbiosynthese von entscheidender Bedeutung. Daher wurde auch der Effekt von PSP-Inhibitoren auf diese beiden Parameter untersucht. Wie in den Untersuchungen zur pCREB Dephosphorylierung und zur Abnahme des *Aanat* mRNA-Spiegels waren die PSP-Inhibitoren Calyculin A oder Microcystin-LR effektiver als Okadainsäure in der Verhinderung einer Abnahme des AANAT Proteingehalts und der Melatoninproduktion, die innerhalb von 30 Minuten nach Entzug des NA-Stimulus erfolgte. Auf der einen Seite lassen sich diese Ergebnisse dadurch erklären, dass PSPs den AANAT-Proteingehalt und die Melatoninbiosynthese über die Regulation des *Aanat* mRNA-Spiegels in Abhängigkeit vom pCREB-Gehalt steuern. Auf der anderen Seite könnten PSPs ebenso direkten Einfluss auf den Phosphorylierungszustand des AANAT Proteins ausüben. Die AANAT besitzt zwei stark konservierte PKA-Phosphorylierungsstellen (Ganguly et al. 2002). Die cAMP-abhängige, N-terminale Phosphorylierung der AANAT am Threonin 31 ist für die Bildung eines Proteinkomplexes zwischen phosphorylierter AANAT und dem Protein 14-3-3 von entscheidender Bedeutung (Obsil et al. 2001). Für die Melatoninproduktion ist dieser Komplex entscheidend, da durch den Komplex das AANAT-Protein vom proteasomalen Abbau geschützt wird (Gastel et al. 1998; Ganguly et al. 2001). Der Entzug von NA und eine Erniedrigung des cAMP-Spiegels bewirken über die proteasomale Proteolyse den Abbau des AANAT Proteins. Es erscheint daher

möglich, dass die Dephosphorylierung des AANAT Proteins durch PSPs den Abbau der AANAT initiiert und dass dieser Prozess einen zusätzlichen Mechanismus zur Abschaltung der Melatoninbiosynthese darstellen könnte. In zukünftigen Experimenten muss dieser Aspekt jedoch mit der Hilfe von Antikörpern untersucht werden, welche die AANAT in Pinealozyten der Ratte abhängig vom Phosphorylierungszustand darstellen können.

Wie bereits erwähnt deuten die mit Hilfe von PSP-Inhibitoren durchgeführten pharmakologischen Untersuchungen an, dass die PSP 1 für die pCREB Dephosphorylierung verantwortlich ist. Diese Vermutung wird durch immunchemische- und immunzytochemische Experimente bekräftigt. Diese weisen eindeutig die Existenz der katalytischen  $\alpha$ -Untereinheiten der PSP 1- und 2A (CSU-PSP 1, CSU-PSP 2) in Pinealozyten der Ratte nach. Die vorliegenden Resultate bestätigen und erweitern frühere Untersuchungen, in denen die Expression der katalytischen  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -Untereinheiten der PSP 1 im Pinealorgan adulter Ratten mit Hilfe der *in situ* Hybridisierung und der Immunoblot-Technik nachgewiesen werden konnten (Sakagami et al. 1994; Da Cruz e Silva et al. 1995). In anderen Zellsystemen wurde eine Beteiligung sowohl der PSP 1 als auch der PSP 2A an der pCREB Dephosphorylierung beschrieben (zur Übersicht, siehe Hunter 1995). Die PSP 1 ist für die Dephosphorylierung von pCREB in PC12 Zellen und in kultivierten hippocampalen Neuronen verantwortlich (Hagiwara et al. 1992; Bito et al. 1996). Dagegen steuert die PSP 2A die pCREB Dephosphorylierung effektiver als die PSP 1 in HepG2 humanen Hepatoma Zellen und in der Leber von Ratten (Wadzinski et al. 1993). Diese Ergebnisse legen nahe, dass sich die für die Dephosphorylierung von pCREB verantwortliche PSP von Zelltyp zu Zelltyp unterscheidet und die relative Menge von CSU-PSP 1 oder CSU-PSP 2 im Zellkern einen entscheidenden Faktor darstellt. In der vorliegenden Arbeit konnte eine deutliche nukleäre CSU-PSP 1-IR nachgewiesen werden. Die CSU-PSP 2A-IR war dagegen ausschließlich im Zytoplasma der Pinealozyten lokalisiert. Das zelluläre Verteilungsmuster der PSPs und die pharmakologischen Untersuchungen legen daher nahe, dass in Pinealozyten der Ratte die PSP 1 und nicht die PSP 2A die nukleäre pCREB Dephosphorylierung steuert.

Die bis zu achtstündige Stimulation der Rattenpinealozyten mit NA beeinflusste weder die Intensität noch das subzelluläre Verteilungsmuster der CSU-PSP 2A-IR. Dagegen verursachte die Stimulation mit NA innerhalb von 8 h eine Zunahme der nukleären CSU-PSP 1-IR. Die immunchemischen Daten der vorliegenden Arbeit

belegen, dass die Gesamtproteinmenge der CSU-PSP 1 im Verlauf einer noradrenergen Stimulation unverändert blieb. Daraus lässt sich schließen, dass die Stimulation mit NA eine Translokation der CSU-PSP 1 in den Zellkern der Pinealozyten hervorruft. Eine Translokation der CSU-PSP 1 in den Zellkern wurde auch in anderen Zellsystemen beschrieben (Omay et al. 1995). Die Translokation der PSP 1 in Pinealozyten der Ratte zeigt jedoch erstmalig eine Translokation der CSU-PSP 1 in einem natürlichen Zelltyp. Es muss allerdings darauf hingewiesen werden, dass der Entzug des NA-Stimulus für 30 Minuten, in einem Zeitraum, in dem die nahezu komplette Dephosphorylierung von pCREB erfolgte, keine Abnahme in der nukleären CSU-PSP 1-IR verursachte (M. Koch und H.-W. Korf, unveröffentlichte Ergebnisse). Diese Befunde deuten an, dass der Mechanismus, welcher die Aktivierung der nukleären CSU-PSP 1 steuert und dadurch die pCREB Dephosphorylierung verursacht, nicht mit einer nukleären Translokation der CSU-PSP 1 korreliert.

Die Aktivität der katalytischen Untereinheiten der PSPs wird durch eine Vielzahl endogener Inhibitoren gesteuert. In den siebziger Jahren wurden die endogenen, hitzestabilen Inhibitoren-1 und 2 (I-1 und I-2) als potente Inhibitoren der PSP 1 identifiziert (Huang et al. 1976; Nimmo und Cohen 1978). I-1 wird ausschließlich nach Phosphorylierung durch die PKA oder  $Ca^{2+}$ /Calmodulin-abhängigen Kinase (CaMK) II am Threonin 35 zu einem effektiven Inhibitor (Aitken et al. 1982; Foulkes et al. 1983; Elbrecht et al. 1990, Endo et al. 1996). Die Fähigkeit von I-2 zur Inhibition der PSP 1 ist dagegen von einer Phosphorylierung unabhängig. Im Pinealorgan der Ratte konnte I-1 mit Hilfe der *in situ* Hybridisierung und der Immunoblot-Technik nachgewiesen werden (Sakagami et al. 1994; Da Cruz e Silva et al. 1995). In Pinealozyten könnte daher die Aktivität der PSP 1 möglicherweise über eine PKA-abhängige Phosphorylierung des I-1 gesteuert werden. Eine gut charakterisierte, neuronale Isoform von I-1 stellt das *dopamine and adenosine 3',5'-monophosphate-regulated phosphoprotein*, 32 kDa (DARPP-32; zur Übersicht, siehe Greengard et al. 1998) dar. Eine deutliche Anreicherung von DARPP-32 konnte in Neuronen nachgewiesen werden, die Dopaminreize aufnehmen und verarbeiten. Die Aktivität von DARPP-32 wird, ähnlich wie die bei I-1, über eine cAMP/PKA vermittelte Phosphorylierung an einem Threoninrest gesteuert (Hemmings et al. 1984). Die selektive Anreicherung von DARPP-32 in dopaminrezipienten Neuronen lässt auf eine wichtige Funktion von DARPP-32 bei der Verarbeitung von dopaminergen Signalprozessen schließen. DARPP-32 konnte, jedoch in deutlich geringerer Dichte, ebenso in ande-

ren Neuronentypen des Gehirns nachgewiesen werden (Hemmings et al. 1986). DARPP-32 kommt ebenfalls im Pinealorgan der Ratte vor. In der vorliegenden Arbeit wurde DARPP-32 mit Hilfe des Immunoblotverfahrens im Pinealorgan der Ratte nachgewiesen. Die Darstellung des aktivierten Proteins erfolgte mit einem AK, welcher ausschließlich die am Threonin 34 phosphorylierte (p) Form von DARPP-32 erkennt. Im Verlauf einer noradrenergen Stimulation erfolgte keine signifikante Veränderung des Gehalts an p(Thr34)DARPP-32. Auch nach Entzug des NA-Stimulus kam es innerhalb von 30 min zu keiner signifikanten Veränderung der p(Thr34) DARPP-32-IR. Die Signalstärke der p(Thr34) DARPP-32-IR war im Vergleich zum Immunsignal für das Gesamtprotein deutlich reduziert. Daraus lässt sich schließen, dass im Pinealorgan der Ratte nur ein geringer Anteil von DARPP-32 in der am Threonin 34 phosphorylierten Form vorliegt. Außerdem wird die Phosphorylierung von DARPP-32 am Threonin 34 nicht durch Noradrenalin beeinflusst. Die rapide Abnahme der pCREB-IR innerhalb von 30 min kann daher nicht durch eine NA/cAMP/PKA-abhängige Regulation des endogenen PSP 1-Inhibitors DARPP-32 erklärt werden.

In diesem Zusammenhang sei auf eine Gruppe weiterer endogener Regulatoren hingewiesen, welche nicht nur die Aktivität der CSU-PSP 1 kontrollieren, sondern auch die katalytische Untereinheit an bestimmte subzelluläre Kompartimente positionieren. Besonders hervorzuheben sind die nukleären regulatorischen Untereinheiten *PSP 1 nuclear targeting subunit* (PNUTS; Allen et al. 1998) und *nuclear inhibitor of PSP 1* (NIPP-1; Jagiello et al. 1995). PNUTS und NIPP-1 gehören zu einer Gruppe von Proteinen, die ähnlich wie die Ankerproteine der PKA, zur Positionierung der PSP 1 in bestimmten Zellkompartimenten dienen. So konnte ein stabiler Komplex aus PNUTS und der CSU-PSP 1 ausschließlich im Zellkern dargestellt werden. Durch die Bindung an die CSU-PSP 1 fungiert PNUTS als ein potenzieller Modulator der CSU-PSP 1 Aktivität im Zellkern (Allen et al. 1999). Die Fähigkeit von NIPP-1 zur Inhibierung der CSU-PSP 1 Aktivität im Zellkern ist von einer Phosphorylierung des NIPP-1 Proteins an bestimmten Serinresten, welche das Bindemotiv zur CSU-PSP 1 flankieren, abhängig. Durch diese Phosphorylierung kommt es zu einer Inaktivierung von NIPP-1 (Beullens et al. 1999). Die PKA und Caseinkinase (CK) 2 sind als dafür verantwortliche Kinasen beschrieben worden. Eine zu PNUTS und NIPP-1 verwandte Gruppe von regulatorischen Untereinheiten der CSU-PSP 1 stellen die in der Skelettmuskulatur vorkommenden *glycogen targeting subunit*  $G_M$  und  $G_L$  dar. Diese steuern die Aktivität der CSU-PSP 1 in Abhängigkeit von Insulin- und Adrenalinreizen

(Hubbard und Cohen 1993). Über eine mögliche Assoziation der CSU-PSP 1 mit PNUTS oder NIPP-1 wäre daher eine vom NA-Stimulus abhängige Steuerung der pCREB Dephosphorylierung durch die CSU-PSP 1 im Zellkern von Pinealozyten denkbar.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass in kultivierten Pinealorganen und Pinealozyten der Ratte der Entzug des NA-Stimulus innerhalb von 30 Minuten eine rapide pCREB Dephosphorylierung verursachte. Der ICER-Proteingehalt blieb dagegen in diesem Zeitraum unbeeinflusst. Dem Entzug des NA-Stimulus und der pCREB Dephosphorylierung folgte eine Abnahme der *Aanat* mRNA, des AANAT-Proteingehalts und der Melatoninbiosynthese. Die pCREB Dephosphorylierung und damit einhergehend die Abnahme der aufgeführten Parameter konnte durch PSP-Inhibitoren verhindert werden. Die pCREB Dephosphorylierung konnte daher als ein essenzieller Mechanismus für die akute Herabregulation des CRE-tragenden *Aanat* Gens identifiziert werden. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit liefern ferner einen weiteren experimentellen Ansatzpunkt für das von Hunter (1995) beschriebene Konzept: In Signalkaskaden bilden Phosphatasen mit den korrespondierenden Kinasen und phosphorylierten Proteinen ein komplexes Netzwerk zur Regulation der zellulären Aktivität in neuronalen und endokrinen Zellen aus. Auf die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit übertragen hebt die PSP 1 die durch die PKA Typ II induzierte Phosphorylierung von CREB wieder auf und gemeinsam steuern sie die Transkription des *Aanat* Gens.

#### **4.4 Die funktionelle Interaktion von AANAT und Protein 14-3-3 in Pinealozyten der Ratte und des Rindes**

In der vorliegenden Arbeit wurde mit Hilfe eines Ko-Immünpräzipitationsansatzes die Interaktion zwischen der AANAT und dem Protein 14-3-3 in Pinealozyten der Ratte und des Rindes untersucht. In Pinealozyten beider Spezies konnte erstmalig eine NA-abhängige Komplexbildung von AANAT und Protein 14-3-3 dargestellt werden.

Während bei Nagetieren die Melatoninbiosynthese hauptsächlich über die transkriptionale Steuerung der AANAT reguliert wird und postranslationale Mechanismen dabei eine zusätzliche Rolle spielen (Gastel et al. 1998), wird bei einer Vielzahl von Tierarten (z. B. Rind, Schaf und Primaten) die AANAT ausschließlich durch die

NA/cAMP-gesteuerte proteasomale Proteolyse des AANAT Proteins gesteuert (siehe auch Einleitung unter 1.3). Eine Folge der artspezifischen Steuerung der AANAT ist eine unterschiedliche Dynamik der Melatoninbiosynthese und Melatoninsekretion. So erfolgt bei Ungulaten, Primaten und auch beim Menschen der Anstieg des Melatoninspiegels im Blutkreislauf unmittelbar zu Beginn der Nacht (Reppert et al. 1979; Hedlund et al. 1977; Schomerus et al. 2000, 2002), während der Melatoninspiegel von Nagetieren, parallel zu einem nächtlich stark erhöhten *Aanat* mRNA-Spiegel, erst mit einer zeitlichen Verzögerung von mehreren Stunden ansteigt (Roseboom et al. 1996; Maronde et al. 1999a). Das unterschiedliche Muster in der Melatoninfreisetzung könnte eine Folge der sich im Verlauf der Phylogenese drastisch umgewandelten intrazellulären Signalverarbeitungsprozesse in den Pinealozyten sein. Die beobachteten Unterschiede werfen die Frage nach dem Grund für das große Ausmaß an Plastizität in den zellulären Regulationsprozessen der Melatoninbiosynthese auf. Ebenso ist unklar, welche verhaltensbiologischen und ökologischen Konsequenzen sich für die einzelnen Spezies aus den jeweiligen individuellen molekularen Strategien zur Regulation der Melatoninbiosynthese ergeben. Einen möglichen Ansatzpunkt zur Aufklärung dieser Fragestellungen könnten vergleichende Untersuchungen der molekularen Regulationsmechanismen der AANAT ergeben. Die entscheidende Voraussetzung zur nächtlichen Ankurbelung der Melatoninbiosynthese ist die cAMP/PKA-vermittelte, N-terminale Phosphorylierung der AANAT am Threonin 31. Diese Phosphorylierung ermöglicht eine Interaktion der AANAT mit dem Protein 14-3-3 (Ganguly et al. 2002). Erste Hinweise auf eine mögliche Komplexbildung der AANAT mit dem Protein 14-3-3 ergaben sich bei der Aufreinigung der AANAT. In einer Fraktion mit hoher AANAT Aktivität konnten ebenso die Isoformen  $\epsilon$  sowie  $\zeta$  des Proteins 14-3-3 nachgewiesen werden (Roseboom et al. 1994). Neuere Untersuchungen mit aufgereinigter, heterolog exprimierter AANAT zeigten eine cAMP/PKA-vermittelte Komplexbildung zwischen der AANAT und dem Protein 14-3-3- $\zeta$  (Ganguly et al. 2001; Obsil et al. 2001).

