

**Aus dem Institut für Anatomie und Zellbiologie
an der Medizinischen Fakultät
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg**
(Direktor: Prof. Dr. Dr. Bernd Fischer)

**Molekularbiologische Untersuchungen an
Melatonin-Rezeptor-*knockout*-Mäusen**

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Medizin (Dr. med.)

vorgelegt
der Medizinischen Fakultät
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Elena Groß (geb. Michajlov)

geboren am 01.02.1982

in Uschtobe

Betreuer: Prof. Dr. Elmar Peschke

Gutachter:

Prof. E.Peschke

PD D.Weinert

Prof. S. Steinlecher (Hannover)

Datum der Eröffnung des Promotionsverfahrens: 06.04.2010

Datum der Verteidigung: 30.07.2010

Referat und bibliographische Beschreibung

Die Anzahl der an Diabetes mellitus Typ 2-erkrankten Menschen steigt jährlich an. Ursächlich für die steigende Prävalenz der Erkrankung werden genetische Faktoren, aber auch Über- und Fehlernährung sowie Bewegungsmangel verantwortlich gemacht. Außerdem ist es bekannt, dass Störungen circadianer Abläufe, sogenannte Desynchronisationen, als Ursache für Krankheiten gesehen werden. So beeinflusst der Zeitpunkt der Nahrungsaufnahme wesentlich den circadianen Rhythmus der in enger Kooperation zur Aufrechterhaltung der Blutglukose-Spiegel arbeitenden Organe Leber und Pankreas. Damit liegt der Zusammenhang zwischen der Zunahme Typ 2-diabetischer Erkrankungen beim Menschen und dauerhafter Missachtung natürlicher tageszeit-abhängiger Körperfunktionen nahe. Untersuchungen zum Einfluss des Pinealorgan und seines Hormons Melatonin auf den Glukosestoffwechsel gehen bis auf den Anfang des vergangenen Jahrhunderts zurück. Zahlreiche *in vitro*- und tierexperimentelle Untersuchungen konnten den engsten funktionell-physiologischen Zusammenhang sowie die antagonistische Wechselwirkungen zwischen Melatonin- und Insulin-Sekretion belegen. Die Interaktionen von Glukosestoffwechsel und biologischen Rhythmen bei Säugetieren bilden den Hintergrund der vorliegenden Arbeit. Im Besonderen sind die Auswirkungen der Melatonin-Rezeptor-Deletion auf „die Innere Uhr“ sowie den Kohlenhydratstoffwechsel der Maus von Interesse. Zur Klärung der Fragestellung dienten 4 Mauslinien: MT1-Rezeptor-*knockout* (MT1), MT2-Rezeptor-*knockout* (MT2), Doppel-*knockout* (MT1/MT2) sowie eine Wildtyp-Linie als Kontrollgruppe. Untersucht wurden molekularbiologisch die circadianen Expressionsprofile der Uhrgene *Per1* und *RevErb α* sowie die des Uhrgen-kontrollierten Gens *Dbp* in drei definierten Organsystemen: Leber, Pankreas und Hypothalamus. Das verwendete Verfahren war die *real-time*-RT-PCR. Flankiert wurden die Untersuchungen durch die Bestimmung der Blutglukose-Spiegel, der radioimmunologischen Messung der Insulin-Sekretion sowie der molekularbiologischen Bestimmung circadianer Expressionsprofile der Insulin-Transkripte. Die Untersuchungsergebnisse lassen erkennen, dass Melatonin für die Aufrechterhaltung circadianer Oszillationen von Uhrgenen in verschiedenen Organsystemen der Maus von nicht essentieller Bedeutung ist. Dennoch haben die unterschiedlichen Melatonin-Rezeptor-*knockout*-Mäuse veränderte Expressionsmuster der untersuchten Uhrgene mit konsekutiv veränderten Amplituden und Phasenshift. Melatonin wird unter anderem eine Funktion als circadianer Synchronisator zuerkannt. Außerdem zeigten sich organspezifische Melatonin-Rezeptor-Funktionen. Schließlich konnte der engste funktionell-physiologische Zusammenhang zwischen Melatonin- und Insulin-Sekretion bestätigt werden.

Groß (geb. Michajlov), Elena: Molekularbiologische Untersuchungen an Melatonin-Rezeptor-*knockout*-Mäusen. Halle (Saale), Uni., Med. Fak., Diss. 78 Seiten, 2010.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	IV
1. Einleitung	1
1.1. Ein Leben zwischen den Uhren	1
1.2. Das photoneuroendokrine System (PNS) der Säuger	2
1.2.1. Circadiane Photorezeption und Retinohypothalamischer Trakt (RHT)	3
1.2.2. Nucleus suprachiasmaticus (SCN)	3
1.2.3. Das Pinealorgan	4
1.3. Melatonin „Das Hormon der Dunkelzeit“	5
1.3.1. Synthese, Freisetzung und Abbau von Melatonin	5
1.3.2. Noradrenerge Kontrolle der Melatoninsynthese	7
1.3.3. Wirkung und therapeutischer Einsatz von Melatonin	7
1.4. Melatoninrezeptoren	10
1.4.1. Identifizierung von Melatonin-Rezeptoren	10
1.4.2. Klonierung des Melatonin-Rezeptors	11
1.4.3. Signaltransduktionswege der Melatoninrezeptoren	13
1.5. Die molekulare „Innere Uhr“	13
1.6. Uhrengene in der Peripherie: die Zelle als kleinste Einheit der „Inneren Uhr“	16
2. Zielstellung der Arbeit	17
3. Material und Methoden	18
3.1. Versuchstierhaltung und Materialgewinnung	18
3.2. Molekularbiologische Untersuchungen	20
3.2.1. RNA-Isolierung	20
3.2.2. RNA-Gelelektrophorese	22
3.2.3. cDNA-Synthese	23
3.2.5. DNA-Gelelektrophorese	28
3.2.7. DNA-Extraktion	30
3.3. Insulin-RIA (Radioimmunoassay)	30

3.4. Statistische Auswertungen	31
3.5. Chemikalien und Geräte	31
3.5.1. Chemikalien	31
3.5.2. Geräte	32
4. Ergebnisse	33
4.1. Nachweis des Melatonin-Rezeptor- <i>knockouts</i>	33
4.2. Nachweis der Melatonin-Rezeptoren in verschiedenen Organsystemen der Wildtyp-Maus	34
4.3. Nachweis der Uhrengenenexpression in verschiedenen Organsystemen der Wildtyp-Maus	35
4.4. Untersuchungen der diurnalen Uhrengenenexpressions-Profile in verschiedenen Organsystemen der Wildtyp-Maus	37
4.5. Auswirkungen des Melatonin-Rezeptor- <i>knockouts</i> auf die diurnale Uhrengenenexpression	40
4.5.1. Pankreatische Uhrengen-Expression	40
4.5.2. Hepatische Uhrengen-Expression	41
4.5.3. Hypothalamische Uhrengen-Expression	41
4.6. Auswirkungen des Melatonin-Rezeptor- <i>knockouts</i> auf die Glukose-Homeostase	42
4.6.1. Untersuchungen der Insulin-Transkriptionsprofile im Tagesgang	43
4.6.2. Diurnale Plasma-Insulin-Profile in Wildtyp- und Melatonin-Rezeptor- <i>knockout</i> -Tieren	43
4.6.3. Diurnale Blutglukose-Profile bei Wildtyp- und Melatonin-Rezeptor- <i>knockout</i> -Tieren	44
5. Diskussion	52
5.1. Das untersuchte Tiermodell	54
5.2.1. Melatonin-Rezeptor- <i>knockout</i> und die Uhrengenenexpression im Pankreas	56
5.2.2. Melatonin-Rezeptor- <i>knockout</i> und die hepatische Uhrengenenexpression	56
5.2.3. Melatonin-Rezeptor- <i>knockout</i> und die Uhrengenenexpression im Hypothalamus	58
5.3. Melatonin-Rezeptor- <i>knockout</i> und sein Einfluss auf die Glucose-Homöostase	58
6. Zusammenfassung	60
7. Literaturverzeichnis	62
8. Thesen	78

9. Lebenslauf	VI
10. Eidesstattliche Erklärung	VII
11. Danksagung	VIII

Abkürzungsverzeichnis

AA-NAT	Arylalkylamin-N-acetyltransferase
Abb.	Abbildung
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
cAMP	zyklisches 3`-5`-Adenosinmonophosphat
cGMP	zyklisches 3`-5`-Guanosinmonophosphat
cDNA	<i>complementary desoxyribose nucleic acid</i>
CIM	<i>Columna intermediolateralis</i>
CREB	<i>cyclic AMP response element binding protein</i>
Ct	<i>cycle time</i>
DNA	<i>desoxyribose nucleic acid</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
et al.	<i>et alii</i>
GCS	<i>Ganglion cervicale superius</i>
GLUT4	Glukosetransporter 4
G-Protein	Guaninnukleotid-bindendes Protein
GPR50	<i>G protein-coupled receptor 50</i>
GTP	Guanosintriphosphat
HIOMT	Hydroxyindol-O-methyltransferase
IP3	Inositol-1,4,5-triphosphat
L	Molekulargewichtsstandard
L:D	Licht zu Dunkel-Verhältnis
MOPS	Morpholinopropan-Sulfonsäure
mRNA	<i>messenger ribonucleic acid</i>
MT1/2	Melatoninrezeptortyp1/2
MT1-/-	MT1-Rezeptor- <i>knockout</i>
MT2-/-	MT2-Rezeptor- <i>knockout</i>
MT1/2-/-	MT1/2-Rezeptor-Doppel- <i>knockout</i>
MW	Mittelwert
n	Stichprobenumfang
NA	Noradrenalin
NO	Stickstoffmonoxid
p	Irrtumswahrscheinlichkeit
PACAP	<i>pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
Per	<i>period</i>

PIN	Pinealorgan
PVN	<i>Nucleus paraventricularis</i>
RET	Retina
RIA	radioimmunoassay
RHT	Retinohypothalamischer Trakt
RNA	<i>ribonucleic acid</i>
ROR	Retinoid-Orphan-Rezeptoren
RT	Reverse Transkriptase
RT-PCR	<i>reverse-transcription polymerase chain reaction</i>
SCN	<i>Nucleus suprachiasmaticus</i>
SEM	<i>standard error of mean, Standardfehler</i>
TAE	Acetat-Ethylendiamin
Tab.	Tabelle
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
UV	ultraviolett
WT	Wildtyp

1. Einleitung

1.1. Ein Leben zwischen den Uhren

„Die Zeit ist gemessene Bewegung.“ So definierte Aristoteles [384-322] die Zeit. Die Bewegung der Sonne bestimmte seine Zeit. Heutzutage richten wir uns nach unserer Armbanduhr, nach der Bahnhofsuhr, dem morgendlichen Wecker. Uhren teilen unser Leben in Tage, Stunden, Minuten, Sekunden. Auf die wichtigste Uhr in unserem Leben achten wir kaum: die „Innere Uhr“. Aber unbemerkt teilt auch die „Innere Uhr“ unser Leben ein. In ganz besonderem Maße wird unser Leben durch die sich täglich ändernden Beleuchtungsverhältnisse bestimmt. Nahezu alle Lebensvorgänge, wie Nahrungsaufnahme, Arbeits- und Ruhephasen, aber auch Stoffwechsellleistungen unterliegen der zeitlichen Organisation dieses durch den Sonnentag vorgegebenen Rhythmus. So ist zu verstehen, dass sich zur Antizipation des Tag-Nacht-Rhythmus sehr früh in der Phylogenie endogene Mechanismen, so genannte „Innere Uhren“, ausgebildet haben (Pittendrigh, 1993). Tatsächlich zeigen neuere genetische Untersuchungen, dass molekulare Komponenten biologischer Zeitmesser bereits in Archaeobakterien und Proteobakterien entwickelt wurden (Dvornyk et al., 2003). Diese endogenen Oszillatoren haben die Aufgabe, einen Organismus auf die nächste Hellphase vorzubereiten, noch bevor sie eingetreten ist. Die „Innere Uhr“ des Menschen verursacht bereits vor Sonnenaufgang einen Anstieg von Herzfrequenz, Blutdruck und Blutkortisolspiegel. Mittlerweile konnte in einer Vielzahl von Lebensformen, angefangen von einzelligen Blaualgen bis hin zu komplexen Organismen wie Säugetieren, endogene Oszillatoren nachgewiesen werden (Dunlap, 1999; Johnson und Golden, 1999). Ein Wesensmerkmal der „Inneren Uhren“ ist, dass sie auch ohne den Einfluss äußerer periodischer Reize (Zeitgeber) in der Lage sind, einen Rhythmus aufrecht zu erhalten (Aschoff et al., 1965). Da die Periodenlänge (τ) hierbei etwa einer Tageslänge entspricht (Definition: 20-28 h, Peschke und Peschke, 1998), bezeichnet man solche Rhythmen als circadian (Pittendrigh, 1960). Externe Reize, in erster Linie Licht, vermögen die mit einem freilaufenden Rhythmus oszillierenden „Inneren Uhren“ zu verstellen und sie so mit der tatsächlichen Tageslänge zu synchronisieren. Somit ist es leicht vorstellbar, dass Störungen dieser außergewöhnlichen Uhr, besonders bei deren Synchronisation, mit erheblicher Beeinträchtigung für den ganzen Organismus einhergehen: Eine experimentell wiederholte Phasenverschiebung reduziert bei *Drosophila* die Lebensdauer (Aschoff et al., 1971). Die Reproduktionsrate von verschiedenen Cyanobakterien-Stämmen ist umso niedriger, je weniger ihre Periodenlänge mit den tatsächlichen Beleuchtungsverhältnissen übereinstimmt (Ouyang et al., 1998). Schicht- und Nachtarbeit erhöhen beim Menschen die Krankheitshäufigkeit und mindern das Wohlbefinden (Carpentier und Cazamian, 1981; Clemens, 1981). Schließlich kann der Verlust des Augenlichts zur vollständigen

Entkopplung des endogenen Rhythmus mit den sich ändernden äußeren Beleuchtungsverhältnissen führen, was mit schweren Schlaf- und Befindlichkeitsstörungen einhergeht (sog. *free running blindness*, Sack et al., 1992).

Wo aber genau ist nun diese „Innere Uhr“ lokalisiert und wie ist sie aufgebaut?

1.2. Das photoneuroendokrine System (PNS) der Säuger

Wie bei allen Tieren, bei denen ein übergeordneter Oszillator circadiane Schrittmacherfunktion für den gesamten Körper übernimmt, hat auch die „Innere Uhr“ des Säugers ein neuronales Korrelat, welches sich in dem paarig angelegten Nucleus suprachiasmaticus (*SCN*) des Hypothalamus befindet (Klein et al., 1991). Obwohl erste anatomische Beschreibungen des *SCN* bereits im frühen letzten Jahrhundert erfolgten (Gurdjian, 1927; Krieg, 1932), konnte seine funktionelle Bedeutung als Korrelat der „Inneren Uhr“ durch zahlreiche Läsions- und Transplantationsversuche erst viel später verstanden werden (Moore und Eichler, 1972; Ibuka et al., 1977; van den Pol und Powley, 1979; Sawaki et al., 1984; Lehman et al., 1987; Meijer und Rietvelt, 1989). Die Synchronisation dieses „*master circadian pacemaker*“ (Weaver, 1998) durch Lichtreize erfolgt durch seine Ankopplung an das Auge über den so genannten Retinohypothalamischen Trakt (RHT; Moore und Lenn, 1972; Moore et al., 1995). Der *SCN* nutzt zur Weitervermittlung seiner rhythmischen Aktivität an den Körper unter anderem die rhythmische Freisetzung des Neurohormons Melatonin aus der Epiphysis cerebri. Diese drei Komponenten des circadianen Systems - der Synchronisator (Auge und RHT), der endogene Oszillator (*SCN*) und der Effektor (Epiphyse und Melatonin) - werden zum photoneuroendokrinen System (PNS) zusammengefasst (Abb. 1; Korf 1994).

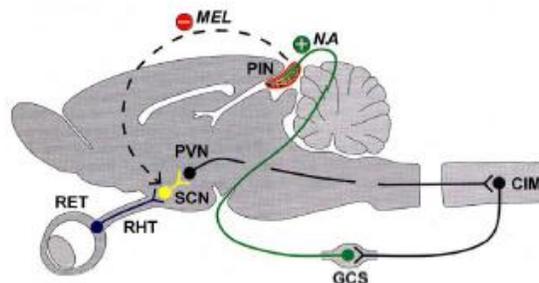


Abb. 1: Das photoneuroendokrine System (PNS) des Säugers.

Die Retina (RET) empfängt Informationen der aktuellen Photoperiode und leitet diese über den Retinohypothalamischen Trakt (RHT), einem gesonderten Teil des Nervus opticus, zum endogenen Oszillator im Nucleus suprachiasmaticus (*SCN*) weiter. Von dort erfolgt u. a. die efferente Projektion zum Nucleus paraventricularis (*PVN*). Zwischen *PVN* und Ganglion cervicale superius (*GCS*) verläuft über die Columna intermediolateralis (*CIM*) eine bisynaptische Verbindung. Vom *GCS* ziehen schließlich sympathisch-postganglionäre Nervenfasern zum Pinealorgan (*PIN*), das nach Ausschüttung des Neurotransmitters Noradrenalin (*NA*) Melatonin produziert. Melatonin (*MEL*) hemmt die neuronale Aktivität des *SCN* und bildet somit eine Rückkopplungsschleife im PNS aus (modifiziert nach Korf, 1994).

Bemerkenswert ist die Tatsache, dass die Bausteine dieses Systems trotz ihrer unterschiedlichen Lokalisation im Gehirn allesamt Abkömmlinge des Diencephalons sind.

1.2.1. Circadiane Photorezeption und Retinohypothalamischer Trakt (RHT)

Von der Retina des Auges werden Lichtreize der aktuellen Photoperiode wahrgenommen und in neuronale Signale umgewandelt. Es handelt sich dabei um eine bestimmte Subpopulation retinaler Ganglienzellen, die mit ihren axonalen Fortsätzen über den RHT zu den Zellen des *SCN* projizieren und Melanopsin als ihr eigenes Photopigment synthetisieren (Provencio et al., 1998, 2000; Hattar et al., 2002). Die retinofugalen Nervenfasern des RHT zweigen bereits vor dem Corpus geniculatum laterale vom Tractus opticus ab und erreichen überwiegend den ventrolateralen Teil des *SCN*. Über diesen Weg wird die „Innere Uhr“ mit der Photoperiode synchronisiert (*photoentrainment*; Roenneberg und Foster, 1997). Eine Zerstörung dieser Bahn führt zur so genannten „circadianen Blindheit“ (Johnson et al., 1988). Die Axonterminalen der retinalen Ganglienzellen enthalten die Neurotransmitter PACAP (*Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide*) und Glutamat (Hannibal et al., 2000; Provencio et al., 2000; Gooley et al., 2001). Diese beiden Neurotransmitter spielen bei der Codierung von Lichtinformationen aus der Retina in chemische neuronale Aktivitäten im *SCN* eine wichtige Rolle.

