

Aus dem Zentrum der Morphologie (Dr. Senckenbergische Anatomie) des Klinikums
der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main

Institut für Anatomie III (Zelluläre und molekulare Anatomie)

Direktor: Prof. Dr. rer. nat. J. H. Stehle

**UNTERSUCHUNG ZUR DIURNALEN UND PHOTOPERIODISCHEN
FLUKTUATION DES ICER-PROTEINSPIEGELS IM PINEALORGAN
DES SYRISCHEN HAMSTERS**

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Zahnmedizin des Fachbereichs Medizin der
Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main

vorgelegt von

Yuri Carsten Glass
aus Valencia

Frankfurt am Main 2008

Dekan: Prof. Dr. J. M. Pfeilschifter

Referent: Prof. Dr. J. H. Stehle

Koreferent: Prof. Dr. Dr. G. Kauert

Tag der mündlichen Prüfung: 14.10.2008

Für meinen Sohn Noah und meine Frau Bettina
und für meine Eltern Elisabeth und Burckhard

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	1
1.1	Biologische Rhythmen	1
1.2	Das photoneuroendokrine System	2
1.3	Die Melatoninsynthese im Pinealorgan	4
1.4	Die cAMP-Signaltransduktionskaskade	8
1.5	Melatoninsynthese beim Säugetier	9
1.6	Profil der Melatoninsynthese beim Syrischen Hamster	10
1.7	Bedeutung der Melatoninsynthese für den Syrischen Hamster	11
1.8	Nichtinduzierbarkeit der Melatoninsynthese beim syrischen Hamster	13
1.9	Transkriptionsfaktoren im Pinealorgan	14
2	ZIELSETZUNG DER UNTERSUCHUNG	18
3	MATERIAL UND METHODE	19
3.1	Chemikalien	19
3.2	Versuchstiere und Haltungsbedingungen	19
3.3	Manipulation der Versuchstiere	20
3.4	Immunzytochemische Methode	22
3.5	Semiquantitative und densitometrische Auswertung der immunzytochemischen Färbung	24
3.6	Quantifizierung der ICER-Expression	25
3.7	Statistische Auswertung	25
4	ERGEBNISSE	26
4.1	ICER-Proteinexpression in der Langtag-Gruppe	26
4.2	ICER-Proteinexpression in der Kurztag-Gruppe	30
4.3	Vergleich der ICER-Expression in der Langtag- und Kurztag-Gruppe	34
5	DISKUSSION	37
6	ZUSAMMENFASSUNG	40
7	ABSTRACT	42
8	LITERATURVERZEICHNIS	44
9	DANKSAGUNG	53
10	VERÖFFENTLICHUNGEN	54
11	EHRENWÖRTLICHE ERKLÄRUNG	55
12	LEBENS LAUF	56

1 EINLEITUNG

1.1 Biologische Rhythmen

Jeder Organismus weist endogene biologische Rhythmen auf, wobei der in Zellen, Geweben, oder ganzen Organismen zu findende 24-Stunden-Rhythmus das herausragende Beispiel dafür ist. Letzteres wird grundlegend durch den tages- bzw. jahreszeitlich bedingten Wechsel der Beleuchtungsverhältnisse beeinflusst. Die Anpassung der Stoffwechselprozesse und Verhaltensweisen an diese Oszillationen erfolgt nicht passiv, sondern wird durch eine innere Uhr gesteuert (Pittendrigh 1981). Die Engrammierung und Antizipation der Phasenlage und Periodenlänge von Licht und Dunkelheit durch eine innere Uhr ermöglicht eine optimale zeitliche Organisation der Lebewesen in ihrer Umwelt. Ein Beispiel dafür ist der morgendliche Anstieg der Herzfrequenz und des Blutdruckes beim Erwachen, wodurch der Körper auf eine erhöhte Leistung während der Aktivitätsphase vorbereitet wird.

Selbst ohne äußerer, periodisch ablaufender Umgebungssignale kann der Körper diese tageszeitlichen Rhythmen beibehalten. Ihre Periodenlänge weicht auch ohne eine Synchronisation an die externe Tageszeit (d.h. im Freilauf) nur geringfügig von 24 Stunden ab und man spricht deshalb von zirkadianen (ungefähr eine Tageslänge dauernde) Rhythmen (Pittendrigh 1960). Eine wichtige Eigenschaft für die Exaktheit einer biologischen Uhr ist, dass ihr innerer, genetisch bedingter Rhythmus durch externe Zeigeber verstellt werden kann. Licht ist dabei der wichtigste exogene Faktor für die Synchronisation des endogenen Oszillators mit den aktuellen Beleuchtungsverhältnissen. Daher sind endogene Schrittmacher stets lichtempfindlich oder zumindest eng an das Lichtsystem gekoppelt.

Der rhythmische Ablauf von Tag und Nacht haben das Leben auf der Erde von Anbeginn geprägt. Darum stellen lichtsensitive Organe einen selektiven Vorteil für die meisten Spezies dar. Licht transportiert zwei Formen von Information, welche für das Überleben von großer Bedeutung sind:

- die dreidimensionale Form, die Farbe und die Bewegung der erfassten Objekte

- das zeitliche Signal, welches Tag und Nacht unterscheidet und ihre relative Dauer

Der Vorteil der Lichtwahrnehmung wurde durch die Entwicklung eines endogenen zirkadianen Oszillators verbessert, welches den Organismus dazu befähigt, die Dämmerung und das Morgengrauen, Essenszeit und die Schlafzeit zu antizipieren. Durch diesen selektiven Druck haben sich zwei visuelle Systeme im *Diencephalon* im Laufe der Vertebratenevolution zur Verarbeitung der Lichtinformation entwickelt:

- die seitlichen Augen, welche Abbilder von Objekten erzeugen
- und die Epiphyse, welche die Abfolge von Licht und Dunkelheit als neuronaler Effektor in ein hormonelles Signal umsetzt.

Bei Wirbeltieren wird der Regelkreis, der den photischen Eingang in die innere Uhr, den endogenen Oszillator selbst und den neuroendokrinen Effektoren beinhaltet, zum photoneuroendokrinen System (PNS) zusammengefasst (zur Übersicht siehe Korf 1994). Im PNS wird letztlich ein photischer Reiz in ein neuroendokrines Signal umgewandelt.

1.2 Das photoneuroendokrine System

Bei Vertebraten führt also das PNS zu einer Umsetzung von Zeitinformation in ein Phasen-kodiertes hormonelles Signal, nämlich in die nächtlich erhöhte Synthese von Melatonin im Pinealorgan (Korf 1994; Korf et al., 1998; Oksche et al., 1987). Diese Dynamik der Melatoninsynthese wurde bis jetzt in allen Wirbeltierklassen gefunden und wurde während ihrer Entwicklung beibehalten, unabhängig davon, ob das Tier tag- oder nachtaktive ist. Das Hormon Melatonin kodiert somit die Länge der Dunkelphase (Korf et al., 1998).

Im Gegensatz zu Amphibien, Reptilien und Vögeln, bei denen die melatoninproduzierenden Zellen des Pinealorgans noch direkt lichtempfindlich sind, erhält das Pinealorgan bei den Säugetieren die Lichtinformation über einen komplexen neuronalen Schaltkreis (Korf 1994, 1998; Oksche et al., 1987). In

der Entwicklungsgeschichte der Säugetiere haben sich überlappende Fähigkeiten der spezialisierten Zellen in den seitlichen Augen und im Pinealorgan (z.B. zur Lichtwahrnehmung, Oszillation und humoralen Lichtkodierung) nicht durchgesetzt und es erfolgte eine Aufteilung der Aufgaben der Lichtverarbeitung.

Das PNS der Säugetiere kann folgendermaßen zusammengefasst werden: die Retina empfängt die Lichtinformation aus der Umgebung und wandelt diese in ein neuronales Signal um. Dieses Signal wird über den retinohypothalamischen Trakt zum *Nucleus suprachiasmaticus* (SCN) weitergeleitet (siehe Abbildung 1; Moore und Lenn, 1972).

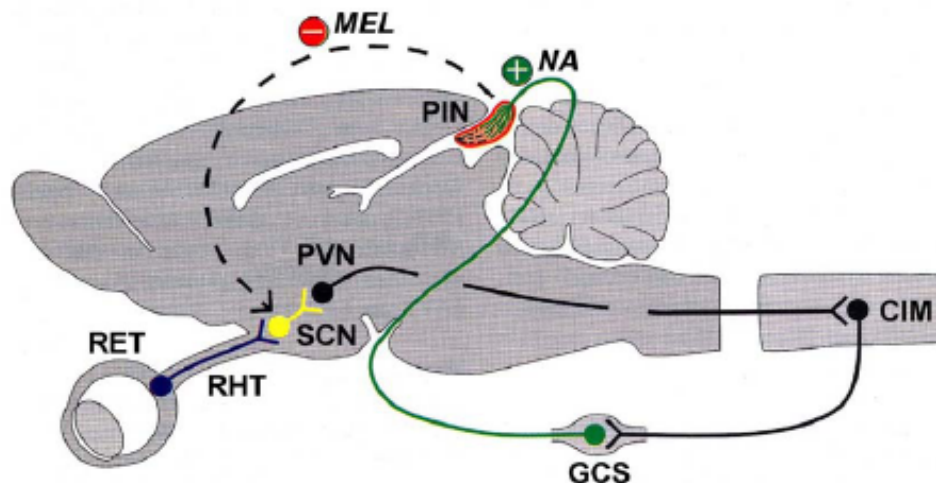


Abbildung 1: Das photoneuroendokrine System der Ratte. Lichtreize werden von der Retina (RET) aufgenommen und über den retinohypothalamischen Trakt (RHT) zum *Nucleus suprachiasmaticus* (SCN), dem Sitz des endogenen Oszillators, übertragen. Efferente Nervenfasern des SCN erreichen den *Nucleus paraventricularis* (PVN) des Hypothalamus, der seinerseits zur *Columna intermediolateralis* (CIM) des thorakalen Abschnitts des Rückenmarks projiziert. Von der CIM ziehen präganglionäre sympathische Nervenfasern zum *Ganglion cervicale superius* (SCG). Postganglionäre Nervenfasern des SCG ziehen zum Pinealorgan (PIN) und setzen dort den Neurotransmitter Noradrenalin (NA) frei. Die rhythmische NA-Freisetzung aktiviert im Pinealorgan die Melatoninsynthese. Das Hormon Melatonin (MEL) kann über die Bindung an Melatoninrezeptoren im SCN die Phasenlage der inneren Uhr beeinflussen und ist somit an der Bildung einer Rückkoppelungsschleife im photoneuroendokrinen System beteiligt. Modifiziert nach Korf (1996), Stehle und Korf (1996) und Korf et al. (1996, 1998).

Durch Läsions- und Retransplantationsexperimente konnte gezeigt werden, dass der SCN als endogene biologische Uhr agiert (Moore und Eichler 1972; Ralph et al., 1990; Stephan und Zucker 1972). Zirkadiane Rhythmen wurden auch in hypothalamischen Schnittpräparaten beschrieben, wodurch belegt werden konnte, dass der SCN tatsächlich ein autonomer Oszillator ist (Green und Gillette 1982; Shibata et al., 1982). Licht ist das biologisch relevante Signal, dass die Periodenlänge der inneren Uhr im SCN beeinflussen kann (Moore und Lenn 1972; Moore et al., 1973). Demzufolge dient die retinohypothalamische Bahn der Synchronisation des endogenen (zirkadianen) Rhythmus mit den aktuellen Beleuchtungsverhältnissen. Die Signale aus dem SCN werden über einen multisynaptischen Weg zum *Ganglion cervicale superius* (SCG) weitergeleitet. Aus dem SCG ziehen sympathische, postganglionäre Nervenfasern zum Pinealorgan (Epiphyse, Zirbeldrüse), um dort rhythmisch den Neurotransmitter Noradrenalin (NA) abzugeben (Klein et al., 1985; Driifhout et al., 1996). Die während der Nacht erhöhte Ausschüttung von NA führt im Pinealorgan zur einer erhöhten Synthese von Melatonin. Melatonin wiederum kann über die Bindung an Melatoninrezeptoren im SCN die Aktivität des endogenen Oszillators beeinflussen und ist somit an der Bildung einer Rückkopplungsschleife im photoneuroendokrinen System beteiligt (Cassone et al., 1987, 1988; Shibata et al., 1989; Stehle et al., 1989).

1.3 Die Melatoninsynthese im Pinealorgan

Das Pinealorgan der Vertebraten stellt den Effektor des photoneuroendokrinen Systems dar, der das Hormon Melatonin rhythmisch mit erhöhten Werten während der Dunkelphase synthetisiert (Klein 1985). Die Dauer der Melatoninsynthese unterliegt in Abhängigkeit von der Länge der Dunkelperiode jahreszeitlichen Schwankungen (Reiter 1991). Die saisonalen Veränderungen der Beleuchtungsverhältnisse können über Melatonin die sich verändernde Länge der Dunkelphase kodieren. Seine Effekte übt das Hormon mit großer Wahrscheinlichkeit über hochaffine Melatoninrezeptoren aus, die bei Säugtieren im SCN und in der hypophysären *Pars tuberalis* (PT), aber auch in peripheren Geweben gefunden werden konnten (Dubocovich 1995; Morgan et al., 1994; Vanecek et al., 1987; Vanecek 1988; Weaver et al., 1991, 1993).

Melatonin hat eine Reihe von Wirkungen: so kann eine Melatoninapplikation beim Menschen Schläfrigkeit induzieren (Vollrath et al., 1980), Melatonin kann zur Resynchronisierung des endogenen Oszillator bei blinden Menschen, nach Perturbationen als Folge eines raschen Ortswechsels über Zeitzonen hinweg, oder bei Schichtarbeit therapeutisch eingesetzt werden. Die Phasenlage der Aktivität des SCN kann demnach nicht nur durch Licht, sondern auch durch Melatonin feinjustiert werden (Cassone et al., 1987; Redmann et al., 1983; Stehle et al., 1989). In der pränatalen und frühen postnatalen Phase ist der Einfluß von Melatonin auf die Aktivität des SCN von besonderer Bedeutung: da zu diesem Zeitpunkt die retinohypothalamischen Verbindungen noch nicht etabliert sind (Klein et al., 1991). Das mütterliche Melatonin wirkt pränatal über die Zirkulation und postnatal über die Muttermilch auf die Phasenlage der Aktivität des kindlichen SCN (Weaver und Reppert, 1989).

Ein weiterer bedeutender Effekt von Melatonin ist die Vermittlung der Jahreszeiten auf die Aktivität der hypothalamisch-hypophysären-gonadalen Achse (Reiter 1991). Der Wirkungsort für Melatonin ist dabei wahrscheinlich die hypophysäre PT, da dort in allen bisher untersuchten Spezies eine sehr hohe Dichte von Melatoninrezeptoren gefunden wurde (Morgan et al., 1994; Weaver et al., 1991, 1993). Melatonin soll dort auf die Freisetzung gonadotroper Hormone Einfluss nehmen (Morgan et al., 1996; Nakazawa et al., 1991). Die Melatoninbiosynthese im Pinealorgan beginnt mit der Aufnahme von Tryptophan aus der Blutbahn, das von der Tryptophanhydroxylase zu 5-Hydroxytryptophan hydroxyliert wird (Lovenberg et al., 1967). Danach wird das 5-Hydroxytryptophan durch eine Decarboxylase in Serotonin umgeformt (siehe Abbildung 2) (Snyder et al., 1965). Serotonin wird von der Arylalkylamin *N*-Acetyl-transferase (AANAT) in *N*-Acetylserotonin umgesetzt (Weissbach et al., 1960), das im letzten Schritt von der Hydroxyindol-O-Methyltransferase (HIOMT) in Melatonin umgewandelt wird (Axelrod und Weissbach, 1960).

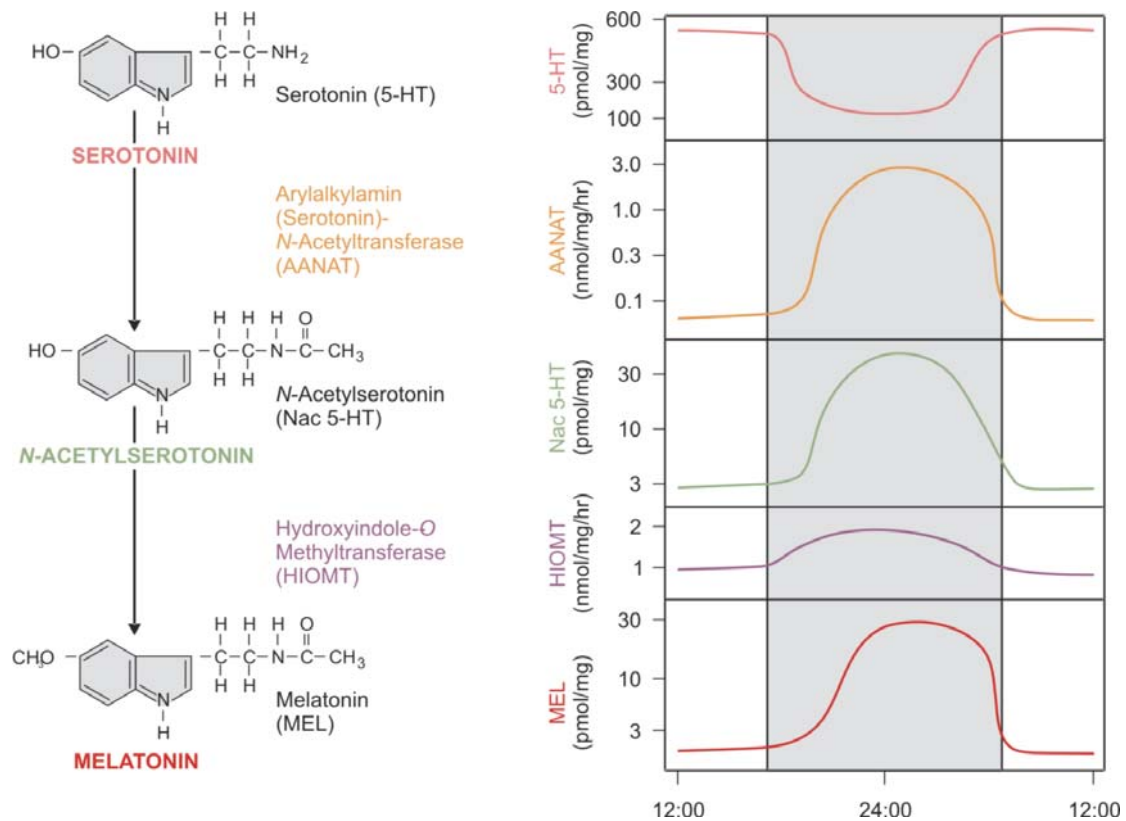


Abbildung 2: Links sind die einzelnen Syntheseschritte der Melatoninbiosynthese, ausgehend von Serotonin, dargestellt. Rechts sind die diurnalen Schwankungen der Enzymaktivitäten von AANAT und HIOMT sowie der Substratkonzentration von Serotonin und N-Acetylserotonin, und von Melatonin im Pinealorgan der Ratte aufgezeigt (modifiziert nach Klein 1985).