In der vorliegenden Arbeit konnte in vergleichenden Untersuchungen der Komplex aus AANAT und Protein 14-3-3 erstmalig sowohl in Pinealozyten der Ratte als auch in Pinealozyten des Rindes dargestellt werden. Die Komplexbildung zwischen AANAT und Protein 14-3-3 war von einer noradrenergen Stimulation abhängig. So konnte eine erfolgreiche Ko-Immünpräzipitation sowohl bei der Ratte als auch beim Rind ausschließlich nach sechsständiger Stimulation mit NA erzielt werden.

Sowohl mit einem AK gegen die AANAT als auch mit einem AK gegen das Protein 14-3-3 konnte der AANAT/Protein 14-3-3 Komplex in Pinealozyten der Ratte erfolgreich immunpräzipitiert werden. In Pinealozyten des Rindes wurde der Komplex erfolgreich mit einem AK gegen Protein 14-3-3 nachgewiesen. Die vorliegenden Untersuchungen belegen somit, dass Tierarten, welche generell eine unterschiedliche molekulare Strategie zur Regulation der Melatoninbiosynthese entwickelt haben, mit der NA-abhängigen Ausbildung des AANAT/Protein 14-3-3 Komplexes jedoch einen gemeinsamen Mechanismus für die Regulation des AANAT Proteins besitzen. Die Interaktion zwischen AANAT und Protein 14-3-3 konnte auch in Homogenaten aus Pinealorganen des Schafes, welche in der Nacht entnommen wurden, und in einer AANAT exprimierenden Zelllinie (HA6 Zellen; Ganguly et al. 2001) nachgewiesen werden. In den Homogenaten aus Schafspinealorganen lag in einer chromatographisch aufgetrennten Fraktion mit hoher AANAT Aktivität das AANAT Protein ausschließlich in phosphorylierter Form vor. Ebenso wurden in dieser Fraktion die Protein 14-3-3 Isoformen  $\epsilon$  und  $\zeta$  nachgewiesen. Die Komplexbildung in den HA6 Zellen konnte durch Applikation von Forskolin und mit Hilfe des cAMP-Analogs dbcAMP induziert werden. Diese Ergebnisse legen nahe, dass ebenso in Pinealozyten der Ratte und des Rindes die cAMP/PKA-abhängige Phosphorylierung der AANAT am Threonin 31, hervorgerufen durch die Stimulation mit NA, für die Ausbildung des pinealen AANAT/Protein 14-3-3 Komplexes essenziell ist.

Die Phosphorylierung eines Serin- oder Threoninrestes innerhalb einer spezifischen Protein 14-3-3 Erkennungssequenz ist für die Interaktion des potenziellen Bindungspartners mit dem Protein 14-3-3 essenziell (zur Übersicht, siehe Aitken et al. 2002). Als Beispiele seien hier die Interaktionen zwischen Protein 14-3-3 und der Tryptophanhydroxylase und die Interaktion von Raf 1 mit Protein 14-3-3, die von der Phosphorylierung des Raf 1 Proteins am Serin 259 abhängig ist, aufgeführt (Furukawa et al. 1993; Muslin et al. 1996; Michaud et al. 1995). In der Literatur sind jedoch ebenso zahlreiche Interaktionen mit dem Protein 14-3-3 beschrieben worden, welche von einer Phosphorylierung des Zielproteins unabhängig sind (Borch et al. 2001). Das hochkonzentrierte Vorkommen von Protein 14-3-3 im Gehirn, dort macht es 1% des Gesamtproteinanteils aus, sowie die multiplen Erkennungssequenzen in den Zielproteinen von Protein 14-3-3 lassen darauf schließen, dass es sich bei den 14-3-3 Proteinen um eine ubiquitär vorkommende Proteinfamilie handelt, deren Mitglieder in zahlreichen unterschiedlichen Zellfunktionen eine wichtige Aufgabe besitzen. Tat-

sächlich konnten bis zum heutigen Zeitpunkt über 100 Zielproteine für das Protein 14-3-3 identifiziert werden. Alle bekannten Zielproteine weisen jedoch bis auf die Interaktion mit den 14-3-3 Proteinen keine weiteren funktionellen oder strukturellen Gemeinsamkeiten auf (Klein et al. 2003). Die hauptsächlich funktionelle Bedeutung der Interaktion zwischen der AANAT und dem Protein 14-3-3 liegt im Einfluss des Proteins 14-3-3 auf die Stabilität und Halbwertszeit des AANAT Proteins. Weitere Konsequenzen, die sich aus der Interaktion ergeben, sind erstens die Erhöhung der Affinität der AANAT zum Substrat Serotonin, wodurch die Umwandlung von Serotonin zu N-Acetylserotonin bei sinkender Serotoninkonzentration in der Nacht erleichtert wird und zweitens der Schutz der Phosphatgruppe am Threonin 31 der AANAT vor dem Zugriff durch Phosphatasen, wodurch die Stabilität der AANAT/Protein 14-3-3 Komplexes wiederum erhöht wird (Klein et al. 2003).

Die Immunpräzipitationen und der Nachweis des Proteins 14-3-3 im Immunoblot wurden mit Hilfe eines polyklonalen AK (A274) durchgeführt. Dieser richtet sich gegen mehrfache Isoformen des Proteins 14-3-3. Im Jahre 1967 beschrieben Moore und Perez erstmalig das Protein 14-3-3 als ein saures, im Gehirn in großer Menge vorkommendes Protein (Moore und Perez 1967). Der Name „Protein 14-3-3“ kombiniert dabei die Fraktionsnummer der Mitglieder dieser Proteinfamilie in der Diethylaminoethyl-(DEAE)-Zellulose Chromatographie und das Laufverhalten (Positionsnummer) in der im Anschluss erfolgten Starch Gelelektrophorese. Die Familie der 14-3-3 Proteine besteht aus 30 bzw. 33 kDa großen, zueinander homologen Isoformen, die i. d. R. lösliche zytoplasmatische Homo- oder Heterodimere bilden (zur Übersicht, siehe Aitken 1996; Fu et al. 2000; Yaffe 2000). Bei den Säugetieren sind sieben Isoformen charakterisiert, die aufgrund ihres Elutionsverhaltens in der Reverse-Phasen Chromatographie mit  $\beta$ ,  $\varepsilon$ ,  $\gamma$ ,  $\eta$ ,  $\sigma$ ,  $\tau$  oder  $\xi$  bezeichnet werden (Ichimura et al. 1988; Toker et al. 1992). Zusätzlich sind die phosphorylierten  $\beta$ - und  $\xi$  Isoformen als die  $\alpha$ - und  $\delta$  Isoformen identifiziert worden (Aitken et al. 1995). Bis auf die Protein 14-3-3- $\varepsilon$  Isoform, mit einem Molekulargewicht von 33 kDa, besitzen alle anderen Protein 14-3-3 Isoformen ein Molekulargewicht von 30 kDa. In der vorliegenden Arbeit erkannte der AK A274 in Lysaten aus Ratten- und Rinderpinealocyten deutlich eine 30 kDa und 33 kDa große Bande. In beiden Spezies blieb die Signalstärke der Immunsignale während der sechsstündigen Stimulation mit NA unverändert, wodurch auf eine nahezu unveränderte Menge des Proteins 14-3-3 im Verlauf der NA-Stimulation ge-

geschlossen werden kann. In den Immunpräzipitaten aus homogenisierten Rattenpinealocyten, welche mit dem AK A274 behandelt wurden, konnte in der anschließenden Darstellung des Proteins 14-3-3 die 30 kDa Bande deutlich stärker im Immunoblot nachgewiesen werden. In den Immunpräzipitaten, welche mit einem AK gegen die AANAT der Ratte (Anti- ratAANAT) behandelt wurden, konnte in der anschließenden Darstellung des Proteins 14-3-3 im Immunoblot nur die 30 kDa große Bande dargestellt werden. Diese Befunde sprechen für eine vorwiegende Interaktion der AANAT mit den 30 kDa großen Protein 14-3-3 Isoformen. In einer chromatographisch aufgetrennten Fraktion mit hoher AANAT Aktivität konnten die Protein 14-3-3 Isoformen  $\epsilon$  und  $\zeta$  nachgewiesen werden (Roseboom et al. 1994; Ganguly et al. 2001). In Homogenaten aus Schafspinealorganen wurden zusätzlich die  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta$  und  $\eta$  Isoformen und eine Interaktion von AANAT mit der Protein 14-3-3- $\zeta$  Isoform beschrieben (Roseboom et al. 1994; Obsil et al. 2001; Ganguly et al. 2001). Daher kann davon ausgegangen werden, dass ebenso in Pinealocyten der Ratte und des Rindes die AANAT vorwiegend mit der Protein 14-3-3- $\zeta$  Isoform einen Komplex bildet.

Die immunzytochemische Darstellung des Proteins 14-3-3 erfolgte in der vorliegenden Arbeit mit Hilfe eines monoklonalen AK (8C3), der ausschließlich die 33 kDa große Protein 14-3-3- $\epsilon$  Isoform erkennt (Roseboom et al. 1994; Ganguly et al. 2001). Das Vorkommen des Proteins 14-3-3 in Pinealocyten der Ratte und des Rindes konnte mit Hilfe der vorliegenden immunzytochemischen Daten bestätigt und das exakte zelluläre Verteilungsmuster erstmalig in den Pinealocyten beschrieben werden. Für das Protein 14-3-3- $\epsilon$  lag eine ausschließlich zytoplasmatische Immunreaktivität (IR) in nahezu sämtlichen Pinealocyten der Ratte und des Rindes vor. Das Verteilungsmuster blieb während der noradrenergen Stimulation in beiden Spezies unverändert. Ein Großteil der Protein 14-3-3 Isoformen konnte bisher als lösliche Bestandteile im Zytoplasma nachgewiesen werden (zur Übersicht, siehe Fu et al. 2000; Yaffe 2000; Aitken et al. 2002). Im Gehirn wird Protein 14-3-3 vorwiegend in Neuronen exprimiert (Isobe et al. 1989). In den Neuronen sind 40% der Protein 14-3-3 Gesamtmenge mit Membranen assoziiert. Hauptsächlich wurde eine Lokalisation von Protein 14-3-3 an der Zellmembran und an Vesikelmembranen beschrieben (Martin et al. 1994). Protein 14-3-3 fand sich auch in subzellulären Kompartimenten, beispielsweise dem Golgi-Apparat (Celis et al. 1990). Bestimmte Protein 14-3-3 Isofor-

men sind an der Steuerung der DNA Replikation im Zellkern beteiligt (Zannis-Hadjopoulos et al. 2002). In der hier ausgeführten immunzytochemischen Darstellung der AANAT ließ sich eine deutliche Induktion der AANAT-IR in Rinderpinealocyten nach sechsständiger noradrenerger Stimulation zeigen. Die AANAT-IR lag ausschließlich im Zytoplasma verteilt vor. In der Überlagerung mit der Protein 14-3-3- $\epsilon$ -IR ist zu erkennen, dass sich die AANAT-IR in unmittelbarer räumlicher Nähe zur IR für das Protein 14-3-3- $\epsilon$  befindet.

Die AANAT ist das bisher einzige Enzym der GCN5 (Motif A/B) Acetyltransferase Superfamilie, welches direkt an das Protein 14-3-3 bindet (Klein et al. 2002). GCN5 ist eine Histon Acetyltransferase und stellt ein bedeutendes Mitglied der Superfamilie dar (Neuwald et al. 1997; Dyda et al. 2000). Die Bezeichnung Motif A/B weist auf zwei stark konservierte Abschnitte in der Aminosäuresequenz hin, über die sämtliche Mitglieder der GCN5 Protein Superfamilie zu identifizieren sind. Die N-terminale Phosphorylierungsstelle ist in eine spezielle Abfolge von Aminosäuren eingebettet. Nach Phosphorylierung des Threonins 31 liegt dort eine Bindungsstelle für das Protein 14-3-3 vor (RRHTLPAN – RRHpTLPAN, wobei pT ein Phosphothreonin darstellt). Die Phosphorylierung am C-Terminus ist bisher weniger gut erforscht. So wurden die kristallographischen Untersuchungen zum AANAT/Protein 14-3-3 Komplex mit einer verkürzten Form der AANAT durchgeführt, welcher die C-terminale Phosphorylierungsstelle fehlte (Obsil et al. 2001). In diesen Untersuchungen lag eine Stöchiometrie von zwei AANAT Molekülen mit einem Protein 14-3-3 Dimer vor. Unter physiologischen Umständen wird jedoch eine Komplexbildung zwischen einem AANAT Molekül und einem Protein 14-3-3 Dimer vermutet (Klein et al. 2003). Zukünftige Untersuchungen werden daher die Phosphorylierung am C-Terminus und deren Bedeutung für die Regulation der AANAT Aktivität fokussieren. Als eine grundsätzliche Funktion der Protein 14-3-3 Familie wird die gleichzeitige Bindung von zwei unterschiedlichen Proteinen an ein Protein 14-3-3 Dimer diskutiert (Liu et al. 1995; Xiao et al. 1995). Biochemische Untersuchungen konnten dies bestätigen (Brasemann und McCormick 1995; Guthridge et al. 2000; MacNicol et al. 2000). Möglicherweise wird daher die AANAT über die Bindung an das Protein 14-3-3 Dimer mit einem dritten, bisher unbekanntem Protein zu einer funktionellen Einheit verknüpft.

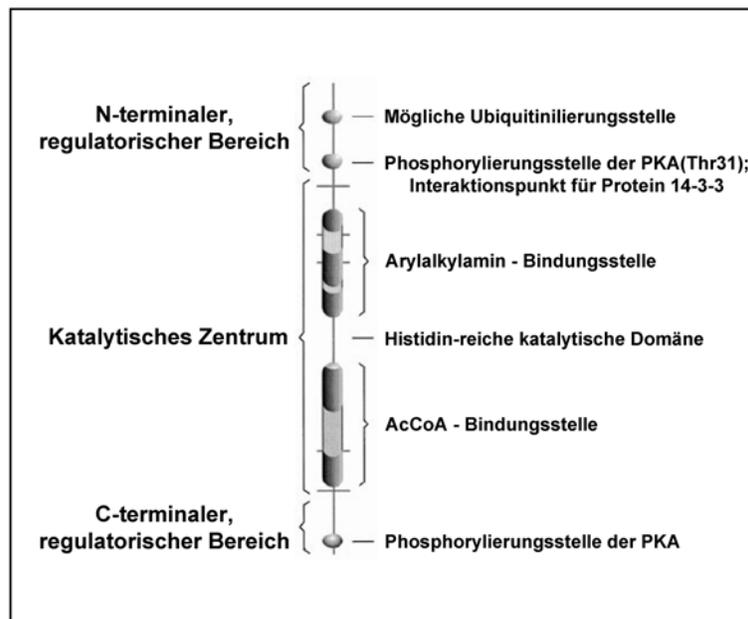


Abb. 4.1: Schematische Darstellung der AANAT (verändert nach Klein et al. 2002). Das katalytische Zentrum wird beidseitig durch regulatorische Bereiche flankiert. Sowohl im N-terminalen als auch im C-terminalen regulatorischen Bereich ist eine Phosphorylierungsstelle für die Protein Kinase A (PKA) vorzufinden. Durch die N-terminale Phosphorylierung am Threonin 31 wird die Interaktion zwischen der AANAT und dem Protein 14-3-3 ermöglicht: Bindungsmotif für Protein 14-3-3 (RRHTLPAN → RRHpTLPAN). Die Bedeutung der C-terminalen Phosphorylierungsstelle für die Regulation der AANAT ist bisher weniger gut erforscht.

#### 4.5 Das Cannabinoidsystem im Pinealorgan der Ratte und seine Bedeutung für die Steuerung der Melatoninbiosynthese

Bisher ist über das Vorkommen von Cannabinoid (CB) Rezeptoren im Pinealorgan und einer Beteiligung endogener Cannabinoide (CBs) an der Regulation der Melatoninbiosynthese wenig bekannt. Deshalb wurde hier die funktionelle Bedeutung des Cannabinoidsystems für die Regulation der Melatoninbiosynthese im Pinealorgan der Ratte untersucht. Kultivierte Pinealorgane der Ratte wurden mit  $\Delta^9$ -Tetrahydrocannabinol, welches die stärkste psychoaktive Substanz aus der Cannabispflanze (*Cannabis sativa*) und ein potenter Agonist der CB 1- und 2 Rezeptoren ist, stimuliert, um seine Auswirkungen auf die Regulation der Melatoninbiosynthese zu untersuchen. Zunächst wurden CB 1- und 2 Rezeptoren im Pinealorgan der Ratte mit Hilfe der Immunhistochemie und des Immunoblotverfahrens dargestellt.