1.2.2. Nucleus suprachiasmaticus (SCN)

An der Spitze des streng hierarchisch organisierten circadianen Systems des Säugers steht der *SCN*. Das paarig angelegte Kerngebiet liegt am Boden des 3. Ventrikels, unmittelbar oberhalb des Chiasma opticum. Die elektrische, metabolische und genetische Aktivität des *SCN* ist bei allen bis jetzt untersuchten Spezies hoch während des Tages und niedrig während der Nacht (Weaver, 1998). Die Neurone des *SCN* sind durch zahlreiche synaptische Kontakte miteinander verbunden (Güldner und Wolff, 1996). Darüber hinaus deuten elektrophysiologische Studien darauf hin, dass auch interneuronale Kontakte über *gap junctions* existieren (Jiang et al., 1997). Wie Untersuchungen an dissoziierten Zellen gezeigt haben, soll im *SCN* jedes einzelne Neuron einen Oszillator darstellen, der seinen eigenen Rhythmus generiert; dies zeigt sich sowohl in der rhythmischen Entladungsfrequenz, als auch in der Sekretion von Neuropeptiden, wie dem Vasopressin (Murakami et al., 1991; Welsh et al., 1995). Man geht heute bei den Neuronen des *SCN* von einem Verbund einzelner Oszillatoren aus, die sich gegenseitig über den Neurotransmitter GABA synchronisieren, wodurch ein einheitlicher Rhythmus zustande kommt (ein sogenanntes Multioszillatorennetzwerk; Liu et al., 1997; Liu und Reppert, 2000). Auch dem Stickstoffmonoxid (NO) und dem Kohlenmonoxid (CO) wird eine mögliche synchronisierende Wirkung im Rahmen dieses Netzwerkes zugeschrieben. Die Phasenverschiebung der rhythmischen Aktivität des *SCN* durch

Lichtreize wird vor allem über die Ausschüttung der exzitatorischen Aminosäure Glutamat aus Axonterminalen der retinalen Ganglienzellen vermittelt (Liou et al., 1986). Das Neuropeptid PACAP (*Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide*), welches ebenfalls aus den Neuronen des RHT ausgeschüttet wird, soll vorgeben, ob der Lichtreiz phasenbeschleunigend oder – verzögernd auf den SCN wirkt (Hannibal, 2002). Neben dem RHT empfängt der SCN weitere Signale über neuronale Afferenzen, die unter anderem aus dem serotoninergeren System stammen und womöglich ebenfalls in das „*entrainment*“ der Uhr involviert sind. So sollen Phasenverschiebungen durch andere Zeitgeber als Licht, wie z.B. Weckreize oder körperliche Aktivität, vermittelt werden (Hastings et al., 1997; van Esseveldt et al., 2000). Ein wichtiges Ausgangssignal des SCN soll das Vasopressin sein, was sich in einer circadianen Freisetzung dieses Transmitters in benachbarte Kerne und in den Liquor zeigt (Schwartz und Reppert, 1985; Kruisbrink et al., 1987; Jolkkonen et al., 1988; Kalsbeek et al., 1995). Efferenzen erreichen vornehmlich thalamische und hypothalamische Kerngebiete (Hoornemann und Buijs, 1982; Watts et al., 1987; Watts, 1991), wodurch zahlreiche physiologische Prozesse eine circadiane Organisation erhalten (Buijs et al., 1998). Für das photoneuroendokrine System spielt die Verbindung zum Nucleus paraventricularis (PVN) des Hypothalamus eine entscheidende Rolle. Über ihn und eine polysynaptische Neuronenkette erhält der SCN Anschluss an das Pinealorgan.

1.2.3. Das Pinealorgan

Die Epiphysis cerebri, die wegen ihrer Ähnlichkeit mit einem Pinienzapfen auch als Zirbeldrüse oder Pinealorgan genannt wird, fand erstmals ca. 300 v. Chr. Erwähnung durch Herophilus, einem Anatomen der alexandrinischen Schule. Der griechische Arzt Galen (130-200 n. Chr.) beschrieb die Morphologie der Epiphyse ca. 450 Jahre später als eine Lymphknoten-ähnliche Drüse. Erst der französische Aufklärer René Descartes (1596-1650) ordnete die Epiphyse, die er als „Sitz des erkennenden Teils der Seele“ bezeichnete, dem optischen System zu. Gegen Ende des 19. Jahrhunderts wurde die Epiphyse zum ersten Mal mit der Fortpflanzung in Verbindung gebracht. Großen Einfluss hierauf hatten Berichte von Heubner (1842-1926), der bei Patienten mit Epiphysentumoren eine gestörte sexuelle Entwicklung beobachtete.

Die Epiphyse gehört zur Gruppe der circumventrikulären Organe, die sich fast ausschließlich im Bereich des dritten Ventrikels befinden und keine Blut-Hirn-Schranke besitzen. In Relation zum Körpergewicht ist die Drüse recht klein (50-150 mg beim Menschen, 1 mg bei der Ratte), die Durchblutung hingegen ist beachtlich, sie wird allein durch die der Niere übertroffen (Arendt, 1988). Das Pinealorgan übernimmt innerhalb des photoneuroendokrinen Systems des Säugers die Funktion eines neuroendokrinen Effektorsystems. Phylogenetisch betrachtet war die Zirbeldrüse

ursprünglich selbst lichtempfindlich und vereinigte die drei Funktionen des PNS (Synchronisator, Oszillator und Effektor) in jedem einzelnen Pinealozyten. Diese Fähigkeiten sind bei anderen Vertebraten wie den Sauropsidae noch vorzufinden (Oksche, 1983; Oksche et al., 1987).

Die Epiphyse des Säugers ist weder lichtempfindlich, noch vermag sie eigene Rhythmen zu generieren (Vollrath, 1981; Foster et al., 1989; Kramm et al., 1993). Die wichtigste Aufgabe des Pinealorgans ist die Synthese des Neurohormons Melatonin.

1.3. Melatonin „Das Hormon der Dunkelzeit“

Das Melatonin (N-Acetyl-5-methoxytryptamin), ein Indolamin, wurde 1958 von der Arbeitsgruppe um den Dermatologen Aaron B. Lerner aus Zirbeldrüsen von Rindern isoliert.

Die Bezeichnung „Melatonin“ leitet sich von seiner Fähigkeit ab, die Pigmentverteilung von Melanophoren in der Haut von Amphibien zu verändern (aufzuhellen). Seine Vorläufersubstanzen sind das Tryptophan und Serotonin (Lerner et al., 1958). Neben der Epiphyse konnte das Hormon in verschiedenen Geweben wie der Retina (Hardeland et al., 1996a), der Harderschen Drüse der Rhodentia, des Iris-Ciliarkörpers, der Tränendrüse, sowie in Blutleukozyten und im Gastrointestinaltrakt nachgewiesen werden (Arendt, 1995). Melatonin ist einer bestimmten circadianen Sekretionsrhythmik unterworfen, insofern als es fast ausnahmslos in der Dunkelheit freigesetzt wird. Daher wird Melatonin oft als „Hormon der Dunkelzeit“ bezeichnet (Reiter, 1991c). Eine weitere Besonderheit im Sekretionsmuster des Melatonins ist die Tatsache, dass sowohl tag- als auch nachtaktive Tiere während der Dunkelzeit, unabhängig von ihrem Aktivitätszustand, einen hohen Melatoninspiegel aufweisen, der bereits bei kurzem Lichteinfall extrem stark abfällt (Wurtman et al., 1963; Axelrod, 1974; Lewy et al., 1992; Laakso et al., 1994; Zawieska et al., 1995).

1.3.1. Synthese, Freisetzung und Abbau von Melatonin

Nach Aufnahme von Tryptophan aus dem Blutgefäßsystem in die Pinealozyten durch aktiven Transport kommt es zur Bildung von 5-Hydroxytryptophan durch das mitochondriale Enzym Tryptophan-5-Hydroxylase. Durch die aromatische Aminosäuredecarboxylase im Zellplasma wird 5-Hydroxytryptophan zu 5-Hydroxytryptamin, dem Serotonin, decarboxyliert. Als nächster Schritt erfolgt die N-Acetylierung des Serotonins durch die Arylalkylamin-N-Acetyltransferase (AA-NAT) zu N-Acetylserotonin (Abb. 2).

Die AA-NAT ist das Schlüsselenzym der Melatoninbiosynthese. Es bestimmt nicht nur die Bildung, sondern auch die Abgabe von Melatonin in die Blutbahn. Die AA-NAT ist somit der molekulare Schalter für alle Reize, die die Melatoninbiosynthese steuern.

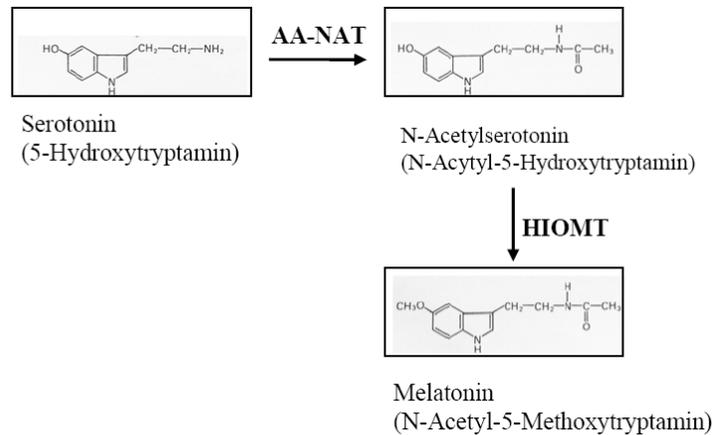


Abb. 2: Schematische Darstellung der Melatoninbiosynthese.

Die Steuerung der AA-NAT-Aktivität ist speziesspezifisch unterschiedlich: während bei Nagern die Regulation vor allem auf translationeller Ebene erfolgt (Borjigin et al., 1995; Coon et al., 1995; Roseboom et al., 1996; Maronde et al., 1999a), wird bei Huftieren und wahrscheinlich auch beim Menschen die Melatoninsynthese über posttranslationelle Mechanismen, wie dem proteasomalen Abbau der AA-NAT, gesteuert (Gastel et al., 1998; Schomerus et al., 2000; Stehle et al., 2001a; Ganguly et al., 2002). In einem abschließenden Schritt wird eine Methylgruppe vom S-Adenosyl-Methionin durch das zytosolische Enzym Hydroxyindol-O-Methyltransferase (HIOMT) auf das N-Acetylserotonin übertragen, so dass N-Acetyl-5-Methoxytryptamin, das Melatonin, entsteht. Die Tag-Nacht-Schwankung von HIOMT ist nur gering ausgeprägt (Klein et al., 1981), graduelle Unterschiede sind nur über Perioden von Tagen oder Wochen erkennbar (Sugden, 1989). Melatonin wird im Gegensatz zu vielen anderen Hormonen nicht gespeichert, sondern im Anschluss an die Synthese aufgrund seiner hohen Lipophilie durch passive Diffusion direkt in das Blutgefäßsystem oder den Liquor cerebrospinalis abgegeben (Illnerova et al., 1978, 1979). Die nächtliche Melatoninsekretion des Menschen ist beim Säugling bis zu drei Monaten sehr niedrig bis nicht messbar. Vermutlich beginnt die circadiane Melatonin-Rhythmik erst später, nachdem die postganglionären sympathischen Nervenfasern in die Epiphyse eingewachsen sind (Rollag et al., 1981). Die Sekretion erreicht in der frühen Kindheit mit ein bis drei Jahren ein Maximum (nächtliche Melatoningonzentration ca. 300 pg/ml), um danach rapide bis zum Ende der Adoleszenz (ca. 60-120 pg/ml) abzufallen. Eine weitere moderate Abnahme der Sekretion findet bis ins Senium (ca. 20-50 pg/ml) statt (Waldhauser und Waldhauser, 1988; Touitou, 2001). Die Metabolisierung des Hormons erfolgt zunächst in der Leber zu 6-Hydroxymelatonin. Das hydroxylierte Produkt kann dann sulfatiert oder glukuronidiert und mit dem Harn ausgeschieden werden (Kopin et al.,

1961; Pardridge und Mietus, 1980). Letzteres findet vor allen bei Nagetieren und beim Menschen statt. Melatonin besitzt bei Nagetieren und dem Menschen eine recht kurze Halbwertszeit mit einem starken hepatischen „*first pass effect*“ und einer biphasischen Elimination. Die Halbwertszeit liegt je nach Applikationsart bei etwa 2 Minuten (intravenöse Gabe) und 45 Minuten (orale Gabe) (Arendt, 1995).

1.3.2. Noradrenerge Kontrolle der Melatoninsynthese

Die Kontrolle der Melatoninsynthese erfolgt über Noradrenalin, das nachts durch erhöhte Entladungsraten aus postganglionären sympathischen Nervenfasern freigesetzt wird (Drijfhout et al., 1996) und an die β -Adrenorezeptoren der Pinealozytenmembran bindet.

Der β 1-Adrenorezeptor ist an ein Gs-Protein (stimulierendes Guanin-Nukleotid-bindendes regulatorisches Protein) gebunden, welches das Enzym Adenylatcyclase aktiviert. Durch den Anstieg von cyclischem AMP (cAMP) und Aktivierung der cAMP-abhängigen Proteinkinase (PK1) wird die AA-NAT-Aktivität erhöht und aufrechterhalten. Die direkte Stimulation von α 1-Adrenorezeptoren hat keinen Einfluss auf die AA-NAT- Aktivität, jedoch kann die β 1-adrenerge Stimulation von cAMP und AA-NAT durch simultane Aktivierung von α 1-Adrenorezeptoren erhöht werden. α 1-adrenerge Rezeptoren erhöhen das intrazelluläre Calcium in der Zelle (Schomerus et al., 1995). Der Rhythmus der Melatoninbiosynthese kommt komplett zum Erliegen, wenn die noradrenerge Innervation der Epiphyse ausgeschaltet wird, z.B. durch eine hohe Querschnittslähmung bei Verletzungen des Rückenmarks.

1.3.3. Wirkung und therapeutischer Einsatz von Melatonin

Für Melatonin sind eine Reihe von Funktionen beschrieben worden, die aber noch nicht vollständig erforscht und gesichert sind. Zu den mit am besten dokumentierten Wirkungen von Melatonin gehört sein Einfluß auf die Steuerung jahreszeitlich abhängiger Reproduktionszyklen.

Der Reproduktionszyklus von sich saisonal fortpflanzenden Tieren wird primär über die Tageslänge gesteuert. So führen exogene Gaben von Melatonin während Langtag bei Schafen zu einem vorzeitigen Anstieg der Gonadotropin-Sekretion und einem früheren Beginn der Paarungszeit. Gleichzeitig nimmt dabei die Prolaktin-Sekretion ab. Dies wird auch kommerziell genutzt, um die Zuchtsaison oder auch den Fellzyklus zu bestimmen und zu nutzen.

Auch die Fellbeschaffenheit, der Appetit und das Körpergewicht verändern sich im Verlaufe eines Jahres (Arendt, 1988). Bei Hamstern führen erhöhte Melatoninkonzentrationen dagegen zur Involution der Gonaden (Carter und Goldmann, 1983; Tamarkin et al., 1985; Cassone, 1990; Hattori et al., 1995; Niedziela et al., 1995). Auch beim Menschen sind saisonale Muster in der Konzeptionsrate und der Menarche zu erkennen, wobei dies durch soziokulturelle Faktoren

überlagert nicht so ausgeprägt wie bei vielen Tieren auftritt (Arendt, 1995). Anovulatorische Zyklen, zum Beispiel bei hypothalamischer Amenorrhoe (Brzezinsky et al., 1988), wurden in einigen Fällen mit verlängerter Melatoninsekretion in Verbindung gebracht. Innerhalb des Zyklus fällt Melatonin während der Follikelphase und steigt dann parallel zu dem Progesteronpeak während der Lutealphase stark an. Sehr hohe chronische Gaben von Melatonin (um 300 mg) können bei einer normal zyklischen Frau die LH- Sekretion unterdrücken (Arendt, 1995) und somit antigonadotrop wirken. In Anbetracht dieser Tatsache wurde der Einsatz als Kontrazeptivum in Erwägung gezogen, wobei Langzeitwirkungen so hoher Dosen nicht untersucht wurden. Klinische Dosen von 1 bis 10 mg sollen keinen negativen Effekt auf das Reproduktionssystem des Menschen haben. Die antigonadotrope Bedeutung des Melatonins wird noch deutlicher durch Beobachtungen, dass bei Epiphysen-zerstörenden Tumoren das klinische Bild der Pubertas praecox, einer sexuellen Frühreife, auftritt (Gutzeit, 1896). Neben der Gonaden-Achse werden auch andere endokrine Systeme durch das Melatonin beeinflusst. So hat das Melatonin einen direkten Einfluss auf den Glucosestoffwechsel, indem es die Insulinsekretion der pankreatischen β - Zelle hemmt (Peschke et al., 1998, 2000, 2002). Beim Menschen besteht eine reziproke Beziehung zwischen der Körperkerntemperatur und dem Melatonin-Plasmagehalt (Cagnacci et al., 1992). Exogen zugeführtes Melatonin kann die Körpertemperatur senken und helles Licht, das die Melatoninsekretion supprimiert, hebt die Körpertemperatur an. Dagegen zeigen Nagetiere während der Nacht erhöhte Melatonin-konzentrationen und erhöhte Körpertemperaturen. Mit zunehmendem Alter nimmt die Melatoninsekretion bei gesunden Säugetieren deutlich ab (Reiter et al., 1981; Iguchi et al., 1982; Pang und Tang, 1984; Waldhauser und Waldhauser, 1988). Dies steht nicht im Zusammenhang mit der Kalzifikation der Epiphyse (Welsh, 1985). Etwa ein Drittel aller Menschen über 50 Jahre leidet an chronischer Insomnia in Form von Einschlaf- und Durchschlafstörungen. Durch orale Gaben von Melatonin zur Nacht konnten vor allem die Einschlafstörungen vermindert werden, ohne die *REM (rapid eye movement)*-Phasen zu beeinträchtigen, wie dies bei Einnahme von Benzodiazepinen beobachtet wird (Zhdanova et al., 2001). Gestörte circadiane Rhythmen treten auch bei Beschäftigung in Schichtarbeit, beim *jet lag* infolge interkontinentaler Reisen, bei einigen Formen von Blindheit, sowie bei schweren Krankheiten auf. Sie sind oft verbunden mit verringerter Leistungsfähigkeit und Stimmungsschwankungen. Hier ist der Einsatz von Melatonin zwecks Resynchronisierung von Rhythmen durchaus angebracht (Arendt, 1995). In pharmakologisch hohen Dosen verabreichtes Melatonin wirkt bei Menschen und Nagetieren schlaffördernd und sedativ. Auch eine antikonvulsive und analgetische Bedeutung wurde beschrieben (Sugden, 1983). Melatoninmangel wird ferner immer wieder mit psychiatrischen Krankheitsbildern wie *seasonal affective disorders (SAD)* (Putilov, 1999), Schizophrenie (Ferrier et al., 1982) und manisch

depressiven Psychosen in Zusammenhang gebracht. Seit Juni 2007 ist Melatonin zur kurzfristigen Behandlung der primären Insomnie in Deutschland zugelassen. Es konnte gezeigt werden, dass ein bedeutender Anteil depressiver Patienten keinen normalen circadianen Melatonin-Rhythmus aufweist (Mendlewicz et al., 1979). Ein weiterer Sekretions- und Wirkort von Melatonin bei Wirbeltieren ist die Retina. Dort wirkt Melatonin lokal, indem es die Calcium-abhängige Dopamin-Freisetzung inhibiert. Daneben wirkt es sich auf das so genannte *disc shedding*, die Pigmentaggregation und die Phagozytose von Photopigmentzellen aus (Tosini und Menaker, 1996). Melatonin ist aufgrund seiner Lipophilie ein plazentagängiges Hormon. Bei Nagetieren konnte gezeigt werden, dass Melatonin *in utero* das bedeutendste humorale Signal für die Organisation des fetalen circadianen Systems ist (Arendt, 1995). Vermutlich hat Melatonin weiter eine protektive Wirkung auf das kardiovaskuläre System. Beim Menschen und den meisten Tieren konnte durch Epiphysenextrakte der Blutdruck gesenkt werden. Bei Ratten führte Pinealektomie zu einem Blutdruckanstieg (Zanaboni, 1967), der durch Melatonin-Gabe gesenkt werden konnte (Krause, 1999). Bei einigen Tiermodellen konnte gezeigt werden, dass das Wachstum hormonabhängiger Tumore zu einem gewissen Anteil photoperiodisch beeinflusst ist (Bartsch und Bartsch, 1981). In einer Studie mit Ratten zeigten Tamarkin und Mitarb., dass durch 7,12-Dimethylbenz(α)Anthracen (DMBA) induzierte Mammatumore nach Pinealektomie starkes Wachstum zeigten, das durch tägliche Melatoningaben abnahm (Tamarkin et al., 1981). Weitere Experimente führten zu der Annahme, dass Melatonin onkostatistische Eigenschaften besitzt. Weiterhin wird eine Wirkung des Epiphysenhormons Melatonin auf das Immunsystem angenommen. So berichtet Maestroni über Melatoninrezeptoren auf T-Helferzellen, deren Aktivierung zur Abgabe von Zytokinen, vor allem Interleukin 2 (IL-2) und Gamma-Interferon (γ -Interferon), führt. In humanen Monozyten führt Melatonin zur Produktion einer Reihe von Interleukinen (IL-1, IL-6, IL-12). Gamma-Interferon soll wiederum auf die Epiphyse zurückwirken, weshalb auch von einem „Epiphysen-Immun-Hämatopoetischen Netzwerk“ gesprochen wird (Maestroni, 2000). Caroleo und Mitarb. beobachteten eine erhöhte T-Helferzell-Aktivität und erhöhte IL-2-Produktion nach Melatonin-Injektionen bei immunodefizienten Mäusen (Caroleo et al., 1992). Melatonin wirkt als potenter freier Radikalfänger (Reiter, 1993; Brömme et al., 2000a; Peschke et al., 2000a; Ebel et al., 2000a). Seine antioxidative Eigenschaft gegenüber dem hochtoxischen Hydroxylradikal (\cdot OH) kommt durch Elektronenabgabe zustande. Dabei wird Melatonin selber zum Radikal (Methyl-Kationen-Radikal), das aber weitaus weniger reaktiv und weniger toxisch ist (Touitou, 2001). Durch Versuche mit Mäusen konnte gezeigt werden, dass Melatonin die Stressantwort mit Aktivierung des Sympathicus reduzieren kann (Mutoh et al., 2003). Über eine Verlängerung der Lebensspanne Melatonin-substituierter weiblicher Mäuse berichten Anisimov et al. Sie beobachteten jedoch gleichzeitig ein

vermehrtes Auftreten maligner Tumore bei diesen Tieren (Anisimov et al., 2001). Die Lebensspanne von Fruchtfliegen, *Drosophila melanogaster*, konnte durch Melatonin-angereichertes Futter signifikant verlängert werden. Zusätzlich wurde ihre Resistenz gegen thermischen und oxidativen Stress erhöht (Bonilla et al., 2002). Vor allem die antioxidativen, tumorsuppressiven, immunverstärkenden und temperatursenkenden Eigenschaften von Melatonin haben im Zusammenhang mit verschiedenen Alterstheorien zu der Spekulation geführt, Melatonin könne den Alternsprozess verzögern. Dies führte in einigen Teilen der Welt zum Konsum unphysiologisch hoher Dosen von Melatonin, obwohl Langzeitwirkungen und Nebenwirkungen zur Zeit noch nicht ausreichend erforscht sind.