Das neugebildete, lipophile Melatonin wird ohne Speicherung direkt in die Blutbahn abgegeben. Somit wird die Rate der Hormonabgabe durch die Neusynthese von Melatonin bestimmt. Die rhythmische Melatoninsynthese basiert in allen untersuchten Wirbeltieren auf dem nächtlichen Anstieg der Aktivität des geschwindigkeitsbestimmenden Enzyms der Melatoninsynthese, der (AANAT) (Klein und Weller, 1970). Für die Regulation der AANAT-Enzymaktivität werden in der Ratte hauptsächlich transkriptionelle Mechanismen verantwortlich gemacht: der Anstieg und der zeitliche Verlauf der AANAT-mRNA, der Proteinmenge und der Enzymaktivität korrelieren eng miteinander (Borjigin et al., 1995; Roseboom et al., 1996). Die Menge der AANAT-mRNA, ebenso wie die Aktivität dieses Enzyms, ist im Rattenpinealorgan während des Tages niedrig und steigt um das 150-fache während der Nacht an (Borjigin et al., 1995; Roseboom et al., 1996).

In vivo und *in vitro* steigt die AANAT-mRNA Menge in Rattenpinealorgan in-

nerhalb von 1 h nach einer NA-Stimulation an (Borjigin et al., 1995; Roseboom et al., 1996). NA wird in synaptischen Vesikeln in den sympathischen Nervenendigungen gespeichert und freigesetzt (Drijfhout et al., 1996). Es wirkt stimulierend auf die AANAT über den β -adrenergen Rezeptor und die Aktivierung des cAMP-Signaltransduktionsmechanismus (Klein et al., 1997). Die Auslösung der Transkription wird durch eine cAMP-abhängige Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors CREB (cyclic-AMP response element binding protein) durch die katalytische Untereinheit der Proteinkinase A eingeleitet (Maronde et al., 1999; Roseboom et al., 1995). Phospho-CREB stimuliert dann die Transkription des cAMP-induzierbaren Gens der AANAT (Roseboom und Klein 1995; Stehle et al., 2002).

Der inhibitorische Transkriptionsfaktor ICER (inducible cAMP early repressor) ist in der Abschaltung der erhöhten Melatonin synthese am Ende der Nacht involviert (Maronde et al., 1995; Pfeffer et al., 2000; Stehle et al., 1993). Die Aktivität von ICER wird ausschließlich durch seine vorhandene Menge bestimmt, da diesem die randständige Phosphorylierungsdomäne fehlt. Die Transkription von ICER erfolgt ebenfalls durch die NA-induzierte Aktivierung der cAMP-Signalkaskade und wird auch durch die PKA II vermittelt. Der ICER-Proteinspiegel steigt nach dem Absinken des phospho-CREB-Spiegels und als Konsequenz einer höheren Menge von ICER hemmt es die cAMP-induzierbare Gen-Transkription. (siehe Abbildung 3)

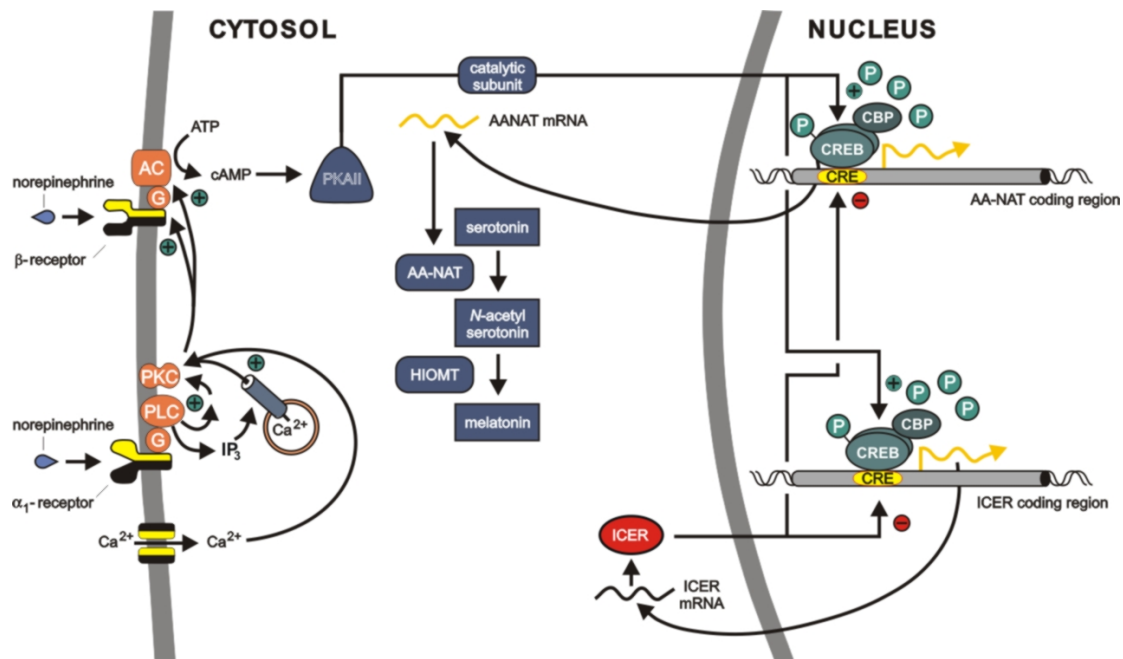


Abbildung 3: Konzept der Rolle von Transkriptionsfaktoren bei der Signalübertragung im Pinealorgan der Ratte. Die Stimulation durch den Neurotransmitter NA erhöht die intrazelluläre cAMP-Konzentration im Pinealorgan und führt zur Aktivierung der Proteinkinase A (PKA). Die PKA phosphoryliert den Transkriptionsfaktor CREB an der Aminosäure Serin in Position 133. pCREB induziert die Transkription von Genen, die ein CRE-Element in der Promotorstruktur besitzen. Im Promotor des Transkriptionsfaktors ICER-, des AANAT- und des β_1 -ADR-Gens konnten CREs gefunden werden. ICER kann pCREB entweder von CRE-Elementen verdrängen oder durch Heterodimerisierung inaktivieren. Dies führt dann zur Hemmung der Transkription von cAMP-sensitiven Genen. Abkürzungen: AANAT, Arylalkylamin *N*-Acetyltransferase; β_1 -ADR, β_1 -adrenerger Rezeptor; CRE, *cAMP responsive element*; CREB, *cAMP responsive element binding protein*; ICER; *inducible cAMP early repressor*; pCREB, phosphoryliertes CREB (modifiziert nach Stehle und Korf, 1996).

1.4 Die cAMP-Signaltransduktionskaskade

cAMP ist im Zentralnervensystem ein verbreiteter zweiter Botenstoff, der Veränderungen der Genexpression vermitteln kann (Armstrong und Montminy, 1993; Murdock et al., 1982). Alle bekannten Effekte von cAMP werden über die katalytische Aktivität der cAMP-abhängigen PKA reguliert. Dieses Enzym besteht aus katalytischen und regulatorischen Untereinheiten, die sich nach der cAMP-Erhöhung trennen. Die katalytischen Untereinheiten können im Zytoplasma konstitutiv exprimierte Proteine phosphorylieren, oder nach Verlagerung in den Zellkern die Genexpression beeinflussen. Dort phosphorylieren

sie Transkriptionsfaktoren und verändern damit deren Bindungsaffinität zu cAMP-sensitiven Elementen (CREs) in der Promotorstruktur von cAMP-sensitiven Genen (Hunter und Karin, 1992; Hagiwara et al., 1993).

Im Pinealorgan der Ratte ist die Stimulation des cAMP-Signaltransduktionsweges für die rhythmische Melatoninsynthese von entscheidender Bedeutung, da sie zur Induktion, Aufrechterhaltung und Beendigung der AANAT-Enzymaktivität führt (Borjigin et al., 1995; Gastel et al., 1998; Klein 1985; Roseboom et al., 1996; Stehle et al., 1993). Die nächtliche Freisetzung von NA stimuliert α_1 - und β_1 -adrenergen Rezeptoren in der Pinealozytenmembran. Die Stimulation des membranständigen β_1 -adrenergen Rezeptors (β_1 -ADR) aktiviert die Adenylatzyklase, was zur intrazellulären Erhöhung der cAMP-Konzentration führt (Vanecek et al., 1985). *In vitro* kann der β_1 -adrenerge Effekt auf die cAMP-Akkumulation durch die gleichzeitige Stimulation des α_1 -adrenergen Rezeptorsubtyps potenziert werden (Vanecek et al., 1985). Dieses wird durch den Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration und der nachfolgenden Aktivierung der phospholipidabhängigen Proteinkinase C (PKC) erreicht (Sugden et al., 1985). Eine alleinige Stimulation des α_1 -adrenergen Rezeptors ist allerdings nicht in der Lage die cAMP-Akkumulation und damit die Melatoninsynthese zu induzieren.

1.5 Melatoninsynthese beim Säugetier

Die rhythmische Melatoninsynthese ist durchweg in der gesamten Entwicklung der Vertebraten erhalten geblieben. Jedoch ist in Pinealozyten bei Säugetieren durch Veränderungen der neuronalen Progenitor-Zellenabstammung die Fähigkeit einen autonomen zirkadianen Rhythmus zu generieren verloren gegangen (Ekström 2003).

Die zirkadiane Master Uhr befindet sich im SCN (Hastings et al., 2003; Reppert, 2002). Die Beleuchtungsverhältnisse der Umgebung prägen über die retinohypothalamische Bahn die SCN Uhr. Pinealozyten des Säugers funktionieren einzig als SCN-gesteuerter neuroendokriner Signalgeber, welcher die neuronale Lichtinformation der Dunkelheit hormonell kodiert (Kalsbeek et al., 2006; Korf et al., 1998; Maronde et al., 1999; Simonneaux et al., 2003; Stehle

et al., 2001). Ungeachtet der morphologischen Spezialisierung der Pinealozyten des Säugers mit der Gehirnentwicklung, ist der nächtliche Anstieg der Melatoninbiosynthese erhalten geblieben. Bei allen Vertebraten sind für die Melatoninsynthese die gleichen Schritte und Enzyme notwendig (s. Kapitel 1.3). Bemerkenswert ist, dass bei allen bisher untersuchten Säugetieren die Melatoninbiosynthese im Pinealorgan während der Nacht erhöht ist und tagsüber fast nicht nachweisbar ist (Klein 1985; Korf et al., 1998; Weaver 1999).

Veränderungen der Lichtperiode führen zu einer Anpassung der Melatoninsynthese und informieren den Körper durch Länge und Amplitude der Hormonausschüttung über die Dauer der Dunkelheit (Illnerova and Sumova 1997). In niederen Vertebraten wird diese Anpassung durch im Pinealorgan stattfindende, intrinsische Signalkaskaden gewährleistet (Korf et al., 1998), in Säugetieren erfolgt diese durch ein photoperiodisches Gedächtnis, welches sich während der Phylogenese aus dem Pinealorgan in den SCN verlagert hat.

1.6 Profil der Melatoninsynthese beim Syrischen Hamster (*Mesocricetus auratus*)

Der Syrische Hamster weist ein photoperiodisches Verhalten auf. Kurze Tage führen in diesem saisonalen Säuger zur Unterdrückung des Reproduktionsverhalten und der Gonadenfunktion (Gauer et al., 1994; Honrado et al., 1991), zu einer Zunahme des Fellwachstums, sowie der Felldichte (Paul et al., 2007) und leiten den Winterschlaf ein (Masson-Pevet et al., 1994). Daher eignet sich diese Spezies zur Untersuchung der saisonalen Regulation der physiologischen Funktionen und hierbei insbesondere der Reproduktion.

Der Melatoningehalt im Pinealorgan des Syrischen Hamsters zeigt einen eindeutigen Tag-/Nacht-Rhythmus auf, mit einem Maximum in der späten Phase der Nacht (Tamarkin et al., 1979). Verschiedene Versuche haben gezeigt, daß die nächtliche Melatoninsynthese im Syrischen Hamster durch NA stimuliert wird (Pangerl et al., 1990; Reiter et al., 1991; Steinlechner et al., 1984). Verabreichung von β -adrenergen Antagonisten oder die Lichtexposition während der Nacht hemmen die AANAT-Aktivität und somit die Melatonin-

synthese (Lipton et al., 1981; Steinlechner et al., 1985; Vanecek et al., 1982). Zusätzlich zeigen die Synthese und die Menge an NA und Dopamin tageszeitlich abhängige Schwankungen auf, mit einem Maximum während der Nacht (Craft et al., 1984; Miguez et al., 1995).

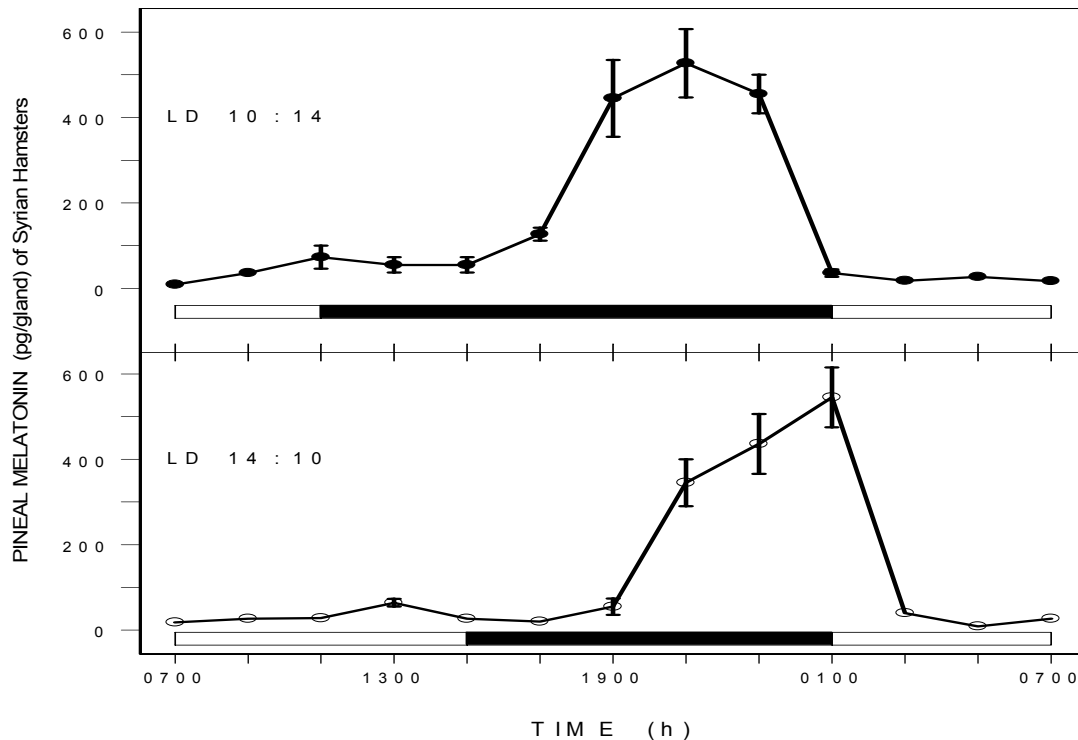


Abbildung 4: Menge an Melatonin im Pinealorgan Syrischer Hamster unter Kurztage- (LD 10:14) und Langtage- (LD 14:10) Bedingungen (Tamarkin et al., 1979).

1.7 Bedeutung der Melatoninsynthese für den Syrischen Hamster

Es konnte gezeigt werden, daß beim Syrischen Hamster, ähnlich wie bei Ratte und Maus, die Melatoninkonzentration im Pinealorgan als auch im Blut während der Nacht bei einem Tag-/Nacht Zyklus zunimmt (Panke et al., 1979; Rollag et al., 1979, 1980; Tamarkin et al., 1979;). In Säugetieren persistiert der Rhythmus der Melatoninausschüttung, wenn das Tier unter konstanter Dunkelheit gehalten wird, wird aber durch eine akute Lichtexposition unterdrückt (Klein 1979). Für den Syrischen Hamster spielt Melatonin unter anderem bei der Hemmung der hypothalamo-hypophysären-gonadalen Achse eine Rolle. Ein Tag-/Nacht-Zyklus mit weniger als 12,5 h Licht führt beim Syrischen Hamster durch das verlängerte nächtliche Melatoninsignal zu einer Unterdrü-

ckung der gonadalen Funktion, was sich beim Männchen mit einer 80% Gewichtsabnahme der Gonaden, der Einstellung der Spermatogenese und einem verringerten Testosteronspiegel im Serum manifestiert (Berndtson et al., 1974; Gaston et al., 1967; Hoffman et al., 1965). Nach 28 Wochen Kurztag Photoperiode kommt es zu einer spontanen Reaktivierung der Gonadenfunktion. Die so genannte Photorefrakterität ist gekennzeichnet durch eine Zunahme des Gonadotropin Plasmaspiegels auf Normalwerte, gefolgt von der Wiederaufnahme der Spermatogenese und der Einstellung des Normalgewichtes der Gonaden (Matt 1979; Nelson et al., 1987; Stetson et al., 1981). Durchtrennt man die postganglionären sympathische Fasern, die zur Epiphyse führen oder entfernt das Pinealorgan des Hamsters, so kann kein Einfluss mehr durch unterschiedliche Photoperioden auf die gonadale Funktion ausgeübt werden (Reiter et al., 1966). Da Licht die Aktivität der Epiphyse unterdrückt, führt die Unterbrechung der hypothalamo-hypophysären-gonadalen Achse zu einer Hemmung der Reproduktivität. Dieser relativ einfach durchzuführende chirurgische Eingriff zeigt deutlich den Einfluß des Pinealorgans, der durch den Licht/Dunkelheits-Zyklus, auf die Gonaden des syrischen Hamsters diktiert wird. Die Dauer der nächtlichen Melatoninsynthese ist direkt proportional zur Länge der Dunkelperiode und stellt durch den tageszeitliche abhängigen Rhythmus für den syrischen Hamster somit einen endokrinen Kode dar, welcher die photische Information verschlüsselt enthält. Dies sichert den optimalen Zeitpunkt z.B. für die saisonalen Reproduktion, den Winterschlaf, Migration oder dem täglichen Schlaf.

1.8 Nichtinduzierbarkeit der Melatoninsynthese beim syrischen Hamster

Anders als bei der Ratte kommt es beim Syrischen Hamster, nach Aktivierung der β -adrenergen Rezeptoren während des Tages, zu keinem Anstieg der Melatoninkonzentration im Pinealorgan (Abb.5) (Lipton 1982; Steinlechner 1984, 1985). Für die fehlende Induzierbarkeit der Melatoninsynthese während des Tages beim syrischen Hamster gibt es unterschiedliche Hypothesen. Eine Erklärung ist ein Abfall der Sensitivität der Adrenorezeptoren während des Tages. Dagegen spricht die Tatsache, daß α - als auch β -adrenerge Bindungsstellen eine Tag/Nacht-Schwankung aufweisen, mit maximalen Werten während des Tages (Pangerl et al., 1990).