In der Immunhistochemie fand sich eine starke Immunreaktivität (IR) für den CB 1 Rezeptor im Zytoplasma und an der Zellmembran in nahezu sämtlichen Pinealocyten. Im Immunoblot wurde eine deutliche CB 1 Rezeptor-IR in Homogenaten aus

stimulierten und unstimulierten Pinealorganen nachgewiesen. Die Signalstärke blieb nach sechsständiger Stimulation mit NA unverändert. In den Homogenaten aus Kortex und Cerebellum konnten ebenfalls eine deutliche IR für den CB 1 Rezeptor nachgewiesen werden. Eine vorwiegend neuronale Verteilung des CB 1 Rezeptors wurde bisher in zahlreichen Untersuchungen mit Hilfe der Rezeptorautoradiographie, der *in situ* Hybridisierung und der Immunzytochemie beschrieben (Herkenham et al. 1990, 1991; Mailleux et al. 1992; Matsuda et al. 1993; Tsou et al. 1998; Egertova und Elphick 2000). In den untersuchten Spezies (Mensch, Primaten und Ratte) fand sich eine hohe Dichte an CB 1 Rezeptoren im zerebralen Kortex, Hippocampus, Basalganglien und Cerebellum. Eine geringere Dichte des CB 1 Rezeptors wurde dagegen im Hypothalamus und Rückenmark beobachtet. In den Neuronen ist der CB 1 Rezeptor vorwiegend in den Axonterminalen lokalisiert. Elektronenmikroskopische Untersuchungen belegen seine vorwiegend präsynaptische Lokalisation (Hajos et al. 2000; Katona et al. 2000). In peripheren Geweben wurde der CB 1 Rezeptor in sensorischen Nervenfasern und im autonomen Nervensystem nachgewiesen (Pertwee et al. 1992). Die detaillierte Beschreibung des neuroanatomischen Verteilungsmusters des CB 1 Rezeptors lieferte eine wichtige Voraussetzung, um die neurophysiologischen Effekte der endogenen CBs in den entsprechenden Hirnarealen zu analysieren. In der vorliegenden Arbeit wurde immunhistochemisch und immunchemisch erstmalig das CB 1 Rezeptorprotein im Pinealorgan dargestellt. Diese Befunde lassen auf eine physiologische Wirkung endogener Cannabinoide auf Signaltransduktionsprozesse im Pinealorgan schließen.

Nahezu sämtlichen Pinealozyten der Ratte zeigten auch eine CB 2 Rezeptor-IR. Die Signalstärke der CB 2 Rezeptor-IR war im Vergleich zur CB 1 Rezeptor-IR jedoch deutlich schwächer, so dass der CB 1 Rezeptor in höherer Proteinmenge als der CB 2 Rezeptor vorkommen könnte. Die CB 2 Rezeptor-IR war im Zytoplasma und an der Zellmembran lokalisiert. Eine deutliche CB 2 Rezeptor-IR ließ sich auch im Immunoblot in Homogenaten aus Pinealorganen, Kortex und Cerebellum darstellen. In den Homogenaten aus Pinealorganen war die Signalstärke der CB 2 Rezeptor-IR nach sechsständiger Stimulation mit NA im Vergleich zu unstimulierten Präparationen unverändert. In der Literatur wurde der CB 2 Rezeptor primär auf Zellen nachgewiesen, die funktionell mit dem Immunsystem assoziiert sind. Diese Zellen enthalten auch den CB 1 Rezeptor, jedoch war sein Proteingehalt gegenüber dem des CB 2 Rezeptors zumeist deutlich geringer (Waksman et al. 1999; Carlisle et al.

2002). Mit Hilfe der *in situ* Hybridisierung und der Rezeptorautoradiographie konnte der CB 2 Rezeptor in lymphoiden Organen (Milz, Knochenmark, Thymus), Pankreas, Mastzellen und Leukozyten nachgewiesen werden (Lynn und Herkenham 1992; Buckley et al. 1998). Der Proteingehalt des CB 2 Rezeptors variiert zellspezifisch. Beispielsweise besitzen ausgereifte B Lymphozyten eine hohe CB 2 Rezeptordichte, dagegen weisen Makrophagen nur eine moderate CB 2 Rezeptordichte auf. In der vorliegenden Arbeit konnte erstmals eine CB 2 Rezeptor-IR in Pinealocyten der Ratte dargestellt werden, die auf die Existenz des CB 2 Rezeptors im Pinealorgan schließen lässt. Bisher wurde der CB 2 Rezeptor im Gehirn der Ratte nur auf der mit dem Immunsystem assoziierten Mikroglia nachgewiesen (Carlisle et al. 2002). Die Pinealocyten stellen somit einen neuronalen Zelltyp im Gehirn dar, der den CB 2 Rezeptor exprimiert. Dieser Rezeptor könnte, neben dem CB 1 Rezeptor, an der Steuerung von Signalverarbeitungsprozessen im Pinealorgan beteiligt sein, die durch endogene CBs gesteuert werden. Die CB 2 Rezeptor-IR in den Homogenaten aus Kortex und Cerebellum lässt sich dadurch erklären, dass es sich hierbei um Gemische aus vielen unterschiedlichen Zelltypen handelt, in denen neben Neuronen auch Mikrogliazellen vorliegen, die, wie erwähnt, den CB 2 Rezeptor exprimieren.

Agonisten der CB 1- und 2 Rezeptoren vermitteln über die  $G_{i/o}$ -Proteinfamilie eine Vielzahl von Signaltransduktionsprozessen (zur Übersicht, siehe Howlett 1995; Pertwee 1999).  $G_{i/o}$ - $\alpha$  Proteine inhibieren die Adenylatzyklase; als Folge kommt es zu einer Hemmung der cAMP-Produktion und somit zur Verminderung der PKA-Aktivität. In hippocampalen Zellen modulieren endogene CBs über den CB 1 Rezeptor die PKA-Aktivität und somit die Phosphorylierung der Kaliumkanäle. Dadurch werden deren Öffnungszustand sowie die Kaliumströme in der Zelle moduliert (Childers und Deadwyler 1996). Die Aktivierung der Transkription des *Aanat* Gens in Pinealocyten der Ratte wird über die cAMP/PKA-abhängige Phosphorylierung des aktivierenden Transkriptionsfaktors CREB vermittelt (siehe oben). Diese wird jedoch, wie hier gezeigt, durch die Stimulation mit THC nicht beeinflusst. Auch der AANAT Proteingehalt wird durch die Stimulation der Pinealorgane mit THC allein oder in Kombination mit NA nicht beeinflusst. Somit kann ein Effekt von THC auf die pCREB gesteuerte Transkription der *Aanat* ausgeschlossen werden.

Interessanterweise wurde jedoch die Aktivität des AANAT Proteins und die Melatoninfreisetzung durch die Stimulation mit THC beeinflusst. So kam es nach Präinkubation mit THC und anschließender Koapplikation von NA zu einer Reduktion

der AANAT Aktivität und zu einer verminderten Melatoninfreisetzung. Der Effekt von THC scheint somit nicht über die pCREB gesteuerte Transkription und die Kontrolle der AANAT Proteinmenge zu erfolgen, sondern über die Modulation der AANAT Aktivität vermittelt zu werden. Gegenstand zukünftiger Untersuchungen soll daher die Aufdeckung der zugrunde liegenden zellulären Signalkaskade sein, welche die AANAT Aktivität nach THC-Stimulation inhibiert und dadurch die Melatoninfreisetzung reduziert. Bei den CB Rezeptoren handelt es sich um G-Protein gekoppelte Rezeptoren. Zahlreiche durch CB Rezeptoren vermittelte Effekte werden in der Zelle über ein an die CB Rezeptoren konjugiertes  $G_{i/o}$  Protein verarbeitet. So wird unter anderem in Neuronen die Leitfähigkeit von Kalium- und Kalziumkanälen durch Agonisten des CB 1 Rezeptors beeinflusst (Mackie et al. 1995; Mc Allister et al. 1999; Gebremedhin et al. 1999; Pan et al. 1996; Hampson et al. 1998). Neben dem cAMP-Spiegel beeinflussten endogene CBs über die Phospholipase C (PLC) und Inositol-1,4,5-triphosphat (IP3) auch den intrazellulären  $Ca^{2+}$ -Spiegel (Sugiura et al. 1999; Netzeband et al. 1999). CB Rezeptor-Agonisten aktivieren den MAPK Signalweg und induzieren die *immediate early genes* Krox-24 und C-FOS (Rueda et al. 2000; Sanchez et al. 1998; Bouaboula et al. 1995, 1996; Patel et al. 1998). In humanen Mamma-Karzinom-Zellen kommt es durch THC-Stimulation, über die Hemmung der PKA, zur transkriptionalen Herabregulation des Prolaktinrezeptors sowie des NGF-Rezeptors (De Petrocellis et al. 1998). Darüber hinaus wurde ein Effekt von endogenen CBs auf die Aktivität der NO-Synthase (NOS) beschrieben (Prevot et al. 1998). Ceramide vermitteln einen vom  $G_{i/o}$  Protein unabhängigen und durch endogene CBs gesteuerten Signalweg (zur Übersicht, siehe Guzman et al. 2001). Pertussis-Toxin, ein Toxin aus dem Bakterium *Bordetella pertussis*, stellt einen potenten Inhibitor des  $G_{i/o}$  Proteins dar. Dieses Toxin soll daher in zukünftigen Untersuchungen verwendet werden, um die zellulären Signalverarbeitungsprozesse in Pinealozyten aufzuklären, welche an der durch THC vermittelten Inhibierung der AANAT Aktivität beteiligt sind.

Endogene CBs spielen eine modulatorische Rolle in vielen neuronalen und neuroendokrinen Systemen (zur Übersicht, siehe Wilson und Nicoll 2002; Murphy et al. 1998). So fungieren die endogenen CBs Anandamid und Arachidonylglycerin als schnelle retrograde Botenstoffe bei der synaptischen Übertragung. Die Aktivierung präsynaptischer CB 1 Rezeptoren führt zur modulierten Freisetzung von exzitatorischen und inhibitorischen Neurotransmittern (zur Übersicht, siehe Howlett et al. 2002). Durch die elektrische Stimulation hippocampaler Sliceulturen aus der Ratte

kommt es beispielsweise zu einer CB 1 Rezeptor-vermittelten Inhibierung der GABA-Ausschüttung aus inhibitorischen Synapsen. Dieser Mechanismus besitzt auch *in vivo* eine funktionelle Bedeutung (Katona et al. 1999, 2000; Paton et al. 1998; Hajos et al. 2000; Hoffman und Lupica 2000). Die Verabreichung von THC moduliert bei Ratten, Primaten und Menschen die Freisetzung von Follikulotropin (FSH), Luteinotropin (LH), Prolaktin und ACTH (Steger et al. 1983; Murphy et al. 1990). THC steuert die Freisetzung dieser Hormone nicht direkt am Ort ihrer Produktion, der Adenohypophyse, da dort keine CB 1 Rezeptoren nachgewiesen werden konnten (Lynn und Herkenham 1994). Vielmehr moduliert THC über CB 1 Rezeptoren im Hypothalamus die Freisetzung von Liberinen, die über Axone und Blutgefäße zur Adenohypophyse gelangen und dort die Sekretion der beschriebenen Hormone stimulieren. THC moduliert die Neurotransmitter im Hypothalamus, welche die Freisetzung der Liberine Gonadoliberin (GnRH) und Kortikoliberin (CRH) aus GnRH-produzierenden bzw. CRH-sezernierenden Neuronen im Hypothalamus steuern (Statham et al. 1995; Murphy und Statham 1996; Murphy 1997; Herkenham und Brady 1994; Rodriguez et al. 1995). Die Freisetzung von Prolaktin aus der Adenohypophyse wird wahrscheinlich vom Nukleus arcuatus gesteuert. THC moduliert hier die Freisetzung des Neurotransmitters Dopamin, der ein wichtiger Hemmstoff der Prolaktinsekretion ist (Fernandez-Ruiz et al. 1997). Im Gegensatz zu diesen Befunden am Hypothalamus-Hypophysensystem beeinflusste THC die Freisetzung des Neurohormons Melatonin direkt im Pinealorgan am Ort der Melatoninbiosynthese. Da im Pinealorgan die CB 1- und 2 Rezeptoren direkt im neuroendokrinen Effektororgan exprimiert werden, ist zu vermuten, dass *in vivo* endogene CBs die Melatoninproduktion direkt modulieren können.

Die Wirkung endogener Cannabinoide wird in den Zielzellen häufig über die CB 1- und 2 Rezeptoren abgewickelt. Pharmakologische Untersuchungen an CB 1- und 2 Rezeptor Knockout-Mäusen (Ledent et al. 1999; Zimmer et al. 1999; Buckley et al. 2000) bzw. an einer CB 1/CB 2 Rezeptor Doppelknockout-Maus weisen jedoch auf zusätzliche Subtypen von CB Rezeptoren hin. Studien mit CB Rezeptor-Agonisten und Rezeptorbindungsstudien mit Radioliganden an den Knockout-Mäusen belegen, dass einige physiologische Effekte von CBs nicht durch die bekannten CB 1- und 2 Rezeptoren vermittelt werden (Hajos et al. 2001; Di Marzo et al. 2000; Breivogel et al. 2001; Jarai et al. 1999). Diese Daten weisen auf weitere, noch nicht identifizierte CB Rezeptortypen hin. Durch den Einsatz spezifischer Antagoni-

sten für den CB 1- oder CB 2 Rezeptor soll in zukünftigen Untersuchungen überprüft werden, über welchen Rezeptortyp der Einfluss von THC auf die AANAT Aktivität und auf die Melatoninfreisetzung vermittelt wird.

#### **4.6 Ausblick**

Die in dieser Arbeit an Pinealozyten der Ratte und des Rindes erzielten Ergebnisse bieten zahlreiche neue Einblicke in die intrazellulären Signalverarbeitungsprozesse von Noradrenalin-gesteuerten Signalkaskaden. In den Pinealozyten wurden zelluläre und molekulare Regulationsmechanismen aufgedeckt, welche die AANAT, das Schlüsselenzym der Melatoninbiosynthese, und somit auch die Freisetzung des Neurohormons Melatonin steuern. Aufgrund des modellhaften Charakters des Pinealorgans zum Studium von Signalübertragungs- und Verarbeitungsprozessen erweitern die vorliegenden Ergebnisse nicht nur das bisherige Verständnis der an der Steuerung der Melatoninbiosynthese beteiligten Regulationsprozesse, sondern bieten auch zahlreiche neue experimentelle Ansatzpunkte für zukünftige Untersuchungen von prinzipiellen zell- und neurobiologischen Signalverarbeitungsprozessen. Die am Pinealorgan erhobenen Befunde lassen sich somit auf komplexere neuronale und neuroendokrine Systeme übertragen.

So wurde zunächst das zelluläre Verteilungsmuster der R-Untereinheiten der PKA und der A Kinase Ankerproteine (AKAP) 95 und 150 in Pinealozyten der Ratte charakterisiert. Die Kolo-kalisation zwischen den R-Untereinheiten der PKA Typ II und AKAP 150 in der Nähe der Zellmembran weist auf eine mögliche funktionelle Interaktion von AKAP 150 mit dem PKA Typ II Holoenzym hin. Es ist bekannt, dass AKAPs neben der Positionierung der PKA weitere an Signalübertragungsprozessen in der Zelle beteiligte Kinasen und Phosphatasen binden können und diese zu einem multifunktionalen Signalkomplex in der Zelle vereinigen. Aus den vorliegenden Befunden lassen sich daher folgende Fragestellungen für zukünftige Untersuchungen ableiten: Welches sind die im Bereich der Zellmembran vorliegenden Zielproteine für eine durch die PKA Typ II vermittelte Phosphorylierung? Welche weiteren Signalmoleküle (Kinasen, Phosphatasen) bzw. Interaktionspartner der PKA Typ II liegen an der Zellmembran der Pinealozyten vor? Mit Hilfe von immunzytochemischen Einzel- und Doppelfärbungen ließen sich weitere Signalmoleküle (z. B. PKC, PSP 2A, PSP 2B) in den Pinealozyten darstellen. Mit Hilfe der in dieser Arbeit angewandten Ko-

Immunpräzipitations-Methodik könnte die mögliche Interaktion der R-Untereinheiten der PKA Typ II mit AKAP 150 bestätigt sowie weitere Interaktionspartner von AKAP 150 identifiziert werden. Die funktionelle Bedeutung der möglicherweise identifizierten Interaktionspartner für die cAMP/PKA-gesteuerte Regulation der AANAT ließe sich im Anschluss mit Hilfe von Inhibitoren/Aktivatoren von Signalmolekülen pharmakologisch untersuchen.