Die wohl wichtigste Rolle des Melatonins ist jedoch seine Bedeutung als „Chronobiotikum“ – sein Einfluss auf die Steuerung circadianer Rhythmen. Über die nächtliche Melatoninbildung und -freisetzung übermittelt die „Innere Uhr“ dem Organismus auf neuroendokrinem Wege das Signal Dunkelheit. Über die Rezeptoren im SCN bildet Melatonin eine Rückkopplungsschleife im circadianen System. Melatonin kann die elektrische Aktivität der SCN-Neurone unterdrücken und zu bestimmten Zeitpunkten die Aktionsphase des circadianen Rhythmus im SCN verschieben. Rhythmisierender Einfluss des Melatonins konnte ebenso eindrucksvoll an der pankreatischen β -Zelle belegt werden (Peschke et al., 1998).

1.4. Melatoninrezeptoren

1.4.1. Identifizierung von Melatonin-Rezeptoren

Die physiologische Wirkung von Melatonin im Organismus wird über Melatoninrezeptoren vermittelt. Melatonin ist ein stark lipophiles Molekül und kann demnach recht einfach Zellmembranen penetrieren (Menéndez-Peláez et al., 1993; Costa et al., 1995).

Es konnten auch spezifische Bindungsstellen in Kernfraktionen von Tiergeweben gefunden werden (Acuna-Castroviejo, 1994). Untersuchungen, die eine direkte zellinterne Funktion des Melatonins über nucleäre Orphan-Rezeptoren postulierten (Wiesenberg et al., 1995; Missbach et al., 1996), konnten von anderer Seite nicht bestätigt werden (Greiner et al., 1996). Es hat sich gezeigt, dass die Melatoninwirkung über hochaffine Transmembranrezeptoren vermittelt wird, die zur Superfamilie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren gehören. Membranassoziierte Melatoninrezeptoren konnten bei allen untersuchten Tierspezies und beim Menschen gefunden werden (Kokkola und Laitinen, 1998). Die erfolgreiche Synthese von 2-[125I]-Iodomelatonin, einem hochaffinen Melatoninrezeptoragonisten mit hoher spezifischer Aktivität und sein Einsatz in Bindungsassays sowie in der Rezeptorautoradiographie ermöglichten die pharmakologische Charakterisierung und Lokalisierung von Melatoninbindungsstellen (Vakkuri et al., 1984a; Duncan et al., 1986, 1988; Niles et al., 1987;

Dubocovich, 1988; Pickering and Niles, 1989; Weaver et al., 1989). Die Verteilung der mit Hilfe der Bindungsstudien nachgewiesenen Rezeptoren ist sehr stark von der Spezies abhängig. Bei fast allen Wirbeltieren konnten im SCN und in der Pars tuberalis der Hypophyse spezifische Bindungsstellen nachgewiesen werden (Vanecek, 1988; Weaver et al., 1989; Williams, 1989; Morgan et al., 1994). Man geht davon aus, dass Melatonin auf die circadiane Rhythmik und die von der Hypophyse synthetisierten Hormone Einfluss nimmt. Beim Menschen konnten neben Bindungsstellen im SCN auch Signale im Hypothalamus, dem Kleinhirn und dem Kortex nachgewiesen werden (Reppert et al., 1988; Fauteck et al., 1994). Melatoninbindungsstellen konnten auch in peripheren Geweben nachgewiesen werden, wie z. B. in den Ovarien, im Darm und in Blutgefäßen (Viswanathan et al., 1990; Evans et al., 1992; Lee und Pang, 1992). Aufgrund von molekularbiologischen und pharmakologischen Untersuchungen konnten in den letzten Jahren die Melatoninrezeptoren in Subtypen differenziert werden. Ausgangspunkt für diese weitere Differenzierung der Rezeptoren war die Klonierung eines Melatoninrezeptors.

1.4.2. Klonierung des Melatonin-Rezeptors

Der erste hochaffine Melatoninrezeptor konnte aus den Melanophoren der Haut des südafrikanischen Krallenfrosches *Xenopus laevis* kloniert werden (Ebisawa et al., 1994). Das Gen kodiert für ein Protein von 420 Aminosäuren mit sieben hydrophoben Segmenten, die die Transmembrandomänen G-Protein-gekoppelter Rezeptoren darstellen (Abb. 3).

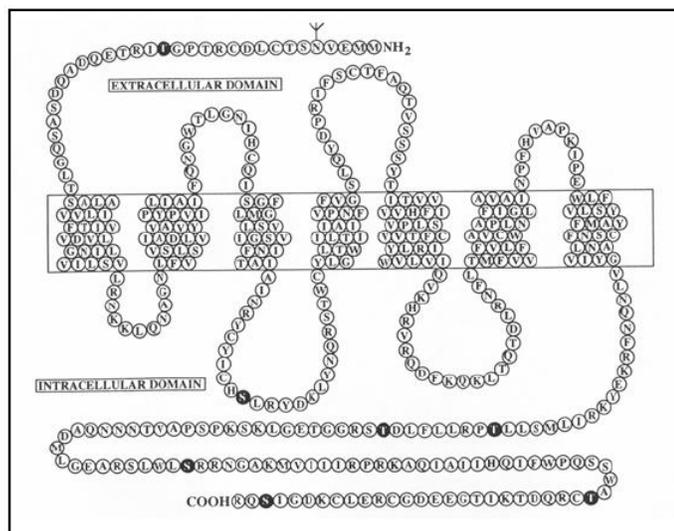


Abb. 3: Mögliche Struktur des Melatonin-Rezeptors. Dargestellt sind die sieben Transmembrandomänen mit dem extrazellulären N-Terminus und dem intrazellulären C-Terminus, sowie einer möglichen Glykosylierungsstelle (ψ) (Modifiziert nach Ebisawa, 1994).

Es besteht eine Kopplung an ein inhibitorisches GTP-bindendes Protein (G-protein, Gi). Die Aktivierung des Rezeptors führt zur Inhibition einer Adenylatzyklase über einen Pertussis-Toxin-sensitiven Mechanismus (Ebisawa et al., 1994). Der erste Rezeptor, der bei Säugertieren kloniert werden konnte, wurde zunächst als Mel_{1a}-Rezeptor bezeichnet. Er stimmt in seiner Aminosäuresequenz zu etwa 60% mit dem ursprünglichen Rezeptor des Krallenfrosches überein (Reppert et al., 1994). Dieser Rezeptortyp wird nach dem *Nomenclature Committee for the International Union of Pharmacology* (IUPHAR) heute als MT1-Rezeptor bezeichnet (Dubocovich et al., 1998a). Eine Expression des MT1-Rezeptors bei Säugetieren konnte vor allem im SCN, in der Pars tuberalis der Hypophyse und in anderen Gehirnregionen sowie in peripheren Geweben mit einschließlicher der pankreatischen Insel nachgewiesen werden (Morgan et al., 1994; Liu et al., 1997; Roca et al., 1997; Peschke et al., 2000, 2002; Clemens et al., 2001; Naji et al., 2004). Über seine Expression im SCN wird wahrscheinlich die Wirkung von Melatonin auf die „Innere Uhr“ vermittelt (Reppert et al., 1994). Kaum ein Jahr später konnte ein zweiter Melatoninrezeptor des Menschen kloniert werden, der sich in seinem pharmakologischen Verhalten und seiner Gewebeverteilung deutlich von dem zuvor klonierten abgrenzte (Reppert et al., 1995a). Dieser ursprünglich als Mel_{1b} bezeichnete Rezeptor wird nach der Nomenklatur des IUPHAR heute MT2-Rezeptor genannt. Der MT2-Rezeptor findet sich überwiegend in der Retina, z.B. bei Mensch und Krallenfrosch (Reppert et al., 1995a; Wiechmann et al., 1999), in der humanen Chorionkarzinoma (Jar)-Zelllinie (Shiu et al., 1999) sowie in humanen PAZ6-Adipozyten (Brydon et al., 2001). Die MT2-Rezeptorexpression im SCN und in den peripheren Organen ist so niedrig, dass sie nicht mittels Autoradiographie mit ¹²⁵I-2-Iodomelatonin (wie für MT1 üblich) detektiert werden kann, sondern nur durch RT-PCR. Dennoch ist bekannt, dass der MT2 für den phasenanpassenden Effekt von Melatonin verantwortlich ist (Liu et al., 1997; Hunt et al., 2001). Der MT2-Rezeptor wird ebenfalls auf der pankreatischen β -Zelle exprimiert (Mühlbauern und Peschke, 2007; Peschke et al., 2008). Ein dritter hochaffiner Melatoninrezeptor konnte bei Hühnern, Amphibien und Fischen nachgewiesen werden. Für diesen zunächst als Mel_{1c} bezeichneten Rezeptor ist in der Nomenklatur des IUPHAR keine Bezeichnung vorgesehen, da er bei Säugetieren nicht exprimiert wird (Reppert et al., 1995a). Neuerdings konnte der Mel_{1c}-Subtyp der Sauropsiden als GPR50 im Säuger identifiziert werden (Dufourny et al., 2008). Die Melatoninrezeptorproteine haben eine Länge von 346-420 Aminosäuren und ein geschätztes Molekulargewicht von 39-47 kDa. Die Rezeptoren gehören zur Superfamilie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren, deren gemeinsames Merkmal eine einzige Polypeptidkette mit sieben Transmembrandomänen ist, die intra- und extrazelluläre Schleifen miteinander verbinden. Rezeptoren dieser Superfamilie zeigen extrazelluläre N-Termini, intrazelluläre C-Termini und einige konservierte Aminosäurereste. Melatoninrezeptoren zeigen

jedoch wenig Ähnlichkeit zu den meisten prototypischen Rezeptoren dieser Gruppe. Die kodierende Region aller bisher geklonten Melatoninrezeptoren besteht aus zwei Exons, die durch ein relativ langes Intron (> 2 kb) getrennt werden.

1.4.3. Signaltransduktionswege der Melatoninrezeptoren

Die Melatoninrezeptoren sind an ein inhibitorisches G-Protein gekoppelt (Gi). Ihre Aktivierung führt zur Hemmung der Adenylatzyklase über einen Pertussistoxin sensitiven Mechanismus. Nach Hormonbindung treten membranständige Melatoninrezeptoren durch Konformationsänderung mit einem inhibitorischen G-Protein (Gi) in Kontakt und aktivieren dieses. Das Protein bindet bei Aktivierung GTP und dissoziiert in eine $G\alpha$ -GTP-Untereinheit und eine $G\beta\gamma$ -Untereinheit. Anschließend tritt die $G\alpha$ -GTP-Untereinheit in Kontakt mit der Adenylatzyklase und hemmt so die Neubildung von cAMP aus ATP. Durch seine intrinsische GTPase-Aktivität kommt es zur Reassoziierung des Gi-Proteins (Reppert et al., 1994, 1995; Conway et al., 2000). Neben der bereits beschriebenen Inhibition der cAMP Kaskade in der pankreatischen Insel hat sich kürzlich gezeigt, dass Kopplung des Melatoninrezeptors MT1 auch an die IP_3/Ca^{2+} - (Peschke et al., 2007; Bach et al., 2007) sowie über den MT2 an die cGMP- Signaltransduktionskaskade (Stumpf et al., 2008, 2009) möglich ist.

1.5. Die molekulare „Innere Uhr“

Lange Zeit war die Erforschung circadianer Rhythmen rein phänomenologischer Natur, und mehrere Modelle über die Funktionsweise des zellulären Oszillators blieben theoretische Spekulationen. Die Erforschung der molekularen Grundlagen für die Erzeugung eines circadianen Rhythmus hat zur Entdeckung von sog. „Uhrengenen“ geführt, deren Translationsprodukte als aktivierende oder hemmende Transkriptionsfaktoren die Expression von Genen beeinflussen können. Die molekulare Basis der Rhythmusgenerierung in den Zellen des SCN besteht aus interagierenden transkriptionellen/translationellen Rückkopplungsschleifen, in denen Uhrengen und die von ihnen kodierten Transkriptionsfaktoren miteinander interagieren (Abb. 4). Der zentrale Mechanismus ist eine Aktivierung der Transkription der Uhrengene aus der Period (Per1-2)- und Cryptochrom (Cry 1,2)-Familie durch die aktivierenden basic-helix-loop-helix-Transkriptionsfaktoren CLOCK und BMAL1. CLOCK- sowie BMAL1-Heterodimere bilden die aktivierenden Elemente des Uhrwerks und sind für sein Funktionieren unabdingbar (King et al., 1997; Gekakis et al., 1998; Bunger et al. 2000; Hogenesch et al., 2000). Die Expression von BMAL1-mRNA im SCN ist rhythmisch (Oishi et al. 2000; Shearman et al. 2000b). CLOCK wird hingegen konstant exprimiert (Tei et al. 1997; Shearman et al. 1999, 2000b). Nach Zusammenlagerung zu CLOCK-BMAL1-Heterodimeren, werden diese in den Zellkern transloziert

und induzieren dort nach Bindung an die E-Box die Expression der Uhrgene *Per1*, *2*; *Cry1*, *2* und *RevErb α* , die für hemmende Faktoren kodieren.

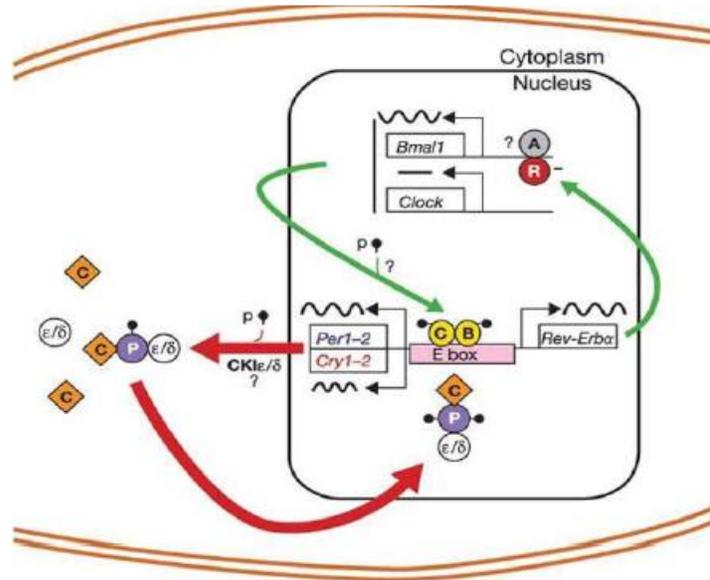


Abb. 4: Molekulare Grundlage der circadianen Rhythmogenese in SCN des Säugers. Positiv wirkende Elemente sind mit dünnen grünen Pfeilen dargestellt, negative mit dicken roten. CLOCK (C, Kreis) und BMAL1 (B, Kreis) bilden Heterodimere und aktivieren die Transkription von *Per1-2*, *Cry1-2* und *RevErb α* , indem sie an E-Box-Elemente in deren Promotor binden. Wenn PER (P, Kreis) im Cytosol ansteigt, bildet es mit CRY (C, Raute) und CK1 ϵ/δ (ϵ/δ , Kreis) einen heterotrimeren Komplex, der phosphoryliert wird (p). Im Kern lagert sich der Komplex aus CRY-PER-CK1 ϵ/δ an das Heterodimer CLOCK-BMAL1, dessen Aktivität dadurch unterdrückt wird, obwohl es weiterhin an DNA gebunden ist (negative Schleife). Die positive Schleife wird gebildet, indem *RevErb α* über *Rev-Erb/ROR* response-Elemente im Promotor von *Bmal1* dessen Transkription unterdrückt. Durch die CRY-/PER-vermittelte Hemmung der Transkription von *RevErb α* wird die Expression von *Bmal1* enthemmt. Ein Aktivator (A, Kreis), z.B. das *ROR α* soll die Transkription von *Bmal1* aktivieren (u. U. ist hierin auch PER2 involviert). Möglicherweise spielen auch andere Kinasen als CK1 ϵ/δ in der Phosphorylierung von Uhrgen-Proteinen eine Rolle (Modifiziert nach Reppert & Weaver, 2002).

Auch hier werden Heterodimere gebildet, z.B. von PER1/CRY1. Im Zytosol lagern sich PER1 über zwei verschiedene Bindungsstellen mit CRY1 und CK1 ϵ zu einem hemmenden Regulatorkomplex zusammen; dieser wird in den Kern transportiert und unterdrückt mit zeitlicher Verzögerung die aktivierende Wirkung des CLOCK/BMAL1-Heterodimers. Dadurch wird die Rückkopplungsschleife geschlossen. Die Konzentration von PER1-Protein wird durch den Grad der Phosphorylierung durch die Caseinkinasen 1 ϵ/δ (CK1 ϵ/δ) bestimmt; phosphoryliertes PER-Protein wird proteosomal abgebaut (Reppert und Weaver, 2002). Erst wenn genügend Menge von nicht-phosphoryliertem PER1 zur Verfügung steht, kommt es zur Bildung von PER1/CRY1-Komplexen (Lee et al. 2004, Takano et al. 2004). Die Phosphorylierung von Uhrgen-Proteinen durch

CK1 ϵ/δ spielt eine wichtige Rolle in der Feinabstimmung der „Inneren Uhr“, deren Bedeutung deutlich wird, wenn man sich das Krankheitsbild FASPS (*familial advanced sleep phase syndrome*) vor Augen führt. Das familiär auftretende FASPS basiert auf einer *missense*-Mutation innerhalb der CK1 ϵ -Bindungsstelle im Per2-Gen, die die Phosphorylierung von PER2-Protein verhindert und eine verkürzte Periode mit gestörtem Schlaf-Wach-Verhalten zur Folge hat (Toh et al. 2001). RevErb α , ein *orphan nuclear receptor*, dessen eigene Transkription über eine CLOCK-BMAL1-getriebene E-Box rhythmisch aktiviert wird, bindet an RevErb/ROR response-Elemente im Promotor von Bmal1, dessen Expression somit gehemmt wird (Preitner et al. 2002, Ueda et al. 2002). In der Folge fällt der Bmal1-mRNA-Gehalt, während Per- und Cry-mRNA ansteigen. Die CRY-PER-vermittelte Hemmung der Genexpression über Interaktion mit CLOCK-BMAL1 beinhaltet auch eine Unterdrückung von RevErb α , wodurch Bmal1 enthemmt wird (Preitner et al. 2002; Yu et al. 2002). Für die positive Transkriptionskontrolle von Bmal1 wurde lange Zeit Per2 verantwortlich gemacht (Shearman et al. 2000b). Derzeit wird jedoch angenommen, dass hier das Uhrgen ROR α involviert ist, das über RevErb/ROR-Elemente (RRE) im Promotor von Bmal1 bindet und für dessen normale Expression notwendig ist (Sato et al., 2004; Akashi und Takumi, 2005).