Die Verabreichung von α - und β -adrenergen Antagonisten während der Nacht führen zu einer Abnahme an AANAT m-RNA und des Melatoningehaltes (Garidou et al., 2003). Dies bedeutet ein synergistisches Wirken von NA über α - als auch β -adrenerge Rezeptoren welche die Transkription des AANAT-Gens und der Melatoninsynthese stimulieren (Garidou et al., 2003). Die Hypothese, dass beim syrischen Hamster ein stimulierender proteinähnlicher Faktor die AANAT-Genexpression induziert, konnte durch die Verabreichung eines Proteinsynthese-Inhibitors während der frühen Dunkelphase, bestätigt werden (Garidou et al., 2003). Hierbei kommt es zur deutlichen Abnahme der AANAT-mRNA. Wird der Proteinsynthese-Inhibitor in der späten Dunkelphase und anschließend ein adrenerger Agonist dem syrischen Hamster zugeführt, so kommt es zu einem Anstieg der AANAT-mRNA Werte, die vergleichbar sind mit dem während der Nacht beobachteten Niveau. Dieses Ergebnis läßt vermuten, dass ein inhibitorischer proteinähnlicher Faktor in der späten Dunkelphase synthetisiert wird und während des Tages aktiv ist, um die Stimulation der Melatoninsynthese zu unterdrücken (Garidou et al., 2003). Bei Ungulaten und Primaten kommt es bereits kurz nach Anbruch der Dunkelheit zu einem Anstieg der Melatoninsynthese. Durch einen tags und nachts konstant bleibenden AANAT-mRNA Spiegel muss nicht wie bei der Ratte oder beim Hamster erst AANAT transkribiert werden, sondern hier kann die Melatoninsynthese direkt aktiviert werden (Ackermann et al., 2006; Coon et al.,

2002; Klein et al., 1997; Schomerus et al., 2000). Als zentrales Element der Regulation der Melatoninbiosynthese bei Ungulaten ist der sofortige Abbau des konstitutiv generierten AANAT Proteins durch proteasomale Proteolyse; erst mit dem nächtlichen Anstieg der NA-Freisetzung wird diese gehemmt und es kommt zu einem raschen Anstieg der Melatoninbiosynthese.

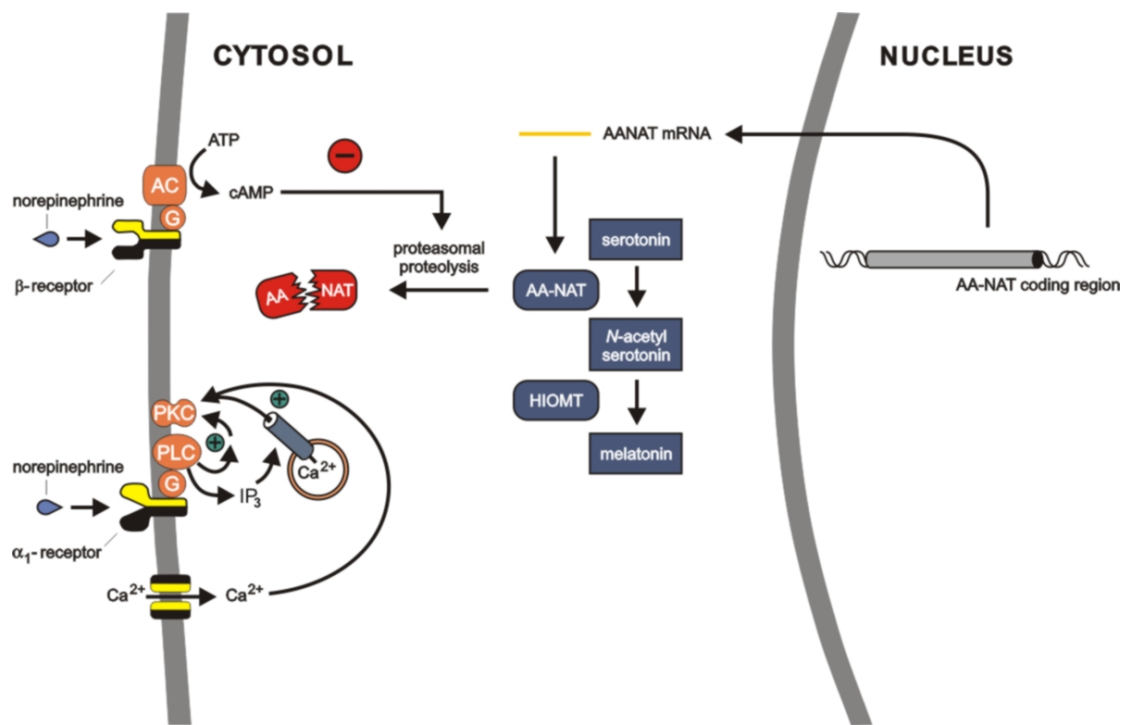


Abbildung 5: Melatoninbiosynthese beim Ungulaten, Primaten.

1.9 Transkriptionsfaktoren im Pinealorgan

Transkriptionsfaktoren können durch ihre Bindung an Promotor- oder Enhancer-Sequenzen, die oberhalb der Transkriptionsstartseite liegen, die Aktivität der DNA-Polymerasen modulieren. Dies kann zu einer Aktivierung oder Hemmung der Transkription von Genen führen und ist somit ein fundamentaler Schritt zwischen einem externen Reiz und einer zellulären Antwort. In den vergangenen Jahren wurde im Pinealorgan eine Reihe von Transkriptionsfaktoren gefunden und deren mögliche Rolle bei der Regulation der Melatoninbiosynthese untersucht. Diese Studien haben gezeigt, dass insbesondere Transkriptionsfaktoren, die durch den NA/cAMP-Signaltransduktionsweg kon-

trolliert werden, bei der Regulation der Melatoninsynthese eine Rolle spielen.

1.9.1 CREB (*cAMP responsive element binding protein*)

Das 43 kDa große Polypeptid ist ein Mitglied der CREB/ATF-Familie von Transkriptionsfaktoren. CREB kommt im Zentralnervensystem nahezu ubiquitär vor und ist an der Vermittlung zwischen neuronalen Reizen und länger anhaltenden intrazellulären Veränderungen beteiligt (Montminy et al., 1990; Yamamoto et al., 1988). CREB gehört zur Familie der leucin-zipper Proteine (Landschultz et al., 1988): das leucin-zipper-Motiv im carboxyterminalen Teil des Protein ermöglicht die für die DNA-Bindung notwendige Dimerisierung (Yamamoto et al., 1998). Neben der DNA-bindenden Domäne (DBD) besitzt der Transkriptionsfaktor CREB noch Glutamin-reiche Sequenzen (Q1, Q2), die für den aktivierenden Einfluß auf die Transkription notwendig sind (Gonzalez et al., 1991). Diese Glutamin-reichen Sequenzen flankieren eine *kinase-inducible* Domäne (KID), die eine posttranskriptionale Aktivierung von CREB erlaubt (Gonzalez et al., 1991). Die Aktivierung von konstitutiv exprimierten CREB erfolgt durch Phosphorylierung der Aminosäure Serin an den Positionen 133 oder 142 des Proteins und kann sowohl über die Akkumulation des zweiten Botenstoffes Ca^{2+} mit nachfolgender Aktivierung der Ca^{2+} /Calmodulin-abhängigen Proteinkinase I oder II, über die MAP-Kinase, als auch über die intrazelluläre Erhöhung des zweiten Botenstoffes cAMP und die nachfolgende Aktivierung der PKA erfolgen (Chen et al., 1998; Gonzales et al., 1989; Gonzales und Montminy, 1989; Sheng et al., 1991). Die Phosphorylierung von CREB führt zur Homodimerisierung und/oder zur Heterodimerisierung mit anderen Transkriptionsfaktoren, wodurch die Aktivität und Bindungsverhalten an CREs dieser Transkriptionsfaktoren reguliert werden kann. Im Pinealorgan der Ratte wird die Phosphorylierung von CREB nur über die Stimulation der cAMP-abhängigen PKA induziert, eine Stimulation der α_1 -adrenergen Rezeptoren, die zur Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration führen, konnte keine CREB-Phosphorylierung in Pinealozyten hervorrufen (Roseboom und Klein, 1995; Maronde et al., 1999; Schomerus et al., 1996; Tamotsu et al., 1995). Eine Beteiligung des Transkriptionsfaktors

CREB an der Aktivierung der Melatoninsynthese liegt aufgrund der Induktion und der Dynamik der Phosphorylierung nahe: in mehr als 95 % aller Pinealocyten konnte 30-60 min nach Stimulation mit NA oder dem β_1 -adrenergen Agonisten Isoproterenol eine maximale phosphoCREB-Immunreaktion induziert werden (Tomatsu et al., 1995). Diese Befunde können die zeitliche Lücke in den biochemischen Abläufen zwischen der β_1 -adrenergen Rezeptoraktivierung und dem Anstieg der AANAT Aktivität überbrücken. Ein weiterer Beleg für eine Beteiligung von CREB an der Aktivierung der AANAT-Transkription ist die Bindung dieses Transkriptionsfaktors an das CRE-Element im Promotor des AANAT-Gens (TGACGCCA) (Baler et al., 1997; Foulkes et al., 1996).

1.9.2 ICER (*inducible cAMP early repressor*)

1993 konnte ein Transkriptionsfaktor aus einer cDNA-Bank des Pinealorgans kloniert werden, der die Transkription von cAMP-sensitiven Genen hemmt: der inhibitorische Transkriptionsfaktor ICER (*inducible cAMP early repressor*; Stehle et al., 1993). ICER gehört zur CREM-Familie (*cAMP responsive element modulator*) (Foulkes et al., 1991), die strukturell mit CREB verwandt ist. ICER ist ein sehr kleiner Transkriptionsfaktor mit nur 120 Aminosäuren und einem relativen Molekulargewicht von 13,4 kDa. ICER hat eine hohe Affinität zu CRE-Elementen (Stehle et al., 1993). Von ICER sind 4 verschiedene Isoformen bekannt, die sich in der An- bzw. Abwesenheit einer γ -Domäne und dem alternativen Einbau zweier DNA-Bindungsdomänen unterscheiden (Molina et al., 1993; Stehle et al., 1993). Allen ICER-Isoformen gemein ist ein kleines, ICER-spezifisches Exon (87 Basenpaare), das durch differentielles Zusammenfügen oberhalb der γ -Domäne eingeordnet wird. Im Gegensatz zu den anderen Mitgliedern der CREM-Familie besteht ICER lediglich aus der DNA-Bindungsdomäne mit dem für die Dimerisierung notwendigen *leucine zipper*-Motiv. ICER fehlen die Glutamin-reichen Domänen sowie die Phosphorylierungs-Domänen. Daher kann angenommen werden, dass die Wirkung von ICER auf die Expression von cAMP-induzierbaren Genen alleine durch die intrazelluläre Konzentration des Translationsproduktes bestimmt wird. Die

ICER-Expression wird von einem internen Promotor, P2, gesteuert (Molina et al., 1993), der 4 CRE-Elemente beinhaltet (Molina et al., 1993) (Abbildung 6). Die ICER-Transkription kann somit potentiell durch pCREB aktiviert und durch ICER selbst inhibiert werden (Molina et al., 1993).

Die hemmende Wirkung von ICER auf Zielgene setzt sich aus einer Konkurrenz mit anderen Transkriptionsfaktoren um CRE-Bindungsstellen und einer Heterodimerisierung von ICER mit aktivierendem Transkriptionsfaktoren zusammen (Stehle, 1995).

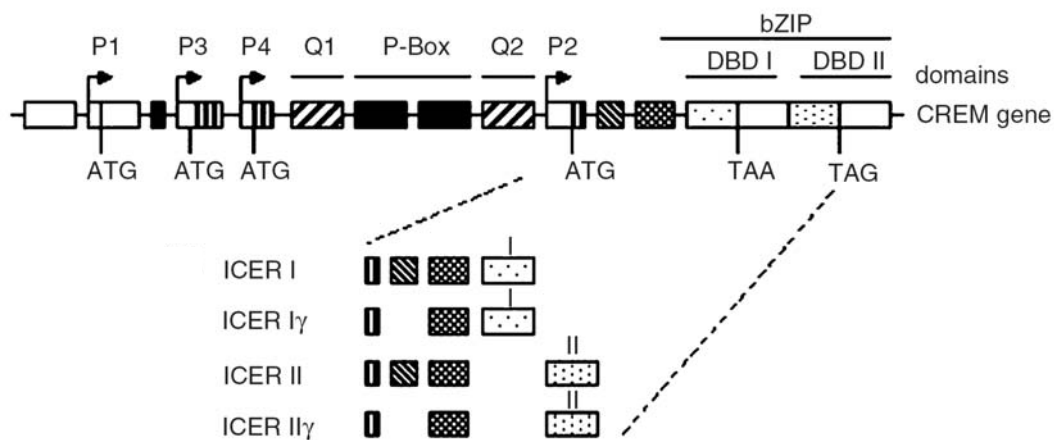


Abbildung 6: (a) Schematische Darstellung der Intron Struktur des CREM/ICER Gens; CREM Promoter; P2, ICER Promoter. Aktivierung des induzierbaren P2 Promoters führt zur ICER Expression. ATG, zeigt den Beginn der Translation an; TAA und TAG zeigen die Stops und Codons an; DBD I und II sind die DNA Bindungsdomänen I und II; bZIP, Basis Leuzin Zipper Motif.

(b) Proteinstruktur von ICER Isoformen (Kaczmarek et al., 2003).

2 ZIELSETZUNG DER UNTERSUCHUNG

Ziel dieser Arbeit war die Vervollständigung des Verständnisses des Melatoninsynthese-Regelkreises beim Syrischen Hamster. Hierzu sollte speziell untersucht werden, ob im Pinealorgan des Syrischen Hamsters, ähnlich wie bei der Ratte oder der Maus ein inhibitorischer Transkriptionsfaktor wie ICER vorkommt. Neben dem Nachweis des ICER-Proteins mittels immunhistochemischer Analyse im perfusionsfixierten Pinealorgan, sollte des Weiteren

- eine semiquantitative Auswertung des Immunsignals erfolgen,
- die Frage geklärt werden, ob die ICER Menge im Pinealorgan des Syrischen Hamsters, wie bei Maus und Ratte über den Tagesverlauf, fluktuiert,
- einer eventuellen Abhängigkeit der ICER Menge im Pinealorgan von der Photoperiode untersucht werden und,
- die mögliche Beteiligung von ICER an der nicht-Induzierbarkeit der Melatoninsynthese beim Syrischen Hamster analysiert werden.

3 MATERIAL UND METHODE

3.1 Chemikalien

Alle Feinchemikalien wurden, soweit nicht anders angegeben, von der Firma Sigma bezogen. Alle Lösungen und Puffer wurden mit destilliertem Wasser (dH₂O) hergestellt und autoklaviert oder sterilfiltriert (Sterilfilter: 0,2 µm Porenweite, Schleicher&Schuell, Dassel).

3.2 Versuchstiere und Haltungsbedingungen

Alle Tierexperimente wurden in Übereinstimmung mit den Richtlinien für Tierversuche nach der Maßgabe der Europäischen Gemeinschaft (Direktive 86/609/EEC) durchgeführt.

Als Versuchstiere wurden männliche Syrische Hamster im Alter zwischen 26 und 58 Tagen gewählt. Sämtliche Versuchstiere wurden unter konstanter Temperatur (20⁰C) und definierten Beleuchtungsverhältnissen gehalten [Lichtphase (L): 230 µW/cm²; Dunkelphase (D): Dunkelrotlicht: <5 µW/cm²] Rotlicht dieser Wellenlänge ist ohne Einfluss auf licht-sensitive Parameter des photoneuroendokrinen Systems. Futter und Wasser standen *ad libitum* zur Verfügung. Bei Versuchsbeginn wurden die Tiere der Langtag-Gruppe einer Lichtphase von 16 h und einer Dunkelphase von 8h während eines Zeitraumes von 2 Wochen unterworfen. Die Tiere der Kurztag-Gruppe wurden einer Lichtphase von 8 h und einer Dunkelphase von 16 h während eines Zeitraumes von 12 Wochen exponiert. Die Einhaltung der 12 Wochen unter Kurztag-Beleuchtungsverhältnissen ist für eine physiologische Antwort (z.B. der Gonaden) beim Syrischen Hamster notwendig.

3.3 Manipulation der Versuchstiere

Die Versuchstiere wurden innerhalb einer Photoperiode (24 h) zu definierten Zeitpunkten getötet, um so eine eventuelle Fluktuation der ICER-Menge feststellen zu können. Dabei wurde folgender Zeitplan gewählt.

Langtag-Zeitplan



Kurztag-Zeitplan

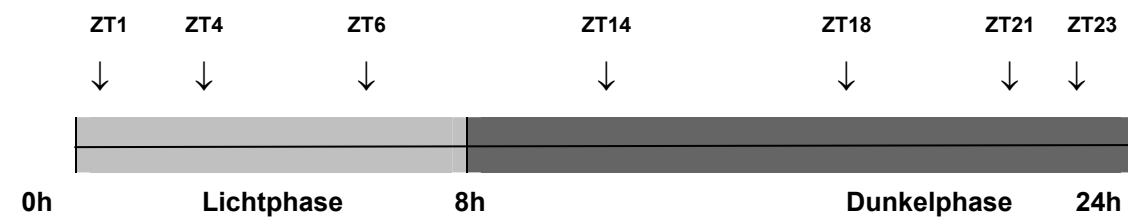


Abbildung 7: Die Hamster der Langtag- und Kurztag-Gruppe wurden zu definierten „Zeitgeber-Time“, ZT 1 – 23 getötet. Der hellgraue Balken zeigt die Lichtphase von jeweils 16 h für den Langtag und 8 h für den Kurztag, der dunkelgraue Balken zeigt die Dunkelphase an.

Zur Entnahme des Pinealorgans wurden die Tiere entsprechend ihrer momentanen Beleuchtungsverhältnisse unter hellem Weißlicht oder Dunkelrotlicht getötet. Nach erfolgter Ethernarkose wurde den Hamstern 0,8 ml Chloralhydrat intraperitoneal injiziert und sofort nach Eintritt des narkotisierenden Effektes wurde dann der Brustkorb eröffnet, um so mittels einer Kanüle über die linke Herzkammer 0,1 ml Heparin in den Kreislauf zu bringen, welches eine vorzeitige Blutgerinnung in den Gefäßen verhindern sollte. Anschließend erfolgte eine Applikation von physiologischer Kochsalzlösung (0,9% NaCl), um möglichst alle Erythrozyten aus den zu perfundierenden Geweben auszu-

schwemmen. Als Perfusionslösung diente 4% Paraformaldehyd (PFA) in phosphat-gepufferter Kochsalzlösung (PBS-Puffer). Nach erfolgter Perfusion des Hamsters wurde die Dekapition und Präparation des Pinealorgans durchgeführt. Zur Freilegung der Epiphyse wurde zunächst die *Calvaria* durch Einschnitt vom *Foramen Magnum* zu beiden Seiten hin mobilisiert. Von der *Calvaria* wurden dann unter Benutzung eines Operationsmikroskops die Meningen vorsichtig abpräpariert, welche das Pinealorgan enthalten. Das Pinealorgan konnte so *in toto* mit dem gesamten Gehirn durch Durchtrennung der beiden *Nn.opticii* von der Schädelbasis gelöst werden.