Mit Hilfe des cAMP-Analogs 8-CPT-2'-O-Me-cAMP konnte nachgewiesen werden, dass EPAC/Rap1 nicht an der Steuerung der Melatoninbiosynthese beteiligt sind und dass langfristige Stimulationen mit NA den Aktivitätszustand von ERK 1 und 2 nicht beeinflussen. Dennoch könnte es sich künftig lohnen, die möglichen funktionellen Eigenschaften von EPAC/Rap 1 in Signalkaskaden von Pinealozyten näher zu beleuchten. Mit Hilfe von AK wäre es möglich, zunächst das Vorkommen und das zelluläre Verteilungsmuster von EPAC in Pinealozyten zu analysieren. Kommerziell erhältliche AK können Rap 1 abhängig von dessen Aktivitätszustand erkennen. Untersuchungen mit diesen AK könnten daher Rap 1 erstmalig und abhängig vom Aktivierungszustand in Pinealozyten darstellen. Dadurch könnten mögliche Ansatzpunkte für die Identifizierung der durch EPAC/Rap 1 gesteuerten Signalkaskaden im Pinealorgan geliefert werden.

Die Dynamik der pCREB Dephosphorylierung und deren Bedeutung für die Steuerung der Melatoninbiosynthese konnte in der vorliegenden Arbeit dargestellt werden. Dieser Transkriptionsfaktor ist an zahlreichen komplexen neuronalen Vorgängen wie Lernen, kognitiven Leistungen und der Entwicklung des ZNS entscheidend beteiligt. Das Pinealorgan der Ratte kann folglich für weitere Untersuchungen zur Steuerung der Phosphorylierung/Dephosphorylierung von CREB herangezogen werden und die daran gewonnen Erkenntnisse möglicherweise auf komplexere neuronale Vorgänge im ZNS übertragen werden. In der vorliegenden Arbeit wurde die Dephosphorylierung von CREB am Serin 133 untersucht. Aus anderen neurobiologischen Systemen, z. B. dem SCN, ist bekannt, dass CREB mindestens 2 andere potenzielle Phosphorylierungsstellen besitzt. Mit dem Serin 142 wurde im SCN eine weitere physiologisch aktive und funktionell bedeutende Phosphorylierungsstelle von CREB identifiziert (Gau et al. 2002). Mit einem zur Verfügung stehen AK gegen das am Serin 142 phosphorylierte CREB könnte daher die Bedeutung dieser Phosphorylierungsstelle für die Steuerung der *Aanat* Transkription geprüft werden. Die Funktion der regulatorischen Faktoren *CREB binding protein* (CBP) und p300, welche die Bin-

derung von CREB an den basalen Transkriptionskomplex unterstützen und somit an der Transkription von CRE tragenden Genen beteiligt sind, ist im Pinealorgan bisher wenig untersucht. Eine NA-Stimulus-abhängige Interaktion dieser Aktivatorproteine mit CREB ließe sich mit Hilfe von Ko-Immünpräzipitationsexperimenten an kultivierten Pinealozyten untersuchen. NA kontrolliert CREB in Pinealozyten der Ratte über die Steuerung der PKA Typ II- und PSP 1 Aktivität. Der enge Zeitraum der pCREB Dephosphorylierung von 30 Minuten nach Entzug des NA-Stimulus konnte bisher noch nicht in einen funktionellen Zusammenhang mit der Regulation der katalytischen Untereinheit der PSP 1 gebracht werden. Eine Funktion von DARPP-32 konnte ausgeschlossen werden, bekanntermaßen steuern jedoch viele weitere regulatorische Untereinheiten die Aktivität der CSU-PSP 1 im Zellkern. Mit Hilfe von Doppelimmunfluoreszenzuntersuchungen und Ko-Immünpräzipitationsexperimenten soll daher die funktionale Beteiligung von NIPP-1 und PNUTS, zwei im Zellkern vorkommenden endogenen Regulatoren der CSU-PSP 1, an kultivierten Pinealozyten untersucht werden.

Wie in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, spielen ebenso posttranslationale Mechanismen bei der Steuerung der AANAT eine wichtige Rolle. Untersuchungen zum Phosphorylierungszustand der AANAT sollen in zukünftigen Untersuchungen im Mittelpunkt stehen. Bisher konnte noch nicht geklärt werden, welche Isoform der PKA für die Phosphorylierung der AANAT verantwortlich ist. Ebenso ist bisher die funktionelle Beteiligung von PSPs an der Dephosphorylierung der AANAT wenig untersucht worden. Daher soll nach Stimuluzug und gleichzeitiger Applikation von PSP-Inhibitoren die Dynamik der Dephosphorylierung der AANAT untersucht werden. Dies könnte mit zur Verfügung stehenden AK erfolgen, welche die am N-Terminus phosphorylierte AANAT erkennen. Über die Bedeutung der C-terminalen Phosphorylierung der AANAT ist bisher wenig bekannt. Diese Frage kann mit AK angegangen werden, welche die am C-Terminus phosphorylierte AANAT erkennen und mit denen die Dynamik der C-terminalen Phosphorylierung/Dephosphorylierung untersucht werden könnte. Die Bedeutung der proteasomalen Proteolyse für die Regulation des AANAT Proteins wurde bisher mit Hilfe von Lactacystin und MG-132, zwei potenten Inhibitoren der proteasomalen Proteolyse, an Pinealozyten des Rindes untersucht. Die Komplexbildung mit dem Protein 14-3-3 schützt dabei die AANAT vor einer Ubiquitinierung und dem anschließenden proteolytischen Abbau. Die in dieser Arbeit angewendete Ko-Immünpräzipitation ist auch geeignet, um eventuell existierende

Komplexe aus AANAT und Ubiquitin nachzuweisen. Durch Entzug des NA-Stimulus und gleichzeitige Applikation von Lactacystin oder MG-132 könnte dieser Komplex angereichert und somit im Immunoblot dargestellt werden.

Die vorliegenden Untersuchungen zur Bedeutung des Cannabinoidsystems für die Steuerung der Melatoninbiosynthese bieten auch interessante Perspektiven für weitere Forschungen. Kultivierte Pinealorgane sind hervorragend geeignet, um aufzuklären, welche intrazellulären Verarbeitungsprozesse an der Wirkung von THC beteiligt sind. Mit Hilfe von spezifischen Antagonisten der CB 1- oder 2 Rezeptoren sowie mit Hilfe des Pertussis-Toxins könnte geklärt werden, welcher Rezeptor den THC Effekt vermittelt und ob dieser an ein  $G_{i/o}$  Protein gekoppelt ist. Es wird zu überprüfen sein, ob intrazelluläre cAMP-Spiegel und/oder  $Ca^{2+}$ -Spiegel durch CBs in Pinealozyten beeinflusst werden. Mit Hilfe von Rezeptorbindungsstudien soll das diurnale und zirkadiane Verteilungsmuster der CB Rezeptoren im Pinealorgan und Gehirn von Tieren aufgedeckt werden, die zu unterschiedlichen Tages- und Nachtzeiten getötet wurden.

Mit Hilfe von kultivierten Pinealozyten und Pinealorganen der Ratte und des Rindes ließen sich in der vorliegenden Arbeit zahlreiche zelluläre und molekulare Mechanismen charakterisieren, welche an der Noradrenalin-gesteuerten Signalkaskade beteiligt sind und die Melatoninbiosynthese steuern. Im Fokus künftiger Fragestellungen werden in erster Linie Untersuchungen zur Dephosphorylierung von pCREB und zur funktionellen Wirkungsweise des Cannabinoidsystems im Pinealorgan stehen. Für die Bearbeitung dieser Fragestellungen bieten die etablierten Methoden eine hervorragende Voraussetzung und das Pinealorgan der Säugetiere wird auch in der Zukunft ein wichtiges Modellsystem zum Studium von Signalübertragungs- und Verarbeitungsprozesse darstellen.

## 5 Zusammenfassung

Der tägliche und jahreszeitliche Wechsel in den Lichtverhältnissen bedeutet für alle Lebewesen eine regelmäßige und fundamentale Veränderung ihrer Lebensbedingungen. Mit Hilfe einer Inneren Uhr können Lebewesen regelmäßige Veränderungen ihrer Umwelt antizipieren. Diese Innere Uhr gewährleistet die Generierung eines endogenen, zirkadianen Rhythmus und dessen Synchronisation mit der Umwelt. Bei Wirbeltieren werden diese Funktionen durch einen spezifischen neuronalen Schaltkreis im Gehirn, dem photoneuroendokrinen System (PNS), erfüllt. Das Pinealorgan ist ein essenzieller Bestandteil des PNS. Dort werden photoperiodische Reize und Signale vom endogenen Oszillator in die Synthese des Neurohormons Melatonin umgesetzt. Die vom zentralen Oszillator im SCN gesteuerte Freisetzung von Noradrenalin (NA) aus sympathischen-postganglionären Nervenfasern in das Pinealorgan ist der entscheidende Reiz zur nächtlichen Ankurbelung der Melatoninbiosynthese. Melatonin wird ausschließlich in der Nacht gebildet und fungiert daher als ein Zeithormon. Unmittelbar nach der Synthese wird das Melatonin in die Blutbahn abgegeben und liefert allen Zellen, die mit spezifischen Melatoninrezeptoren ausgestattet sind, die entsprechenden Licht- und Zeitinformationen. NA bewirkt in allen untersuchten Säugetierarten die Aktivierung des Schlüsselenzyms der Melatoninbiosynthese, der AANAT. Die zellulären und molekularen Regulationsmechanismen für die AANAT unterscheiden sich jedoch artspezifisch. So ruft NA in Pinealozyten der Ratte die cAMP/PKA/pCREB-vermittelte Aktivierung der Transkription des *Aanat* Gens hervor, wogegen in Pinealozyten des Rindes NA die Regulation der proteasomalen Proteolyse des AANAT Proteins kontrolliert.

Das übergeordnete Ziel dieser Arbeit war es, zelluläre und molekulare Mechanismen der noradrenergen Signaltransduktionskaskade zu identifizieren, welche für die Steuerung der Melatoninbiosynthese im Pinealorgan von Säugetieren verantwortlich sind. Deshalb wurden in kultivierten Pinealozyten der Ratte und des Rindes sowohl transkriptionale als auch posttranslationale Regulationsmechanismen untersucht, welche durch NA gesteuert und an der Regulation des Schlüsselenzyms der Melatoninbiosynthese, der AANAT, beteiligt sind.

Mit Hilfe der Immunzytochemie konnte erstmalig das subzelluläre Verteilungsmuster sämtlicher bekannter regulatorischer (R)-Untereinheiten der PKA Typ I und II in Pinealozyten der Ratte nachgewiesen werden. Ebenso wurden die A Kinase Anker Proteine (AKAP) 95 und 150 immunzytochemisch dargestellt, wobei zwischen der AKAP 150-Immunreaktivität (IR) und der IR von RII $\alpha$  bzw. RII $\beta$  eine weitgehende Kolokalisation in der Nähe der Zellmembran der Pinealozyten vorlag. Diese Kolokalisationen deuten eine funktionelle Interaktion der PKA Typ II mit AKAP 150 in Pinealozyten der Ratte an.

Keine Funktion bei der Steuerung der Melatoninbiosynthese scheinen der cAMP-regulierte Austauschfaktor EPAC und die monomere GTPase Rap zu besitzen. So konnte eine Stimulation kultivierter Pinealorgane mit 8-CPT-2'-O-Me-cAMP, einem EPAC-spezifischen cAMP-Analog, einzeln oder in Kombination mit Noradrenalin (NA) weder den AANAT Proteingehalt noch die Freisetzung von Melatonin beeinflussen. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit belegen, dass die cAMP-vermittelte Aktivierung der Melatoninbiosynthese ausschließlich auf die PKA zurückzuführen ist. Ebenso beeinflussten weder NA noch 8-CPT-2'-O-Me-cAMP den Aktivitätszustand von ERK 1 und 2. Eine Erhöhung des cAMP-Spiegels in Pinealozyten der Ratte scheint somit keinen Einfluss auf den Aktivitätszustand von ERK 1 und 2 im Pinealorgan der Ratte auszuüben.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die schnelle Dephosphorylierung von pCREB eine entscheidende Funktion bei der akuten Herabregulation des CRE-tragenden *Aanat* Gens darstellt und somit eine wichtige Rolle für die Beendigung der Melatoninbiosynthese im Pinealorgan der Ratte spielt. Nach Entzug des NA-Stimulus kam es innerhalb von 30 Minuten zu einer fast vollständigen pCREB Dephosphorylierung, die mit einer Abnahme der *Aanat* mRNA, des AANAT Proteingehalts und der Melatoninbiosynthese einherging. Die pCREB Dephosphorylierung und die Abnahme der Melatoninbiosynthese konnten durch PSP-Inhibitoren verhindert werden. Aufgrund der pharmakologischen Untersuchungen und des intrazellulären Verteilungsmusters scheint die PSP 1 die pCREB Dephosphorylierung im Zellkern der Rattenpinealozyten zu steuern.

Mit Hilfe eines Ko-Immunpräzipitationsansatzes wurde erstmalig eine NA-abhängige Komplexbildung von AANAT und Protein 14-3-3 in Pinealozyten der Ratte und des Rindes dargestellt. Die vorliegenden Untersuchungen belegen somit, dass Tierarten, welche generell eine unterschiedliche molekulare Strategie zur Regulation der Melatoninbiosynthese entwickelt haben, mit der NA-abhängigen Ausbildung des AANAT/Protein 14-3-3 Komplexes jedoch einen gemeinsamen Mechanismus zur Regulation des AANAT Proteins besitzen.

Ferner wurde die funktionelle Bedeutung des Cannabinoidsystems für die Steuerung der Melatoninbiosynthese im Pinealorgan der Ratte untersucht. Mit Hilfe der Immunhistochemie und des Immunoblotverfahrens konnten erstmalig CB 1- und 2 Rezeptorproteine im Pinealorgan der Ratte dargestellt werden. Die Stimulation kultivierter Pinealorgane der Ratte mit THC hatte keinen Einfluss auf den pCREB- und AANAT Proteingehalt, konnte jedoch die NA-induzierte Aktivierung des AANAT Proteins und die Melatoninfreisetzung hemmen.

Das Pinealorgan der Ratte und des Rindes dient als ein gut geeignetes Modellsystem zum Studium von Signalkaskaden, da hier Noradrenalinreize in ein definiertes, einfach messbares Endprodukt, die Biosynthese und Sekretion des Neurohormons Melatonin, umgewandelt werden. Die in dieser Arbeit aufgedeckten Signaltransduktionsprozesse liefern daher nicht nur neue Einblicke in die Regulationsprozesse der Melatoninbiosynthese, son-

---

dern dienen ebenso dem besseren Verständnis von Signalübertragungs- und Signalverarbeitungsprozessen in komplexeren neuronalen und neuroendokrinen Systemen.