Zusätzlich zu dem molekularen Mechanismus der „Inneren Uhr“, wie er hier beschrieben wurde, regulieren auch die rhythmisch exprimierten Leucin-Zipper-Transkriptionsfaktoren DBP (*D-Box binding protein*) und E4BP4 antagonistisch über eine D-Box im Promotor von Per1 dessen Expression (Yamaguchi et al. 2000; Mitsui et al. 2001). Den molekularen Ausgang der circadianen Rhythmogenese im SCN bilden so genannte Uhren- kontrollierte Gene (*clock-controlled genes, ccg*), deren Transkription durch CLOCK/BMAL1 aktiviert und durch PER/CRY inaktiviert wird und wodurch Stoffwechselfvorgänge rhythmisiert werden. Diese werden durch die „Innere Uhr“ über strukturelle cis-aktive Sequenzen (auch Kontrollelemente oder *Enhancer* genannt) beeinflusst. *Enhancer* (eng. Verstärker) sind bestimmte Gensequenzen, deren Vorhandensein zu einer vielfachen Steigerung der Transkription dieser Gene führt; sie liegen meist einige hundert bis tausend Basenpaare oberhalb der Promotorregion, können jedoch in Einzelfällen auch unterhalb oder innerhalb des Gens lokalisiert sein. Zu den Kontrollelementen werden heute gezählt: die E-Box, RevErb α /ROR-Elemente und Dbp- Bindungsstellen (Ueda et al., 2002). Zu den E-Box-gesteuerten CCGs gehören unter anderem das Neuropeptid Vasopressin (Jin et al., 1999) sowie Arylalkylamin-N-Acetyltransferase (AA-NAT) das Schlüsselenzym der Melatoninbiosynthese. Ein anderes bekanntes Beispiel ist der bereits erwähnte Transkriptionsfaktor DBP, dessen Transkription über eine E-Box rhythmisch reguliert wird. In der Leber steuert er direkt die Expression von Cytochromen, die in den Metabolismus von Cholesterol, Aminosäuren, Arzneimitteln und Androgenen involviert sind (Lavery et al., 1999).

1.6. Uhrengene in der Peripherie: die Zelle als kleinste Einheit der „Inneren Uhr“

Die rhythmische Expression von Uhrengenen wird nicht nur im *SCN*, dem zentralen circadianen Rhythmusgenerator, beobachtet, sondern auch in zahlreichen Geweben außerhalb dieses Kerngebietes. Mit der Klonierung rhythmisch exprimierter Gene (v. a. von *Per*) im *SCN* wurden im Laufe der letzten Jahre eine Vielzahl von Organen identifiziert, die ebenfalls eine oszillierende Uhrengenenexpression zeigen, wie z.B. Leber, Leukozyten, Skelettmuskulatur sowie das Pankreas (Oishi et al., 1998b; Zylka et al., 1998; McNamara et al., 2001; Nonaka et al., 2001; Mühlbauer et al., 2004, 2009). Diese sind als periphere Oszillatoren zu betrachten und auch hier tragen die Uhrengene zur Aufrechterhaltung der circadianen Rhythmik bei. Diese peripheren Rhythmen scheinen normalerweise (s.u. Damiola et al., 2000) vom *SCN* vorgegeben zu sein, da die Phasenlage peripher oszillierender Uhrengene zeitlich 3-6 h im Vergleich zum *SCN* verzögert ist (Reppert und Weaver, 2001). Wesentliche Unterschiede zwischen zentralem Oszillator und peripheren Schrittmachern finden sich in der Beeinflussbarkeit der Systeme wieder. Im Gegensatz zum zentralen Oszillator im *SCN* ist die rhythmische Expression von Uhrengenen in peripheren Oszillatoren abhängig von einem rhythmisierenden endokrinen und/oder neuronalen Signal. Während der *SCN* vorwiegend durch Licht als Zeitgeber synchronisiert wird, gelten für Organe wie Leber und Herz humorale Faktoren wie Glukose (Hirota et al., 2002) oder Hormone wie Glukokortikoide (Balsalobre et al., 2000) oder Melatonin (Peschke und Peschke, 1998, Rutter et al., 2002) als mögliche Zeitgeber. Periphere Oszillatoren können sich von der Rhythmusvorgabe durch die „Zentraluhr“ - dem *SCN* - abkoppeln lassen (Damiola et al., 2000). Mittels Futterrestriktion während der Lichtphase wurde nach einigen Tagen eine Umkehr der Expressionskinetik von *Per1*, *Per2* und *Per3* sowie *Cry1* beobachtet, allerdings nur in Leber, Niere und Pankreas, nicht jedoch im *SCN*. Diese Befunde zeigen, dass die „peripheren Uhren“ anderen Zeitgebern folgen als die Zentraluhr, wobei Futter als Zeitgeber fungieren kann. Die Ausprägung einer circadianen Rhythmik ist nicht nur Eigenschaft von Organismen, Organen oder Geweben, sondern lässt sich auch auf Ebene einzelner Zellen nachweisen (Schibler et al., 2003). Zahlreiche Untersuchungen wie von Balsalobre et al. (1998), Yagita und Okamura (2000) sowie Grundschober et al. (2001) konnten den Nachweis einer circadianen Schwingung in immortalisierten Säugerzellen nachweisen. Dass der Zellteilungszyklus in manchen Geweben des Säugers einem Tagesrhythmus folgt, konnte in Untersuchungen an intestinalem Epithel (Buchi et al., 1991), der Cornea (Sasaki et al., 1995) und in Keratinozyten (Garcia et al., 2001) belegt werden. Die Bedeutung von Uhrengenen auf zellulärer Ebene wird durch Daten von Matsuo et al. (2003) verdeutlicht und für die Kontrollfunktion mitotischer Prozesse erweitert.

2. Zielstellung der Arbeit

Im Rahmen dieser Arbeit sollen die Auswirkungen des Melatonin-Rezeptor-*knockouts* auf „die Innere Uhr“ und den Glukosestoffwechsel der Maus in Abhängigkeit vom *knockout*-Typ (entweder MT1-Rezeptor, MT2-Rezeptor oder Doppel-*knockout* beider Rezeptoren) auf molekular-biologischer Ebene untersucht werden.

Zunächst soll der Nachweis des Melatonin-Rezeptor-*knockouts* in den Tierlinien MT1-, MT2- und MT1/2 erbracht sowie die Existenz der intakten MT1- und MT2-Rezeptoren im Wildtyp gezeigt werden.

Zur Untersuchung der Auswirkungen des Rezeptor-*knockouts* auf „die Innere Uhr“ sollen jeweils ein Vertreter der Uhrengen-Gruppen, die über drei bis lang bekannte Kontrollelemente ihre regulierende Wirkung entfalten, ausgesucht und deren mRNA-Expression im circadianen Profil analysiert werden.

Diese Uhrengene oder Uhrengen-gesteuerten Gene (*clock-controlled output genes*) sind im Einzelnen: Per1, das über E-Box agiert, Dbp als Vertreter der über D-Box (oder auch Dbp/E4BP4-*binding elements* genannter Bindungssequenz) wirkende Gene und schließlich RevErb α – mit Wirkung über RREs (auch RevErb α /ROR-*binding elements* genannt) an Zielgenen.

Dabei soll insbesondere auf mögliche Amplitudenänderungen sowie Phasenverschiebungen der Genexpression in Abhängigkeit vom *knockout*-Typ eingegangen werden.

Ferner wird das Ziel verfolgt, Aussagen über eventuelle organspezifische Auswirkungen des Melatonin-Rezeptor-*knockouts* treffen zu können. Dazu soll die Expression der oben genannten Uhrengene Per1, Dbp und Rev.Erb. α in drei Organsystemen, die für die Glukose-Regelung wichtig sind, nämlich: Pankreas, Leber und Hypothalamus untersucht werden.

In Anlehnung und in Ergänzung zu gut bekannten Wirkungen des Melatonins auf die Insulinsekretion, erarbeitet an *in vitro* Versuchen in Superfusion, sollen nun die circadiane Insulin mRNA-Expression und Blut-Glukose-Profile in den *knockout*-Tierlinien untersucht werden. Zusätzlich dazu sollten Bestimmungen der circadianen Insulin-Konzentrationen in Seren der jeweiligen Tierlinien mittels Insulin-Radioimmunoassay erfolgen.

3. Material und Methoden

3.1. Versuchstierhaltung und Materialgewinnung

Als Versuchstiere standen 4 Mauslinien: Wildtyp, MT1-Rezeptor-*knockout*-, MT2-Rezeptor-*knockout* sowie MT1/MT2-Rezeptor-Doppel-*knockout* zur Verfügung (Abb. 5). Für die Untersuchungen wurden ausschließlich 6 bis 8 Wochen alte männliche und weibliche Tiere herangezogen.

Die Melatoninrezeptor-*knockout*-Mäuse wurden ursprünglich aus der C57 black-Maus, einem Melatonin-defizienten Stamm, entwickelt, die mit der C3H-Maus, einem Melatonin-profizienten Stamm, rückgekreuzt wurden (Literatur, siehe Tab. 1):

Tab. 1: Charakterisierung der Tierlinien

Tierlinie	MT1-Rezeptor	MT2-Rezeptor	Literatur
Wildtyp (WT) MelaABB	exprimiert	exprimiert	
MT1-<i>knockout</i> Melaabb MT1-/-	deletiert	exprimiert	Liu et al., 1997
MT2-<i>knockout</i> MelaAbb MT2-/-	exprimiert	deletiert	Jin et al., 2003
Doppel-<i>knockout</i> Melaabb MT1/2-/-	deletiert	deletiert	Jin et al., 2003

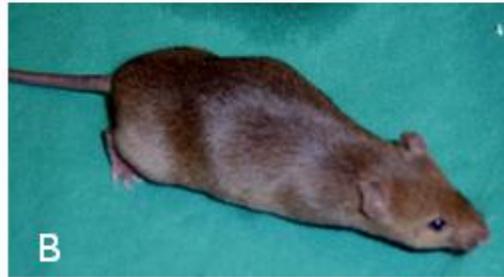


Abb. 5: Versuchstierlinien-Übersicht:

(A) Wildtyp-Maus [Mel AABB], (B) Doppel-*knockout*-Maus [Mel aabb],
(C) MT1-*knockout*-Maus [Mel aaBB], (D) MT2-*knockout*-Maus [Mel AAbb]

Die Tiere wurden in fensterlosen, klimatisierten Versuchsterräumen mit einem Hell-Dunkel-Regime von 12 h Licht und 12 h Dunkelheit (Beginn der Lichtphase um 6:00 h) gehalten und mit einem handelsüblichen pelletierten Trockenfutter und Wasser *ad libitum* versorgt.

Zur Paarung wurden Männchen und Weibchen über einen Zeitraum von 14 Tagen zusammengesetzt, anschließend wurden die tragenden Weibchen isoliert. Die Jungtiere wurden 21 Tage bei dem Muttertier belassen und anschließend nach Geschlechtern getrennt in Gruppen von vier bis sechs Tieren gehalten. Bis zum Alter von 14 Tagen ernährten sich die Jungtiere ausschließlich von Muttermilch. Ab der dritten Lebenswoche wurde zusätzlich pelletiertes Futter aufgenommen, welches zur leichteren Verfügbarkeit für die Jungtiere auf den Käfigboden gelegt wurde. Nach dem Absetzen erhielten die Tiere ausschließlich Pellets und Wasser *ad libitum*.

Zur Erfassung circadianer Unterschiede wurden jeweils 3- 4 Versuchstiere zu 8 festgelegten Zeitpunkten (8:00, 11:00, 14:00, 17:00, 20:00, 23:00, 2:00 und 5:00 Uhr), also in 3-Stunden-Intervallen, mit Äther betäubt. Nach Eröffnung des Thorax wurde durch Punktion des rechten Herzventrikels Blut mit einer heparinisierten Kanüle entnommen. Zeitgleich erfolgte die Bestimmung des Blutzuckers mit einem handelsüblichen Meßgerät. In der Folge wurden Pankreas, Leber (linker Leberlappen) und Hypothalamus entnommen. Das Pankreas wurde nach Entnahme sofort in ein 12 ml Zentrifugenröhrchen mit Schraubverschluß verbracht, welches das Konservierungsregenz RNA-Later™ der Firma Ambion (Ambion Inc. TX, USA) in einem empfohlenen Verhältnis von 5 x Vol RNA-Later zu 1 x Vol Gewebe enthielt. RNA-Later dient vor allem dem Schutz der RNA. Das ist vor allem beim Pankreas notwendig, um die Autolyse des Gewebes durch die eigenen Enzyme zu verhindern. Die anderen Organe wurden in Aluminiumfolie in Flüssigstickstoff (- 196 °C) schockgefroren. Dauerkonservierung erfolgte für schockgefrorene Gewebe bei -80°C. RNA-Later-konserviertes Gewebe wurden über Nacht bei 4°C gelagert und anschließend bei - 20°C dauerhaft asserviert. Das Serum wurde durch die anschließende Zentrifugation des Blutes (für 6 min bei 6500 rpm) gewonnen. Die Materialgewinnung während der Dunkelheit-Phase (20:00, 23:00, 2:00 und 5:00) wurde mit Hilfe einer Rotlicht-Lampe durchgeführt um durch Lichteinfall bedingte unphysiologische Einflüsse auf das melatoninproduzierende Pinealorgan und andere circadiane Prozesse der Versuchstiere zu vermeiden.

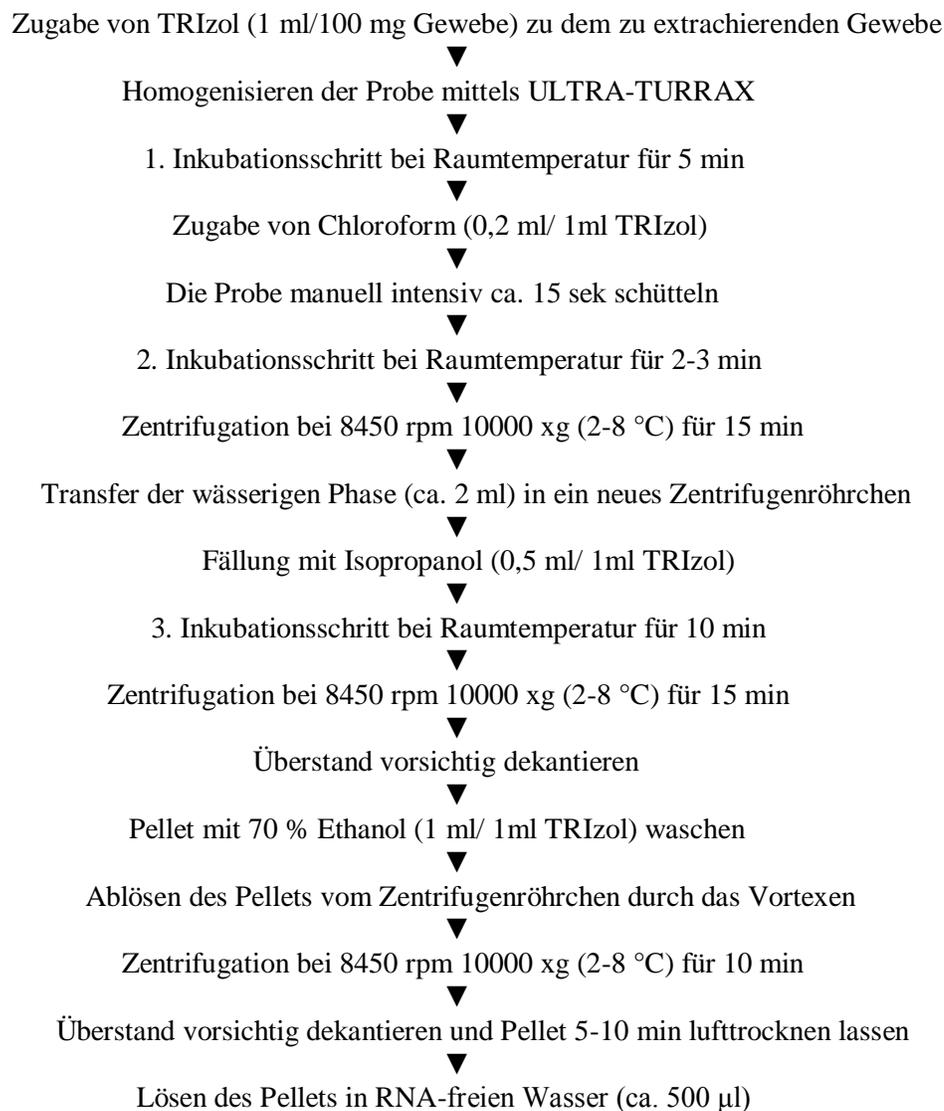
3.2. Molekularbiologische Untersuchungen

3.2.1. RNA-Isolierung

Die am häufigsten verwendete Technik zur Isolierung von RNA, die Methode nach Chomzynski und Sacchi (1987), basiert auf der Grundlage, dass das Gewebe in einer Guanidinisothiocyanat-

lösung lysiert und dabei sehr effektiv Proteine samt RNAsen denaturiert werden. Im sauren Milieu des zugegebenen Phenols sammeln sich Proteine und kleinere DNA-Fragmente, wobei größere DNA-Moleküle sich nach der Zentrifugation in der Interphase befinden. Die RNA ist in der wässrigen Phase (Supernatant) vorhanden und kann durch Zugabe von Alkohol gefällt werden. In dieser Arbeit wurde RNA mit dem TRIzol[®]-Reagenz isoliert, dessen Funktionsweise auf der oben beschriebenen Methode beruht. Im Folgenden sind die einzelnen, leicht modifizierten Arbeitsschritte der RNA-Isolierung kurz aufgeführt:

RNA-Extraktion:



Der erste Inkubationsschritt nach Zugabe des TRIzol[®]-Reagenz und Erreichen eines Homogenisates mittels ULTRA-TURRAX[®] T25 basic diente der vollständigen Dissoziation der Nukleotidkomplexe. Die Zugabe von 0,2 ml Chloroform pro 1 ml TRIzol-Reagenz ermöglichte die Abtrennung der übrigen Gewebsbestandteile von der RNA. Mittels anschließender Zentrifugation wurde eine Phasentrennung erreicht. Die Zugabe von Isopropanol zu der zuvor abgenommenen wässrigen Phase diente der RNA-Präzipitation. Das gewonnene RNA-Pellet wurde anschließend mit 70% Alkohol gewaschen. RNA ist ständig der Gefahr ausgesetzt, von RNAsen enzymatisch abgebaut zu werden. Da RNAsen äußerst stabil sind und im Gegensatz zu den verwandten DNAsen keine Cofaktoren wie z.B. Mg₂₊ für ihre katalytische Aktivität benötigen, muss eine Kontamination mit RNAsen vermieden werden. Aus diesem Grund erfolgte das Lösen der RNA-Pellets in RNase-freiem Wasser. Außerdem wurde grundsätzlich mit RNase-freien Materialien (Pipettenspitzen, Einweggefäße etc. gearbeitet). Die Konzentrationsbestimmung von RNA-Lösungen erfolgte photometrisch über die Messung der optischen Dichte (OD) bei einer Wellenlänge von 260 nm. Die Konzentration der erhaltenen Gesamt-RNA ließ sich nach folgender Formel berechnen:

$$\mu\text{g RNA/ml} = (\text{Absorption } 260\text{nm}) \times 40 \times \text{Verdünnungsfaktor}$$

Zusätzlich wurde zur Kontrolle der RNA-Reinheit die Absorption bei einer Wellenlänge von 280 nm gemessen, um aus dem Quotienten von OD_{260 nm}/OD_{280 nm} den Reinheitsgrad der RNA-Lösung zu bestimmen und eine Aussage über Proteinkontamination treffen zu können.