Die Gehirne samt Pinealorgan wurden für mindestens 4 h in einer 4% PFA-Lösung nachfixiert und anschließend in Saccharoselösung kryoprotectiert. Dabei wurden diese zunächst in 10%-, dann in 20%- und schließlich in 30%-Saccharoselösung eingelegt.

Die Gehirne wurden nach Entnahme aus der Saccharoselösung mit Hilfe von Trockeneis schockgefroren und am Kryostaten in Frontalebene in 14 µm starke Schnittpräparate geschnitten. Die Aufnahme der Schnittpräparate erfolgte auf Chromalaun/Gelatine-beschichteten Objektträgern (Merck, Darmstadt), welche bis zur immunzytochemischen Färbung ständig bei – 20°C gelagert wurden.

Um den Einfluß der unterschiedlichen Photoperioden auf den Syrischen Hamster zu bestätigen, wurden zu jedem Zeitpunkt der jeweiligen Photoperiode die Gonaden der Tiere gesammelt und gewogen. Gemäß den erfolgten Beobachtungen ist unter einer Kurztag Photoperiode (8 h Licht, 16 h Dunkelheit) eine Unterdrückung der Funktion der hypothalamo-hypophysären-gonadalen Achse zu erwarten.

3.4 Immunzytochemische Methode

Durch die Immunzytochemie ist es möglich in Gewebeschnitten Proteine oder Peptide (Antigene) spezifisch nachzuweisen und zu lokalisieren. Unter den verschiedenen Färbemethoden (direkte, indirekte, PAP- und Avidin-Biotin-Methode) wurde die Avidin-Biotin-Methode gewählt, da diese eine sehr hohe Empfindlichkeit bietet und auf fixiertem Material hervorragende Ergebnisse erzielt.

Diese Methode basiert auf der Fähigkeit des Eiweißglykoproteins Avidin, 4 Moleküle des Vitamins Biotin physikalisch zu binden. Es werden drei Reagenzien benötigt: das erste ist ein Primärantikörper, der spezifisch gegen das zu bestimmende Antigen gerichtet ist. Der Sekundärantikörper, der an der ersten binden kann, ist mit Biotin konjugiert. Das dritte Reagenz ist ein Peroxidase-konjugierter Avidin-Biotin-Komplex. Die freien Stellen der Avidinmoleküle ermöglichen die Bindung an das Biotin des Sekundärantikörpers. Das Enzym Peroxidase und damit das gesuchte Antigen wird mit einem geeigneten Chromogen sichtbar gemacht. Die Substrat-Chromogenreaktion, die benutzt wird, um die Peroxidase sichtbar zu machen, lässt keine Unterscheidung zu, ob es sich bei dem nachgewiesenen Enzym um das Enzym handelt, das durch die Immunreaktion das zelluläre Antigen lokalisiert, oder ob es sich um enzymatische Aktivität handelt, die im Präparat schon vor Beginn der Anfärbung vorhanden war. Vorrangig findet sich die endogene Peroxidaseaktivität in roten und weißen Blutkörperchen. Sofern diese Aktivität nicht vor Zugabe des markierenden Enzyms blockiert wird, ist eine positive Anfärbung nicht nur auf das spezifische Antigen, sondern auch auf die im Gewebe bereits vorhandene Peroxidaseaktivität zurückzuführen. Um die endogene Peroxidase irreversibel zu hemmen, werden die Gefrierschnitte in ein Bad aus 30% H_2O_2 und Methanol überführt.

Als unspezifische Hintergrundfärbung versteht man die positive Anfärbung eines Präparates, die nicht das Ergebnis einer Antigen-Antikörper-Bindung darstellt. Die häufigste Ursache ist die Anlagerung von Proteinen an stark geladene Kollagen- und Bindegewebelemente der Präparate. Ist die erste dem Gewebspräparat zugefügte Proteinlösung der Primärantikörper, kann er an diese geladenen Stellen unspezifisch adsorbiert werden. Der

nachfolgend zugesetzte Sekundärantikörper bindet trotzdem an den Primärantikörper, und es kommt zu einer Peroxidase Farbreaktion. Die positive Färbung an diesen Stellen ist dann nicht bedingt durch eine unspezifische Antikörperanlagerung an Kollagen und sonstiges Bindegewebe. Die unspezifische Färbung kann erfolgreich durch Hinzufügen einer neutralen Proteinlösung vor Zugabe des Primärantikörpers vermieden werden. Dieses Protein lagert sich an die elektrisch geladenen Stellen und verhindert auf diese Weise eine Adsorption des Primärantikörpers.

3.4.1 *Protokoll der Immunzytochemie*

Die Gewebeschnitte wurden nach Entnahme aus dem Gefrierschrank zum Trocknen ausgelegt und anschließend in 70% Alkohol eingelegt. Um die endogene Peroxidase zu blocken wurden dann die Gefrierschnitte in ein Bad aus Methanol und 30% H₂O₂ gelagert und anschließend erneut in 70% Alkohol gelegt. Die Präparate wurden in PBS/0,3% Triton-Puffer gewaschen und nun in Ziegen Serum (1:20) mit PBS/Triton-Puffer für 30 min inkubiert, um eine unspezifische Hintergrundfärbung zu vermeiden. Da noch nicht bekannt war bei welcher Primärantikörperkonzentration es zu einer möglichen Färbung kommen würde, wurde zunächst eine Konzentrationsreihe mit dem Primärantikörper- ICER- getestet werden. Der Primärantikörper wurde in PBS/Triton und 1% Albumin auf die Gewebeschnitte über Nacht in verschiedenen Konzentrationen (1:10.000, 1:30.000, 1:60.000, 1:80.000) gegeben. Nach erneutem Waschen mit PBS/Triton wurde der Sekundärantikörper, ein mit Biotin konjugierter anti-Kaninchen Antikörper (1:100), in PBS/Triton für 1 h dazugegeben. Die Präparate wurden nochmals mit PBS/Triton gewaschen und die Extravidin-Peroxidase (1:100) im PBS/Triton-Puffer hinzugegeben. Schließlich wurden die Gefrierschnitte in PBS-Puffer und danach in Tris-Puffer gelegt, bevor die Färbung in Diaminobenzidin/Tris mit 30% H₂O₂ erfolgte. Vor der abschließenden Eindeckelung mit Entellan (Merck, Darmstadt) wurden alle Präparate in einer aufsteigenden Alkoholreihe (70%-100%) und in Xylol entwässert.

Zur Erfolgskontrolle der Immunzytochemie wurde immer ein Gewebeschnitt vom Pinealorgan der Ratte mitgefärbt, da bisher nicht bekannt war, ob es

beim Syrischen Hamster zu einer positiven ICER-Immunoreaktion im Pinealorgan kommt.

Primäre Antikörper		
Antigen	Hersteller	Arbeitskonzentration
ICER Protein	Dr. C.A. Molina, UMDNJ,NJ, USA	1:10.000

Sekundärer Antikörper		
Antigen	Hersteller	Arbeitskonzentration
Anti-Kaninchen/IgG-Biotin	Santa Cruz Biotechnology, INC.	1:100

Tabelle 1: Liste der verwendeten Antikörper.

3.5 Semiquantitative und densitometrische Auswertung der immunzytochemischen Färbung

Die semiquantitative Auswertung aller Präparate wurde an einem VIDAS-Bildanalysesystem (KS 300, Kontron) durchgeführt. Die immunzytochemischen Präparate wurden zunächst von einer Videokamera (AVT Horn, Aalen) aufgenommen, die mit einem Mikroskop (Axioplan, Zeiss, Göttingen) verbunden war. Die Daten wurden mit einer Auflösung von 512 x 512 Bildpunkten und 8 Bits (Grauwerte von 0-255) digitalisiert und an das Bildanalysesystem weitergegeben.

Zur densitometrischen Analyse wurde die Intensität der spezifischen Signale anhand der Grauwertskala von 0 (schwarz) bis 225 (weis) ermittelt. Der ermittelte Grauwert wurde invertiert und mit der entsprechenden Fläche des Signals verrechnet. Die Ergebnisse wurden als corrSUMDENS (corrected sum of densities) ausgedrückt (Wicht et al., 1999). Um verschiedene Ergebnisse vergleichbar zu machen, wurden alle Werte als Prozent des maximalen corrSUMDENS Wertes angegeben. Zur statistischen Absicherung wurden mindestens 3 zufällige Präparate ausgewertet.

3.6 Quantifizierung der ICER-Expression

Die in der Immunzytochemie nachgewiesenen ICER-Signale wurden mit einem computerunterstützten Analysesystem ausgewertet (Vidas 21; Fa.Zeiss). Hierbei wurden sowohl die Menge, als auch die Intensität der gefärbten Zellkerne einbezogen. Von jedem Zeitpunkt wurden von drei verschiedenen Hamstern zufällig gewählte Bereiche, die ca. 100 Zellen umfassten, blind ausgewertet (Vergrößerung 600x). Zur Evaluation der Daten einer Versuchsreihe wurde der höchste corrSUMDENS-Wert (Maximalwert) als 100% gesetzt und die korrespondierenden Werte als Prozent des Maximalwertes ausgedrückt.

3.7 Statistische Auswertung

Die Daten der densitometrischen Analyse wurden mit SPSS durch ANOVA mit anschließendem Bonferroni Test für mehrfache Vergleiche mit $p < 0,05$ als Kriterium für Signifikanz und Standardabweichung (\pm SEM) dargestellt.

Die Ausführung und Auswertung des Versuchs erfolgte nach den Kriterien einer Doppel-Blind-Studie, so wurden die einzelnen Tiere den Versuchseinheiten (ZTs) nach dem Zufallsprinzip zugeordnet und die ermittelten Messwerte wurden ebenfalls durch eine Randomisierungsfunktion, die für die statistische Auswertung verwendete Programm (SPSS), ausgewählt.

4 ERGEBNISSE

Im Pinealorgan des Syrischen Hamsters zeigten alle Zellen eine auf den Kern begrenzte spezifische ICER Immunoreaktion auf. Es konnte unabhängig von der Photoperiode (LD/SD) unter welcher die Tiere gehalten wurden, eine signifikante Tagesfluktuation der ICER Signalintensität festgestellt werden.

4.1 ICER-Proteinexpression in der Langtag-Gruppe

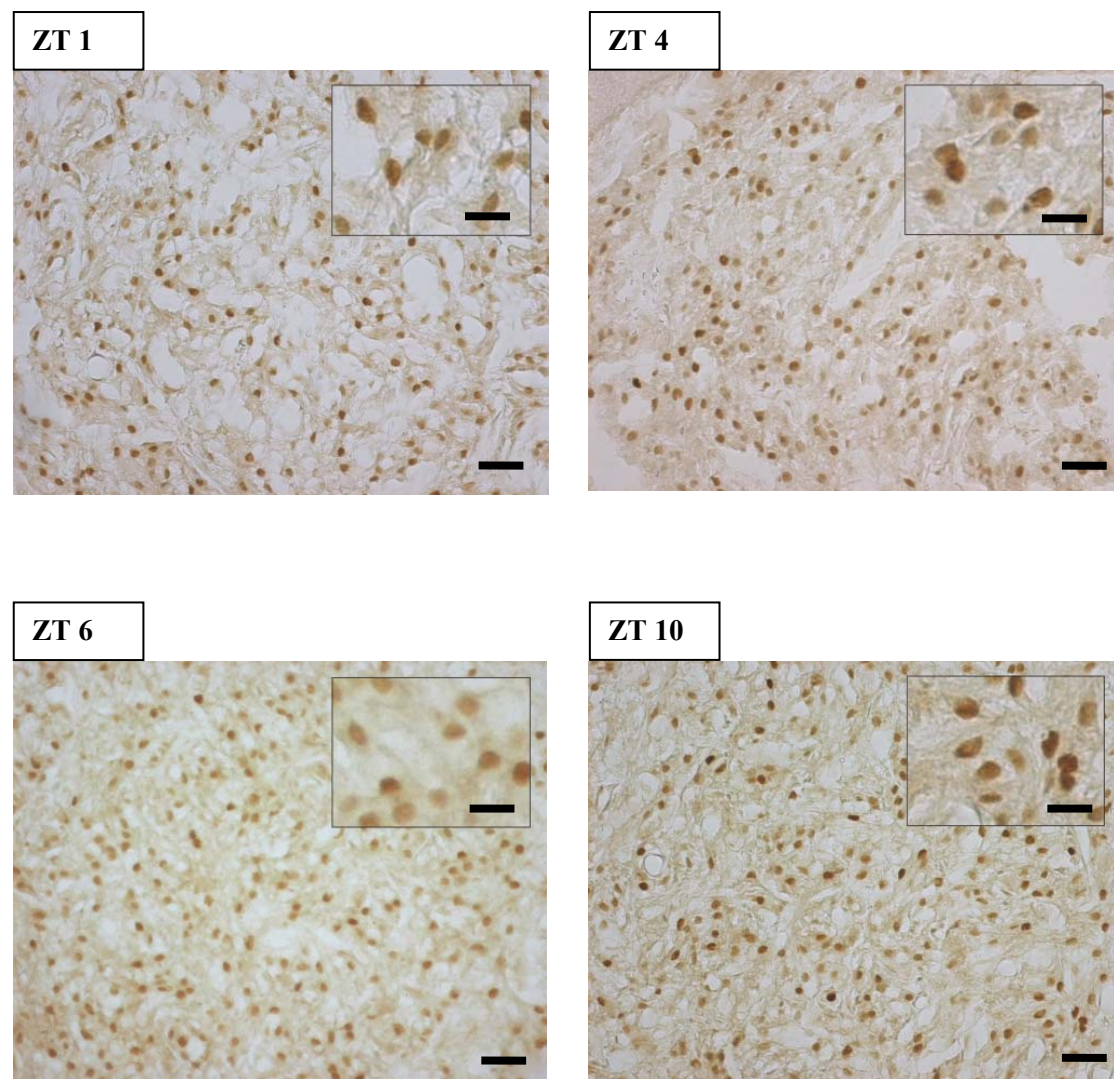


Abbildung 8: Immunzytochemische Färbung der Hirnschnitte aus dem Pinealorgan des Syrischen Hamsters bei einer Photoperiode von 16h Licht und 8h Dunkelheit (Langtag). Zeitpunkte ZT 1 bis 10. Die ICER-Immunoreaktion ist ausschließlich im Zellkern nachweisbar. Maßstabsbalken (Ausschnitt): 50 µm; Maßstabsbalken (Übersicht): 100 µm.

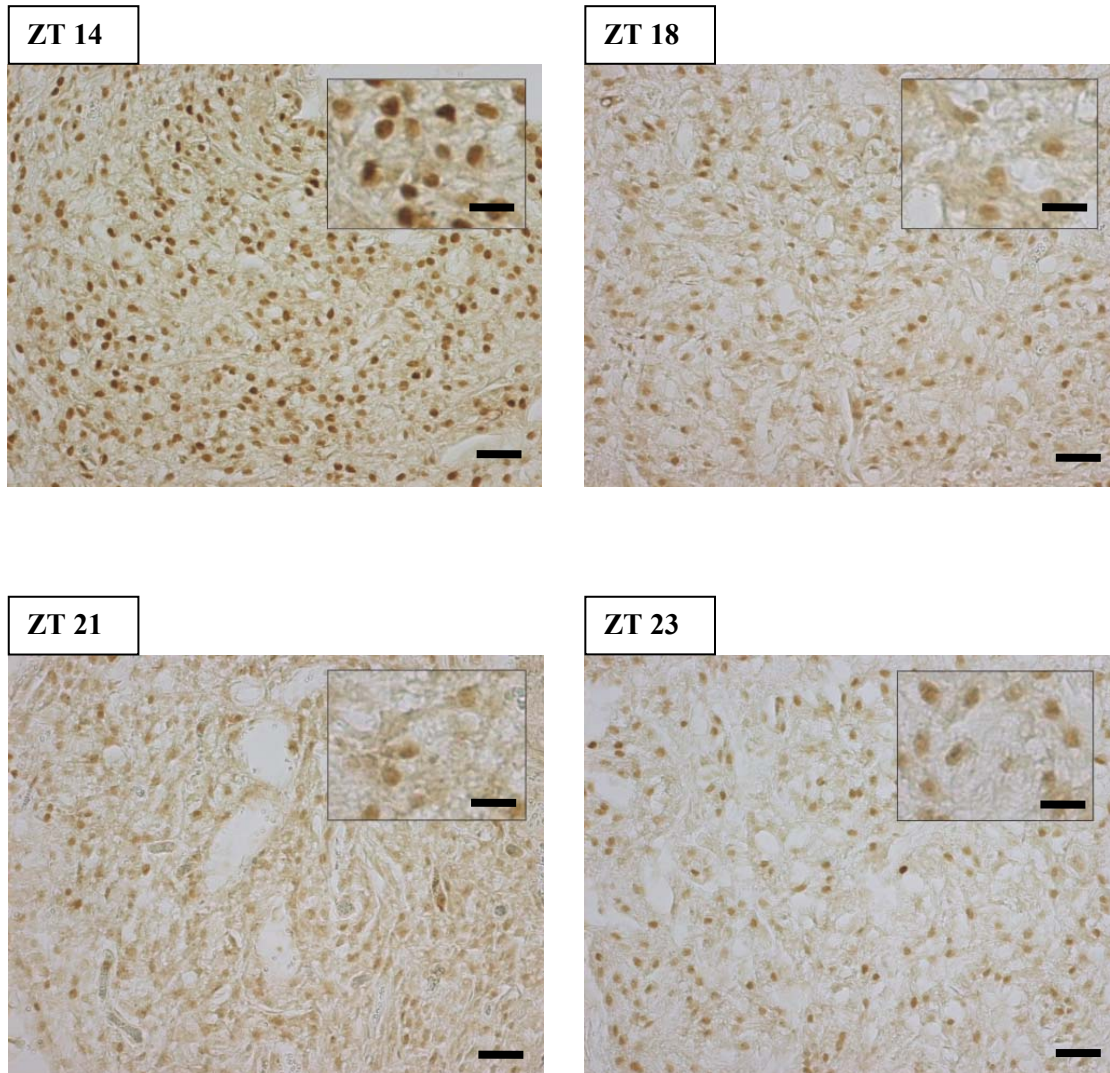
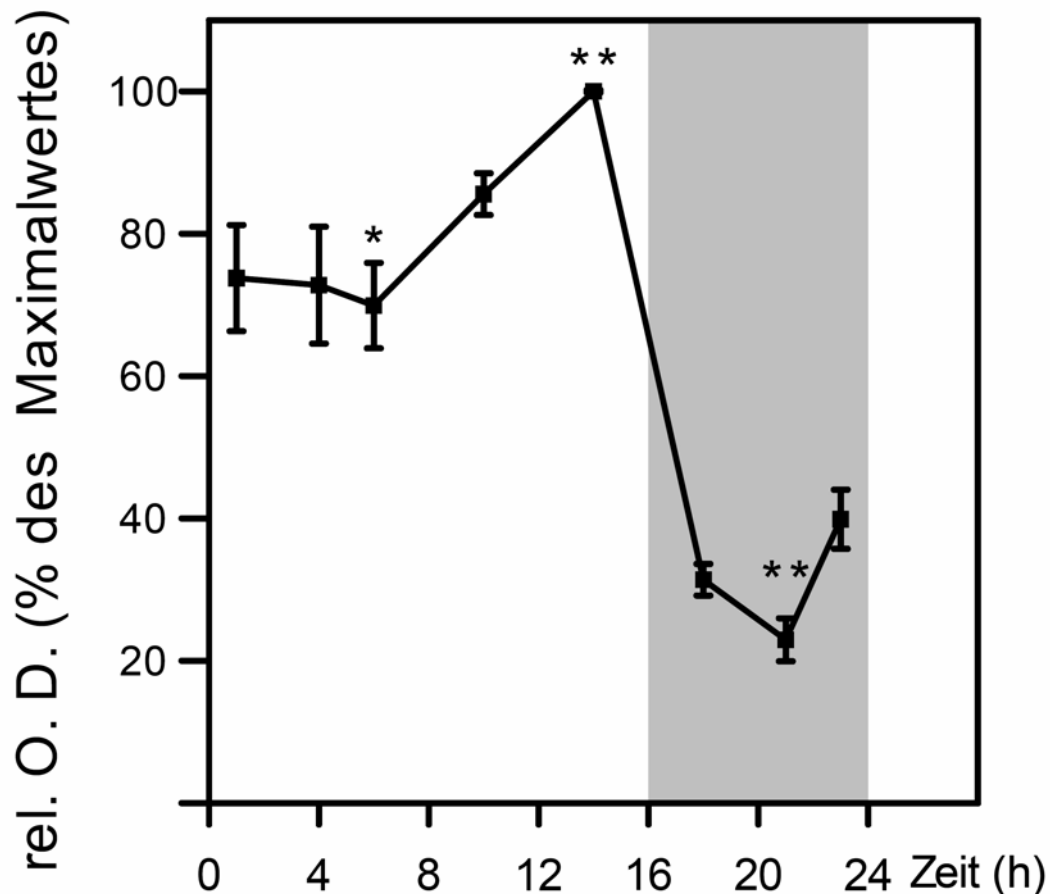