**6 Abkürzungen**

AANAT	Arylalkyamin <i>N</i> -acetyltransferase
AC	Adenylatcyclase
ACTH	Adrenokortikotropin
AK	Antikörper
AKAP	A Kinase Anker Protein
AS	Antiserum
ATF-1	aktivierender Transkriptionsfaktor 1
ATP	Adenosintriphosphat
AVP	Arginin-Vasopressin
Bp	Basenpaare
8-Br-cAMP	8-Bromo-cAMP
BSA	Rinderserum Albumin
CaMK	Ca <sup>2+</sup> /Calmodulin-abhängige Kinase
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CB	Cannabinoid
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
CIM	Columna intermediolateralis
CK	Caseinkinase
CLSM	Konfokale Laserscanning-Mikroskopie
CRE	<i>Ca<sup>2+</sup>/cAMP responsive element</i>
CREB	<i>Ca<sup>2+</sup>/cAMP responsive element-binding protein</i>
CRH	Kortikoliberin
8-CPT-2'-O-Me-cAMP	8-(4-Chloro-phenylthio)-2'-O-methyladenosin-cAMP
α-CSU-PSP 1	α-katalytische Untereinheit der PSP 1
CT	<i>circadian time</i>
DARPP-32	<i>dopamine and adenosine 3',5'-monophosphate-regulated phosphoprotein, 32 kDa</i>
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium nutrient-Mix F12</i>
EBSS	<i>Earle's Balanced Salt Solution</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EPAC	<i>exchange protein directly activated by cAMP</i>

ERK 1/2	Extrazellulär regulierte Kinase 1/2
FSH	Follikulotropin
GCS	Ganglion cervicale superius
GRP	<i>gastrin releasing peptide</i>
GnRH	Gonadoliberin
GEF	<i>guanosine nucleotide exchange factor</i>
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure
HRP	Meerrettichperoxidase
HIOMT	Hydroxyindol-O-methyltransferase
I-1	hitzestabiler Inhibitor-1 der PSP 1
ICER	<i>inducible cAMP early repressor</i>
IP3	Inositol-1,4,5-triphosphat
LH	Luteinotropin
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MG	Molekulargewicht
MOPS	Morpholinopropan-Sulfonsäure
NA	Noradrenalin
NGF	<i>Nerve Growth Factor</i>
<i>NIPP-1</i>	<i>nuclear inhibitor of PSP 1</i>
NOS	Stickstoffmonoxid-Synthase
PAGE	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese
PACAP	<i>Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide</i>
PBS	Phosphat-gepufferte Saline
PNS	Photoneuroendokrines System
PKA	Protein Kinase A
PKC	Proteinkinase C
PLC	Phospholipase C
PNUTS	<i>PSP 1 nuclear targeting subunit</i>
PSP	Protein Serin/Threonin Phosphatase
PVN	Nucleus paraventricularis
RHT	Retinohypothalamischer Trakt
R1 $\alpha$	Regulatorische I $\alpha$ -Untereinheit der PKA
RNA	Ribonukleinsäure
Rpm	<i>rounds per minute</i>

---

RT	Raumtemperatur
SCN	Nucleus suprachiasmaticus
SDS	Natriumdodecylsulfat
SEM	Standardfehler des Mittelwerts
SOM	Somatostatin
TBS	Tris-gepufferte Saline
THC	$\Delta^9$ -Tetra-hydrocannabinol
VIP	Vasoaktives Intestinales Polypeptid
ZT	Zeitgeber time

Englischsprachige Begriffe, mRNA- und Gene werden mit kursiv ausgeführten Druckbuchstaben, alle weiteren Begriffe in normal ausgeführten Druckbuchstaben bezeichnet.

## 6 Literatur

- Aitken A, Bilham T, Cohen P (1982) Complete primary structure of protein phosphatase inhibitor-1 from rabbit skeletal muscle. *Eur J Biochem* 126: 235-246.
- Aitken A, Howell S, Jones D, Madrazo J, Patel Y (1995) 14-3-3 alpha and delta are the phosphorylated forms of Raf-activating 14-3-3 beta and zeta. *J Biol Chem* 270: 5706-5709.
- Aitken A (1996) 14-3-3 and its possible role in co-ordinating multiple signaling pathways. *Trends Cell Biol* 6: 341-347.
- Aitken A, Baxter H, Dubois T, Clokie S, Mackie S, Mitchell K, Peden A, Zemlickova E (2002) Specificity of 14-3-3 isoforms dimer interactions and phosphorylation. *Biochem Soc Trans* 30: 351-360
- Allen PB, Kwon YG, Nairn AC, Greengard P (1998) Isolation and characterization of PNUTS, a putative protein phosphatase 1 nuclear targeting subunit. *J Biol Chem* 273: 4089-4095.
- Allen PB, Hsieh-Wilson L, Yan Z, Feng J, Ouimet CC, Greengard P (1999) Control of protein phosphatase I in the dendrite. *Biochem Soc Trans* 27: 543-546.
- Arendt J (1995) Melatonin and the mammalian pineal gland. Chapman and Hall, London pp 201-285.
- Armstrong R, Wen W, Meinkoth J, Taylor S, Montminy M (1995) A refractory phase in cyclic AMP-responsive transcription requires downregulation of protein kinase A. *Mol Cell Biol* 15: 1826-1832.
- Axelrod J (1974) The pineal gland: a neurochemical transducer. *Science* 184: 1341-1348.
- Baler R, Covington S and Klein DC (1997) The rat arylalkylamine *N*-acetyltransferase gene promoter: cAMP activation via cAMP responsive element-CCAAT complex. *J Biol Chem* 272: 6979-6985.
- Berson DM, Dunn FA, Takao M (2002) Phototransduction by retinal ganglion cells that set the circadian clock. *Science* 295: 1070-1073.
- Beullens M, van Eynde A, Vulsteke V, Connor J, Shenolikar S, Stalmans W, Bollen M (1999) Molecular determinants of nuclear protein phosphatase-1 regulation by NIPP-1. *J Biol Chem* 274: 14053-14061.
- Biemans BA, Gerkema MP, Van der Zee EA (2002) Increase in somatostatin immunoreactivity in the suprachiasmatic nucleus of aged Wistar rats. *Brain Res* 58: 463-467.
- Bito H, Deisseroth K, Tsien RW (1996) CREB phosphorylation and dephosphorylation: a  $Ca^{2+}$ - and stimulus duration-dependent switch for hippocampal gene expression. *Cell* 87: 1203-1214.

- Borch J, Bych K, Roepstorff P, Palmgren MG, Fuglsang AT (2002) Phosphorylation-independent interaction between 14-3-3 protein and the plant plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase. *Biochem Soc Trans* 30: 411-415.
- Borjigin J, Wang MM, Snyder SH (1995) Diurnal variation in mRNA encoding serotonin *N*-acetyltransferase in the pineal gland. *Nature* 378: 783-785.
- Bouaboula M, Bourrie B, Rinaldi-Carmona M, Shire D, Le Fur G, Casellas P (1995) Stimulation of cannabinoid receptor CB1 induces *krox-24* expression in human astrocytoma cells. *J Biol Chem* 270: 13973-13980.
- Bouaboula M, Poinot-Chazel C, Marchand J, Canat X, Bourrie B, Rinaldi-Carmona M, Calandra B, Le Fur G, Casellas P (1996) Signalling pathway associated with stimulation of CB2 peripheral cannabinoid receptor: involvement of both mitogen-activated protein kinase and induction of *Krox-24* expression. *Eur J Biochem* 237: 704-711.
- Boussiotis VA, Freeman GJ, Berezovskaya A, Barber DL, Nadler LM (1997) Maintenance of human T cell anergy: blocking of IL-2 gene transcription by activated Rap1. *Science* 278: 124-128.
- Braselmann S, McCormick F (1995) Bcr and Raf form a complex in vivo via 14-3-3 proteins. *EMBO J* 14: 4839-4848.
- Bregman DB, Bhattacharyya N, Rubin CS (1989) High affinity binding protein for the regulatory subunit of cAMP-dependent protein kinase II-B. Cloning, characterizations, and expression of cDNAs for rat brain P150. *J Biol Chem* 264: 4648-4656.
- Breivogel CS, Griffin G, Di Marzo V, Martin BR (2001) Evidence for a new G protein-coupled cannabinoid receptor in mouse brain. *Mol Pharmacol* 60: 155-163.
- Broek D, Toda T, Michaeli T, Levin L, Birchmeier C, Zoller M, Powers S, Wigler M (1987) The *S. cerevisiae* CDC25 gene product regulates the RAS/adenylate cyclase pathway. *Cell* 48: 789-799.
- Buck LB (1992) The olfactory multigene family. *Curr Opin Neurobiol* 2: 282-288.
- Buckley NE, Hansson S, Harta G, Mezey E (1998) Expression of the CB<sub>1</sub> and CB<sub>2</sub> receptor messenger RNAs during embryonic development in the rat. *Neuroscience* 82: 1131-1149.
- Buckley NE, McCoy KL, Mezey E, Bonner T, Zimmer A, Felder CC, Glass M, Zimmer A (2000) Immunomodulation by cannabinoids is absent in mice deficient for the cannabinoid CB<sub>2</sub> receptor. *Eur J Pharmacol*. 396: 2-3.
- Campbell SL, Khosravi-Far R, Rossman KL, Clark GJ, Der CJ (1998) Increasing complexity of Ras signaling. *Oncogene* 17: 1395-1413.
- Card JP, Brecha N, Karten HJ, Moore RY (1981) Immunocytochemical localization of vasoactive intestinal polypeptide-containing cells and processes in the suprachiasmatic nucleus of the rat: light and electron microscopic analysis. *J Neurosci* 1: 1289-1303.

- Carlisle SJ, Marciano-Cabral F, Staab A, Ludwick C, Cabral GA (2002) Differential expression of the CB<sub>2</sub> cannabinoid receptor by rodent macrophages and macrophage-like cells in relation to cell activation. *Int Immunopharmacol* 2: 69-82.
- Carr DW, Stofko-Hahn RE, Fraser ID, Cone RD, Scott JD (1992) Localization of cAMP-dependent protein kinase to the postsynaptic densities by A-kinase anchoring proteins. Characterization of AKAP 79. *J Biol Chem* 266: 14188-14192.
- Celis JE, Gesser B, Rasmussen HH, Madsen P, Leffers H, Dejgaard K, Honore B, Olsen E, Ratz G, Lauridsen JB, et al (1990) Comprehensive two-dimensional gel protein databases offer a global approach to the analysis of human cells: the transformed amnion cells (AMA) master database and its link to genome DNA sequence data. *Electrophoresis* 11: 989-1071.
- Childers SR, Deadwyler SA (1996) Role of cyclic AMP in the actions of cannabinoid receptors. *Biochem Pharmacol* 52: 819-827.
- Chomczynski P, Sacchi N (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*;162: 156-159.
- Coghlan VM, Langeberg LK, Fernandez A, Lamb NJ, Scott JD (1994) Cloning and characterization of AKAP 95, a nuclear protein that associates with the regulatory subunit of type II cAMP-dependent protein kinase. *J Biol Chem* 269: 7659-7665.
- Cook SJ, Rubinfeld B, Albert I, McCormick F (1993) RapV12 antagonizes Ras-dependent activation of ERK1 and ERK2 by LPA and EGF in Rat-1 fibroblasts. *EMBO J* 12: 3475-3485.
- Coon SL, Roseboom PH, Baler R, Weller JL, Namboodiri MA, Koonin EV, Klein DC (1995) Pineal serotonin *N*-acetyltransferase: expression cloning and molecular analysis. *Science* 270: 1681-1683.
- Coon SL, Del Olmo E, Young WS 3rd, Klein DC (2002) Melatonin synthesis enzymes in *Maca mulatta*: focus on arylalkylamine *N*-acetyltransferase (EC 2.3.1.87). *J Clin Endocrinol Metab* 87: 4699-4706.
- Craig M, Luu HA, McCready TL, Williams D, Andersen RJ, Holmes CF (1996) Molecular mechanisms underlying the interaction of motuporin and microcystins with type-1 and type-2A protein phosphatases. *Biochem. Cell Biol.* 74: 569-578.
- Craft CM, Murage J, Brown B, Zhan Poe X (1999) Bovine arylalkylamin *N*-acetyltransferase activity correlated with mRNA expression in pineal and retina. *Brain Res Mol Brain Res* 65: 44-51.
- Da Cruz e Silva EF, Fox CA, Ouimet CC, Gustafson E, Watson SJ and Greengard P (1995) Differential expression of protein phosphatase 1 isoforms in mammalian brain. *J Neurosci* 15: 3375-3389.

- DeCoursey PJ, Buggy J (1989) Circadian rhythmicity after neural transplant to hamster third ventricle: specificity of suprachiasmatic nuclei. *Brain Res* 500: 263-275.
- De Petrocellis L, Melck D, Palmisano A, Bisogno T, Laezza C, Bifulco M, Di Marzo V (1998) The endogenous cannabinoid anandamide inhibits human breast cancer cell proliferation. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 8375-8380.
- deRoos J, Zwartkruis FJT, Verheijen MHG, Cool RH, Nijman SMB, Wittinghofer A, Bos JL (1998) Epac is a Rap1 guanine-nucleotide-exchange factor directly activated by cyclic AMP. *Nature* 396: 474-477.
- deRoos J, Rehmann H, van Triest M, Cool RH, Wittinghofer A, Bos JL (2000) Mechanisms of regulation of the EPAC family of cAMP-dependent RAPGEFs. *J Biol Chem* 275: 20829-20836.
- Di Marzo V, Breivogel CS, Bisogno T, Tao Q, Brigden DT, De Petrocellis L, Razdan RK, Zimmer AM, Zimmer A, Martin BR (2000) Evidence for non CB<sub>1</sub>-non CB<sub>2</sub> anandamide receptors in mouse brain. In: *Symposium on the Cannabinoids*, Burlington Vermont, International Cannabinoid Research Society. p 18.
- Dodge K, Scott JD (2000) AKAP79 and the evolution of the AKAP model. *FEBS Letters* 476: 58-61.
- Drucker-Colin R, Aguilar-Roblero R, Garcia-Fernandez F, Fernandez-Cancino F, Rattoni FB (1984) Fetal suprachiasmatic nucleus transplants: diurnal rhythm recovery of lesioned rats. *Brain Res* 311: 353-357.
- Dyda F, Klein DC, Hickman AB (2000) GCN5-related N-acetyltransferase: a structural overview. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 29: 81-103.
- Ebling FJP (1996) The role of glutamate in the photic regulation of the suprachiasmatic nucleus. *Prog Neurobiol* 50: 109-132.
- Edelman AM, Blumenthal DK, Krebs EG (1987) Protein serine/threonine kinases. *Annu Rev Biochem* 56: 567-613.
- Egertova M, Elphick MR (2000) Localisation of cannabinoid receptors in the rat brain using antibodies to the intracellular C-terminal tail of CB<sub>1</sub>. *J Comp Neurol* 422: 159-171.
- Eide T, Coghlan V, Orstavik S, Holsve C, Solberg R, Skalhegg BS, Lamb NJC, Langeberg L, Fernandez A, Scott JD, Jahnsen T, Tasken K (1998) Molecular cloning, chromosomal localisation, and cell cycle dependent subcellular distribution of the A-kinase anchoring protein, AKAP 95. *Exp Cell Res* 238: 305-316.
- Elbrecht A, DiRenzo J, Smith RG, Shenolikar S (1990) Molecular cloning of protein phosphatase inhibitor-1 and its expression in rat and rabbit tissues. *J Biol Chem* 265: 13415-13418.
- Elphick MR, Egertova M (2001) The neurobiology and evolution of cannabinoid signalling. *Phil Trans R Soc Lond B Biol Sci* 356: 381-408

- Endo S, Zhou X, Connor J, Wang B, Shenolikar S (1996) Multiple structural elements define the specificity of recombinant human inhibitor-1 as a protein phosphatase-1 inhibitor. *Biochemistry* 35: 5220-5228.
- Enserink JM, Christensen AE, de Rooij J, van Triest M, Schwede F, Genieser HG, Doskeland SO, Blank JL, Bos JL (2002) A novel EPAC-specific cAMP analogue demonstrate independent regulation of Rap1 and ERK. *Nature Cell Biol* 4: 901-906.
- Falcon J, Galarneau KM, Weller JL, Ron B, Chen G, Coon SL, Klein DC (2001) Regulation of arylalkylamine *N*-acetyltransferase-2 (AANAT2, EC 2.3.1.87) in the fish pineal organ: evidence for a role of proteasomal proteolysis. *Endocrinology* 142: 1804-1813.
- Feinberg AP, Vogelstein B (1983) A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity *Anal Biochem* 132: 6-13.
- Feliciello A, Li Y, Avvedimento EV, Gottesman ME, Rubin CS (1997) A-kinase anchor protein 75 increases the rate and magnitude of cAMP signaling to the nucleus. *Curr Biol* 7: 1011-1014.
- Feliciello A, Gottesman ME, Avvedimento EV (2001) The biological function of A-kinase anchor proteins. *J Mol Biol* 308: 99-114.
- Fernandez-Ruiz JJ, Munoz RM, Romero J, Villanua MA, Makriyannis A, Ramos JA (1997) Time course of the effects of different cannabimimetics on prolactin and gonadotrophin secretion: evidence for the presence of CB<sub>1</sub> receptors in hypothalamic structures and their involvement in the effects of cannabimimetics. *Biochem Pharmacol* 53: 1919-1927.
- Foulkes JG, Strada SJ, Henderson PJ, Cohen P (1983) A kinetic analysis of the effects of inhibitor-1 and inhibitor-2 on the activity of protein phosphatase-1. *Eur J Biochem* 132: 309-313.
- Foulkes NS, Borjigin J, Snyder SH, Sassone-Corsi P (1996) Transcriptional control of circadian hormone synthesis via the CREM feedback loop. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 14140-14145.
- Fu H, Subramanian RR, Masters SC (2000) 14-3-3 proteins. Structure, function and regulation. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 40: 617-647.
- Furukawa Y, Ikuta N, Omata S, Yamauchi T, Isobe T (1993) Demonstration of the phosphorylation-dependent interaction of tryptophan hydroxylase with the 14-3-3 protein. *Biochem Biophys Res Commun* 194: 144-149.
- Ganguly S, Gastel JA, Weller JL, Schwartz C, Jaffe H, Nambodiri MA, Coon SL, Hickman AB, Rollag M, Obsil T, Beauverger P, Ferry G, Boutin JA, Klein DC (2001) Role of a pineal cAMP-operated arylalkylamine *N*-acetyltransferase/14-3-3-binding switch in melatonin synthesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 8083-8088.