3.2.2. RNA-Gelelektrophorese

Die qualitative Kontrolle der RNA erfolgte mittels Auftrennung der Proben in der Agarose-Gelelektrophorese. Dazu wurden 0,6 g Agarose mit 33 ml destilliertem Wasser versetzt und auf dem Magnetrührer bei ca. 180 °C gelöst. Nach dem Abkühlen und Zugabe von 4,6 ml MOPS-Puffer (Morpholino-Propan-Sulfonsäure-Puffer; Zusammensetzung siehe unter 3.5.1.) sowie 1,3 ml Formaldehyd zur Hemmung der Ausbildung von Sekundärstrukturen der RNA wurde das Gel in einen Gelträger gegossen. Als Laufpuffer wurde nach dem Erstarren des Gels 300 ml des 1:10 verdünnten MOPS-Puffers in die Kammer gegeben. Vor dem Pipettieren in die Geltaschen wurden die Proben entsprechend vorbereitet. Es erfolgte eine Zugabe von je 2,5 µl MOPS-Puffer, 12 µl Formamid und 4 µl Formaldehyd zu je 6 µl Proben. Anschließend folgten ein Denaturierungsschritt bei 55 °C für 15 min, Abkühlen auf Eis sowie Zugabe von je 4 µl Blue Juice. Bei einer Spannung von 40 V/80 mA wanderten die Proben für etwa 2 Stunden. Das Gel wurde für 10 min in Ethidiumbromid gefärbt und nach 24 Stunden wässern in destilliertem H₂O war die Detektion

mittels einer UV-Licht-Photoeinrichtung möglich. Bei der Extraktion wird die gesamte sich im Zytoplasma befindliche RNA: ribosomale RNA (rRNA), *transfer*-RNA (tRNA) und *messenger*-RNA (mRNA) isoliert. Das Vorliegen intakter zytoplasmatischer RNA ist anhand von zwei für die 28S-rRNA und die 18rRNA charakteristischen Banden erkennbar. Weitere RNA-Produkte sind im Gel aufgrund ihrer geringen Konzentration nicht als separate Bande sichtbar. Exemplarisch ist so ein RNA-Gel in Abb. 6 dargestellt:

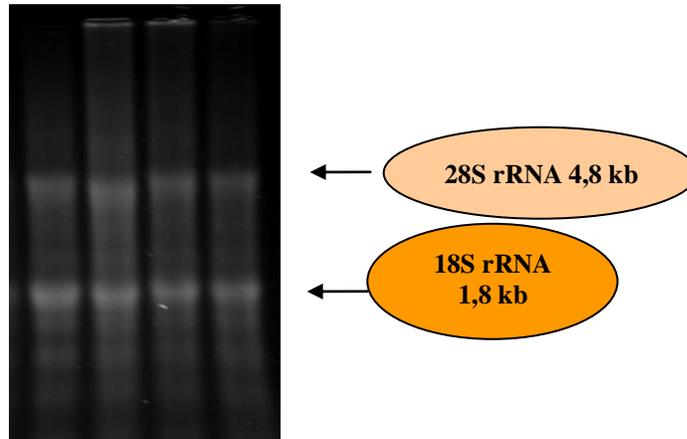


Abb. 6: RNA-Qualitätskontrolle nach Extraktion aus Maus-Pankreata.

3.2.3. cDNA-Synthese

Um eine vollständige Eliminierung verbleibender DNA in den Proben zu erreichen, ging der cDNA-Synthese ein DNA-Verdauungs-Schritt mittels des Enzyms DNase voraus. Verwendet wurde ein System (RNAfree) von Ambion Inc.

Im Folgenden sind die einzelnen Arbeitsschritte kurz aufgeführt:

DNase-Behandlung von RNA-Proben

1. Zugabe von 10 µl DNase-Puffer zu je 100 µl RNA in Lösung im 1,5 ml Eppendorfgefäß auf Eis
2. Zugabe von 1 µl DNase-Enzym (2U)
3. Die Proben vortexen
4. Inkubation bei 37 °C für 25 min
5. Zugabe von 10 µl DNase-Inaktivierungsreagenz
6. Die Proben vortexen
7. Inkubation bei Raumtemperatur für 2 min; zwischendurch die Proben vortexen
8. Zentrifugation 1 min (Eppendorfszentrifuge 12000 rpm, bei Raumtemperatur)
9. Überstand (DNA-freie RNA) in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß übertragen

Um die Expression bestimmter Gene auf mRNA-Ebene mittels PCR-Techniken zu untersuchen, wurde zunächst die gewonnenen Gesamt-RNA mit Hilfe einer RNA-abhängigen DNA-Polymerase

(retroviralen Ursprungs) mittels *random*, d.h. zufällig entlang des RNA-Stranges bindender Hexanukleotid-Primer, in cDNA umgeschrieben. Die Transkription der mRNA in cDNA erfolgte mittels eines RT-Kits (Promega Inc. Wi, USA). Dazu wurde je 1 µg der Proben-RNA mit RNase-freiem Wasser auf ein Volumen von 9,5 µl aufgefüllt und nach 10minütiger Inkubation bei 70 °C zur thermischen Denaturierung im Thermomixer und Abkühlen auf Eis mit 10,5 µl Mastermix (Tab. 2) versetzt. Anschließend wurde der Reaktionsansatz bei 37 °C für 60 min inkubiert und für 5 min auf 99 °C erhitzt. Nach dem Abkühlen auf Eis wurden die Reaktionsansätze mit je 80 µl Nuklease-freiem Wasser auf ein Volumen von 100 µl aufgefüllt und bei - 20 °C aufbewahrt.

Tab. 2: Mastermix (MM)-Zusammensetzung für die RT-Reaktion

Reagenz	Menge
- MgCl ₂	4 µl
- Reverse Transkriptase 10 × Buffer	2 µl
- dNTP Mischung 10 mmol/l	2 µl
- Recombinanter RNasin [®] Ribonuclease Inhibitor	0,5 µl
- Random Primer	1 µl
- AMV Reverse Transkriptase	1 µl

3.2.4. Real-time-RT-PCR

Mit Hilfe einer „Polymerasekettenreaktion“ (*Polymerase Chain Reaktion*, PCR) kann ein beliebiger DNA-Abschnitt *in vitro* selektiv und exponentiell vermehrt werden. Voraussetzung ist, dass die Sequenz des zu vermehrenden DNA-Abschnittes bekannt ist um Startsequenzen (*Primer*) für die DNA-Polymerase synthetisieren zu können. Diese Startermoleküle sind synthetisch hergestellte DNA-Oligonucleotide, bestehend aus 20-30 Basenpaaren. Von deren 3'-Ende aus synthetisiert eine thermostabile DNA-Polymerase (meist *Thermus aquaticus* DNA-Polymerase oder kurz Taq-Polymerase) einen komplementären DNA-Strang. Durch die Auswahl von *Primern* mit komplementären Sequenzen auf gegenüberliegenden Strängen der *Template*-DNA kann gezielt die DNA-Sequenz zwischen den *Primern* amplifiziert werden. Die Reaktion verläuft in sog. Thermocyclern, Maschinen, die temperaturkonstante DNA Vermehrungs-Zyklen garantieren. Ein PCR-Zyklus beginnt mit der thermischen Denaturierung des zu amplifizierenden DNA-Doppelstranges, der in zwei einzelsträngige DNA-Matrizenmoleküle aufgeschmolzen wird (Denaturierung). Danach kühlt das Reaktionsgemisch auf eine Temperatur ab, die es den im Überschuss befindlichen *Primern* erlaubt, sich an die komplementäre Zielsequenz der Matrizen-DNA anzulagern (*Annealing*). Diese Temperatur ist *primerspezifisch*. Im weiteren wird die

Temperatur auf das Temperaturoptimum der DNA-Polymerase erhöht, wobei der *Primer* durch Einbau von komplementären Nucleotridtriphosphaten verlängert wird, bis wieder eine doppelsträngige DNA vorliegt (*Elongation*). Wiederholt man mehrfach diese drei Schritte, erreicht man mit jedem Zyklus eine Verdopplung, durch die Aneinanderreihung (Kette) mehrerer solcher Zyklen eine exponentielle Anreicherung der Ziel-DNA. Im Idealfall kommt es nach 30 Zyklen zu einer etwa 10^6 -fachen Vervielfältigung der anfangs eingesetzten DNA-Menge. Die PCR-Produkte können zur Kontrolle des PCR-Produktes in einem Agarose-Gel nach Anfärbung mit einem Fluoreszenzfarbstoff wie Ethidiumbromid, unter langwelligem UV-Licht, sichtbar gemacht werden. Im Verlauf der Arbeit wurde eine Variante der konventionellen RT-PCR (*reverse transcription, PCR*), nämlich die *real-time* RT-PCR eingesetzt. Bei diesem technischen Ansatz lassen sich die PCR-Produkte in „Echtzeit“ (*real-time*) erfassen und aufzeichnen. Der Vorteil der *real-time* RT-PCR ist, dass auf Grund ihrer hohen Sensitivität bei deutlich weniger Amplifikationszyklen auch Unterschiede des mRNA-Gehaltes bei schwach exprimierten Genen dargestellt werden können. Das Prinzip der *real-time* RT-PCR beruht darauf, dass man zum PCR-Ansatz einen Fluoreszenzfarbstoff (hier: EVA Green[®] Biotrend Chemikalien GmbH, Köln, Deutschland) zugibt, der mit neu synthetisierter DNA interagiert. Am Ende eines jeden Amplifikationszyklus kann die Fluoreszenz gemessen und auf den Gehalt an vorhandener DNA rückgeschlossen werden. Dabei ist die Fluoreszenzintensität proportional zur Menge der DNA im Reaktionsansatz. Die Messung der Fluoreszenz erfolgte am Ende eines jeden Elongationsschrittes. Die PCR wurde unter folgenden Reaktionsbedingungen durchgeführt (Tab. 3). Jeder Reaktionsansatz mit einem Volumen von 20 μ l enthielt 4 μ l der entsprechenden cDNA, 4, 5 μ l Nuklease-freies Wasser, 0,25 μ l des Fluoreszenzfarbstoffes Eva Green[®], je 0,5 μ l der Primer sowie 10 μ l eines Mastermix (Promega Inc., Madison, WI, USA), welcher das Enzym Taq-Polymerase (50 units/ml), MgCl₂ (3 mmol/l) und die Basen dATP, dGTP, dTTP und dDTP (je 400 μ mol/l) enthält. Die Amplifikation wurde mittels computergesteuertem Thermocycler *Rotorgene 2000* (Corbett-Research Inc., Mortlake, NWS, Australien) durchgeführt. Die quantitative Auswertung erfolgte durch eine Doppelbestimmung der jeweiligen Proben und Berechnung der Mittelwerte. Die Quantifizierung der Amplifikationskurven erfolgte mit Hilfe der Analysesoftware *Rotorgene V. 4.6* (Corbett Research Inc., Mortlake, NSW, Australien) über den *cycle-threshold* (Ct- Wert). Dieser Wert beschreibt die zyklusabhängige Fluoreszenzzunahme bis zum Erreichen eines definierten Schwellenwertes, der im linearen Bereich der sigmoidalen Amplifikationskurve liegen sollte (siehe Abb. 7). Zur Berechnung der relativen mRNA-Konzentration eignet sich die $\Delta\Delta$ Ct-Methode (Livak und Schmittgen, 2001). Dazu ermittelt man zunächst den Δ Ct-Wert als Differenz der Ct-Werte des Standard-Gens, welches konstant exprimiert wird (in dieser Arbeit - β -Aktin), und der Zielgene (z.B. Per1) für jede Probe.

Tab. 3: Reaktionsbedingungen der RT-PCR

Reaktionszyklus	Temperatur	Dauer
1. Initiale Denaturierung	95 °C	2 min
2. Amplifikation (40-45 Zyklen)		
2.1. Denaturierung	94 °C	30 s
2.2. Primeranlagerung	62- 64 °C	30 s
2.3. Elongation	72 °C	30- 40 s
2.4. Messung des Fluoreszenzsignals	80- 85 °C	15 s
3. Halt (Abkühlung)	40 °C	2 min
4. Halt (Erwärmung)	50 °C	1 min
5. Schrittweise Denaturierung und Messung	von 50 auf 99 °C	1 °C/min

Die Differenz aus den ΔC_t -Werten des Standards und der Proben ergibt den $\Delta\Delta C_t$ -Wert. Mit Hilfe der Gleichung $2^{-\Delta\Delta C_t}$ konnten die relativen Konzentrationen der mRNA der zu untersuchenden Gene bestimmt werden. Die Sequenzen der in dieser Arbeit verwendeten *Primer* sind Tab. 4 zu entnehmen.

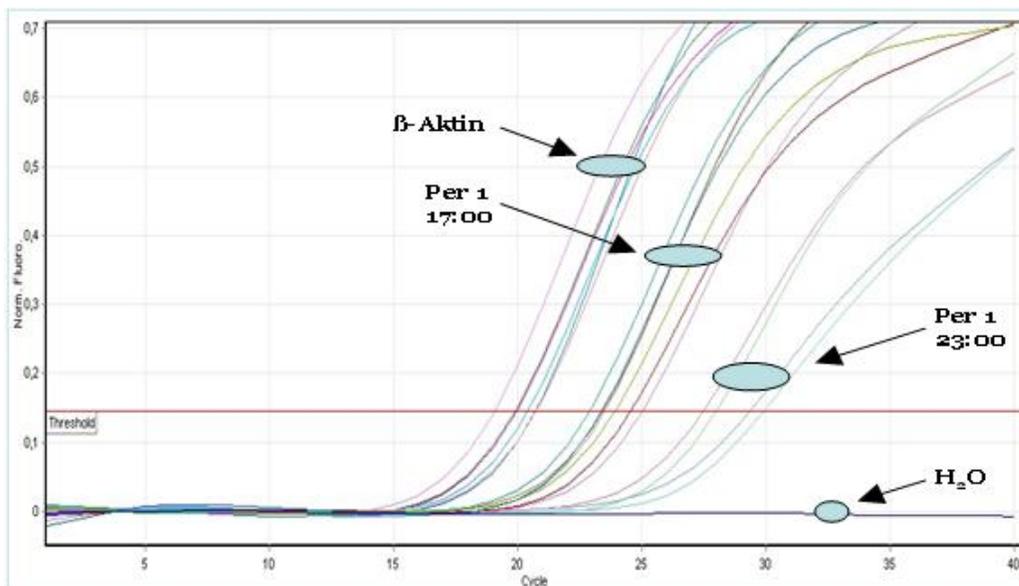


Abb. 7: Ergebnis eines *real-time* RT-PCR-Laufes, welcher die relative Fluoreszenz-Akkumulation von β -Aktin und Per1-Produkten, ausgehend von cDNA aus der Maus- Pankreata-RNA, darstellt. H₂O dient hier als PCR-Negativkontrolle.

Tab. 4: Primersequenzen der in der Arbeit verwendeten Oligonukleotide

Protein	Primersquenz vor	Primersequenz rück	Amplikon Größe	Publizierte Sequenz
β-Aktin Actb	ACTCCTACGTGGGCGACGAAGG	CAGGTCCAGACGCAGGATGGC	389 bp	NM_007393
Per 1 Per 1	CCAGGCCCGGAGAACCTTTTT	CGAAGTTTGAGCTCCCGAAGT	403 bp	NM_011065
RevErba Nr1d1	ACAGCTGACACCACCCAGATC	CATGGGCATAGGTGAAGATTTCT	101 bp	NM_145434
Dbp Dbp	CCGTGGAGGTGCTAATGACCT	CCTCTGAGAAGCGGTGCCT	105 bp	NM_016974
Insulin 2 Ins2	TCTTCTACACCCCATGTCCC	GGTGCAGCACTGATCCAC	149 bp	NM_008387
Mel1a (MT1) <i>MTNR1</i>	GCAGACCTCGTGGTGGCTGT	ATCGTGTACGCTGAGCTGAC	353 bp	NM_008639
Mel1b (MT2) <i>MTNR2</i>	CCCATCTACATCAGCCTCGT	ATTCGCAGGTAGCAGAAGGA	197 bp	AY 145850
Primersequenzen, die zur Genotypisierung der Tierlinien verwendet wurden:				
→ (Liu et al., 1997) Mel1a (MT1) – knockout: Primer A: GAGTCCAAGTTGCTGGGCAGTGGA Primer B: GAAGTTTTCTCAGTGTCCCGCAATGG				
→ (Jin et al., 2003) Mel1b (MT2) – knockout: Exon 1 vor: CCAGGCCCCCTGTGACTGCCCGGG Exon 1 rev.: CCTGCCACTGAGGACAGAACAGGG				

3.2.5. DNA-Gelelektrophorese

Die Gelelektrophorese ist ein Trennverfahren, bei dem die Wanderung von geladenen Molekülen in einem elektrischen Feld durch Interaktion mit einer festen Matrix mit definierter Porengröße zu deren Trennung genutzt wird. Die hierbei verwendeten horizontalen Platten-Gele bestehen aus einer elektrisch neutralen, festen Gelmatrix aus Agarose in einem Puffer, zum Beispiel TAE-Puffer (Tris-Acetat-EDTA-Puffer, Zusammensetzung siehe unter 3.5.1.). Das Wanderungsverhalten von Makromolekülen hängt von der Stärke des angelegten elektrischen Feldes, der Nettoladung, der Form und Größe der Makromoleküle, sowie der Ionenstärke, der Porengröße der inerten Matrix und der Temperatur des Systems ab. Nukleinsäuren sind aufgrund ihres Zucker-Phosphat-Rückgrats in dem verwendeten Puffersystem negativ geladen. Deshalb wandern sie im elektrischen Feld in Richtung Anode. Die Motilität wird von der Größe und Konformation der Moleküle bestimmt. Je kleiner ein Fragment ist, desto schneller kann es sich durch das Gel bewegen. Zur Längenbestimmung oder Konzentrationsbestimmung von DNA-Fragmenten werden DNA-Längenmarker auf das Gel aufgetragen. Der Farbstoff Ethidiumbromid, der dem Gel zugesetzt wird, interkaliert mit den Nukleinsäuren und macht sie im UV-Licht als Banden sichtbar (Sambrook et al., 1989; Rickwood und Hames, 1990). Um die DNA-Fragmente entsprechend ihrer Größe aufzutrennen und damit eindeutig das amplifizierte PCR-Produkt zu identifizieren wurde Agarose in verdünntem TAE-Puffer unter ständigem Rühren gelöst und gekocht. Je nach erwarteter Anzahl der Basenpaare des DNA-Abschnittes variiert man der Anteil der Agarose. Verwendet wurden meist 1,5%ige oder 3%ige Gele. Nach kurzem Abkühlen konnte die Flüssigkeit in eine horizontale Gelkammer gegossen werden und erstarrte nach etwa 20 min. Die Kammer wurde mit einer TAE-Pufferlösung als Laufpuffer gefüllt, so dass das Gel vollständig bedeckt war. Jeweils 10 µl des PCR-Produktes wurde mit 5 µl Blue-Juice versetzt und in die Kavitäten des Gels pipettiert. Zusätzlich zu den Proben wurde je nach erwarteter Anzahl der Basenpaare des PCR-Produktes ein 50bp- oder 100bp-Längenstandard (*GeneRuler*[™] 50bp/100bp DNA-ladder) aufgetragen, um die Größe der entsprechenden Banden zuordnen zu können. Bei 80 V wanderten die DNA-Fragmente entsprechend ihrer Molekülgröße 3 bis 5 Stunden. Die Detektion der DNA-Banden erfolgte mittels einer UV-Licht-Photoeinrichtung nach Auftrennung der PCR-Produkte und Ethidiumbromid-Fluoreszenzfärbung. Zur Bestimmung der Größe der im Gel sichtbare PCR-Produkte wurde mithilfe der Software Bio1D die jeweilige Bande der Probe mit dem Molekulargewichtsstandard verglichen und konnte auf Grund seiner Wanderungsstrecke in Relation zum Molekülgrößenstandard errechnet werden.