Abbildung 9: Immunzytochemische Färbung der Hirnschnitte aus dem Pinealorgan des Syrischen Hamsters bei einer Photoperiode von 16h Licht und 8h Dunkelheit (Langtag). Zeitpunkte ZT 14 bis ZT23. Die ICER-Immunoreaktion ist ausschließlich im Zellkern nachweisbar. Maßstabsbalken (Ausschnitt): 50 μm ; Maßstabsbalken (Übersicht): 100 μm .

In den Pinealorganen der LD Gruppe stiegen die ICER Werte über den Tagesverlauf stetig an und erreichten maximale Werte 2 h vor dem Licht/Dunkelheit – Wechsel. Bei Einbruch der Dunkelphase kam es zu einem rapiden Abfall der ICER Immunreaktion mit niedrigsten Werten etwa 5 h nach Beginn der Phase. Zum Ende dieser Phase kam es dann aber erneut zu einem Anstieg der Werte.



ICER LD

Abbildung 10: Diurnale Fluktuation des ICER Proteins im Pinealorgan des Syrischen Hamster mit einer Langtag (LD) Photoperiode von 16h Licht und 8h Dunkelheit. Die relative optische Dichte der ICER-Immunreaktion ist als % des absoluten Maximalwertes von der Langtag-Gruppe dargestellt. Die grau unterlegte Fläche stellt die Dunkelphase dar; Der Zeitpunkt ZT 14 (** $p < 0.01$) ist signifikant zu allen anderen Zeitpunkten unterschiedlich. Der Zeitpunkt ZT 21 (** $p < 0,01$) und ZT 6 (** $p < 0,01$) unterscheidet sich signifikant zu ZT: 4, 14.

Für die Gewichte der Gonaden der Langtag-Gruppe wurden für die jeweiligen Zeitpunkte folgende Werte gemessen:

<i>Zeitpunkt</i>	<i>Gonadengewichte</i>
ZT 1	10,26g
ZT 4	7,93g
ZT 6	9,53g
ZT 10	11,2g
ZT 14	7,12g
ZT 18	10,25g
ZT 21	10,81g
ZT 23	10,58 g

Tabelle 2: Gonadengewichte in der Langtag-Gruppe. Die grau unterlegten Felder zeigen die Werte für die Nacht an und die weißen die für den Tag.

4.2 ICER-Proteinexpression in der Kurztag-Gruppe

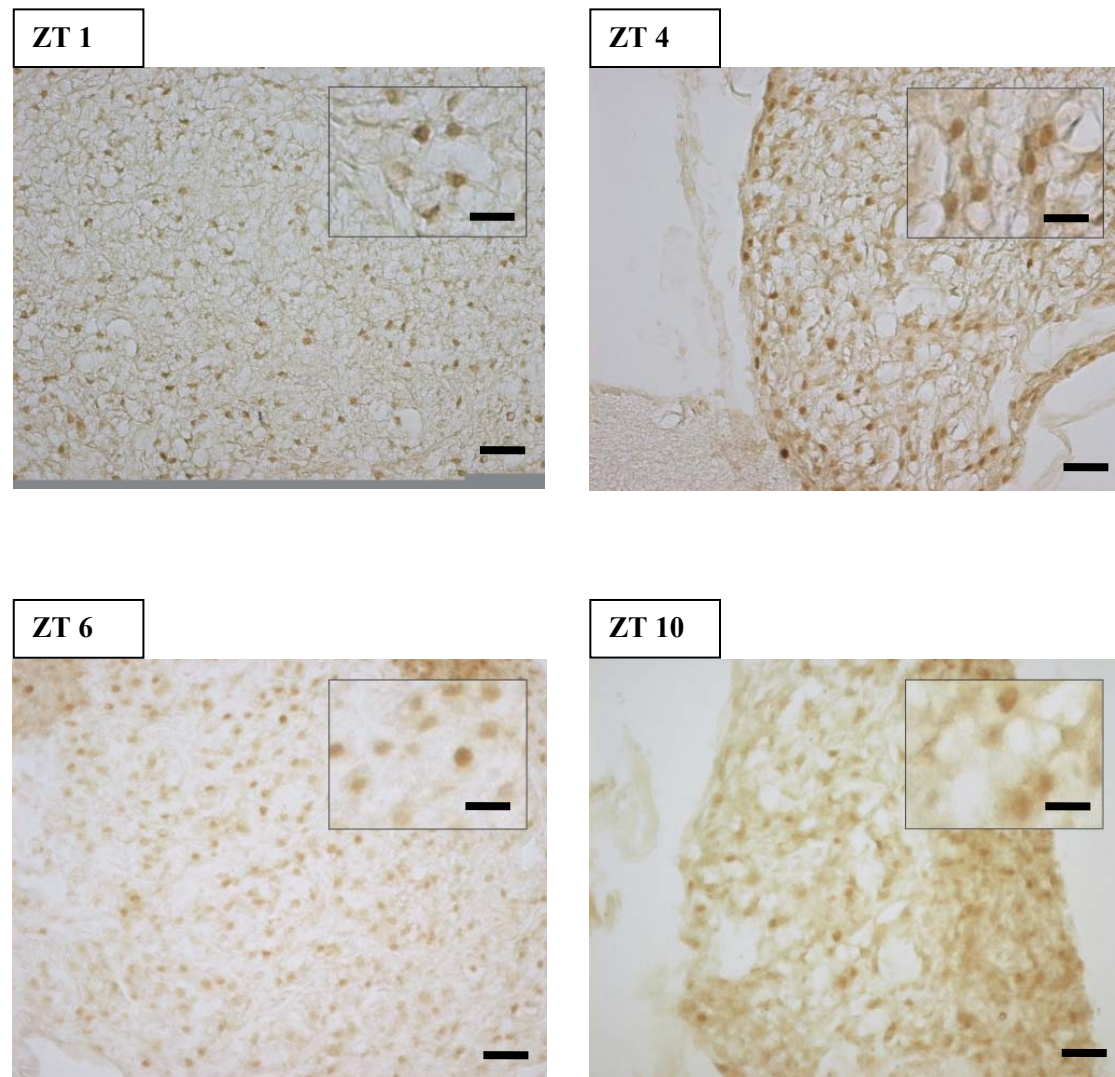


Abbildung 11: Immunzytochemische Färbung der Hirnschnitte aus dem Pinealorgan des Syrischen Hamsters bei einer Photoperiode von 8h Licht und 16h Dunkelheit (Kurztag). Zeitpunkte ZT1 bis ZT10. Die ICER-Immunoreaktion ist ausschließlich im Zellkern nachweisbar. Maßstabsbalken (Ausschnitt): 50 μm ; Maßstabsbalken (Übersicht): 100 μm .

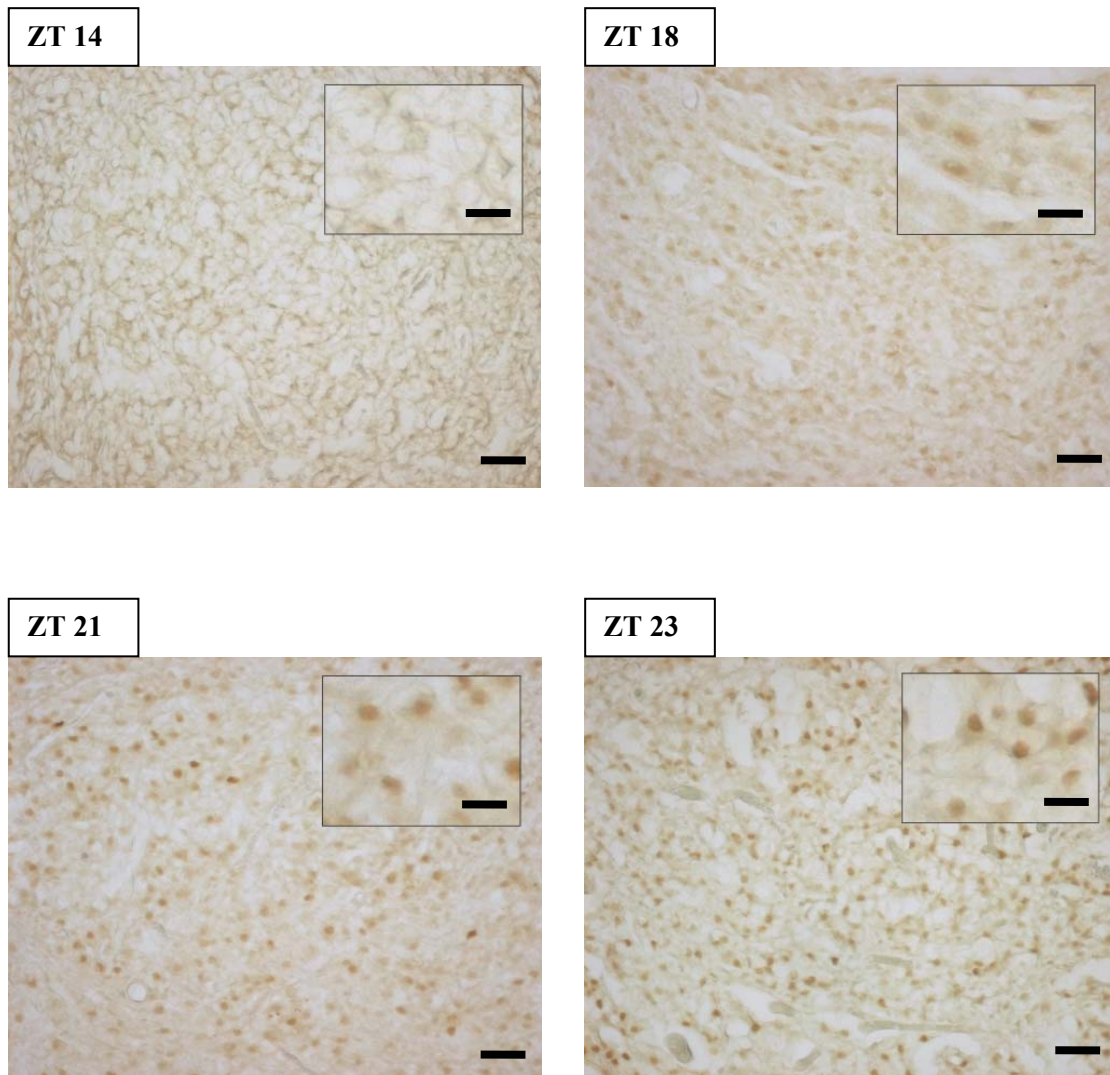


Abbildung 12: Immunzytochemische Färbung der Hirnschnitte aus dem Pinealorgan des Syrischen Hamsters bei einer Photoperiode von 8h Licht und 16h Dunkelheit (Kurztag). Zeitpunkte ZT14 bis ZT23. Die ICER-Immunoreaktion ist ausschließlich im Zellkern nachweisbar. Maßstabsbalken (Ausschnitt): 50 μm ; Maßstabsbalken (Übersicht): 100 μm .

Die ICER Werte der Hamster aus der SD Gruppe wiesen ein ähnliches Verlaufsmuster auf wie die der LD Gruppe, jedoch mit einem insgesamt gedämpfteren Profil. Hierbei wurden die Maximalwerte um die Mittagszeit ca. 4 h vor dem Licht/Dunkelheits-Wechsel erreicht und zeigten, wie auch in der LD Gruppe, zu Beginn der Dunkelphase einen Abfall mit einem Minimum 6 h nach Beginn der Dunkelphase, um dann wieder während der zweiten Hälfte der Dunkelphase anzusteigen.

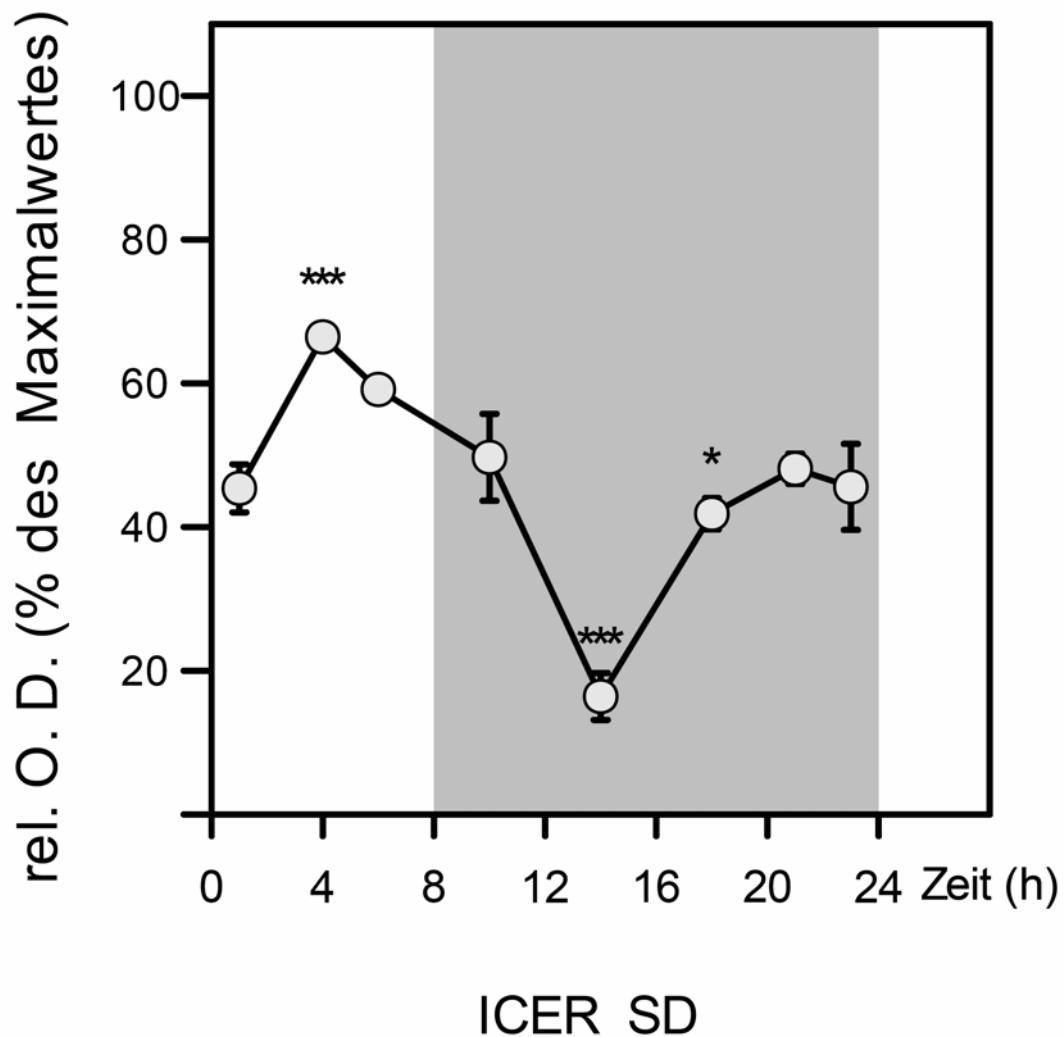


Abbildung 13: Diurnale Fluktuation des ICER Proteins im Pinealorgan des Syrischen Hamster mit einer Kurztag Photoperiode von 8 h Licht und 16 h Dunkelheit. Die relative optische Dichte der ICER-Immunoreaktion ist als % des absoluten Maximalwertes der Kurztag-Gruppe dargestellt. Die grau unterlegte Fläche stellt die Dunkelphase dar. ZT 4 und ZT 14 (***) sind signifikant zu allen anderen Zeitpunkten unterschiedlich. ZT 18(* p<0.05) unterscheidet sich signifikant zu ZT: 14, 10, 1, 4, 6.

Für die Gewichte der Gonaden der Kurztag-Gruppe wurden für die jeweiligen Zeitpunkte folgende Werte gemessen:

<i>Zeitpunkt</i>	<i>Gonadengewichte</i>
ZT 1	6,25g
ZT 4	5,57g
ZT 6	3,28g
ZT 10	5,85g
ZT 14	5,64g
ZT 18	6,6g
ZT 21	6,85g
ZT 23	3,67g

Tabelle 3: Gonadengewichte in der Kurztag-Gruppe. Die grau unterlegten Felder zeigen die Werte für die Nacht an und die weißen, die für den Tag.

4.3 Vergleich der ICER-Expression in der Langtag- und Kurztag-Gruppe

Zur besseren Vergleichbarkeit der beiden Gruppen wurden die Originaldaten der LD Gruppe um 8 h phasenverschoben, so dass der Beginn der Dunkelphase mit der SD Gruppe zeitlich übereinstimmte (Abbildung 14).