- Ganguly S, Coon SL, Klein DC (2002) Control of melatonin synthesis in the mammalian pineal gland: the critical role of serotonin acetylation. *Cell Tissue Res* 309: 127-137.
- Gastel JA, Roseboom PH, Rinaldi PA, Weller JL, Klein DC (1998) Melatonin production: proteasomal proteolysis in serotonin N-acetyltransferase regulation. *Science* 279: 1358-1360.
- Gau D, Lemberger T, von Gall C, Kretz O, Le Minh N, Gass P, Schmid W, Schibler U, Korf HW, Schutz G (2002) Phosphorylation of CREB Ser142 regulates light-induced phase shifts of the circadian clock. *Neuron* 34: 245-253.
- Gebremedhin D, Lange AR, Campbell WB, Hillard CJ, Harder DR (1999) Cannabinoid CB1 receptor of cat cerebral arterial muscle functions to inhibit L-type Ca<sup>2+</sup> channel current. *Am J Physiol* 276: H2085-H2093.
- Glantz SB, Amat JA, Rubin CS (1992) cAMP signaling in neurons: patterns of neuronal expression and intracellular localization of a novel protein, AKAP 150, that anchors the regulatory subunit of cAMP-dependent protein kinase II $\beta$ . *Mol Biol Cell* 3: 1215-1228.
- Gooley JJ, Lu J, Chou TC, Scammell TE, Saper CB (2001) Melanopsin in cells of origin of the retinohypothalamic tract. *Nat Neurosci* 4: 1165.
- Green DJ, Gillette R (1982) Circadian rhythm of firing rate recorded from single cells in the rat suprachiasmatic nucleus. *Brain Res* 245: 198-200.
- Greengard P, Nairn AC, Girault JA, Ouimet CC, Snyder GL, Fisone G, Allen PB, Fienberg A, Nishi A (1998) The DARPP-32/protein phosphatase-1 cascade: a model for signal integration. *Brain Res Brain Res Rev* 26: 274-284.
- Groos GA, Hendriks J (1982) Circadian rhythms in electrical discharge of rat suprachiasmatic neurons recorded in vitro. *Neurosci Letters* 34: 283-288.
- Gurdjian ES (1927) The diencephalon of the albino rat: studies on the brain of the rat. Vol. 2: *J Comp Neurol* 43: 1-114.
- Guthridge MA, Stomski FC, Barry EF, Winnal W, Woodcock JM, McClure BJ, Dottore M, Berndt MC, Lopez AF (2000) Site-specific serine phosphorylation of the IL-3 receptor is required for hemopoietic cell survival. *Mol Cell* 6: 99-108.
- Guzman M, Galve-Roperh I, Sanchez C (2001) Ceramide: a new second messenger of cannabinoid action. *Trends Pharmacol Sci* 22: 19-22.
- Hagiwara M, Alberts A, Brindle P, Meinkoth J, Feramisco J, Deng T, Karin M, Shenolikar S, Montminy M (1992) Transcriptional attenuation following cAMP induction requires PSP1-mediated dephosphorylation of CREB. *Cell* 70: 105-113.
- Hajos N, Katona I, Naiem SS, Maackie K, Ledent C, Mody I, Freund TF (2000) Cannabinoids inhibit hippocampal GABAergic transmission and network oscillations. *Eur J Neurosci* 12: 3239-3249.

- Hajos N, Ledent C, Freund TF (2001) Novel cannabinoid-sensitive receptor mediates inhibition of glutamatergic synaptic transmission in the hippocampus. *Neuroscience* 106: 1-4.
- Hampson AJ, Bornheim LM, Scanziani M, Yost CS, Gray AT, Hansen BM, Leonoudakis DJ, Bickler PE (1998) Dual effects of anandamide on NMDA receptor-mediated responses and neurotransmission. *J Neurochem* 70: 671-676.
- Hannibal J, Moller M, Ottersen OP, Fahrenkrug J (2000) PACAP and glutamate are co-stored in the retinohypothalamic tract. *J Comp Neurol* 418: 147-155.
- Hannibal J (2002) Neurotransmitters of the retino-hypothalamic tract. *Cell Tissue Res* 309: 73-88.
- Hattar S, Liao HW, Takao M, Berson DM, Yau KW (2002) Melanopsin-containing retinal ganglion cells: architecture, projections, and intrinsic photosensitivity. *Science* 295: 1065-1070.
- Hausken ZE, Dell'Acqua ML, Coghlan VM, Scott JD (1996) Mutational analysis of the A-kinase anchoring protein (AKAP)-binding site on RII-classification of side chain determinants for anchoring and isoform selective association with AKAPs. *J Biol Chem* 271: 29016-29022.
- Haystead TA, Sim AT, Carling D, Honnor RC, Tsukitani Y, Cohen P, Hardie DG (1989) Effects of the tumor promoter okadaic acid on intracellular protein phosphorylation and metabolism. *Nature* 337: 78-81.
- Hedlund L, Lischko MM, Rollag MD, Niswender GD (1977) Melatonin: daily cycle in plasma and cerebrospinal fluid of calves. *Science* 195: 686-687.
- Hemmings HC Jr, Greengard P, Tung HY, Cohen P (1984) DARPP-32, a dopamine-regulated neuronal phosphoprotein, is a potent inhibitor of protein phosphatase-1. *Nature* 310: 503-505.
- Hemmings HC Jr, Greengard P (1986) DARPP-32, a dopamine- and adenosine 3':5'-monophosphate regulated phosphoprotein: regional, tissue, and phylogenetic distribution. *J Neurosci* 6: 1469-1481.
- Herkenham M, Lynn AB, Little MD, Johnson MR, Melvin LS, de Costa BR, Rice KC (1990) Cannabinoid receptor localization in brain. *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 1932-1936.
- Herkenham M, Lynn AB, Johnson MR, Melvin LS, de Costa BR, Rice KC (1991) Characterization and localization of cannabinoid receptors in rat brain: a quantitative *in vitro* autoradiographic study. *J Neurosci* 11: 563-583.
- Herkenham M, Brady LS (1994)  $\Delta^9$ -Tetrahydrocannabinol and the synthetic cannabinoid CP-55940 induce expression of *c-fos* mRNA in stress-responsive nuclei of rat brain. *Soc Neurosci Abstr* 20: 1676.

- Hirsch AH, Glantz SB, Li Y, You Y, Rubin CS (1992) Cloning and expression of an intronless gene for AKAP 75, an anchor protein for the regulatory subunit of cAMP-dependent protein kinase II beta. *J Biol Chem* 267: 2131-2134.
- Ho AK, Chik CL (2000) Adrenergic regulation of mitogen-activated protein kinases in rat pinealocytes: opposing effects of protein kinase A and protein kinase G. *Endocrinology* 141: 4496-4502.
- Ho AK, Price L, Mackova M, Chik CL (2001) Potentiation of cyclic AMP and Cyclic GMP accumulation by p38 mitogen-activated protein kinase (p38MAPK) inhibitors in rat pinealocytes. *Biochem Pharmacol* 62: 1605-1611.
- Hoffman A, Lupica CR (2000) Mechanisms of cannabinoid inhibition of GABA<sub>A</sub> synaptic transmission in the hippocampus. *J Neurosci* 20: 2470-2479.
- Howlett AC (1995) Cannabinoid compounds and signal transduction mechanisms. In: *Cannabinoid Receptors* (Pertwee RD ed). Academic Press, London, pp 167-204.
- Howlett AC, Barth F, Bonner TI, Cabral G, Casellas P, Devane WA, Felder CC, Herkenham M, Mackie K, Martin BR, Mechoulam R, Pertwee RG (2002) International Union of Pharmacology. XXVII. Classification of cannabinoid receptors. *Pharmacol Rev* 54: 161-202.
- Huang FL, Glinsmann WH (1976) Separation and characterization of two phosphorylase phosphatase inhibitors from rabbit skeletal muscle. *Eur J Biochem* 70: 419-426.
- Hubbard MJ, Cohen P (1993) On target with a new mechanism for the regulation of protein phosphorylation. *Trends Biochem Sci* 18: 172-177.
- Hunter T (1995) Protein kinases and phosphatases: the yin and yang of protein phosphorylation and signaling. *Cell* 80: 225-236.
- Ibuka M, Inouye ST, Kawamura H (1977) Analysis of sleep-wake-fulness rhythms in male rats after suprachiasmatic nucleus lesions and ocular enucleation. *Brain Res* 122: 33-47.
- Ichimura T, Isobe T, Okuyama T, Takahashi N, Araki K, Kuwano R, Takahashi Y (1988) Molecular cloning of cDNA coding for brain-specific 14-3-3 protein, a protein kinase-dependent activator of tyrosine and tryptophan hydroxylases. *Proc Natl Acad Sci USA* 85: 7084-7088.
- Iguchi H, Kato KI, Ibaysshi H (1982) Melatonin serum levels and metabolic clearance rate in patients with liver cirrhosis. *J Clin Endocrinol Metab* 54: 1025-1027.
- Inouye ST, Kawamura H (1979) Persistence of circadian rhythmicity in a mammalian hypothalamic "island" containing the suprachiasmatic nucleus. *Proc Natl Acad Sci USA* 76: 5962-5966.
- Inouye ST, Kawamura H (1982) Characteristics of a circadian pacemaker in the suprachiasmatic nucleus. *J Comp Physiol* 146: 153-166.

- Isobe T, Ichimura T, Okuyama T (1989) Chemistry and cell biology of neuron- and glia-specific proteins. *Arch Histol Cytol* 52: 25-32.
- Iuvone PM, Brown AD, Haque R, Weller JL, Zawilska JB, Chaurasia SS, Ma MH, Klein DC (2002) Retinal melatonin production: a role of proteasomal proteolysis in circadian and photic control of arylalkylamin *N*-acetyltransferase. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 43: 564-572.
- Jagiello I, Beullens M, Stalmans W, Bollen M (1995) Subunit structure and regulation of protein phosphatase-1 in rat liver nuclei. *J Biol Chem* 270: 17257-17263.
- Jarai Z, Wagner JA, Varga K, Lake KD, Compton DR, Martin BR, Zimmer AM, Bonner TI, Buckley NE, Mezey E, et al. (1999) Cannabinoid-induced mesenteric vasodilation through an endothelial site distinct from CB1 or CB2 receptors. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 14136-14141.
- Johnson RF, Moore RY, Morin LP (1988) Loss of entrainment and anatomical plasticity after lesion of hamster retinohypothalamic tract. *Brain Res* 460: 297-313.
- Kalsbeek A, Buijs RM (2002) Output pathways of the mammalian suprachiasmatic nucleus: coding circadian time by transmitter selection and specific targeting. *Cell Tissue Res* 309: 109-118.
- Katona I, Sperlagh B, Sik A, Káfalvi A, Vizi ES, Mackie K, Freund TF (1999) Presynaptically located CB1 cannabinoid receptors regulate GABA release from axon terminals of specific hippocampal interneurons. *J Neurosci* 19: 4544-4558.
- Katona I, Sperlagh B, Magloczky Z, Santha E, Káfalvi A, Czirjak S, Mackie K, Vizi ES, Freund TF (2000) GABAergic interneurons are the targets of cannabinoid actions in the human hippocampus. *Neuroscience* 100: 797-804.
- Kawasaki H, Springett GM, Mochizuki N, Toki S, Nakaya M, Matsuda M, Housman DE, Graybiel AM (1998) A family of cAMP-binding proteins directly activate Rap1. *Science* 282: 2275-2279.
- Kitayama H, Sugimoto Y, Matsuzaki T, Ikawa Y, Noda M (1989) A ras-related gene with transformation suppressor activity. *Cell* 56: 77-84.
- Kiyama H, Wanaka A, Maeno H, Matsumoto K, Sun G, Shiosaka S, Tohyama M (1994) Growth factors and extracellular signal-related kinases (mitogen-activated protein kinases) in the rat pineal gland. *Neuroendocrinology* 59: 152-155.
- Klein DC, Lines SV (1969) Pineal hydroxyindole O-methyl-transferase activity in the growing rat. *Endocrinology* 84: 1523-1525.
- Klein (1974) Circadian rhythms in indole metabolism in the rat pineal gland. In: Schnitt, FO, Worden FG (eds) *The neurosciences: third study program*. MIT Press, Cambridge, MA, pp 509-516.

- Klein DC (1985) Photoneuronal regulation of the mammalian pineal gland. In: Edvered D, Clark S (eds) Photoperiodism, melatonin and the pineal gland, Ciba Found Symp, 117, pp 38-65.
- Klein DC, Coon SL, Roseboom PH, Weller JL, Bernard M, Gastel JA, Zatz M, Luovone PM, Rodriguez IR, Begay V, Falcon J, Cahill GM, Cassone VM, Baler R (1997) The melatonin rhythm-generating enzyme: molecular regulation of serotonin *N*-acetyltransferase in the pineal gland. *Rec Progr Hormone Res* 52: 307-358.
- Klein DC, Ganguly S, Coon SL, Weller JL, Obsil T, Hickman A, Dyda F (2002) 14-3-3 proteins and photoneuroendocrine transduction: role in controlling the daily rhythm in melatonin. *Biochem Soc Trans* 30: 365-373.
- Klein DC, Ganguly S, Coon SL, Shi Q, Gaildrat P, Morin F, Weller JL, Obsil T, Hickman A, Dyda F (2003) 14-3-3 proteins in pineal photoneuroendocrine transduction: how many roles? *J Neuroendocrinology* 15: 370-377.
- Kopin IJ, Pare CMB, Axelrod J, Weissbach H (1961) The fate of melatonin in animals. *J Biol Chem* 236: 3072-3075.
- Korf HW, Oksche A, Ekstrom P, Gery I, Zigler JS Jr, Klein DC (1986) Pinealocyte projections into the mammalian brain revealed with S-antigen antiserum. *Science* 231: 735-737
- Korf HW (1994) The pineal organ as a component of the biological clock. Phylogenetic and ontogenetic considerations. *Ann NY Acad Sci* 719: 13-42.
- Korf HW (1996) Innervation of the pineal gland (Burnstock G, ed.) Vol. 10: Autonomic-endocrine interactions (Unsicker K, ed.). Harwood Academic Publishers, Amsterdam, pp 129-180.
- Korf HW, Schomerus C, Maronde E, Stehle JH (1996) Signal transduction molecules in the rat pineal organ:  $Ca^{2+}$ , pCREB, and ICER. *Naturwissenschaften* 83: 535-543.
- Korf HW, Schomerus C, Stehle JH (1998) The pineal organ, its hormone melatonin, and the photoneuroendocrine system. *Adv Anat Embryol Cell Biol* 146, pp 1-100.
- Korf HW (1999) Evolution of melatonin-producing pinealocytes. *Adv Exp Med Biol* 460: 17-29.
- Korf HW, Schomerus C, Maronde E, Stehle JH (2001) Signal transduction in the rodent pineal organ: activation of membrane-bound receptors stimulates gene expression. In: Goos HJT, Rastogi RK, Vaudry H, Pierantoni R (eds) *Perspective in comparative endocrinology: unity and diversity*. Monduzzi Editore, Bologna, pp 63-71.
- Kopp MDA, Schomerus C, Dehghanii F, Korf HW, Meissl H (1999) Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide and melatonin in the suprachiasmatic nucleus: effects on the calcium signal transduction cascade. *J Neurosci* 19: 206-219.