3.2.6. Restriktionsanalyse

Die Restriktionsanalyse wird zur Bestätigung der Identität der amplifizierten Sequenzen

durchgeführt. Die sog. Restriktionsendonukleasen kommen nur bei Bakterien vor. Bakterien schützen sich mit Hilfe dieser Enzyme vor dem Eindringen fremder DNA. Ein Restriktionsenzym schneidet das amplifizierte PCR-Produkt hochspezifisch innerhalb einer Sequenz von 4 bis 8 Nukleotiden; es entstehen zwei Fragmente mit einem spezifischen Molekulargewicht. Nach dem Pipettieren von je 10 µl des zu analysierenden PCR-Produktes, 6 µl RNase-freies Wasser, 2 µl des Restriktionsenzym und 2 µl des zugehörigen Puffers in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß erfolgte eine Inkubation der Proben im Wasserbad entsprechend der Angaben des Herstellers. Die spezifischen Enzyme, Größe der Amplifikationsprodukte sowie erwartete Molekulargewichte der Fragmente sind Tab. 5 zu entnehmen.

Tab. 5: Restriktionsanalyse: Enzyme und Reaktionsbedingungen sowie Molekulargewichte der Ausgangs- und Restriktionsprodukte

Ausgangs- Restriktions- Produkte	Enzym	Temperatur	Dauer	Größe des PCR-Produkts	Fragmente
PerI	Pst I	37 °C	6 h	403bp	333 + 70bp
Dbp	Bsm I	37 °C	6 h	105bp	55 + 60bp
RevErbA	Ava I	37 °C	6 h	101bp	66 + 35bp

Durch Auftrennung mittels DNA-Gelelektrophorese ließen sich die Fragmente in Relation zu den nicht geschnittenen PCR-Produkten und einem Molekulargewichtsstandart identifizieren. Exemplarisch ist so ein DNA-Gel in Abb. 8 dargestellt:

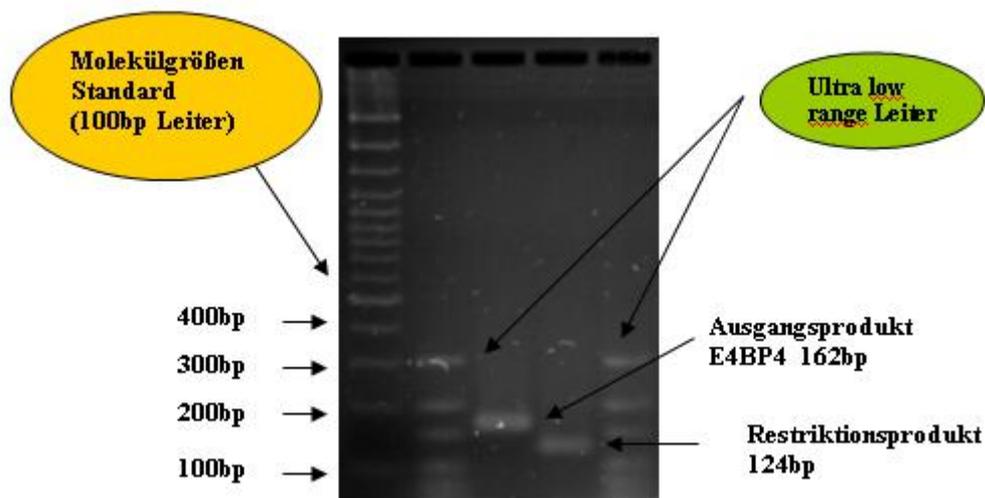
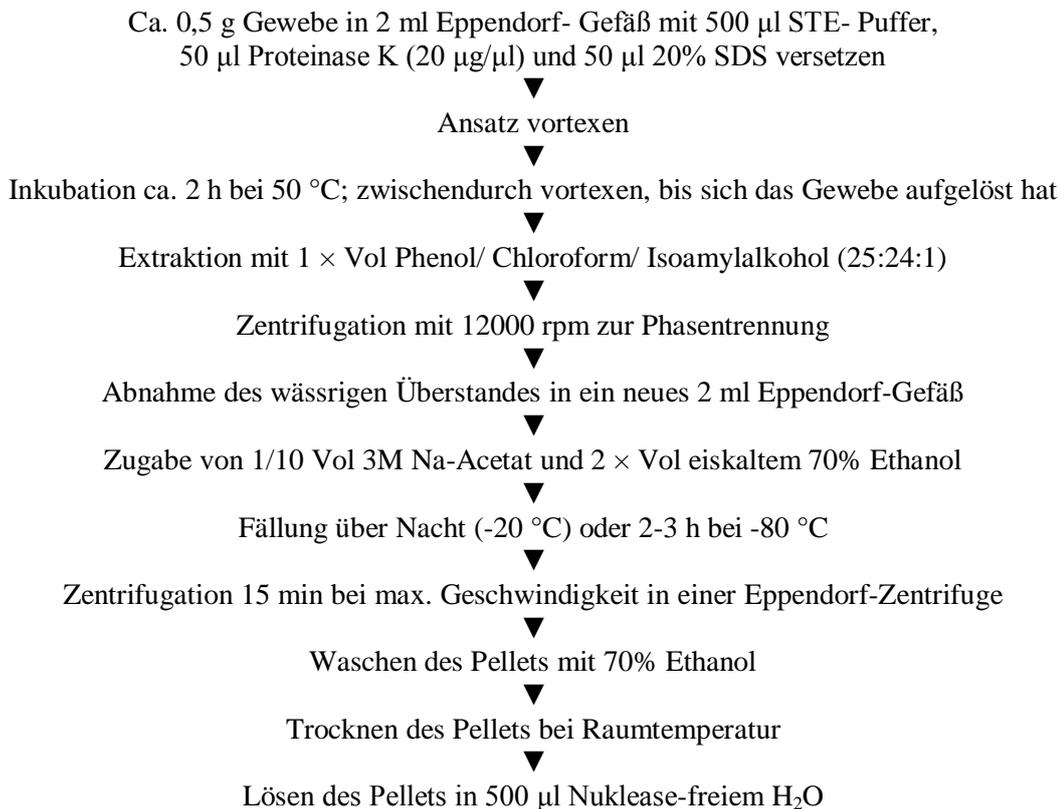


Abb. 8: Beispiel einer Restriktionsanalyse am Ausgangsprodukt E4BP4.

3.2.7. DNA-Extraktion

Zur Genotypisierung der Melatoninrezeptor-*knockout*-Mäuse wurde die DNA-Extraktionsmethode angewandt. Dazu wurde jeweils ein konserviertes Leberstück von allen vier Tierlinien verarbeitet. Im Folgenden sind die einzelnen Arbeitsschritte kurz aufgeführt:

DNA-Extraktion aus Gewebe



3.3. Insulin-RIA (Radioimmunoassay)

Die Bestimmung der Insulinkonzentrationen im Serum erfolgte mit Hilfe eines Insulin Coat-A-Count RIAs (Firma DPC Biermann GmbH, Bad Nauheim, Deutschland). Der Insulin Coat-A-Count RIA ist ein Festphasen Radioimmunoassay, bei dem ¹²⁵J-markiertes Insulin eine vorgegebene Zeit mit dem Insulin im Probandenserum (Einsatzmenge in der vorliegenden Arbeit: 200 µl Maus-Serum) um die Antikörperbindungsstellen auf der Innenwand von Polypropylen-Rörchen konkuriert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wird der Überstand abgegossen oder abgesaugt und die an die Antikörper gebundene Fraktion in einem Gamma-Counter gemessen. Die Counts sind zu der Insulin-Konzentration umgekehrt proportional. Durch Vergleich mit unter gleichen Bedingungen behandelten Standards lässt sich die Konzentration des Insulins im Serum aus der Standardkurve ablesen.

3.4. Statistische Auswertungen

Die statistische Auswertung der Ergebnisse und Signifikanztests erfolgte mit dem Statistikprogramm GraphPad (GraphPad Software Inc., CA, USA) unter Nutzung des Mann-Whitney U-Tests für nicht standardnormalverteilte Varianzen. Die Daten wurden als Mittelwerte mit Standardfehler angegeben (\pm - SEM). Bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit (p) kleiner als 5% ($p < 0,05$) wurden die Ergebnisse als statistisch signifikant angesehen.

3.5. Chemikalien und Geräte

3.5.1. Chemikalien

Agarose	peq Lab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
Blue Juice	<u>Zusammensetzung:</u> 87 % Glycerin, 0,25 mol/l EDTA, 0,05 % Bromphenolblau
Chloroform	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Diethylether	Universitätsapotheke Halle / Saale, Deutschland
DNase- Enzym	DNase-Kit DNA-free™, Ambion Inc., Austin, TX, USA
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
Ethanol	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Ethidiumbromid	Ethidium Bromide Solution, 10 mg/ml, PROMEGA, Madison, WI, USA
EVA Green®	Biotum, Hayward, USA
Formaldehyd	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Formamid	PROMEGA, Madison, WI, USA
Heparin	Liquemin® N 25 000, Roche
Isoamylalkohol	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Isopropanol	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Längenstandard	GeneRuler™ 50bp/100bp DNA- ladder, Fermentas GmbH, St.- Leon- Rot, Deutschland
MOPS- Puffer	M orpholino- P ropan- S ulfonsäure- Puffer <u>Zusammensetzung:</u> 0,2 mol/l MOPS, 0,5 mmol/l EDTA, 3 mol/l Natriumacetat, 40 mol/l NaOH, pH 7,0
PCR- Mastermix	PROMEGA, Madison, WI, USA
Phenol	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Proteinase K	PROMEGA, Madison, WI, USA

Restriktionsenzyme:

Kpn I, Bsm I, Ava I	Fermentas GmbH, St.- Leon- Rot, Deutschland
Pvu II	PROMEGA, Madison, WI, USA
Xho I, Pst I	Roche, Mannheim, Deutschland
RNase- freies Wasser	PROMEGA, Madison, WI, USA
RNA-Later™	Ambion Inc. Austin, TX, USA
RT- Kit	PROMEGA, Madison, MI, USA
SDS (20%)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
STE- Puffer	Sodium- Tris- EDTA- Puffer <u>Zusammensetzung:</u> 10 mM Tris, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, pH-Wert: 8,0
TAE- Puffer	Tris-Acetat-EDTA- Puffer <u>Zusammensetzung:</u> 50 mol/l Tris, 2 mmol/l EDTA, 50 mmol/l Natriumacetat, pH 8,0
TRIzol® - Reagenz	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland

3.5.2. Geräte

Analysesoftware Rotorgene V. 4.6	Corbett Research Inc., Mortlake, NSW, Australien
Eppendorf Centrifuge 5415 D	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Photometer	SPECORD S100, Analytik Jena AG, Jena, Deutschland
Software Bio1D	Vilber Lourmat, France
Strom/ Spannungsmessgerät	Standard Power Pack P25, Biometra GmbH, Göttingen, Deutschland
Thermomixer comfort 5355	Eppendorf- Netheler- Hinz GmbH, Hamburg, Deutschland
Thermocycler	Corbett- Research Inc., Mortlake, NSW, Australien
ULTRA – TURRAX® T25 basic	IKA® Werke GmbH, Staufen, Deutschland
Zentrifuge	Biofuge 15, Heraeus Sepatech GmbH, Osterode, Deutschland

4. Ergebnisse

4.1. Nachweis des Melatonin-Rezeptor-*knockouts*

Die kodierende Region der Melatoninrezeptoren MT1 und MT2 besteht aus 2 Exons und einem dazwischen liegendem Intron. Die Melatonin-Rezeptor-*„knockout“*-Mutation wurde durch eine gezielte Disruption des Exon 1 unter Insertion einer Phosphoglycerat-Neomycin-Kassette (PGK-neo) geschaffen (Abb. 9):

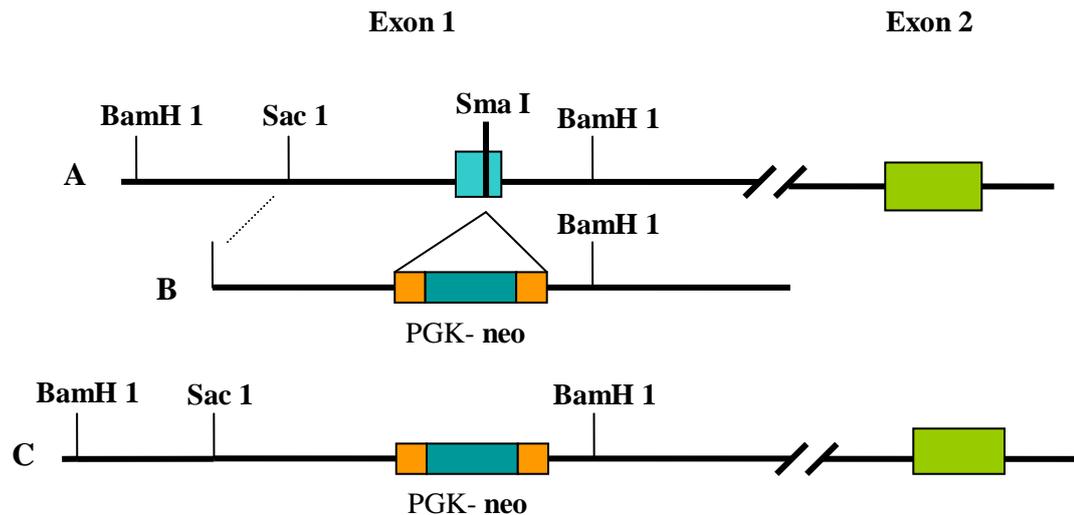


Abb. 9: Schaffung einer Melatoninrezeptor-*„knockout“*-Mutation, modifiziert nach Jin et al., 2003; (A) Wildtyp-Allel, (B) *targeting vector*, (C) Mutiertes Allel.

Der Nachweis des Melatonin-Rezeptor-*knockouts* im vorliegenden Tiermodell erfolgte mittels PCR-Analyse der genomischen DNA unter Verwendung bestimmter Primer-Sets entsprechend der Beschreibung nach Liu et al., (1997) und Jin et al., (2003); siehe dazu auch „Material und Methoden“-Abschnitt.

Die hierfür verwendete DNA wurde jeweils aus dem linken Leberlappen der Tiere mit Hilfe der unter 3.2.7 beschriebenen Methode zur DNA-Gewinnung isoliert.

Anhand der Auftrennung der spezifischen Produkte mittels PCR-Gelelektrophorese konnte die Existenz des jeweiligen Melatonin-Rezeptor-*knockouts* eindeutig belegt werden:

Genotypisierung mit *MTNR1a*-spezifischen Primern (Abb. 10A) sowie Genotypisierung mit *MTNR1b*-spezifischen Primern (Abb. 10B). Insertion der Neo-Kassette verhindert die Bildung des spezifischen PCR-Produktes ausgehend vom Wildtyp-Allel.

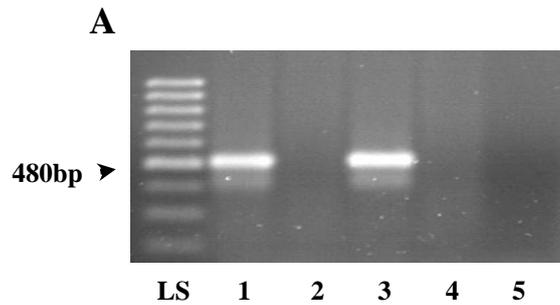


Abb. 10 A: Nachweis des MT1-Rezeptor-*knockouts* in DNA aus Lebergewebe der MT1-*knockout* (2)- und der MT1/MT2-Doppel-*knockout* (4)-Mauslinien; die beiden Amplikons weisen eine Molekulargröße von 480bp auf. Nachweis des MT1-Rezeptors in Wildtyp (1)- und MT2-*knockout* (3)-Tierlinie. (5) H₂O-Kontrolle; LS-Molekulargrößenstandard (100bp ladder).

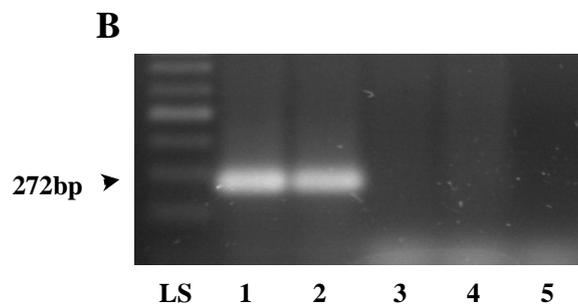


Abb. 10 B: Nachweis des MT2-Rezeptor-*knockouts* in DNA aus Lebergewebe der MT2-*knockout* (3)- und der MT1/MT2-Doppel-*knockout* (4)-Mauslinien; die beiden Amplikons weisen eine Molekulargröße von 272bp auf. Nachweis des MT2-Rezeptors in Wildtyp (1)- und MT1-*knockout* (2)-Tierlinie. (5) H₂O-Kontrolle; LS-Molekulargrößenstandard (100bp ladder).

4.2. Nachweis der Melatonin-Rezeptoren in verschiedenen Organsystemen der Wildtyp-Maus

Wie bereits oben erwähnt, besteht die mRNA der Gene für die Melatoninrezeptoren MT1 und MT2 aus 2 Exons und einem dazwischen liegenden Intron. Zur Beweisführung der Expression beider Gene in Organsystemen der Wildtyp-Maus wurde die Existenz eines Ausschnittes der mRNA im Exon 2 überprüft. Anhand der Auftrennung der spezifischen Produkte mittels PCR-Gelelektrophorese konnte eindeutig die Amplifikation der erwarteten Produkte des mRNA-Abschnittes des MT1-Rezeptors mit einer Größe von 353bp und des MT2-Rezeptors mit einer Größe von 197bp in allen untersuchten Organen nachgewiesen werden (Abb. 11).