Insgesamt betrachtend ist der Anstieg der ICER Werte größer und erreicht höhere Werte während des Tages bei Hamstern, welche einer kurzen Nacht ausgesetzt waren (LD Bedingungen) im Vergleich zu denen der SD Gruppe.

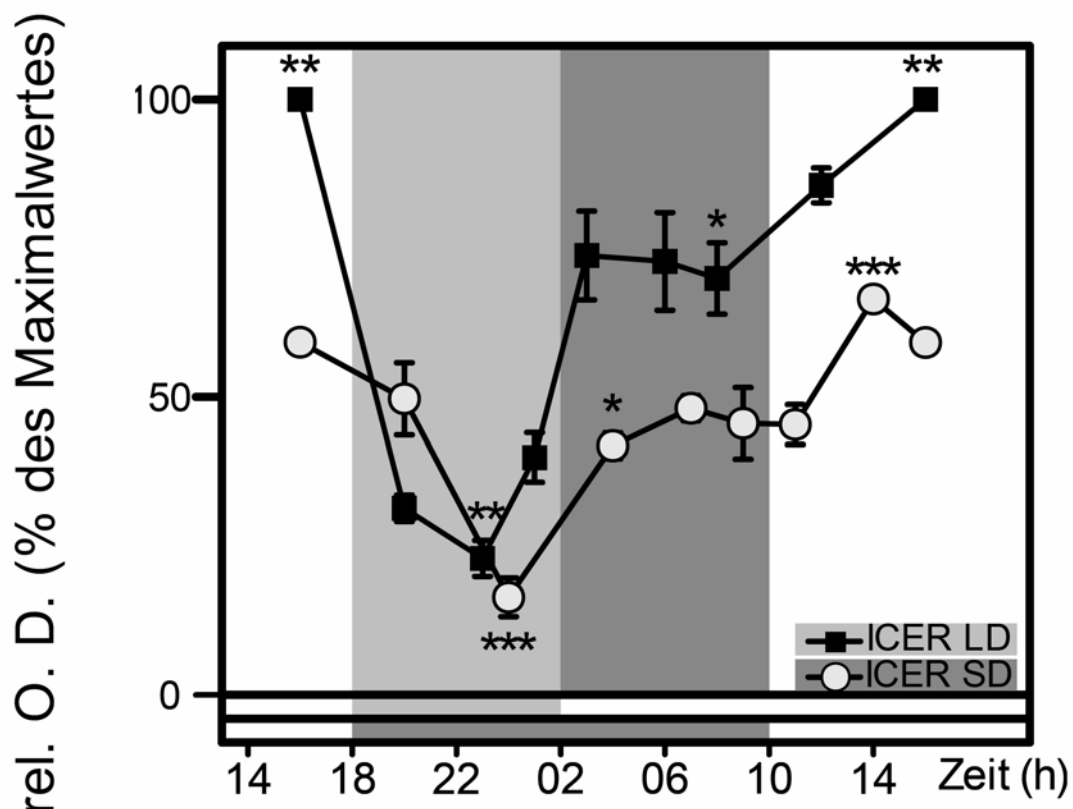


Abbildung 14: Vergleichende Darstellung der diurnalen Fluktuation des ICER Proteins im Pinealorgan des Syrischen Hamster mit einer Kurztag Photoperiode (SD) von 8 h Licht und 16 h Dunkelheit vs. einer Langtag Photoperiode (LD) von 16 h Licht und 8 h Dunkelheit. Die relative optische Dichte der ICER-Immunoreaktion ist als % des absoluten Maximalwertes von der Langtag- bzw. Kurztag-Gruppe dargestellt. Die dunkelgrau unterlegte Fläche stellt die Dunkelphase der Kurztag Gruppe dar; die hellgrau unterlegte Fläche stellt die Dunkelphase der Langtag Gruppe dar. LP und SP Gruppe unterscheiden sich signifikant im Zeitpunkt ($p < 0.05$) und in der Photoperiode ($0,01$). *** $p < 0.001$ ist für die Zeitpunkte: 6 h nach Licht aus und 4 h nach Licht an in der SD Gruppe gegen alle anderen Werte. ** $p < 0.01$ ist für die Zeitpunkte 5h nach Licht aus und 14h nach Licht in der LD Gruppe gegen alle anderen Werte.

Auswertung:

Die Abhängigkeit der gemessenen ICER Konzentrationen im Pinealorgan des Syrischen Hamsters von den Tageszeitpunkten ZT der jeweiligen Photoperiode wurden zunächst jeweils für den Langtag und Kurztag über ANOVA überprüft. Das Testergebnis ergab bei einem Signifikanzniveau von 0,05, dass zwischen den Mittelwerten zu den jeweiligen Faktorstufen, bzw. ZT Zeitpunkten sowohl beim Langtag als auch beim Kurztag hoch signifikante Unterschiede bestehen (Abbildung 14).

Die Ermittlung der einzelnen Mittelwerte der ICER-Konzentrationen erfolgte mittels Bonferoni-Test und es ergaben sich die in Abbildung 14 dargestellten Signifikanzen.

Anschließend wurde der Frage nachgegangen, ob sich die Langtagkonzentration von ICER von denen der Kurztagkonzentration im Mittel unterscheiden. Der T-Test ergab, dass sich die ICER-Konzentrationen von LD und SD im Mittel auf einem Signifikanzniveau von 0,05 unterscheiden.

Weiterhin wurde untersucht, ob sich die Mittelwerte des Tages von denen der Nacht zu vorgegebenem Signifikanzniveau von 0,05 unterscheiden. Dazu wurden die Mittelwerte zu 2 neuen Gruppen zusammengefasst: den Mittelwerten des Tages und der Nacht. Anschließend wurde mit Hilfe linearer Kontraste verglichen. Dieser Test (lineare Kontrast test) ergab signifikante Unterschiede zwischen den Tages- und Nachtmitteln beim Langtag als auch beim Kurztag (s. Abbildung 14).

Die Bestätigung einer Unterdrückung der Funktion der hypothalamo-hypophysären-gonadalen Achse unter Kurztag Photoperiode (8 h Licht, 16 h Dunkelheit) wird durch die gesammelten Gewichte der Gonaden der Syrischen Hamster in Abbildung 15, 16 dargestellt. Die Kurztag Photoperiode führt zu einer signifikanten Abnahme der Gonadengewichte beim syrischen Hamster (s. Abbildung 16).

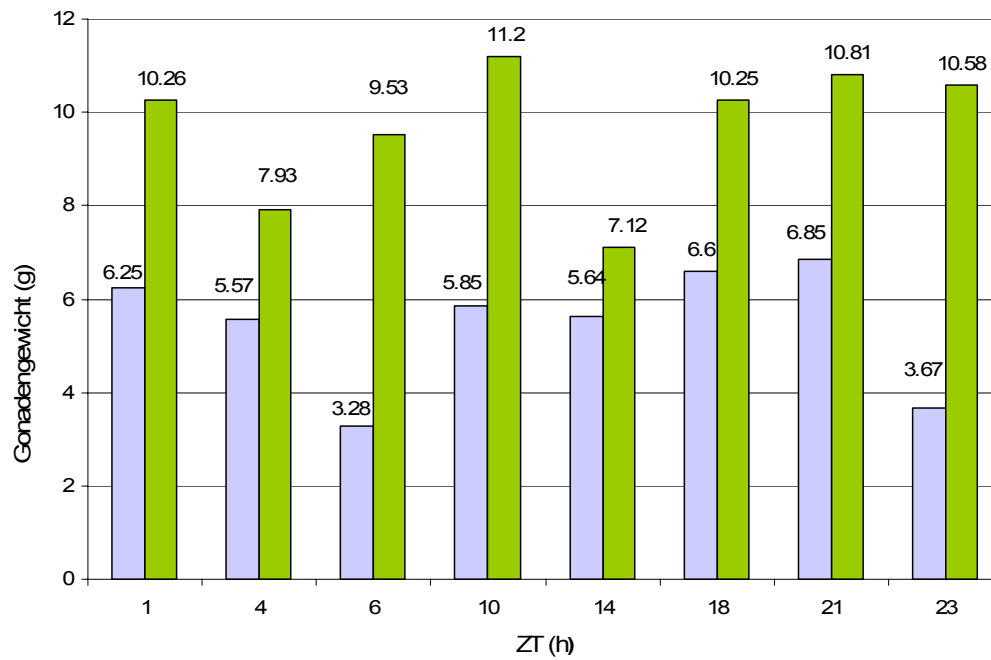


Abbildung 15: Gonadengewichte des Syrischen Hamsters unter Langtag Photoperiode (grüne Balken) und Kurztag Photoperiode (violette Balken). Es sind für die einzelnen Zeitpunkte die Mittelwerte von jeweils 3 Tieren gebildet worden.

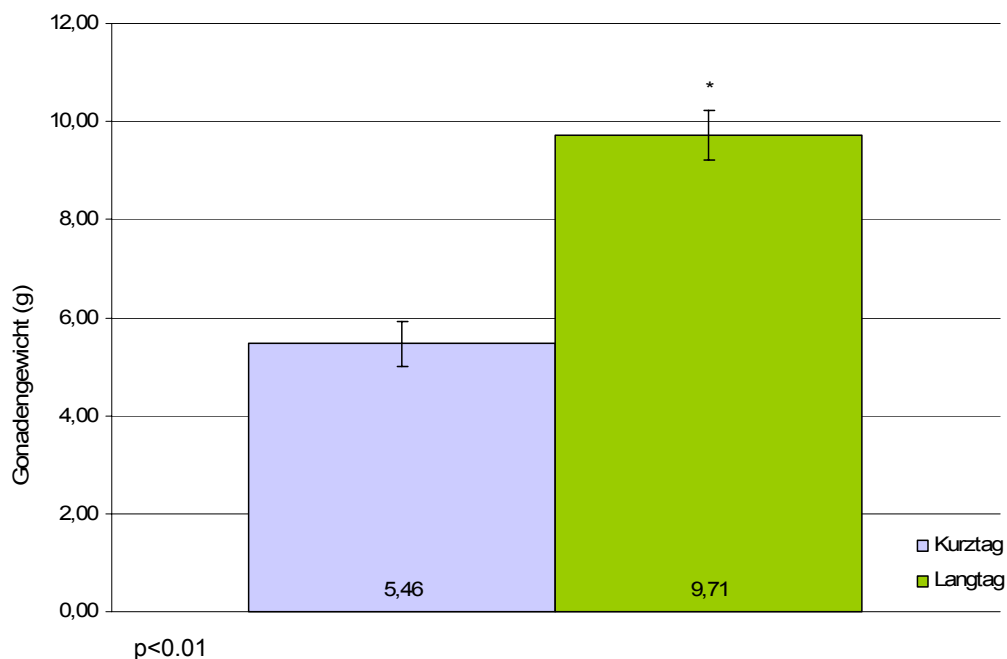


Abbildung 16: Gonadengewichte des Syrischen Hamsters unter Langtag Photoperiode (grüner Balken) und Kurztag Photoperiode (violetter Balken). Die Gonadengewichte der Langtaggruppe sind signifikant höher (* $P < 0.01$) als die der Kurztaggruppe. Der Standardmittelwert Fehler ist für den Kurztag \pm SEM 0,46 und für den Langtag \pm SEM 0,51. n= 24 Tiere pro Gruppe.

5 DISKUSSION

Im Pinealorgan der Ratte, der Maus und des Syrischen Hamsters ist der nächtliche Anstieg der Melatoninsynthese entscheidend von der Aktivierung der cAMP-Signaltransduktionskaskade (von Gall et al., 2000; Klein et al., 1970; Santana et al., 1988) und von der transkriptionalen Regulation der *Aanat-mRNA* Menge abhängig (Coon et al., 1995; Gauer et al., 1999; Roseboom et al., 1998). Des Weiteren gibt es zahlreiche Untersuchungen, die eine Regulation der Transkription des *Aanat*-Gens durch zwei Transkriptionsfaktoren, dem Aktivator CREB und dem Inhibitor ICER, die durch die cAMP-Signaltransduktionskaskade aktiviert werden, zumindest in der Ratte und in der Maus bestätigt haben (von Gall et al., 2001; Roseboom und Klein 1995; Maronde et al., 1999). Die hier dargestellte Fluktuation des ICER Proteins im Pinealorgan des Syrischen Hamsters deutet auf eine Mitbeteiligung des inhibierenden Transkriptionsfaktors ICER bei der Hemmung der nächtlich erhöhten Melatoninsynthese auch in dieser Spezies hin, ähnlich wie dies bereits in der Ratte und der Maus gezeigt werden konnte (Foulkes et al., 1996; von Gall et al., 2000; Pfeffer et al., 1999; Maronde et al., 1999; Stehle et al., 1993).

Im Pinealorgan des Syrischen Hamsters sind die ICER Werte niedrig zum Beginn der Nacht und steigen zum Ende der Dunkelperiode an, unabhängig davon, ob die Tiere unter LD oder SD Bedingungen gehalten wurden. ICER Minimalwerte werden unter LD und SD Bedingungen jeweils 5 und 6 h nach Beginn der Dunkelperiode erreicht. Diese Beobachtung lässt vermuten, dass mit Beginn der Dunkelphase ein aktiver ICER Abbau gleichzeitig mit der NA-Ausschüttung aus den sympathischen Nervenendigungen stattfindet (Miguez et al., 1998; Steinlechner et al., 1984). Im Pinealorgan der Ratte konnte gezeigt werden, dass die Abwesenheit von ICER zu einer Desinhibition von cAMP-induzierbaren Genen führt (Maronde et al., 1999; Pfeffer et al., 1998, 2000; Stehle et al., 1993). Garidiou et al. Zeigte in einem Versuch am Syrischen Hamster bei Verabreichung eines Proteinsyntheseinhibitors in der zweiten Hälfte der Nacht, dass eine adrenerge Stimulation, also eine Aktivierung der *Aanat* Gen Expression und so auch der Melatoninsynthese, während des Tages möglich ist (Garidou et al., 2003). Die Beobachtung der nicht-Induzierbarkeit der Melatoninsynthese unter natürlichen Verhältnissen ist eine Besonderheit des syrischen Hamsters, welcher im Unterschied zur Ratte und der Maus einen während des ganzen Ta-

ges erhöhten ICER-Protein Spiegel aufweist. Wird der Proteinsynthese-Inhibitor erst 3 Stunden nach Licht an gegeben, ist eine adrenerge Stimulation während des Tages beim Syrischen Hamster nicht möglich (Garidou et al., 2003), da bereits in der ersten Stunde nach Lichtexposition der ICER Protein Spiegel so weit erhöht ist, dass seine inhibierende Wirkung nicht mehr durch den Proteinsyntheseinhibitor unterdrückt werden kann (s. Abb. 14). Wird dagegen der Proteinsyntheseinhibitors zum Ende der Nacht verabreicht, kann eine adrenerge Stimulation, also auch die Melatoninsynthese während des Tages induziert werden (Garidou et al., 2003). Diese Beobachtung kann zusammen mit unseren Ergebnissen die Beteiligung von ICER an der nicht-Induzierbarkeit der Melatoninsynthese beim Syrischen Hamster während des Tages erklären.

Bemerkenswert ist die kürzlich beschriebene Beteiligung einer proteosomalen- und NA-abhängigen Regulation eines transkriptionellen Inhibitors des *Aanat* Genes in Pinealozyten der Ratte (Terriff et al., 2005). Der Regelkreis der Ubiquitinvermittelten proteosomalen Proteolyse spielt eine entscheidende Rolle in der Regulation etlicher zellulärer Prozesse, wie zum Beispiel beim Zellzyklus, bei der Zelldifferenzierung, bei der Modulation der Zelloberflächenrezeptoren und Ionenkanälen, bei der Regulation der Immun- und Entzündungsantwort, bei der DNA-Reparatur, und schließlich auch bei der Regulation von Transkriptionsfaktoren. Im Pinealorgan der Ratte wird der AANAT Proteinspiegel außer durch eine transkriptionale und die translationale Regulation auch noch durch einen proteosomalen Abbau reguliert (Zheng et al., 2003; Ganguly et al., 2005). In stimulierten Pinealozyten wird AANAT durch die cAMP-abhängige Proteinkinase phosphoryliert und reagiert so mit dem Protein 14-3-3 (Ganguly et al., 2005). Diese Verbindung verhindert eine proteosomale Proteolyse von AANAT und erhöht somit die Enzymaktivität. Zum Ende der Dunkelphase wird dann schließlich AANAT dephosphoryliert und durch das Proteasom abgebaut (Gastel et al., 1998). Die Untersuchungen von Terriff et al., 2005 haben einen stimulierenden, als auch hemmenden Effekt auf den adrenerg regulierten AANAT Proteinspiegel bestätigt, welcher von dem Zeitpunkt der Proteasomaussetzung abhängig ist. Eine zusätzliche Behandlung der Pinealozyten mit Cyclohexamid, einem Proteinsyntheseinhibitor, führte zu einer Unterdrückung des inhibierenden Effektes des Proteasoms auf die *Aanat* Transkription (Terriff et al., 2005). Diese Beobachtung bestätigt die Vermittlung der proteosomalen Regulation der *Aanat* Transkription durch ein inhibierendes Protein. ICER ist als inhibierendes Protein am wahrscheinlichsten, da

es tagsüber synthetisiert wird und so beim Syrischen Hamster eine Hemmung der *Aanat* Transkription während des Tages, und einen Abbau des AANAT Spiegels zum Ende der Nacht, wenn ICER Werte ansteigen, bewirken könnte. Im Pinealorgan des Syrischen Hamsters erreicht das ICER Protein seinen Minimalwert exakt zum Zeitpunkt wenn die *Aanat* mRNA anfängt zu steigen, sowohl unter LD als auch unter SD Bedingungen (Garidou et al., 2003; Diaz et al., 2003). Der Zusammenhang zwischen niedrigen ICER Werten und einer Zunahme der cAMP sensitiven Genexpression im Pinealorgan des Syrischen Hamster wird durch die Tatsache unterstützt, dass die *Icer* mRNA ebenfalls nach 3 h in der Dunkelperiode zunimmt, unabhängig von der Photoperiode, unter der die Syrischen Hamster gehalten wurden (Diaz et al., 2003). Der schnelle Anstieg der *Icer* mRNA verglichen zu dem der *Aanat* mRNA lässt sich durch die beschriebene höhere Sensitivität des *Icer* Genes erklären (Pfeffer et al., 1999), welche auf das Vorhandensein von 4 CRE Promotor Elementen (Molina et al., 1993) im Vergleich zum *Aanat* Promotor, mit nur einem einzigen CRE Element zurückzuführen ist (Baler et al., 1997).

Wie auch in der Ratte und in der Maus, steigen die ICER Werte im Pinealorgan beim Syrischen Hamster bereits während der Nacht an. Die markantere Dynamik der ICER Werte der Hamster, welche einer kurzen Nacht (LD Bedingungen) ausgesetzt waren, im Vergleich zu der der SD Gruppe kann als Resultat einer früheren Stagnation der proteasomalen Proteolyse von ICER unter LD Bedingungen interpretiert werden. In diesem Zusammenhang ist es interessant, dass hypophysäre GH3-Zellen 3h nach Stimulation der cAMP Signaltransduktionskaskade einen Lactocystein-sensitiven proteasomalen Abbau von mehr als 50% des ICER Pools aufweisen (Folco und Koren 1997). Durch die rasche Proteolyse von ICER kann ein sofortige Umschaltung stattfinden, wodurch eine präzise Regulation der cAMP-induzierten transkriptionellen Antwort möglich wird und erklärt letztlich die beobachtete Situation im Pinealorgan des Syrischen Hamsters zu Beginn der Nacht.