- Kopp MD, Meissl H, Dehghani F, Korf HW (2001) The pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide modulates glutamatergic calcium signalling: investigations on rat suprachiasmatic nucleus neurons. *J Neurochem* 79: 161-171.
- Lämmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
- Landsverk HB, Carlson CR, Steen RL, Vossebein L, Herberg FW, Tasken K, Collas P (2001) Regulation of anchoring of the RIIalpha regulatory subunit of PKA to AKAP95 by threonine phosphorylation of RIIalpha: implications for chromosome dynamics at mitosis. *J Cell Sci* 114: 3255-3264.
- Lange-Carter CA, Malkinson AM (1991) Differential regulation of the stability of cyclic AMP-dependent protein kinase messenger RNA in normal versus neoplastic mouse lung epithelial cells. *Cancer Res* 51: 6699-6703.
- Ledent C, Valverde O, Cossu G, Petitet F, Aubert JF, Beslot F, Bohme GA, Imperato A, Pedrazzini T, Roques BP, Vassart G, Fratta W, Parmentier M. (1999) Unresponsiveness to cannabinoids and reduced addictive effects of opiates in CB1 receptor knockout mice. *Science* 283: 401-4044.
- Lehman MN, Silver R, Gladstone WR, Kahn RM, Ginson M, Bittman EL (1987) Circadian rhythmicity restored by neural transplant: immunocytochemical characterization of the graft and its integration with the host brain. *J Neurosci* 7: 1626-1638.
- Lerner AB, Case JD, Takahashi Y, Lee Y, Mori W (1958) Isolation of melatonin, the pineal gland factor that lightens melanocytes. *J Am Chem Soc* 80: 2587.
- Li Y, Ndubuka C, Rubin CS (1996) A kinase anchor protein 75 targets regulatory (RII) subunits of cAMP-dependent protein kinase II to the cortical actin cytoskeleton in non-neuronal cells. *J Biol Chem* 271: 16862-16869.
- Liu D, Bienkowska J, Petosa C, Collier RJ, Fu H, Liddington R (1995) Crystal structure of the zeta isoform of the 14-3-3 protein. *Nature* 376: 191-194.
- Lovenberg W, Jequier E, Sjoerdsma A (1967) Tryptophan hydroxylation: measurement in pineal gland, brain stem, and carcinoid tumor. *Science* 155: 217-219.
- Ludvig N, Ribak CE, Scott JD, Rubin CS (1990) Immunocytochemical localization of the neuronal-specific regulatory subunit of the type II cyclic AMP-dependent protein kinase to postsynaptic structures in the rat brain. *Brain Res* 520: 90-102.
- Lynn AB, Herkenham M (1994) Localization of cannabinoid receptors and nonsaturable high-density cannabinoid binding sites in peripheral tissues of the rat: implications for receptor-mediated immune modulation by cannabinoids. *J Pharmacol Exp Ther* 268: 1612-1623.

- Mackie K, Lai Y, Westenbroek R, Mitchell R (1995) Cannabinoids activate an inwardly rectifying potassium conductance and inhibit Q-type calcium currents in AtT20 cells transfected with rat brain cannabinoid receptor. *J Neurosci* 15: 6552-6561.
- Mackova M, Man JR, Chik CL, Ho AK (2000) p38<sup>MAPK</sup> Inhibition enhances basal and norepinephrine-stimulated p42/44<sup>MAPK</sup> phosphorylation in rat pinealocytes. *Endocrinology* 141: 4202-4208.
- MacNicol MC, Muslin AJ, MacNicol AM (2000) Disruption of the 14-3-3 binding site within the B-Raf kinase domain uncouples catalytic activity from PC12 cell differentiation. *J Biol Chem* 275: 3803-3809.
- Mailleux P, Parmentier M, Vanderhaeghen JJ (1992) Distribution of cannabinoid receptor messenger RNA in the human brain: an in situ hybridization histochemistry with oligonucleotides. *Neurosci Lett* 143: 200-204.
- Maronde E, Middendorff R, Telgmann R, Müller D, Hemmings B, Tasken K, Olcese (1997) Melatonin synthesis in bovine pineal gland is regulated by type II cyclic AMP-dependent protein kinase. *J Neurochem* 68: 770-777.
- Maronde E, Pfeffer M, Olcese J, Molina CA, Schlotter F, Dehghani F, Korf HW, Stehle JH (1999a) Transcription factors in neuroendocrine regulation: rhythmic changes in pCREB and ICER levels frame melatonin synthesis. *J Neurosci* 19: 3326-3336.
- Maronde E, Wicht H, Tasken K, Genieser HG, Dehghani F, Olcese J, Korf HW (1999b) CREB phosphorylation and melatonin biosynthesis in the rat pineal gland: involvement of cyclic AMP dependent protein kinase type II. *J Pineal Res* 27: 170-182.
- Maronde E, Pfeffer M, von Gall C, Dehghani F, Schomerus C, Wicht H, Kroeber S, Olcese J, Stehle JH, Korf HW (2000) Signal transduction in the rodent pineal organ from the membrane to the nucleus. *Adv Exp Med Biol* 460: 109-131.
- Martin H, Rostas J, Patel Y, Aitken A (1994) Subcellular localisation of 14-3-3 isoforms in rat brain using specific antibodies. *J Neurochem* 63: 2259-2265.
- Matsuda LA, Bonner TI, Lolait SJ (1993) Localization of cannabinoid receptor messenger RNA in the brain. *J Comp Neurol* 327: 535-550.
- McAllister SD, Griffin G, Satin LS, Abood ME (1999) Cannabinoid receptors can activate and inhibit G protein-coupled inwardly rectifying potassium channels in a *Xenopus* oocyte expression system. *J Pharmacol Exp Ther* 291: 618-626.
- Michaud NR, Fabian JR, Mathes KD, Morrison DK (1995) 14-3-3 is not essential for Raf-1 proteins that are biologically activated in a 14-3-3- and Ras-independent manner. *Mol Cell Biol* 15: 3390-3397.
- Moga MM, Moore RY (1997) Organization of neuronal inputs to the suprachiasmatic nucleus in the rat. *J Comp Neurol* 389: 508-534.

- Molina CA, Foulkes NS, Lalli E, Sassone-Corsi P (1993) Inducibility and negative autoregulation of CREM: an alternative promoter directs the expression of ICER, an early response repressor. *Cell* 75: 875-886.
- Montminy M (1997) Transcriptional regulation by cyclic AMP. *Annu Rev Biochem* 66: 807-822.
- Moore BE, Perez VJ (1967) Specific acidic protein of the nervous system (Carlson FD, ed.): Physiological and Biochemical aspects of nervous integration. Englewood Cliffs, NJ, Prentice Hall, pp 343-359.
- Moore RY, Eichler VB (1972) Loss of circadian adrenal corticosterone rhythm following suprachiasmatic nucleus lesions in the rat. *Brain Res* 42: 201-206.
- Moore RY, Lenn NJ (1972) A retinohypothalamic projection in the rat. *J Comp Neurol* 146: 1-14
- Moore RY, Gustafson EL, Card JP (1984) Identical immunoreactivity of afferents to the rat suprachiasmatic nucleus with antisera against avian pancreatic polypeptide, molluscan cardioexcitatory peptide and neuropeptide Y. *Cell Tissue Res* 236: 41-46.
- Moore RY (1996) Entrainment pathways and the functional organization of the circadian system. *Prog Brain Res* 111: 103-119.
- Morgan PJ, Davidson G, Lawson W, Barret P (1990) Both pertussis toxin-sensitive and insensitive G-proteins link melatonin receptor to inhibition of adenylate cyclase in the ovine pars tuberalis. *J Neuroendocrinol* 2: 773-776.
- Morgan PJ, Barrett H, Howell E, Helliwell R (1994) Melatonin receptors: localizations, molecular pharmacology and physiological significance. *Neurochem Int* 24: 101-146.
- Morrison DK, Cutler RE (1997) The complexity of Raf-1 regulation. *Curr Opin Cell Biol* 9: 174-179.
- Murphy LL, Steger RW, Smith MS, Bartke A (1990) Effects of delta-9-tetrahydrocannabinol, cannabinol and cannabidiol, alone and in combinations, on luteinizing hormone and prolactin release and on hypothalamic neurotransmitters in the male rat. *Neuroendocrinology* 52: 316-321.
- Murphy LL, Statham BC (1996) The role of cannabinoid receptors in the luteinizing hormone (LH) and adrenocorticotropin (ACTH) response to cannabinoids. *Soc Neurosci Abstr* 22: 1344.
- Murphy LL (1997) The effect of anandamide and methanandamide on luteinizing hormone (LH), adrenocorticotropin (ACTH), and corticosterone (CORT) release in female rats. *Soc Neurosci Abstr* 23: 2049.
- Murphy LL, Munoz RM, Adrian BA, Villanua MA (1998) Function of cannabinoid receptors in the neuroendocrine regulation of hormone secretion. *Neurobiol Dis* 5: 432-446.

- Muslin AJ, Tanner JW, Allen PM, Shaw AS (1996) Interaction of 14-3-3 with signaling proteins is mediated by the recognition of phosphoserine. *Cell* 84: 889-897.
- Namboodiri MAA, Sugden D, Klein DC, Tamarkin L, Mefford IN (1985) Serum melatonin and pineal indolamine metabolism in a species with a small day night *N*-acetyltransferase rhythm. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 80: 731-736.
- Netzeband JG, Conroy SM, Parsons KL, Gruol DL (1999) Cannabinoids enhance NMDA-elicited  $Ca^{2+}$  signals in cerebellar granule neurons in culture. *J Neurosci* 19: 8765-8777.
- Neuwald AF, Landsman D (1997) GCN5-related histone *N*-acetyltransferases belong to a diverse superfamily that includes the yeast SPT10 protein. *Trends Biochem Sci* 22: 154-155.
- Nimmo GA, Cohen P (1978) The regulation of glycogen metabolism. Purification and characterisation of protein phosphatase inhibitor-1 from rabbit skeletal muscle. *Eur J Biochem* 87: 341-351.
- Nishi A, Snyder GL, Greengard P (1997) Bidirectional regulation of DARPP-32 phosphorylation by dopamine. *J Neurosci* 17: 8147-8155.
- Obsil T, Ghirlando R, Klein DC, Ganguly S, Dyda F (2001) Crystal structure of the 14-3-3zeta:serotonin *N*-acetyltransferase complex. A role for scaffolding in enzyme regulation. *Cell* 105: 257-267.
- Ohtsuka T, Shimizu K, Yamamori B, Kuroda S, Takai Y (1996) Activation of brain B-Raf protein kinase by Rap1B small GTP-binding protein. *J Biol Chem* 271: 1258-1261.
- Omay SB, Ogasawara H, Toyoda H, Nakai K, Shima H, Nagao M, Mumby MC, Shiku H, Nishikawa M (1995) Translocation of protein phosphatase 1 catalytic subunits during 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>-induced monocytic differentiation of HL-60 cells. *Cancer Res* 55: 774-780.
- Pan X, Ikeda SR, Lewis DL (1996) Rat brain cannabinoid receptor modulates N-type  $Ca^{2+}$  channels in a neuronal expression system. *Mol Pharmacol* 49: 707-714.
- Paolillo M, Feliciello A, Porcellini A, Garbi C, Bifulco M, Schinelli S, Ventra C, Stabile E, Ricciardelli G, Schettinin G, Avvedimento EV (1999) The type and the localization of cAMP-dependent protein kinase regulate transmission of cAMP signals to the nucleus in cortical and cerebellar granule cells. *J Biol Chem* 274: 6546-6552.
- Patel NA, Moldow RL, Patel JA, Wu G, Chang SL (1998) Arachidonylethanolamide (AEA) activation of FOS proto-oncogene protein immunoreactivity in the rat brain. *Brain Res* 797: 225-233.
- Paton GS, Pertwee RG, Davies SN (1998) Correlation between cannabinoid mediated effects on paired pulse depression and induction of long term potentiation in the rat hippocampal slice. *Neuropharmacology* 37: 1123-1130.

- Pertwee RG, Stevenson LA, Elrick DB, Mechoulam R, Corbett AD (1992) Inhibitory effects of certain enantiomeric cannabinoids in the mouse vas deferens and the myenteric plexus preparation of guinea-pig small intestine. *Br J Pharmacol* 105: 980-984.
- Pertwee RG (1999) Pharmacology of cannabinoid receptor ligands. *Curr Med Chem* 6: 635-664.
- Pfeffer M, Maronde E, Molina CA, Korf HW, Stehle JH (1999) Inducible cyclic AMP early repressor protein in rat pinealocytes: a highly sensitive natural reporter for regulated gene transcription. *Mol Pharmacol* 56: 279-289.
- Pfeffer M, Maronde E, Korf HW, Stehle JH (2000) Antisense experiments reveal molecular details on mechanisms of ICER suppressing cAMP-inducible genes in rat pinealocytes. *J Pineal Res* 29: 24-33.
- Prevot V, Rialas CM, Croix D, Salzet M, Dupouy J-P, Poulain P, Beauvillain J-C, Stefano GB (1998) Morphine and anandamide coupling to nitric oxide stimulates GnRH and CRF release from rat median eminence: neurovascular regulation. *Brain Res* 790: 236-244.
- Provencio I, Rodriguez IR, Jiang G, Hayes WP, Moreira EF, Rollag MD (2000) A novel human opsin in the inner retina. *J Neurosci* 20: 600-605
- Raisman G, Brown-Grant K (1977) The "suprachiasmatic syndrome": endocrine and behavioral abnormalities following lesions of the suprachiasmatic nuclei in the female rat. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 198: 279-314.
- Ralph MR, Foster RG, Davis FC, Menaker M (1990) Transplanted suprachiasmatic nucleus determines circadian rhythms. *Science* 247: 975-978.
- Ratoosh SL, Lifka J, Hedin L, Jahsen T, Richards JS (1987) Hormonal regulation of the synthesis and mRNA content of the regulatory subunit of cyclic AMP-dependent protein kinase type II in cultured rat ovarian granulosa cells. *J Biol Chem* 262: 7306-7313.
- Reppert SM, Perlow MJ, Tamarkin L, Klein DC (1979) A diurnal melatonin rhythm in primate cerebrospinal fluid. *Endocrinology* 104: 295-301.
- Reppert SM, Weaver DR, Ebisawa T (1994) Cloning and characterization of a mammalian melatonin receptor that mediates reproductive and circadian responses. *Neuron* 13: 1177-1185.
- Reppert SM, Goson C, Mahle CD, Weaver DR, Slaugenhaupt SA, Gusella JF (1995) Molecular Characterization of a second melatonin receptor expressed in human retina and brain: the Mel<sub>1b</sub> melatonin receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 8734-8738.
- Reppert SM, Weaver DR, Godson C (1996) Melatonin receptors step into the light: cloning and classification of subtypes. *Trends Pharmacol Sci* 17: 100-102.
- Reppert SM, Weaver DR (2002) Coordination of circadian timing in mammals. *Nature* 418: 935-941.

- Ribelayga C, Pevet P, Simonneaux V (2000) HIOMT drives the photoperiodic changes in the amplitude of the melatonin peak of the Siberian hamster. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 278: R1339-R1345.
- Rittenhouse J, Marcus F (1983) Peptide mapping by polyacrylamide gel electrophoresis after cleavage at aspartyl-prolyl peptide bonds in sodium-dodecyl sulfate-containing buffers. *Anal Biochem* 138: 442-448.
- Rodriguez de Fonseca FR, Villanua MA, Munoz RM, San-Martin-Clark O, Navarro M. (1995) Differential effects of chronic treatment with either dopamine D1 or D2 receptor agonists on the acute neuroendocrine actions of the highly potent synthetic cannabinoid HU-210 in male rats. *Neuroendocrinology* 61: 714-721.
- Romijn HJ, Sluiter AA, Pool CW, Wortel J, Buijs RM (1997) Evidence from confocal fluorescence microscopy for a dense, reciprocal innervation between AVP-, somatostatin-VIP/PHI-, GRP- and VIP/PHI/GRP-immunoreactive neurons in the rat suprachiasmatic nucleus. *Eur J Neurosci* 9: 2613-2623.
- Roseboom PH, Weller JL, Babila T, Aitken A, Sellers LA, Moffett JR, Namboodiri MAA, Klein DC (1994) Cloning and characterization of the epsilon and zeta isoforms of the 14-3-3 proteins. *DNA Cell Biol* 13: 629-640.
- Roseboom PH, Klein DC (1995) Norepinephrine stimulation of pineal cyclic AMP response element-binding protein phosphorylation: primary role of a beta-adrenergic receptor/cyclic AMP mechanism. *Mol Pharmacol* 47: 439-449.
- Roseboom PH, Coon SL, Baler R, McCune SK, Weller JL, Klein DC (1996) Melatonin synthesis: analysis of the more than 150-fold nocturnal increase in serotonin N-acetyltransferase messenger ribonucleic acid in the rat pineal gland. *Endocrinology* 137: 3033-3045.
- Rueda S, Galve-Roperh I, Haro A, Guzman M (2000) The CB<sub>1</sub> cannabinoid receptor is coupled to the activation of c-Jun N-terminal kinase. *Mol Pharmacol* 58: 814-820.
- Sakagami H, Ebina K, Kondo H (1994) Localization of phosphatase inhibitor-1 mRNA in the developing and adult rat brain in comparison with that of protein phosphatase-1 mRNAs. *Mol Brain Res* 25: 7-18.
- Sanchez C, Galve-Roperh I, Rueda D, Guzman M (1998) Involvement of sphingomyelin hydrolysis and the mitogen-activated protein kinase cascade in the  $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol-induced stimulation of glucose metabolism in primary astrocytes. *Mol Pharmacol* 54: 834-843.
- Sawaki Y, Nihonmatsu I, Kawamura H (1984) Transplantation of the neonatal suprachiasmatic nuclei into rats with complete bilateral suprachiasmatic lesions. *Neurosci Res* 1: 67-72.