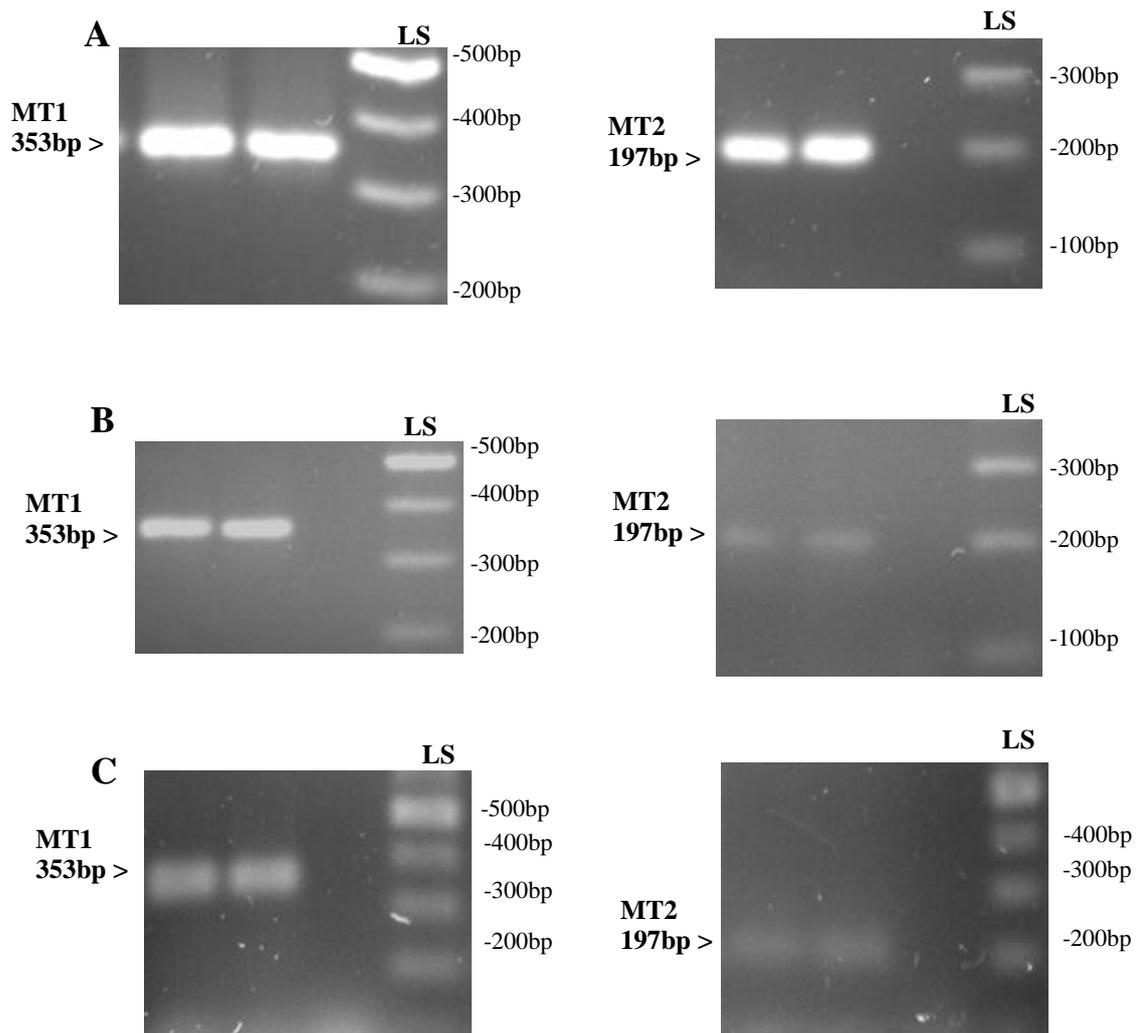


Abb. 11: Analyse des PCR-Produktes mit MT1- bzw. MT2-Rezeptor-spezifischen Primern in verschiedenen Organsystemen der Wildtyp-Maus. Nachweis der Melatonin-Rezeptoren in (A) Langerhansschen Insel, (B) Leber und (C) Hypothalamus. Abgebildet sind PCR-Produkte nach Auftrennung im 3%igen Agarosegel und anschließender Färbung mit dem UV-anregbaren Farbstoff Ethidiumbromid sowie einem Molekulargrößenstandard (LS: 100bp-ladder).

4.3. Nachweis der Uhrenexpression in verschiedenen Organsystemen der Wildtyp-Maus

Eines der Ziele dieser Dissertation war die Untersuchung des möglichen Einflusses des Melatonin-Rezeptor-*knockouts* auf das chronobiologische System der Maus. Zur Beweisführung der Expression der zu untersuchenden Uhren- bzw. Uhren-gesteuerten Gene *Per1*, *Dbp* und *RevErb α* in verschiedenen Organsystemen der Maus wurden Pankreata, Leber und Hypothalamus entsprechend aufgearbeitet und revers transkribiert. Anschließend erfolgte die RT-PCR-Untersuchung der Proben mit Maus-spezifischen Primern für *Per1*, *Dbp* und *RevErb α* .

Anhand der Auftrennung der PCR-Produkte mittels PCR-Gelelektrophorese konnte eindeutig die Amplifikation von Per1 mit einer Größe von 403bp sowie Dbp und RevErb α mit einer Größe von 105 bzw. 101bp in allen drei Organsystemen nachgewiesen werden (Abb. 12). Zusätzlich zu den Proben des Gesamtpankreas wurde hier die Expression der Gene Per1, DBP und RevErb α direkt in der Langerhansschen Insel nachgewiesen.

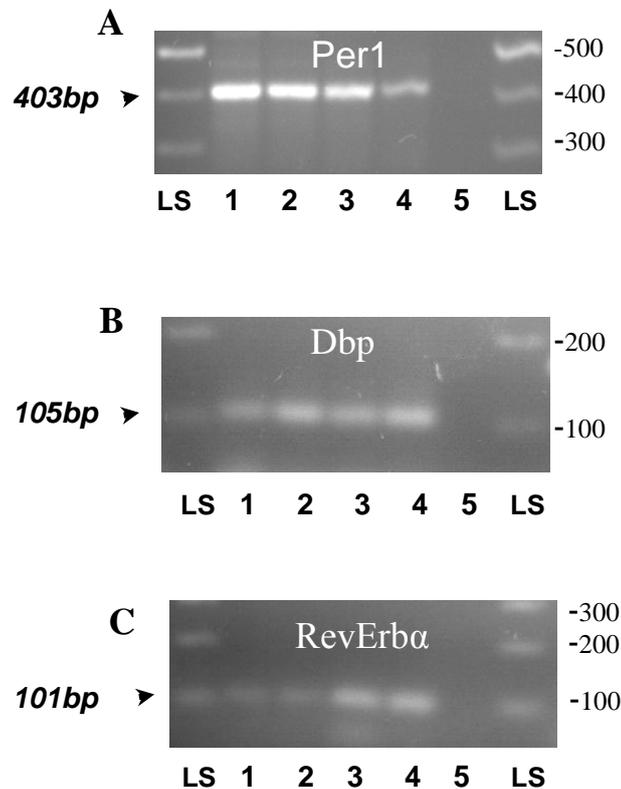


Abb. 12: Gelelektrophoretischer Nachweis der Transkripte von Per1 (A), Dbp (B) und RevErb α (C) mit Hilfe der RT-PCR-Technik in Hypothalamus (1), Leber (2), Pankreas (3) und der Langerhansschen Insel (4) der Wildtyp-Maus. Die H₂O-Kontrolle (5) ohne Einsatz von cDNA diente zum Nachweis eventueller unspezifischer DNA-Verschleppung; LS-Molekulargrößenstandard (100bp-ladder).

Zur Bestätigung der Identität der amplifizierten Produkte erfolgte zusätzlich eine Restriktionsanalyse. Wie in Abb. 13 dargestellt, wurden die Amplifikationsprodukte sowohl bei Per1 als auch bei Dbp und RevErb α durch die spezifischen Restriktionsenzyme Pst I, Bsm I bzw. Ava I im Bereich der charakteristischen Erkennungssequenzen geschnitten. Nach der Auftrennung der entstandenen Fragmente durch die Gelelektrophorese resultierten Banden an den erwarteten Positionen für die entsprechenden Restriktionsprodukte.

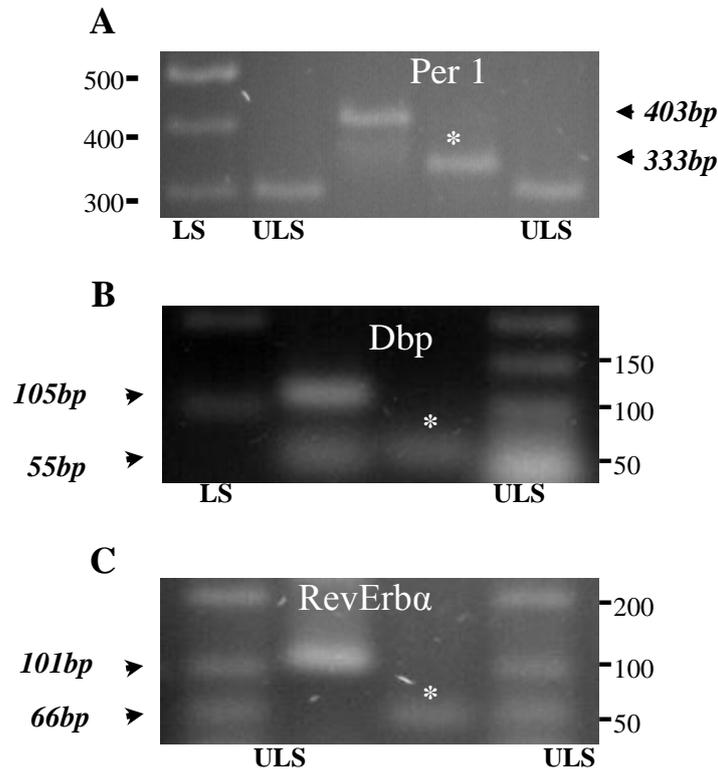


Abb. 13: Darstellung der Restriktionsanalyse zur Bestätigung der Identität der durch Per 1, DBP und RevErb α -spezifischen Primern generierten Amplifikationsprodukte. Dargestellt sind jeweils die nichtgeschnittenen Ausgangsprodukte sowie die größeren Fragmente nach der Restriktion (*). Kleinere Spaltprodukte wandern aufgrund ihrer geringeren Molekulargröße schneller im elektrischen Feld und sind im Agarosegel oft nicht mehr detektierbar. Die Molekulargröße der PCR-Produkte in Relation zum Molekularstandard (LS-100bp ladder; ULS-ultra low range ladder) ist in Basenpaaren (bp) angegeben.

- (A) Restriktionsanalyse des Per-Amplifikationsproduktes durch das Enzym Pst I in die erwarteten Fragmente mit einer Größe von 333 und 70bp. Das 70bp Spaltprodukt ist nicht abgebildet.
- (B) Nachweis der spezifischen Fragmente von 55 und 50bp nach Restriktionsanalyse des Dbp-Amplifikationsproduktes durch das Enzym Bsm I. Beide Spaltprodukte liegen hier aufgrund fast gleicher Größenverhältnisse überlagert vor und sind somit schwer trennbar.
- (C) Restriktionsanalyse des RevErb α -Amplifikationsproduktes durch das Enzym Ava I in die Fragmente von 66 und 35bp. Das 35bp Fragment ist wegen geringer Molekulargröße nicht mehr nachweisbar.

4.4. Untersuchungen der diurnalen Uhrengenenexpressions-Profile in verschiedenen Organsystemen der Wildtyp-Maus

Um herauszufinden, ob die Expression der Uhrengene Per1, RevErb α und des Uhrengenkontrollierten Gens Dbp in verschiedenen Organsystemen der Wildtyp-Maus einem circadianen Rhythmus folgt, wurden jeweils Pankreas, Leber und Hypothalamus entsprechend aufgearbeitet und mit Hilfe der quantitativen *real-time*-RT-PCR untersucht.

In allen drei untersuchten Organsystemen konnten eindeutig circadiane Änderungen der Genexpression nachgewiesen werden (Abb. 14).

Die mRNA des transcriptionell über E-Box agierenden inhibierenden Faktors Per1 zeigen ein typisches Expressionsmuster mit einem Maximum um 17 Uhr (Pankreas) bzw. 14 Uhr (Leber und Hypothalamus), sowie einem Expressionsminimum zwischen 5 und 8 Uhr. Auch für den über die Dbp-Box transcriptionell regulierend wirkenden Faktor Dbp konnte eine circadiane Expressionsänderung nachgewiesen werden. Das Maximum der Expression liegt hierbei bei 14 Uhr in Hypothalamus und Pankreas und bei 17 Uhr in der Leber, das Minimum ist in allen 3 Organsystemen zwischen 5 und 8 Uhr. Die Transkripte des RevErb/ROR-Box Faktors RevErb α weisen ebenso ein charakteristisches circadianes Muster der Genexpression auf. Im Hypothalamus und Pankreas liegt das Maximum der RevErb α -Expression bei 14 Uhr, in der Leber ist das Maximum bei 11 Uhr und somit um 3 Stunden vorverlagert. Auch hier liegen die Expressionsminima bei allen 3 untersuchten Organsystemen zwischen 5 und 8 Uhr. Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass in den untersuchten Organen die Wildtyp-Maus über funktionelle circadiane Oszillatoren verfügt, was sich im charakteristischen Expressionsmuster der untersuchten Uhrgene Per1, RevErb α und des Uhrgenkontrollierten Faktors Dbp äußert. Weiterhin kann man von einer möglichen Organspezifität im Expressionsmuster dieser Uhrgene sprechen.

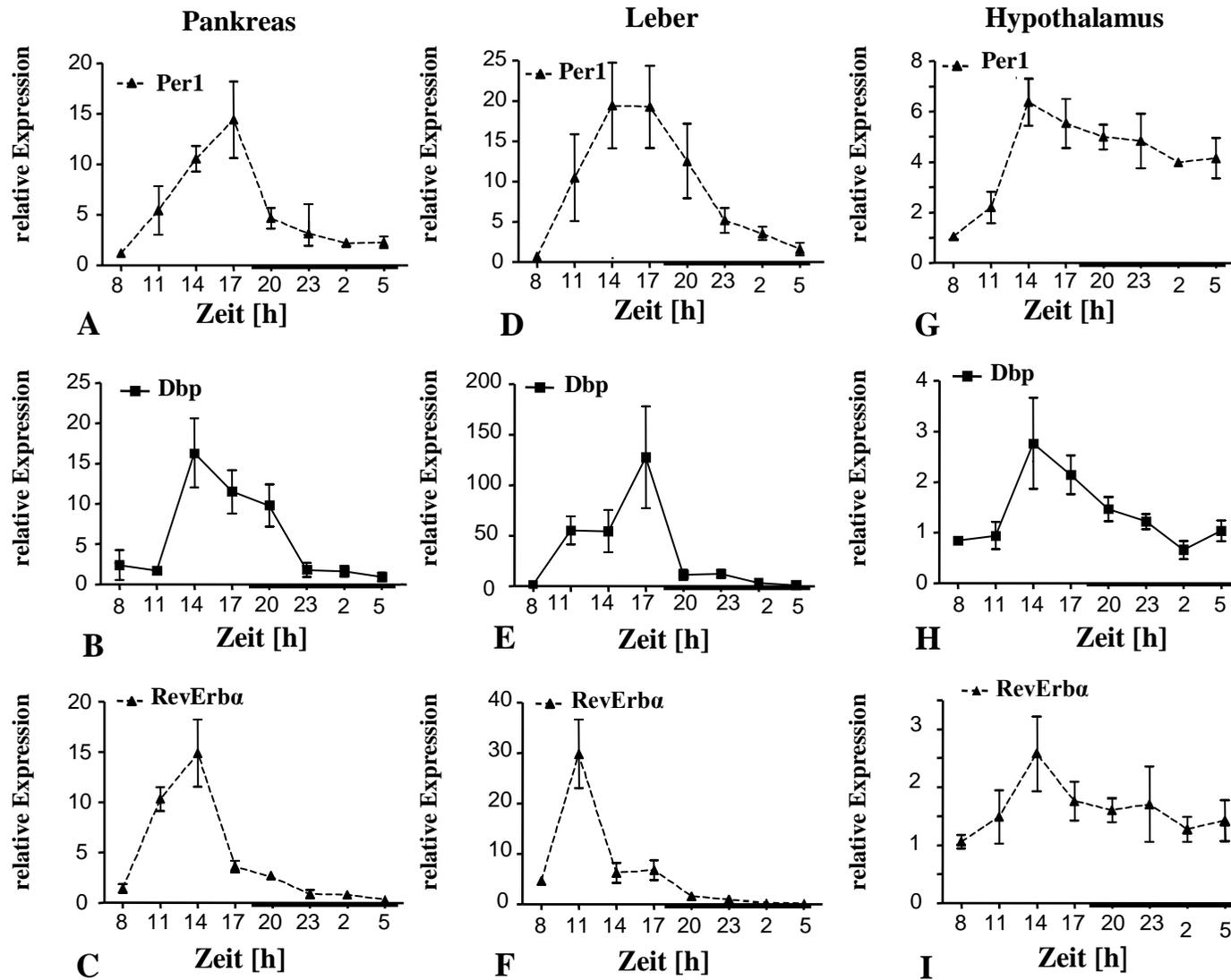


Abb. 14: Graphische Darstellung der diurnalen Uhrgenen-Expressionsprofile in verschiedenen Organsystemen der Wildtyp-Maus.

4.5. Auswirkungen des Melatonin-Rezeptor-*knockouts* auf die diurnale Uhrengenenexpression

Um Aussagen über mögliche Veränderungen im chronobiologischen System der Maus in Folge des Melatoninrezeptor-*knockouts* treffen zu können, wurden die Expressionsprofile der Uhrengene *Per1*, *Dbp* und *RevErb α* in Pankreas, Leber und Hypothalamus im Direktvergleich zwischen *knockout*-Tieren und Wildtyp-Tieren (Kontrolle) analysiert. Besonders geachtet wurde dabei auf mögliche Änderungen der Expressionsamplitude sowie Phasenverschiebungen im Expressionsmuster der mittels *real-time*-RT-PCR gewonnenen Befunde.

4.5.1. Pankreatische Uhrengen-Expression

Die circadianen Untersuchungen der Expressionsprofile von *Per1*, *Dbp* und *RevErb α* an Pankreata der *knockout*-Tiere lassen erkennen, dass die circadiane Rhythmik der Expression dieser Gene trotz des Rezeptor-*knockouts* erhalten bleibt (Abb. 15A-C).

Im Expressionsmuster für *Per1* in Pankreata der *knockout*-Tiere zeichnen sich Phasen-, jedoch keine Amplitudenveränderungen ab (Abb. 15A). Es wird eine leichte Tendenz für eine Phasenverschiebung im pankreatischen Expressionsmuster der MT2-*knockout*-Linie sichtbar. Bei der Doppel-*knockout*-Linie lassen sich dagegen deutliche Veränderungen im *Per1*-Expressionsmuster nachweisen. Es zeigt sich hier eine Phasenverschiebung von 6 Stunden mit einem Maximum der Expression um 23 Uhr. So sind die Expressionsunterschiede zwischen Wildtyp- und Doppel-*knockout*-Linien zum 20 Uhr-Zeitpunkt signifikant unterschiedlich mit einem $p < 0,01$ ($n = 4 - 6$) bei einem 2,3fach höheren Expressionsprofil um 20 Uhr und 4,8fach höherem Expressionsprofil um 23 Uhr ($n = 4$, $p = 0,0571$). Die circadianen Expressionsprofile für *RevErb α* zeigen in allen 3 *knockout*-Linien einen Anstieg der Transkriptionsamplitude im Vergleich zum Wildtyp (Abb. 15B). Das *RevErb α* -Expressionsniveau in Pankreata der MT1-*knockout*-Linie liegt um 11 Uhr 4,1fach über dem des Wildtyps und ist somit signifikant höher ($n = 4 - 5$, $p < 0,05$). Untersuchungen der pankreatischen *RevErb α* -Expression in der MT2-*knockout*-Linie zeigen ebenfalls einen signifikanten Anstieg der Transkriptionsamplitude im Vergleich zum Wildtyp. Während das Expressionsmuster für *Dbp* mit einem Maximum bei 17 Uhr in den Pankreata der Doppel-*knockout*-Tiere dem des Wildtyps vergleichbar ist (Abb. 15C), liegen die Expressionsmaxima bei MT2- und MT1-*knockout*-Linien bei 14 Uhr. Es zeigen sich außerdem deutliche Unterschiede der *Dbp*-Expressionsamplitude bei MT2-*knockout*-Typ: so ist die *Dbp*-Expressionsamplitude der MT2-*knockout*-Linie zu fast allen Tageszeitpunkten signifikant höher und liegt über der des Wildtyps ($p < 0,0001$, *two-way ANOVA* für *knockout*-Effekt). Zum 14 Uhr-Zeitpunkt ist sie 5fach höher als die Expressionsamplitude des Wildtyps ($n = 7 - 8$, $p < 0,01$). Die Expressionsamplitude bei der Doppel-*knockout*-Linie ist der des Wildtyps ähnlich.

4.5.2. Hepatische Uhrengen-Expression

Auch in der Leber der Wildtyp-Linie folgen die Per1-Expression einem circadianen Muster mit einem Transkriptions-Maximum um 17 Uhr und einem Minimum um 5 Uhr.