Die hier präsentierten Daten lassen sich hervorragend in bereits erarbeitete Modelle der transkriptionellen Regulation des *Aanat* Gens und der posttranslationalen Mechanismen der Aktivierung der Melatoninsynthese beim Nagetier einfügen. Entscheidend ist jedoch, dass die signifikant erhöhten und während der gesamten Lichtperiode persistierenden ICER Werte die immer wieder beobachtete Unmöglichkeit der Stimulation der Melatoninsynthese im Pinealorgan des Syrischen Hamsters während des Tages erklärt.

6 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 im Tagesgang und während des Jahres antizipieren. Diese Innere Uhr sitzt bei Säugetieren im hypothalamischen Nucleus suprachiasmaticus (SCN) und generiert einen zirkadianen Rhythmus, der durch Signale des retino-hypothalamischen Traktes mit den Umweltbeleuchtungsbedingungen synchronisiert wird. Bei Wirbeltieren werden die Elemente, die an der Genierung von zirkadianen Zeitsignalen beteiligt sind zu einem spezifischen neuronalen Schaltkreis im Gehirn, dem photoneuroendokrinen System (PNS), zusammengefasst. Im PNS werden im Pinealorgan photoperiodische Signale in die zirkadian rhythmische Synthese des Neurohormons Melatonin umgesetzt. Dabei ist die vom zentralen Oszillator im SCN gesteuerte Freisetzung von Noradrenalin (NA) aus sympathischen postganglionären Nervenfasern in das Pinealorgan der entscheidende Reiz zur nächtlichen Ankerbelegung der Melatoninbiosynthese. Melatonin wird ausschließlich in der Nacht gebildet und fungiert daher als ein Zeithormon. Unmittelbar nach der Synthese wird Melatonin in die Blutbahn abgegeben und liefert allen Zellen, die mit spezifischen Melatoninrezeptoren ausgestattet sind, die aktuelle Licht- und Zeitinformationen. NA bewirkt in allen untersuchten Säugetieren die Aktivierung des Schlüsselenzyms der Melatoninsynthese, der Arylalkylamin *N*-Acetyltransferase (AANAT). Die Transkription der *Aanat* wird durch eine cAMP-abhängige Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors CREB (cyclicAMP response element binding protein) eingeleitet. Der inhibitorische Transkriptionsfaktor ICER (inducible cAMP early repressor) ist in die Abschaltung der erhöhten Melatoninsynthese am Ende der Nacht involviert. Die Transkription von *Icer* erfolgt ebenfalls durch die NA-induzierte Aktivierung der cAMP-Signalkaskade.

In Säugetieren, persistiert der Rhythmus der Melatoninausschüttung, wenn das Tier unter konstanter Dunkelheit gehalten wird, wird aber durch eine akute Lichtexposition während der Nacht unterdrückt. Beim Syrischen Hamster ist die photoperiodische Abhängigkeit der Melatoninsynthese für die Hemmung der hypothalamo-hypophysären-gonadalen Achse mit Beginn des Herbstes notwendig und sichert den optimalen Zeitpunkt z.B. für die saisonale Reproduktion, den Winterschlaf, die Migra-

tion oder den täglichen Schlaf. Allerdings kann im Unterschied zu Ratte und Maus beim Syrischen Hamster kein Anstieg der Melatoninkonzentration im Pinealorgan während des Tages induziert werden.

Ziel dieser Arbeit war es deshalb, die fehlende Induzierbarkeit der Melatoninsynthese während des Tages beim Syrischen Hamster besser zu verstehen, und zu untersuchen, ob auch im Pinealorgan des Syrischen Hamsters, wie bei Ratte und Maus, der inhibitorische Transkriptionsfaktor ICER vorkommt und reguliert ist. Um die Nicht-Induzierbarkeit der Melatoninsynthese zu erklären wurde eine eventuelle Abhängigkeit der ICER Menge im Pinealorgan von der Photoperiode untersucht.

Die Unterdrückung der Funktion der hypothalamo-hypophysären-gonadalen Achse unter Kurztag Photoperiode wurde durch die Gewichtsabnahme der Gonadengewichte bestätigt. Die immunhistochemische Analyse bestätigte das Vorkommen des ICER Proteins im Pinealorgan des Syrischen Hamsters und es konnte eine statistisch signifikante Korrelation zwischen der Dauer der Lichtperiode und der Expression des ICER Proteins gezeigt werden. Bei einer Langtag Photoperiode von 16 h Licht wurde ein schnellerer Anstieg und insgesamt höhere ICER Protein Werte als bei der Kurztag Photoperiode beobachtet. Unabhängig von der Photoperiode, waren die ICER Werte niedrig zum Beginn der Nacht und stiegen zum Ende der Nacht an. ICER Minimalwerte wurden in beiden Photoperioden 5 und 6 h nach Beginn der Dunkelperiode beobachtet und lassen sich durch einen aktiven Abbau erklären, der zeitgleich mit der NA-Ausschüttung aus den sympathischen Nervenendigungen stattfindet. Während der gesamten Lichtphase zeigte sich unabhängig von der Photoperiode ein erhöhter ICER Proteinspiegel im Pinealorgan des Syrischen Hamsters, der möglicherweise die Stimulation der Melatoninsynthese während des Tages im Unterschied zur Ratte und der Maus nicht ermöglicht.

Die hier präsentierten Daten lassen sich gut in bereits erarbeitete Modelle der transkriptionellen Regulation des *Aanat* Gens und der posttranslationellen Mechanismen in der Regulation der Melatoninsynthese beim Nager einfügen. Sie zeigen, dass auch beim Syrischen Hamster die transkriptionelle Regulation der Melatoninbiosynthese eine wichtige Rolle zu spielen scheint und das darin offensichtlich der inhibitorische Transkriptionsfaktor des cAMP Signaltransduktionsweges, ICER, ähnlich wie bei Maus und Ratte, involviert ist. Weiterhin könnte die erhöhte Präsenz von ICER während des Tages erklären, warum zu dieser Zeit eine Aktivierung des cAMP-Signaltransduktionsweges nicht zu einem Anstieg der Melatoninbiosynthese führt.

7 ABSTRACT

The daily and seasonal variation in lighting conditions implies for all biological organisms a regularly occurring and fundamental change of their living conditions. With the help of an internal circadian clock animals are able to anticipate the environmental changes of day and night, and season. This internal clock resides in mammals in the hypothalamic suprachiasmatic nucleus (SCN) and is entrained to ambient lighting conditions and by signals stemming from the retino-hypothalamic tract. In vertebrates, the circadian time managing structures are compiled in a neuronal circuit in the brain, the photoneuroendocrine system (PNS). Within the PNS the pineal gland is an important element, where circadian neuronal cues are converted into the nocturnally elevated synthesis of the hormone melatonin. This regulation of melatonin synthesis is triggered by the nocturnal release of norepinephrine (NE) from sympathetic fibers, and is under the control of the endogenous biological clock located in the SCN. Melatonin is synthesized exclusively during the night and serves therefore as a time hormone. Directly after its synthesis melatonin is released into the bloodstream and provides all cells which are equipped with highly specific melatonin receptors with the information of daytime. In all investigated mammals, NE induces the key enzyme of melatonin synthesis, the arylalkylamine *N*-acetyltransferase (AANAT). Activation of *Aanat* transcription is induced by phosphorylation of the transcription factor CREB (cyclic-AMP response element binding protein). At the end of the night the inhibitory transcription factor ICER (inducible cAMP early repressor) is involved in the shut down of the elevated melatonin synthesis. Transcription of *Icer* is induced likewise to *Aanat* by an activation of the cAMP-signaling cascade. In mammals melatonin synthesis persists under conditions of constant darkness, but it is suppressed by an acute light exposure when occurring during the night.

In the Syrian Hamster the photoperiodic dependent melatonin synthesis is necessary for the inhibition of the hypothalamus-pituitary-gonadal axis and ensures the ideal time for sexual activity, breeding, migration or daily sleep. However, in contrast to the rat and the mouse it is not possible in Syrian hamster to induce melatonin synthesis during day time in the pineal gland.

Therefore, the aim of this study was to better understand the missing inducibility of melatonin synthesis during day time in the Syrian hamster, and to investigate

whether an inhibitory transcription factor ICER can be found in the pineal gland and is under circadian regulation, likewise to rat and mouse. To explain the missing inducibility of melatonin synthesis in the pineal gland, a dependency of ICER amount from the prevailing photoperiod was investigated. Inhibition of the hypothalamus-pituitary-gonadal axis under short day photoperiod was shown by a statistical significant reduction of the gonadal weight. The immunocytochemical analysis proofed the existence of ICER protein in the pineal gland of the Syrian hamster and it was possible to demonstrate a statistical significant correlation between the duration of the light period and the expression pattern of ICER protein. A faster rise at the beginning of the dark period and higher ICER protein levels were found in animals kept under long day photoperiod (16 h light), as compared to short day photoperiod there. ICER values were low at the beginning of the night and increased at the end of the night, independent of the prevailing photoperiod. ICER showed minimal values under both photoperiods at 5 h and 6 h after the beginning of the night. This can be explained by an active ICER degradation, occurring simultaneously to NE-release from the sympathetic fibers. During the whole light period ICER protein values were elevated in the pineal gland of the Syrian hamster, independent of the photoperiod. This could explain the inability of the Syrian Hamster to synthesis melatonin in contrast to rat or mouse.

Here presented data can be nicely fitted into current concepts of a transcriptional regulation of the *Aanat* gene of the melatonin synthesis in the rodent pineal gland. They show that also in the Syrian hamster a transcriptional regulation of melatonin synthesis seems to be of central importance, with an involvement of the inhibitory transcription factor ICER, likewise to rat and mouse. In addition, elevated ICER levels during daytime in the Syrian hamster pineal gland can explain, why during this period an activation of the cAMP-signalling pathway does not lead to an elevated melatonin synthesis in this species.

8 LITERATURVERZEICHNIS

- Ackermann K, Stehle JH (2006) Melatonin synthesis in the human pineal gland: advantages, implications, and difficulties. *Chronobiol Int.* 23: 369-79.
- Armstrong RC, Montminy MR (1993) Transsynaptic control of gene expression. *Ann Rev Neurosci* 16: 17-29.
- Axelrod J, Weissbach H (1960) Enzymatic O-methylation of N-acetyl-serotonin to melatonin. *Science* 131: 1312.
- Baler R, Covington S, Klein DC. (1997) The rat arylalkylamine N-acetyltransferase gene promoter. cAMP activation via a cAMP-responsive element-CCAAT complex. *J Biol Chem* 272: 6979-6985.
- Berndtson WE, Desjardins C (1974) Circulating LH and FSH levels and testicular function in hamsters during light deprivation and subsequent photoperiodic stimulation. *Endocrinology* 95: 195-205.
- Borjigin J, Wang MM und Snyder SH (1995) Diurnal variation in mRNA encoding serotonin N-acetyltransferase in the pineal gland. *Nature* 378: 783-785.
- Cassone VM, Roberts MH und Moore MY (1987) Melatonin inhibits metabolic activity in the rat suprachiasmatic nuclei. *Neurosci Lett* 81: 29-34.
- Cassone VM, Roberts MH und Moore MY (1988). Effects of melatonin on 2-deoxyglucose uptake within the rat suprachiasmaticus. *Am J Physiol* 225: R332-R337.
- Chen KD, Chen LY, Huang HL, Lieu CH, Chang YN, Chang MD, Lai YK (1998) Involvement of p38 mitogen-activated protein kinase signalling pathway in the rapid induction of the 78- kDa glucose- regulated protein 9L rat brain tumor cells. *J Biol Chem* 273: 749-755.
- 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 *Macaca mulatta*: focus on arylalkylamine N-acetyltransferase (EC 2.3.1.87). *J Clin Endocrinol Metab* 87: 4699-706.
- Craft CM, Morgan WW, Reiter FJ (1984) 24-Hour changes in catecholamine synthesis in rat and hamster pineal glands. *Neuroendocrinology* 38: 193-8.
- Diaz E, Garidou ML, Dardente H, Salingre A, Pevet P, Simonneaux V. (2003) Expression and regulation of *Icer* mRNA in the Syrian hamster pineal gland. *Brain Res Mol Brain Res* 112: 163-169.
- Drijfhout WA, van der Linde S, Kooi C, Grol B und Westerink BHC (1996) Norepinephrine release in the rat pineal gland: the input from the biological clock measured by in vivo microdialysis. *J Neurochem* 66: 748-755.
- Dubocovich ML (1995) Melatonin receptors: are there multiple subtypes? *Trends Pharmacol Sci* 16: 50-56.

- Folco EJ, Koren G. (1997) Degradation of the inducible cAMP early repressor (ICER) by the ubiquitin-proteasome pathway. *Biochem J* 328: 37-43.
- Foulkes NS, Borrelli E und Sassone-Corsi P (1991) CREM gene: use of alternative DNA-binding domains generates multiple antagonists of cAMP-induced transcription. *Cell* 64: 739-749
- Foulkes NS, Sassone-Corsi P. (1996) Transcription factors coupled to the cAMP-signalling pathway. *Biochim Biophys Acta* 1288: 101-121.
- Ganguly S, Weller JL, Ho A, Chemineau P, Malpoux B, Klein DC (2005) Melatonin synthesis: 14-3-3-dependent activation and inhibition of arylalkylamine N-acetyltransferase mediated by phosphoserine-205. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 102: 1222-7. Epub 2005 Jan 11.
- Garidou ML, Diaz E, Calgari C, Pevet P, Simonneaux V.(2003) Transcription factors may frame Aa-nat gene expression and melatonin synthesis at night in the Syrian hamster pineal gland. *Endocrinology* 144: 2461-2472.
- Gastel JA, Roseboom PH, Rinaldi PA, Weller JL, Klein DC. (1998) Melatonin production: proteasomal proteolysis in serotonin N-acetyltransferase regulation. *Science* 279:1358-60.
- Gaston S, Menaker M (1967) Photoperiodic control of hamster testis. *Science* 158: 925-8.
- Gauer F, Masson-Pevet M, Pevet P (1994) Seasonal regulation of melatonin receptors in rodent pars tuberalis: correlation with reproductive state. *J Neural Transm Gen Sect* 96: 187-95.
- Gaurer F, Poirel VJ, Garidou ML, Simonneaux V, Pevet P (1999) Molecular cloning of the arylalkylamine-N-acetyltransferase and daily variations of its mRNA expression in the Syrian hamster pineal gland. *Brain Res Mol Brain Res* 71: 87-95.
- Gonzales GA, Menzel P, Leonard J, Fischer WH, und Montminy MR (1989) A cluster of phosphorylation sites on the cyclic AMP-regulated nuclear factor CREB predicted by its sequence. *Nature* 337: 749-752
- Gonzalez GA, Menzel P, Leonard J, Fischer WH, Montminy MR (1991) Characterization of motifs which are critical for activity of the cyclic AMP-responsive transcription factor CREB. *Mol Cell Biol* 11:1306-12.
- Green DJ, Gilette R (1982) Circadian rhythm of firing rate recorded from single cells in the rat suprachiasmatic slide. *Brain Res* 245: 283-288.
- Hagiwara M, Brindle P, Harootunian A, Armstrong R, Rivier J, Vale W, Tsien R und Montminy M (1993) Coupling of hormonal stimulation and transcription via the cyclic AMP-responsive factor CREB is rate limited by nuclear entry of protein kinase A. *Mol Cell Biol* 13: 4852-4859.

- Hastings MH, Reddy AB, Garabette M, King VM, Chahad-Ehlers S, O'Brien J, Maywood ES (2003) Expression of clock gene products in the suprachiasmatic nucleus in relation to circadian behaviour. *Novartis Found Symp* 253: 203-17; discussion 102-9, 218-22, 281-4. Review.
- Hoffman RA, Hester RJ, Towns C (1965) Effect of light and temperature on the endocrine system of the golden hamster (*Mesocricetus auratus* Waterhouse). *Comp Biochem Physiol* 15: 525-33.
- Honrado GI, Bird M, Fleming AS (1991) The effects of short day exposure on seasonal and circadian reproductive rhythms in male golden hamsters. *Physiol Behav* 49: 277-87.
- Hunter T, Karin M (1992) The regulation of transcription by phosphorylation. *Cell* 70: 375-387.
- Illnerova H, Sumova A (1997) Photic entrainment of the mammalian rhythm in melatonin production. *J Biol Rhythms* 12: 547-55. Review
- Kell CA, Deghani F, Wicht H, Molina CA, Korf HW, Stehle JH. (2004) Distribution of transcription factor inducible cyclicAMP early repressor (ICER) in rodent brain and pituitary. *J Comp Neurol* 478:379-394.
- Kalsbeek A, Palm IF, La Fleur SE, Scheer FA, Perrau-Lenz S, Ruitter M, Kreier F, Cailotto C, Buijs RM (2006) SCN outputs and the hypothalamic balance of life. *J Biol Rhythms* 21: 458-69. Review.
- Klein DC, Berg GR. (1970) Pineal gland: stimulation of melatonin production by norepinephrine involves cyclic AMP-mediated stimulation of N-acetyltransferase. *Adv Biochem Psychopharmacol* 3: 241-263.
- Klein DC, Weller JL (1970) Indole metabolism in the pineal gland: a circadian rhythm in N-acetyltransferase. *Science* 169: 1093-1095.
- Klein DC (1985) Photoneural regulation of the mammalian pineal gland. In: *Photoperiodism, Melatonin and the Pineal*. D. Evered, S. Clark, Ed. London: Pitman, pp. 38-56.
- Klein DC, Moore RY, Reppert SM (1991) *Suprachiasmatic Nucleus: The Mind's Clock*. D.C. Klein, R.H. Moore, S.M. Reppert, Eds. New York: Oxford University Press, pp.1-467.
- Klein DC, Coon SL, Roseboom PH, Weller JL, Bernard M, Gastel JA, Zatz M, Iuvone 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. *Recent Prog Horm Res.*, 52:307-57.
- Koch M, Mauhin V, Stehle JH, Schomerus C, Korf HW. (2003) Dephosphorylation of pCREB by protein serine/threonine phosphatases is involved in inactivation of Aanat gene transcription in rat pineal gland. *J Neurochem* 85: 170-179.
- Korf HW, Oksche A, Ekström P, Zigler JS, Gery I und Klein DC (1986) Pinealocyte projections into the mammalian brain revealed with S-antigen antiserum. *Science* 231: 735-737.