- Scharrer E (1964) Photo-neuro-endocrine systems: general concepts. *Ann NY Acad Sci* 117: 13-22.
- Schomerus C, Maronde E, Laedtke E, Korf HW (1996) Vasoactive intestinal peptide (VIP) and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) induce phosphorylation of the transcription factor CREB in subpopulations of rat pinealocytes: immunocytochemical and immunochemical evidence. *Cell Tissue Res* 286: 305-313.
- Schomerus C, Korf HW, Laedtke E, Weller JL, Klein DC (2000) Selective adrenergic/cyclic AMP-dependent switch-off of proteasomal proteolysis alone switches on neural signal transduction: an example from the pineal gland. *J Neurochem* 75: 2123-2132.
- Schomerus C, Laedtke E, Olcese J, Weller JI, Klein DC (2002) Signal transduction and regulation of melatonin synthesis in bovine pinealocytes: impact of adrenergic, peptidergic, and cholinergic stimuli. *Cell Tissue Res* 309: 417-428.
- Schwartz W, Gainer H (1977) Suprachiasmatic nucleus: use of [<sup>14</sup>C] deoxyglucose uptake as a functional marker. *Science* 197: 1089-1091.
- Schwartz W, Davidsen LC, Smith CB (1980) In vivo metabolic activity of a putative circadian oscillator, the rat suprachiasmatic nucleus. *J Comp Neurol* 189: 157-167
- Shibita S, Oomura Y, Kita H, Hattori K (1982) Circadian rhythmic changes of neuronal activity in the suprachiasmatic slice. *Brain Res* 247: 154-158.
- Shields JM, Pruitt K, McFall A, Shaub A, Der CJ (2000) Understanding ras: "it ain't over 'til it's over". *Trends Cell Biol* 10: 147-154.
- Snyder SH, Axelrod J, Wurtman RJ, Fischer E (1965) Control of 5-hydroxytryptophan decarboxylase activity in the rat pineal gland by sympathetic nerves. *J Pharmacol Exp Ther* 147: 371-375.
- Spessert R, Rapp M, Jastrow H, Karabul N, Blum F, Vollrath L (2000) A differential role of CREB phosphorylation in cAMP-inducible gene expression in the rat pineal. *Brain Res* 864: 270-280.
- Spessert R, Rapp M, Vollrath L (2001) Serine/Threonine phosphatase inhibitors decrease adrenergic arylalkylamine *N*-acetyltransferase induction in the rat pineal gland. *J Neuroendocrinol* 13: 581-587.
- Statham BC, Bartke A, Murphy, LL (1995) Evidence that cannabinoid receptors mediate the suppression of luteinizing hormone release by delta-9-tetrahydrocannabinol in ovariectomized rats. *Soc Neurosci Abstracts* 21: 726.
- Steger RW, DePaolo L, Asch RH, Silverman AY (1983) Interactions of  $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol (THC) with hypothalamic neurotransmitters controlling luteinizing hormone and prolactin release. *Neuroendocrinology* 37: 361-370.

- Stehle JH, Foulkes NS, Molina CA, Simmoneaux V, Pévet P, Sassone-Corsi P (1993) Adrenergic signals direct rhythmic expression of transcriptional repressor CREM in the pineal gland. *Nature* 365: 314-320.
- Stehle JH, von Gall C, Korf HW (2001) Analysis of cell signalling in the rodent pineal gland deciphers regulators of dynamic transcription in neural/endocrine cells. *Eur J Neurosci* 14: 1-9.
- Stein JC, Farooq M, Norton WT, Rubin CS (1987) Differential expression of isoforms of the regulatory subunit of type II cAMP-dependent protein kinase in rat neurons, astrocytes and oligodendrocytes. *J Biol Chem* 262: 3002-3006.
- Stephan FK, Zucker I (1972) Circadian rhythms in drinking behavior and locomotor activity of rats are eliminated by hypothalamic lesions. *Proc Natl Acad Sci USA* 69: 1583-1586.
- Sugden D, Klein DC (1983) Regulation of rat pineal hydroxyindole-O-methyltransferase in neonatal and adult rats. *J Neurochem* 40: 1647-1653.
- Sugiura T, Kodaka T, Nakane S, Miyashita T, Kondo S, Suhara Y, Takayama H, Waku K, Seki C, Baba N, et al. (1999) Evidence that the cannabinoid CB1 receptor is a 2-arachidonoylglycerol receptor: structure-activity relationship of 2-arachidonoylglycerol ether-linked analogues and related compounds. *J Biol Chem* 274: 2794-2801.
- Tamotsu S, Schomerus C, Stehle JH, Roseboom PH, Korf HW (1995) Norepinephrine-induced phosphorylation of the transcription factor CREB in isolated rat pinealocytes: an immunocytochemical study. *Cell Tissue Res* 282: 219-226.
- Tanaka M, Ichitani Y, Okamura H, Tanaka Y, Iyata Y (1993) The direct retinal projection to VIP neuronal elements in the rat SCN. *Brain Res Bull* 31: 637-640.
- Taylor SS, Knighton DR, Zheng J, Ten Eyck LF, Sowadski JM (1992) Structural framework for the protein kinase family. *Annu Rev Cell Biol* 8: 429-462.
- Toker A, Sellers LA, Amess B, Patel Y, Harris A, Aitken A (1992) Multiple isoforms of a protein kinase C inhibitor (KCIP-1/14-3-3) from sheep brain. Amino acid sequence of phosphorylated forms. *Eur J Biochem* 206: 453-461.
- Towbin H, Staehelin H, Gordon J (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamid gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA* 76: 4350-4354.
- Tson K, Brown S, Sanudo-Pena MC, Mackie K, Walker JM (1998) Immunohistochemical distribution of cannabinoid CB1 receptors in the rat central nervous system. *Neuroscience* 83: 393-411.
- Van den Pol AN, Powley T (1979) A fine-grained anatomical analysis of the role of the rat suprachiasmatic nucleus in circadian rhythms of drinking and feeding. *Brain Res* 160: 307-326.

- Van den Pol AN, Tsujimoto TJ (1985) Neurotransmitters of the hypothalamic suprachiasmatic nucleus: immunocytochemical analysis of 25 neuronal antigens. *Neurosci* 15: 1049-1086.
- Ventra C, Porcellini A, Feliciello A, Gallo A, Paollilo M, Mele E, Avvedimento VE, Schettini G (1996) The differential response of protein kinase A to cyclic AMP in discrete brain areas correlates with the abundance of regulatory subunit II. *J Neurochem* 66: 1752-1761.
- von Gall C, Lewy A, Schomerus C, Vivien-Roels B, Pevet P, Korf HW, Stehle JH (2000) Transcription factor dynamics and neuroendocrine signalling in the mouse pineal gland: a comparative analysis of melatonin-deficient C57BL mice and melatonin-proficient C3H mice. *Eur J Neurosci* 12: 964-972.
- Vossler MR, Yao H, York RD, Pan MG, Rim CS, Stork PJ (1997) cAMP activates MAP kinase and Elk-1 through a B-Raf- and Rap1-dependent pathway. *Cell* 89: 73-82.
- Wadzinski BE, Wheat WH, Jaspers S, Peruski LF Jr, Lickteig RL, Johnson GL, Klemm DJ (1993) Nuclear protein phosphatase 2A dephosphorylates protein kinase A-phosphorylated CREB and regulates CREB transcriptional stimulation. *Mol Cell Biol* 3: 2822-2834.
- Waksman Y, Olson JM, Carlisle SJ, Cabral GA (1999) The central cannabinoid receptor (CB1) mediates inhibition of nitric oxide production by rat microglial cells. *J Pharmacol Exp Ther* 288: 1357-1366.
- Wartman SA, Branch BJ, Taylor RG, Taylor AN (1969) Evidence for a cholinergic influence on pineal hydroxyindole O-methyl-transferase activity with changes in environmental lighting. *Life Sci* 8: 1263-1270.
- Wicht H, Maronde E, Olcese J, Korf HW (1999) A semiquantitative image-analytical method for the recording of dose-response curves in immunocytochemical preparations. *J Histochem Cytochem* 47: 411-419.
- Wilson RI, Nicoll RA (2002) Endocannabinoid signaling in the brain. *Science* 296: 678-682.
- Wurtman RJ, Axelrod J, Philips LS (1963) Melatonin synthesis in pineal gland: control by light. *Science* 142: 1071-1073.
- Wurtman RJ, Anton-Tay F, (1969) The mammalian pineal as a neuroendocrine transducer. *Recent Prog Horm Res* 25: 493-522.
- Xiao B, Smerdon SJ, Jones DH, Dodson GG, Soneji Y, Aitken A, Gamblin SJ (1995) Structure of a 14-3-3 protein and implications for coordination of multiple signaling pathways. *Nature* 376: 188-191.
- Yaffe MB (2000) How do 14-3-3 proteins work? Gatekeeper phosphorylation and the molecular anvil hypothesis. *FEBS Lett* 513: 53-57.

- Zannis-Hadjopoulos M, Novac O, Alvarez D, Price GB (2002) 14-3-3s are DNA-replication proteins. *Biochem Soc Trans* 30: 397-401.
- Zimmer A, Zimmer AM, Hohmann AG, Herkenham M, Bonner TI (1999) Increased mortality, hypoactivity and hypoalgesia in cannabinoid CB<sub>1</sub> receptor knockout mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 5780-5785.

## 8 Danksagung

Zu aller erst möchte ich mich ganz herzlich bei meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Horst-Werner Korf, Dr. Senckenbergische Anatomie der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt/M, für die Bereitstellung des Themas und des Arbeitsplatzes bedanken. Ebenso möchte ich ihm für seine umfassende Unterstützung, seine intensive Betreuung und für die ständige Diskussionsbereitschaft danken. Seine Ratschläge, Anregungen und Kommentare waren für die Vollendung dieser Arbeit unerlässlich.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Herbert Zimmermann, Zoologisches Institut der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt/M, für die Betreuung dieser Arbeit. Hervorheben möchte ich seine Verdienste als Sprecher des Graduiertenkollegs „Neuronale Plastizität: Moleküle, Strukturen, Funktionen“. Das Graduiertenkolleg ließ mich während der Promotionszeit immer wieder über den Tellerrand der eigenen Arbeit hinausblicken. Die angebotenen Vorlesungen, Seminare, Workshops und Exkursionen brachten mir neben zahlreichen Hilfestellungen und Anregungen für die eigene Promotionsarbeit ebenso wertvolle Einblicke in andere neurobiologische Themenbereiche. In diesem Zusammenhang muss Frau Dr. Barbara Wicht, Frau Dr. Gabi Lahner und Herrn PD Dr. Helmut Wicht für ihre aufopferungsvolle Organisation und Gestaltung des Graduiertenkollegs und für die vielen wertvollen Tipps und Ratschläge gedankt werden.

Bei Dr. Christof Schomerus und Dr. Famarz Dehghani möchte ich mich besonders für Ihre dauerhafte und geduldige Hilfsbereitschaft bedanken. Sie boten mir immer eine Anlaufstelle für die Lösung sämtlicher, nicht nur labor- und computertechnischer Fragen, an.

Den „drei“ Postdoktoranden Dr. Viviane Mauhin, Dr. Michael Kopp und meiner ehemaligen Zimmergenossin Dr. Claudia Heck möchte ich ganz herzlich für ihre tatkräftige und freundschaftliche Unterstützung sowie den vielen Spaß im und um das Labor danken. Sie haben mir bei der Bewältigung vieler Probleme maßgeblich geholfen und mir mit Rat und Tat ständig beiseite gestanden.

Meinem Kumpel „Jupp“ Johannes Hennings und Dr. Maria Deicke möchte ich für ihre Freundschaft danken.

Bei Doris Evers, Iris Habazettl, Gabi Stieß, Elke Lädtke und Shawn Leslie bedanke ich mich für ihre ständige Hilfsbereitschaft und die hervorragende Arbeitsatmosphäre. Das Arbeiten im Labor wurde durch sie maßgeblich erleichtert.

Bei „unserer“ Sekretärin Gisela Müller möchte ich mich für das stets offene Ohr und für die Hilfe bei der Bewältigung kleinerer und größerer Probleme bedanken.

Ganz herzlich möchte ich mich bei allen aktuellen und ehemaligen Mitarbeitern und Kollegen der Dr. Senckenbergischen Anatomie bedanken, die mich mit Rat und Tat während meiner Promotionszeit begleitet und unterstützt haben: Janine Arens, Chiara Fabris, Dr. Suzana Gispert-Sanchez, Antje Jilg, Dr. Magdalena Karolczak, Dr. Gertrud Klauer, PD Dr. Erik Maronde, Georg Matjasko, Käthe Neumann, Prof. Dr. Frank Nürnberger, Dr. Gabi Oleschko, Dr. Martina Pfeffer, Li Pham, Marc Revermann, Manfred Sachs, Ingrid Schneider-Hüther, Manfred Schraml, Prof. Dr. Jörg Stehle, Claudia Torres-Farfan, Dr. Charlotte von Gall, Dr. Qiang Zhang.

## **Lebenslauf**

Marco Koch, geboren am 17. Dezember 1975 in Essen

### **Schulbildung**

1982-1986                      Grundschule in Essen-Gerschede  
1986-1995                      Gymnasium in Essen-Borbeck  
Abschluss: Abitur

### **Studium und Promotion**

1995-2000                      Studium der Biologie an der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt/M mit dem Hauptfach Zoologie und den Nebenfächern Mikrobiologie und Toxikologie

Jan. – Aug. 2000              Anfertigung der Diplomarbeit „Zelluläre Expression getagter Ecto-Nucleotidasen“ unter der Betreuung von Prof. Dr. H. Zimmermann am Zoologischen Institut der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt/M  
Abschluss: Diplom

Okt. 2000 – Sep. 2003      Stipendiat des Graduiertenkollegs „Neuronale Plastizität: Moleküle, Strukturen, Funktionen“ im Rahmen des Sonderforschungsbereich (SFB) 269 „Molekulare und zelluläre Grundlagen neuronaler Prozesse“. Anfertigung der Doktorarbeit „Zelluläre und molekulare Regulationsmechanismen der Melatoninbiosynthese“ unter der Anleitung von Prof. Dr. H.-W. Korf am Anatomischen Institut II, Dr. Senckenbergische Anatomie der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt/M

## **Fördermittel**

Dr. Paul und Cilli Weill-Stiftung: 12.000€ für das Forschungsvorhaben „Funktionelle Untersuchungen zur molekularen und zellulären Wirkungsweise von Cannabinoiden im Modellsystem Pinealorgan“.

## **Veröffentlichungen**

### *Originalarbeiten*

Koch M, Mauhin V, Stehle JH, Schomerus C, Korf HW (2003) Neurotransmitter-driven inactivation of gene transcription in rat pineal gland involves dephosphorylation of pCREB by protein serine/threonine phosphatases. J Neurochem 85: 170-179

Koch M, Korf HW (2002) Distribution of regulatory subunits of protein kinase A and A kinase anchor proteins (AKAP 95, 150) in rat pinealocytes. Cell Tissue Res 310: 331-338

Vollmayer P\*, Koch M\*, Braun N, Heine P, Servos J, Israr E, Kegel B, Zimmermann H (2001) Multiple ecto-nucleotidases in PC12 cells: identification and cellular distribution after heterologous expression. J Neurochem 78: 1019-1028.

### *Tagungsbeiträge*

Koch M, Dehghani F, Habazettl I, Schomerus C, Korf HW (2003) Functional investigations on molecular and cellular mechanism of the cannabinoid system in the rat pineal gland. Ann Anat (Suppl) 186, in press.

Koch M, Schomerus C, Korf HW (2002) Serine/Threonine-phosphoprotein phosphatases influence the amount of pCREB and are involved in the regulation of melatonin biosynthesis in rat pinealocytes. Ann Anat (Suppl) 184, pp 25.

*Poster*

Pham L, Koch M, Korf HW, Schomerus C (2003) Tryptophan-Hydroxylase und Hydroxyindol-O-methyltransferase: funktionelle und immunhistochemische Untersuchungen zu Enzymen der Melatonin-Biosynthese in Pinealocyten des Rindes. Ann Anat (Suppl) 186, in press.

Koch M, Korf HW (2002) Immunocytochemical and immunochemical demonstration of A kinase anchor proteins in rat pinealocytes. Ann Anat (Suppl) 184, pp 93.