- Korf H-W (1994) The pineal organ as a component of the biological clock. *Ann N.Y. Acad. Sci* 719: 13-42.
- Korf HW, Schomerus C und Stehle JH (1998) The Pineal Organ, Its Hormone Melatonin and the Photoneuroendocrine System. In: *Advances in Anatomy Embryology and Cell Biology*, Vol 146, Springer-Verlag, Berlin.
- Korf HW, von Gall C, Stehle J. (2003) The circadian system and melatonin: lessons from rats and mice. *Chronobiol Int* 20: 697-710.
- Landschultz WH, Johnson PF, McNight SL (1988) The leucine zipper protein. A hypothetical structure common to a new class of DNA-binding proteins *Science* 240: 1759-1764
- Lipton JS, Petterborg LJ, Reiter RJ (1981) Influence of propranolol, phenoxybenzamine or phentolamine in the in vivo nocturnal rise of pineal melatonin levels in the Syrian hamster. *Life Sci* 28: 2377-82.
- Lipton JS, Petterborg LJ, Steinlechner S, Reiter RJ (1982) In vivo responses of the pineal gland of the Syrian hamster to isoproterenol or norepinephrine. *Prog Clin Biol Res* 92: 107-15.
- Lovenberg W, Jequier E und Sjoerdsma A (1967) Tryptophan hydroxylation: measurement in pineal gland, brain stem and carcinoid tumor. *Science* 248: 1547-1550.
- Maronde E, Pfeffer M, von Gall C, Dehghani F, Schomerus C, Wicht H, Kroeber S, Olcese J, Stehle JH, Korf HW. (1999) Signal transduction in the rodent pineal organ. From the membrane to the nucleus. *Adv Exp Med Biol* 460: 109-131.
- Maronde E, Pfeffer M, Olcese J, Molina CA, Schlotter F, Dehghani F, Korf HW, Stehle JH. (1999) 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. (1999) 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.
- Masson-Pevet M, Gauer F (1994) Seasonality and melatonin receptors in the pars tuberalis in some long day breeders. *Biol Signals*;3: 63-70.
- Miguez JM, Recio J, Vivian-Roels B, Pevet P (1995) Daily variation in the content of indoleamines, catecholamines and related compounds in the pineal gland of Syrian hamsters kept under long and short photoperiods. *J Pineal Res* 19: 139-48.
- Miguez JM, Recio J, Sanchez - Barcelo E, Aldegunde M. (1998) Changes with age in daytime and nighttime contents of melatonin, indoleamines, and catecholamines in the pineal gland: a comparative study in rat and Syrian hamster. *J Pineal Res* 25:106-115.

- 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.
- Morgan PJ, Barrett P, Howell HE und Helliwell R (1994) Melatonin receptors: localization, molecular pharmacology and physiological significance. *Neurochem Int* 24: 101-146.
- Morgan PJ, Williams LM (1996) The pars tuberalis of the pituitary: a gateway for neuroendocrine output. *Rev Reprod* 1: 153-161.
- 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 Neuro*.146: 1-14.
- Moore RY (1973) Retinohypothalamic projection in mammals: a comparative study. *Brain Res* 51: 403-409.
- Montminy MR, Gonzalez GA, Yamamoto KK (1990) Regulation of cAMP-inducible genes by CREB. *Trends Neurosci* 13: 184-8. Review.
- Nakazawa K, Marubayashi U, McCann SM. (1991) Mediation of the short-loop negative feedback of luteinizing hormone (LH) on LH-releasing hormone release by melatonin-induced inhibition of LH release from the pars tuberalis. *Proc.Natl.Acad.Sci USA* 88: 7576-7579.
- Nelson RJ, Zucker I (1987) Spontaneous testicular recrudescence of Syrian hamsters: role of stimulatory photoperiods. *Physiol Behav.* 39: 615-7.
- Oksche A (1983) Aspects of evolution of the pineal organ. In: *The Pineal Gland and its endocrine Role.* J Axelrod, F Fraschini, GP Velo (Eds) New York: Plenum Press, pp 15-35.
- Pangerl B, Pangerl A, Reiter RJ (1990) Circadian variations of adrenergic receptors in the mammalian pineal gland: a review. *J Neural Transm Gen Sect* 81: 17-29. Review.
- Panke ES, Rollag MD, Reiter RJ (1979) Pineal melatonin concentrations in the Syrian hamster. *Endocrinology*104: 194-7.
- Paul MJ, George NT, Zucker I, Butler MP (2007) Photoperiodic and hormonal influences on fur density and regrowth in two hamster species. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 293: R2363-9. Epub 2007 Sep 26.
- 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: 279-89.
- Pfeffer M, Stehle JH. (1998) Ontogeny of a diurnal rhythm in arylalkylamine-N acetyltransferase mRNA in rat pineal gland. *Neurosci Lett* 248: 163-166.
- Pittendrigh CS (1960) Circadian rhythms and the circadian organization of living systems. *Cold Spring Harbor Symp Quant Biol* 25: 159-184.

- Pittendrigh CS (1981) Circadian Systems: General perspective. In: J Aschoff (Ed) *Biological Rhythms*, New York: Plenum Press, pp 57-80
- Redmann JR, Armstrong SM, NGg KT (1983) Freerunning activity rhythms in the rat: entrainment by melatonin. *Science* 219: 1089-1091.
- Reiter RJ, Hester RJ (1966) Interrelationships of the pineal gland, the superior cervical ganglia and the photoperiod in the regulation of the endocrine systems of hamsters. *Endocrinology* 79: 1168-70.
- Reiter RJ, Hurlbut EC, Tannenbaum MG, Troiani ME. (1987) Melatonin synthesis in the pineal gland of the Richardson's ground squirrel (*Spermophilus richardsonii*): influence of age and insulin induced hypoglycemia. *J Neural Transm* 70: 125-136.
- Reiter RJ, Vaughan GM, Oaknin S, Troiani ME, Cozzi B, Li K. (1987) Norepinephrine or isoproterenol stimulation of pineal N-acetyltransferase activity and melatonin content in the Syrian hamster is restricted to the second half of the daily dark phase. *Neuroendocrinology* 45: 249-56.
- Reiter RJ (1991) Pineal gland: Interface between the photoperiodic environment and the endocrine system. *Trends Endocr Med.* 1: 13-19.
- Rollag MD, Chen HJ, Ferguson BN, Reiter RJ (1979) Pineal melatonin content throughout the hamster estrous cycle. *Proc Soc Exp Biol Med* 162: 211-3.
- Rollag MD, Panke ES, Trakulrungsi W, Trakulrungsi C, Reiter RJ (1980) Quantification of daily melatonin synthesis in the hamster pineal gland. *Endocrinology* 106: 231-6.
- Romero JA, Zatz M, Kebabian JW und Axelrod (1975) Circadian cycles in binding of 3H-alprenolol to β -adrenergic receptor sites in rat pineal. *Nature* 258: 435-436.
- 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 und 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: 3033-3044.
- Roseboom PH, Namboodiri MA, Zimonjic DB, Popescu NC, Rodriguez IR, Gastel JA, Klein DC. (1998) Natural melatonin 'knockdown' in C57BL/6J mice: rare mechanism truncates serotonin N-acetyltransferase. *Brain Res Mol Brain Res* 63: 189-197.
- Santana C, Guerrero JM, Reiter RJ, Troiani ME. (1988) The in vitro activation of cyclic AMP production by either forskolin or isoproterenol in the Syrian hamster pineal during the day is not accompanied by an increase in melatonin production. *Biochem Biophys Res Commun* 157: 930-936.

- Schomerus C, Laedtke E und Korf H-W (1995) Calcium responses of isolated, immunocytochemically identified rat pinealocytes to noradrenergic, cholinergic and vasopressinergic stimulations. *Neurochem. Int.* 27: 163-175
- Schomerus C, Laedtke E, Olcese J, Weller JL, Klein DC, Korf HW (2002) Signal transduction and regulation of melatonin synthesis in bovine pinealocytes: impact of adrenergic, peptidergic and cholinergic stimuli. *Cell Tissue Res* 309: 417-28. Epub 2002 Aug 14.
- Sheng M, Thompson MA und Greenberg ME (1991) CREB. A Ca^{2+} -regulated transcription factor phosphorylated by calmodulin-dependent kinases. *Science* 252: 1427-1430.
- Shibata S, Cassone VM und Moore RY (1989) Effects of melatonin on neuronal activity in the rat suprachiasmatic nucleus in vitro. *Neurosci Lett.* 97: 140-144.
- Simonneaux V, Ribelayga C (2003) Generation of the melatonin endocrine message in mammals: a review of the complex regulation of melatonin synthesis by norepinephrine, peptides, and other pineal transmitters. *Pharmacol Rev* 55: 325-95. Review.
- 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.
- Stehle J, Vanecek J, Vollrath L (1989) Effects of melatonin on spontaneous electrical activity in rat suprachiasmatic nuclei: an in vitro ionophoretic study. *J. Neural Transm* 78: 173-178.
- Stehle JH, Foulkes NS, Molina CA, Simonneaux V, Pevet P, Sassone Corsi P. (1993) Adrenergic signals direct rhythmic expression of transcriptional repressor CREM in the pineal gland. *Nature* 365: 314-320.
- Stehle JH, Foulkes N, Pévet P und Sassone-Corsi P (1995) Developmental maturation of pineal gland function: synchronized CREM inducibility and adrenergic stimulation. *Mol. Endocrinol.* 9: 706-716.
- Stehle JH, von Gall C, Schomerus C, Korf HW (2001) Of rodents and ungulates and melatonin: creating a uniform code for darkness by different signaling mechanisms. *J Biol Rhythms* 16: 312-325.
- Stephan FK, Zucker I (1972) Circadian rhythms in drinking behaviour and locomotor activity of rats are eliminated by hypothalamic lesions. *Proc Natl Acad Sci USA* 69: 1583-1586.
- Stetson MH, Rollag MD, Watson-Whitmyre M, Tate-Ostroff B (1983) Role of the pineal and its hormone melatonin in the termination of photorefractoriness in golden hamsters. *Biol Reprod.* 29:689-96.
- Steinlechner S, King TS, Champney TH, Spaniel-Borowski K, Reiter RJ. (1984) Comparison of the effects of beta-adrenergic agents on pineal serotonin N-acetyltransferase activity and melatonin content in two species of hamsters. *J Pineal Res* 1: 23-30.

- Steinlechner S, King TS, Champney TH, Richardson BA, Reiter RJ (1985) Pharmacological studies on the regulation of N-acetyltransferase activity and melatonin content of the pineal gland of the Syrian hamster. *J Pineal Res* 2: 109-19.
- Sugden D, Vanecek J, Klein DC, Thomas TP und Anderson W (1985) Action of protein kinase C potentiates isoprenaline-induced cyclic AMP accumulation in rat pinealocytes. *Nature* 314: 359-361.
- Tamarkin L, Reppert SM, Klein DC. (1979) Regulation of pineal melatonin in the Syrian hamster. *Endocrinology* 104: 385-389.
- 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.
- Terriff DL, Chik CL, Price DM, Ho AK. (2005) Proteasomal proteolysis in the adrenergic induction of arylalkylamine-N-acetyltransferase in rat pinealocytes. *Endocrinology* 146: 4795-4803.
- Vanecek J, Illnerova H (1982) Effect of light at night on the pineal rhythm in N-acetyltransferase activity in the Syrian hamster *Mesocricetus auratus*. *Experientia* 38: 513-4.
- Vanecek J, Sugden D, Weller J und Klein DC (1985) Atypical synergistic α 1- and β 1-adrenergic regulation of adenosine 3', 5'-monophosphate in cultured rat pinealocytes. *Endocrinology* 116: 2167-2173.
- Vanecek J, Pavlik A, Illnerova H (1987) Hypothalamic melatonin receptor sites revealed by autoradiography. *Brain Res* 435: 359-363.
- Vanecek J (1988) Melatonin binding sites. *J Neurochem* 51: 1436-1440.
- Vollrath L, Semm P, Gammel G (1980) Sleep induction by intranasal application of melatonin. In *Melatonin-current studies and perspectives. Advances in Biosciences, Vol 29*. N. Birau und W. Schlot (Eds.), Pergamon Press, London, pp 327-331.
- 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.
- von Gall C, Schneider-Huther I, Pfeffer M, Dehghani F, Korf HW, Stehle JH. (2001) Clock gene protein mPER1 is rhythmically synthesized and under cAMP control in the mouse pineal organ. *J Neuroendocrinol* 13: 313-316.
- von Gall C, Garabette ML, Kell CA, Frenzel S, Dehghani F, Schumm-Draeger PM, Weaver DR, Korf HW, Hastings MH, Stehle JH. (2002) Rhythmic gene expression in pituitary depends on heterologous sensitization by the neurohormone melatonin. *Nat Neurosci* 5: 234-238.

- Weaver DR, Rivkees SA, Carlson LL, Reppert SM (1991) Localization of melatonin receptors in mammalian brain. In: *Suprachiasmatic nucleus: The Minds Clock*. D.C. Klein, R.Y. Moore und S.M. Reppert (Eds.), Oxford University Press, Oxford, pp.289-308.
- Weaver D, Stehle J, Stopa E, Reppert S (1993) Melatonin receptors in human and monkey hypothalamus and pituitary: implications for circadian and reproductive responses to melatonin. *J Clin Endocrin Metab* 76: 295-301.
- Weaver DR, Reppert SM (1989), Maternal communication of daylength information to the fetus. In *Development of circadian rhythmicity and photoperiodism in mammals*, S.M. Reppert (Ed), Perinatology Press Ithaca, pp. 209-217.
- Weaver DR (1999) The roles of melatonin in development. *Adv Exp Med Biol* 460: 199-214. Review.
- Weissbach H, Redfield BG, Axelrod J (1960) Biosynthesis of melatonin: enzymatic conversion of serotonin to N-acetylserotonin. *Biochim. Biophys. Acta* 43: 352-353.
- Yamamoto KK, Gonzalez GA, Biggs WH 3rd, Montminy MR (1988) Phosphorylation-induced binding and transcriptional efficacy of nuclear factor CREB. *Nature*. 334: 494-8.
- Zatz M, Romero JA, Axelrod J (1976) Diurnal variation in requirement for RNA synthesis in the induction of pineal N-acetyltransferase. *Biochem Pharmacol* 25: 903-906.
- Zheng W, Cole PA (2003) Novel bisubstrate analog inhibitors of serotonin N-acetyltransferase: the importance of being neutral. *Bioorg Chem* 31: 398-411.

9 DANKSAGUNG

Zunächst möchte ich mich ganz herzlich bei meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Jörg H. Stehle, Dr. Senckenbergische Anatomie der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt/M, für die Bereitstellung des Themas und für seine umfassende Unterstützung bedanken. Seine intensive Betreuung, Anregungen und Ratschläge waren für die Vollendung dieser Arbeit unerlässlich. Bedanken möchte ich mich auch ganz herzlich für die Zusammenarbeit zur Fertigstellung der Veröffentlichung: „Transcription factor dynamics in pineal gland and liver of the Syrian hamster (*Mesocricetus auratus*) adapts to prevailing photoperiod“ bei Prof. Dr. Jörg H. Stehle und Prof. Dr. Erik Maronde und Dr. Martina Pfeffer.

Des weiteren möchte mich ganz herzlich bedanken für sowohl praktische, als auch inhaltliche Ratschläge bei Gabi Stieß, Dr. Antje Jilg, PD Dr. Faramarz Deghani, Prof. Dr. Horst-Werner Korf.

Abschließend möchte ich mich auch bei meinem Vater Burckhard Glass ganz herzlich bedanken, der mir als Mathematiker bei der statistischen Auswertung immer zur Seite stand, bei meiner Frau Dr. Bettina Dannewitz, die mir in der Formatierung und letztlich in der Fertigstellung dieser Arbeit eine große Hilfe war und schließlich bei meinem Sohn Noah und bei meiner Mutter Elisabeth Glass, die mir immer wieder Antrieb gaben.

10 VERÖFFENTLICHUNGEN

Maronde E*, Pfeffer M*, Glass Y*, Stehle JH (2007) Transcription factor dynamics in pineal gland and liver of the Syrian hamster (*Mesocricetus auratus*) adapts to prevailing photoperiod. *J Pineal Res.* 43:16-24.

* gemeinsame Erstautorenschaft

POSTER

Daily and Photoperiodic Changes in ICER Protein Levels in the Syrian Hamster Pineal Gland

X. EPBRS Congress, Frankfurt/M 1–5 September 2005

11 EHRENWÖRTLICHE ERKLÄRUNG

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Medizin zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel: Untersuchung zur diurnalen und photoperiodischen Fluktuation des ICER-Proteinspiegels im Pinealorgan des Syrischen Hamsters

im Zentrum der Morphologie des Klinikums der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main, Institut für Anatomie III
unter Leitung von Prof. Dr. rer. nat. J. H. Stehle
ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Ich habe bisher an keiner in- oder ausländischen Medizinischen Fakultät ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht noch die vorliegende Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Vorliegende Arbeit wurde in folgendem Publikationsorgan:
Maronde E*, Pfeffer M*, Glass Y*, Stehle JH (2007) Transcription factor dynamics in pineal gland and liver of the Syrian hamster (*Mesocricetus auratus*) adapts to prevailing photoperiod. *J Pineal Res.* 43:16-24
Veröffentlicht.

Frankfurt am Main, den 04.07.2008

(Unterschrift)

12 LEBENSLAUF

Yuri Carsten Glass

Lutherstrasse 53/1
69120 Heidelberg
Tel.: 06221 400321

Persönliche Daten

geboren am 17.08.1976 in Valencia, Spanien
Familienstand verheiratet, ein Sohn

Schulischer Werdegang

1983-1987	Besuch der August-Gräßer-Schule in Frankfurt
1987-1993	Besuch des Helene-Lange-Gymnasium
1993-1994	Auslandsjahr in der Monterey-Bay-Academy, CA, USA
1994-1996	Besuch des Gymnasium Marienhöhe, Darmstadt
10.06.1996	Erwerb der Allgemeinen Hochschulreife am Gymnasium Marienhöhe, Darmstadt
1996-1997	Zivildienst an den Praunheimer Werkstätten

Universitärer Werdegang

Zum WS 1997/98	Immatrikulation an der Johann-Wolfgang Goethe Universitätsklinik Frankfurt für das Fach Zahnmedizin
01.09.1998	Naturwissenschaftliche Vorprüfung in Frankfurt
20.03.2000	Zahnärztliche Vorprüfung in Frankfurt
04.12.2002	Zahnärztliche Prüfung in Frankfurt
17.02.2002	Approbation als Zahnarzt

Beruflicher Werdegang

2003-2004	Vorbereitungsassistent in der Praxis Dr. Trumm in Hanau
2004-2005	Weiterbildungsassistent in der Mund-Kiefer-Chirurgischen Praxis Dr. Dr. Stepke
2005-06/2006	Wissenschaftlicher Mitarbeiter in der Poliklinik für Zahnerhaltungskunde, ZZMK-Carolinum, Johann-Wolfgang Goethe Universitätsklinik
Seit 07/2006	Weiterbildungsassistent der Oralchirurgie in der Poliklinik für Zahnärztliche Chirurgie und Implantologie, ZZMK-Carolinum, Johann Wolfgang Goethe-Universität