Das hepatische Per1-Expressionsprofil in der MT1-*knockout*-Linie zeigt eine ebenfalls circadiane, jedoch im Gegensatz zum Wildtyp stark herabgesetzte Amplitude (Abb. 14D, 16A). Das Expressionsniveau für Per1 ist im Lebergewebe der Wildtyp-Linie zum 17 Uhr-Zeitpunkt 5,2fach höher und damit signifikant über dem von MT1-*knockout*-Mäusen ($n = 4$, $p < 0,05$). Ein umgekehrt-proportionales Bild zeigt das Per1-Expressionsmuster im Lebergewebe der MT2-*knockout*-Tiere: bei einem Expressionsmaximum um 17 Uhr liegt die Expressionsamplitude 5fach und zum Zeitpunkt um 20 Uhr 2,4fach höher, verglichen mit dem Wildtyp ($n = 4$, $p < 0,05$). Die hepatische Per1-Expression in den Doppel-*knockout*-Mäusen ist mit der des MT1-*knockout*-Typs vergleichbar: zu den meisten Zeitpunkten können hier niedrigere Amplituden im Vergleich zum Wildtyp registriert werden, allerdings kann zu keinem Zeitpunkt die Signifikanzgrenze erreicht werden.

Circadiane Expressionsmuster lassen sich auch für RevErb α im Lebergewebe der *knockout*-Linien nachweisen (Abb. 16B). Die Expressionsamplitude in MT1-*knockout*-Linie ist im Vergleich zum Wildtyp reduziert und unterscheidet sich signifikant von dieser zu den Zeitpunkten 11 und 17 Uhr ($n = 4$, $p < 0,05$). Bei der MT2-*knockout*-Linie zeigen sich dagegen zu den meisten untersuchten Zeitpunkten erhöhte Expressionsspiegel für RevErb α . Dabei sind die Expressionsunterschiede für den Zeitpunkt 14 Uhr signifikant erhöht ($n = 4$, $p < 0,05$). Der Doppel-*knockout* der Melatonin-Rezeptoren führt zu einer gedämpften Expressionsamplitude von RevErb α .

Bei den Untersuchungen der hepatischen Dbp-Expressionsprofile wird eine Phasenverschiebung des Expressionsmusters in allen 3 *knockout*-Linien sichtbar: während sich das Expressionsmaximum für Dbp im Wildtyp bei 17 Uhr befindet, wird dieses in allen 3 *knockout*-Linien um 14 Uhr gemessen (Abb. 16C). Diese Unterschiede sind in MT1- und Doppel-*knockout*-Linien signifikant ($n = 4 - 6$, $p < 0,05$). Außerdem zeigt sich bei den *knockout*-Tieren im Gegensatz zum Wildtyp eine leichte Amplitudendämpfung der Dbp-Expression. So kann z.B. nur eine 205fache Differenz zwischen Dbp-Expressionsmaximum und –minimum bei der MT2-*knockout*-Linie verglichen mit einer 373fachen Differenz im Wildtyp registriert werden.

4.5.3. Hypothalamische Uhrengen-Expression

Im Vergleich zu dem Per1-Expressionsmuster im hypothalamischen Gewebe der Wildtyp-Maus wird eine Dämpfung der Transkriptionsamplitude bei den MT1-*knockout*-Tieren sichtbar (Abb. 17A): die Maximum-Minimum-Differenz beträgt hier nur das 2,2fache gegenüber einem 5,5fachen Unterschied zwischen den beiden Extrema beim Wildtyp. Außerdem findet sich bei

der MT1-*knockout*-Linie eine signifikante Phasen-Vorverlagerung des Expressionsmaximums auf den 8 Uhr Zeitpunkt ($n = 5, p < 0,05$).

Bei den MT2-*knockout*-Tieren lässt sich eine geringfügige Steigerung der Per1-Transkription zu den Zeitpunkten 17 und 20 Uhr beobachten, zu allen anderen Zeitpunkten findet sich jedoch eine reduzierte Expressionsamplitude. Der Per1-Expressionsvergleich zwischen Doppel-*knockout*-Mäusen und dem Wildtyp zeigt signifikante Unterschiede zu den Zeitpunkten 8, 14 und 23 Uhr ($n = 4 - 5, p < 0,05$).

Das RevErb α -Expressionsmuster weist auch im hypothalamischen Gewebe der *knockout*-Tiere einen circadianen Rhythmus auf (Abb. 17B). Bei den MT1-*knockout*-Tieren lässt sich eine starke Expressionsamplituden-Erhöhung (3,6fach höher gegenüber dem Wildtyp) beobachten. Signifikante Unterschiede werden besonders zu den Zeitpunkten 11, 14 und 5 Uhr sichtbar ($p < 0,05$). Der MT2-Rezeptor-*knockout* führt auch hier analog zum Dbp-Expressionsprofil (Abb. 17C) zu einer Dämpfung der RevErb α -Expressionsamplitude mit signifikant höheren Transkriptwerten zu den Zeitpunkten 14, 2 und 5 Uhr beim Wildtyp ($p < 0,05$). Im hypothalamischen Gewebe des Doppel-*knockout*-Typs zeigt sich eine extrem niedrige RevErb α -Expression mit zu fast allen untersuchten Zeitpunkten signifikant erniedrigten Transkriptspiegeln (Ausnahme: 8 Uhr).

Ähnliche Ergebnisse zeigen sich bei den Dbp-Expressionsprofilen im hypothalamischen Gewebe der *knockout*-Mäuse (Abb. 17C). Das Fehlen eines funktionellen MT1-Rezeptors führt zu einer Phasen-Vorverlagerung der Dbp-Expression verbunden mit einer gleichzeitigen Steigerung des Expressionsmaximums. So liegt der Dbp-Expressionsspiegel der MT1-*knockout*-Linie zum 8 Uhr Zeitpunkt signifikant über dem des Wildtyps ($n = 5, p < 0,05$). Im Gegensatz dazu sind Dbp-Expressionsamplitude und -maximum im hypothalamischen Gewebe der MT2-*knockout*-Tiere dem des Wildtyps vergleichbar, obwohl sich eine leichte Tendenz zur Phasenvorverlagerung abzeichnet. Zu den Zeitpunkten 14 und 5 Uhr können hier signifikant reduzierte Dbp-Transkriptionsspiegel beobachtet werden ($n = 6, p < 0,05$). Bei der Doppel-*knockout*-Linie fällt eine Amplitudendämpfung der Dbp-Expression auf: Der Unterschied zwischen Maximum und Minimum ist hier nur 3fach im Vergleich zur 4,5fachen Extremadifferenz beim Wildtyp. Signifikante Expressionsunterschiede werden hier außerdem bei 14 und 5 Uhr Zeitpunkten sichtbar ($n = 4, p < 0,05$).

4.6. Auswirkungen des Melatonin-Rezeptor-*knockouts* auf die Glukose-Homeostase

Melatonin hat nachweislich einen maßgeblichen Einfluss auf den Glucosestoffwechsel. Dieser äußert sich unter anderem in der direkten rezeptorvermittelten Hemmung der Insulinsekretion durch das Hormon Melatonin sowie seinem rhythmisierenden Einfluss auf die pankreatische β -Zelle (Peschke et al., 2002). Der zweite Teil dieser Dissertation befasst sich mit

möglichen Auswirkungen des Melatonin-Rezeptor-*knockouts* auf die Glukosehomeostase. Um diese zu erfassen, wurden circadiane Insulin-Transkriptionsprofile sowie Plasma-Insulin-Spiegel im Tagesverlauf untersucht. Ergänzend dazu wurden Blutglukose-Profile im Tagesgang erstellt.

4.6.1. Untersuchungen der Insulin-Transkriptionsprofile im Tagesgang

Real-time-RT-PCR-Untersuchungen im Tagesgang der pankreatischen Insulin-Transkripte (des *Ins2* Gens) zeigen Unterschiede im Expressionsmuster zwischen den Wildtyp- und MT1-*knockout*-Tieren (Abb. 18A). Transkriptspiegel in den Pankreata der MT1-*knockout*-Linie sind zwischen 8 und 14 Uhr erhöht, liegen jedoch zwischen 17 und 5 Uhr unterhalb denen des Wildtyps. Nur zum 14 Uhr Zeitpunkt kann ein signifikanter Expressionsunterschied ermittelt werden ($n = 4$, $p < 0,05$).

Auch beim MT2-*knockout*-Typ kommt es zur Erhöhung der Insulin-Expression im Tagesgang mit signifikant erhöhtem Transkriptspiegel um 5 Uhr ($n = 4$, $p < 0,05$). Um 11, 20 und 23 Uhr liegen hier die Insulin-Transkriptspiegel jedoch unterhalb des Wildtyp-Niveaus. Mit Hilfe des two-way-ANOVA-Tests wird der signifikante Effekt der MT2-Linie in Hinblick auf die Insulin-Expression sichtbar ($p = 0,0062$).

Der Doppel-*knockout* der Melatonin-Rezeptoren führt ebenfalls zu einer Steigerung der Insulin-Transkripte zu allen untersuchten Zeitpunkten mit Ausnahme des Wertes um 20 Uhr.

Die Expressionsunterschiede gegenüber dem Wildtyp sind zu den Zeitpunkten 14, 17 und 23 Uhr signifikant ($n = 4$, $p < 0,05$). Auch im two-way-ANOVA-Test lässt sich der signifikante Unterschied zwischen den einzelnen Tierlinien nachweisen ($p < 0,0001$).

Die Mittelwerte der Expressionsspiegel im Tagesgang (Abb. 18B: hier ohne Berücksichtigung des Zeit-Effekts) zeigen signifikante Steigerung der Insulin-Transkriptmenge in MT2-*knockout*- ($n = 32$ und 31 , $p < 0,05$) sowie Doppel-*knockout*-Mäusen ($n = 36$ und 31 , $p < 0,001$).

4.6.2. Diurnale Plasma-Insulin-Profil in Wildtyp- und Melatonin-Rezeptor-*knockout*-Tieren

Um einen möglichen Effekt des Melatonin-Rezeptor-*knockouts* auf die Insulin-Sekretion nachzuweisen, wurden Insulin-Plasmaspiegel in Tagesgangserien von Wildtyp- und Knockout-Tieren mit Hilfe des Insulin-Radioimmunoassay (RIA) untersucht.

Ergebnisse dieser Untersuchung, zusammengefasst in Abb. 19A, zeigen, dass die Insulin-Plasmaspiegel bei Wildtyp-Mäusen einen circadianen Rhythmus mit Sekretionspeaks am späten Nachmittag (17 Uhr) sowie in der Nacht (2 Uhr) aufweisen. Dabei beträgt der Unterschied zwischen dem Maximum (17 Uhr) und Minimum (8 Uhr) der Insulin-Konzentration bei den Wildtyp-Tieren bis zum 3,26fachen. Im Gegensatz dazu zeigen die MT1-*knockout*-Tiere eine herabgesetzte Sekretionsamplitude mit einer nur 2,36fachen Differenz zwischen den Extremata.

Die Insulinspiegel im Plasma der MT1-*knockout*-Mäuse liegen zu den Zeitpunkten 14, 17, 23, 2 und 5 Uhr unterhalb von denen des Wildtyps. Wie der Abb. 19B zu entnehmen ist, sind die mittleren Insulinspiegel bei MT1-*knockout*-Tieren deutlich, jedoch nicht signifikant, reduziert ($27,29 \pm 3,550$, $n = 66$ vs. $34,11 \pm 5,037$, $n = 62$). Bei der MT2-*knockout*-Linie zeigt sich ein ähnliches Bild: während zu den Zeitpunkten 8 und 11 Uhr höhere Insulin-Plasmaspiegel gemessen werden, liegen zu allen anderen untersuchten Zeitpunkten erniedrigte Werte vor. Die mittleren Insulinwerte in Seren der MT2-*knockout*-Linie weichen signifikant von denen des Wildtyps ab ($23,45 \pm 2,561$, $n = 63$ vs. $34,11 \pm 5,037$, $n = 62$). Die Doppel-*knockout*-Tiere weisen ebenso stark herabgesetzte Plasma-Insulin-Werte im Tagesgang mit Ausnahme des 8 Uhr Zeitpunkts auf. Auch hier wird ein signifikanter Unterschied der einzelnen Tierlinien beim Vergleich der Insulin-Mittelwerte sichtbar (Abb. 19B: $24,99 \pm 5,082$, $n = 61$ vs. $34,11 \pm 5,037$, $n = 62$, $p < 0,05$). Zusammengefasst lässt sich sagen, dass in Seren aller drei *knockout*-Linien reduzierte Insulin-Konzentrationen im Vergleich zum Wildtyp vorliegen.

4.6.3. Diurnale Blutglukose-Profile bei Wildtyp- und Melatonin-Rezeptor-*knockout*-Tieren

Da Dysregulationen der circadianen Rhythmen sich auf die Zusammenarbeit der für die Glukose-Homeostase wichtigen Organe Pankreas, Leber und Gehirn auswirken und zu pathologischen Störungen der Blutglukose-Profile führen könnten, wurden Blutglukose-Konzentrationen in Seren der Wildtyp- und Knockouttiere gemessen.

Die von einer großen Anzahl der Tiere jeder untersuchten Linie ($n = 8 - 17$ Tiere pro Zeitpunkt) erhobenen Daten sprechen für das Vorliegen eines diurnalen Rhythmus der Blutglukosespiegel. Die Ergebnisse, zusammengefasst in Abb. 20A und B, zeigen Unterschiede in Blutglukose-Spiegeln zwischen den Wildtyp- und MT1-*knockout*-Tieren. Dabei liegen die gemessenen Blutglukose-Werte beim MT1-*knockout*-Typ während der fast gesamten Tageszeit (Ausnahme: 14 Uhr Zeitpunkt) deutlich höher über denen des Wildtyps. Mit Hilfe des two-way-ANOVA-Tests wird der signifikante MT1-*knockout*-Effekt in Hinblick auf die Blutglukose-Konzentration sichtbar ($p = 0,0082$). Beim Vergleich der Mittelwerte der Blutglukose-Konzentrationen aller Wildtyp- und MT1-*knockout*-Tiere ohne Berücksichtigung der Tageszeit (Abb. 15B) wird dieser signifikante Unterschied der einzelnen Linien noch einmal deutlich ($n(\text{WT}) = 104$, $8,8 \pm 0,15$ vs. $n(\text{MT1}) = 124$, $9,5 \pm 0,16$; $p < 0,01$ Mann-Whitney-t test; $n = \text{Anzahl der Tiere}$).

Der Vergleich zwischen den Wildtyp und MT2-*knockout*-Blutglukose-Spiegeln zeigt ein anderes Bild: mit Ausnahme der Zeitpunkte 11 und 5 Uhr weisen die MT2-*knockout*-Tiere niedrigere Blutglukose-Werte als die des Wildtyps auf. Dieser Unterschied erweist sich jedoch als nicht signifikant ($n(\text{WT}) = 104$, $8,754 \pm 0,1462$ vs. $n(\text{MT2}) = 106$, $8,468 \pm 0,1117$). Der Ausfall beider Melatonin-Rezeptoren in der Doppel-*knockout*-Linie verursacht erniedrigte Blutglukose-Konzentrationen während der Hellphase, jedoch erhöhte Werte während der

Dunkelperiode. Auch hier ist dieser Unterschied nicht signifikant ($n(\text{WT}) = 104, 8.8 \pm 0.15$ vs. $n(\text{MT1/MT2}) = 98, 8.3 \pm 0.13$; $n = \text{Anzahl der Tiere}$). Im two-way-ANOVA-Test wird jedoch der signifikante Unterschied zwischen den einzelnen Tierlinien sichtbar ($p = 0,0016$). Verallgemeinernd lässt sich feststellen, dass der Melatonin-Rezeptor-*knockout* einen Einfluss auf die Blutglukose-Spiegel hat, welcher sich jedoch je nach Rezeptor-*knockout*-Typ unterscheidet.

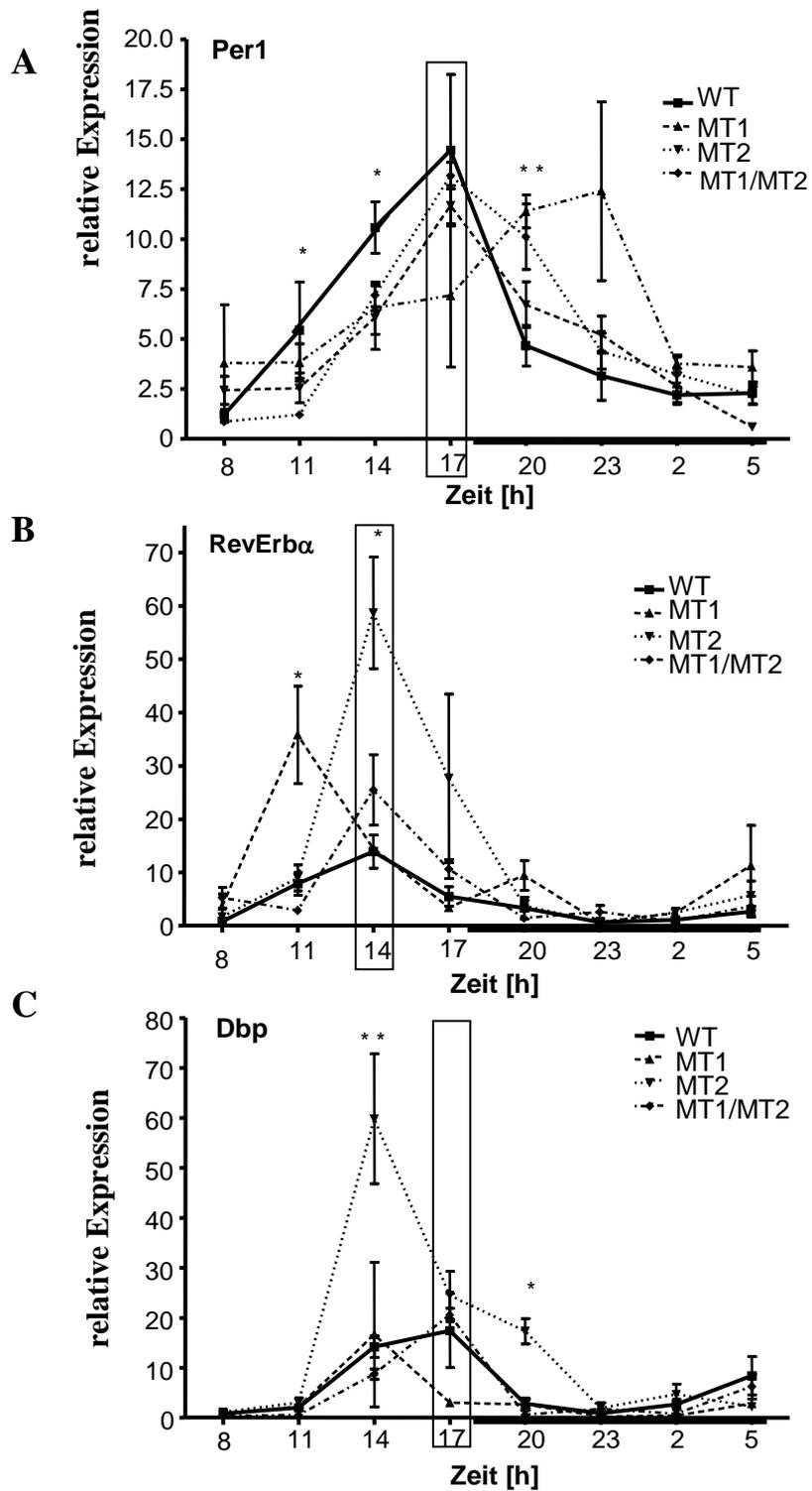


Abb. 15: Graphische Gegenüberstellung der diurnalen Expressionsprofile von Per1 (A), RevErbα (B) und Dbp (C) in Pankreata der Wildtyp- und *knockout*-Linien. Der schwarze Balken gibt die Zeitdauer der Dunkelphase an. Signifikante Linienunterschiede sind durch einen Stern * gekennzeichnet.

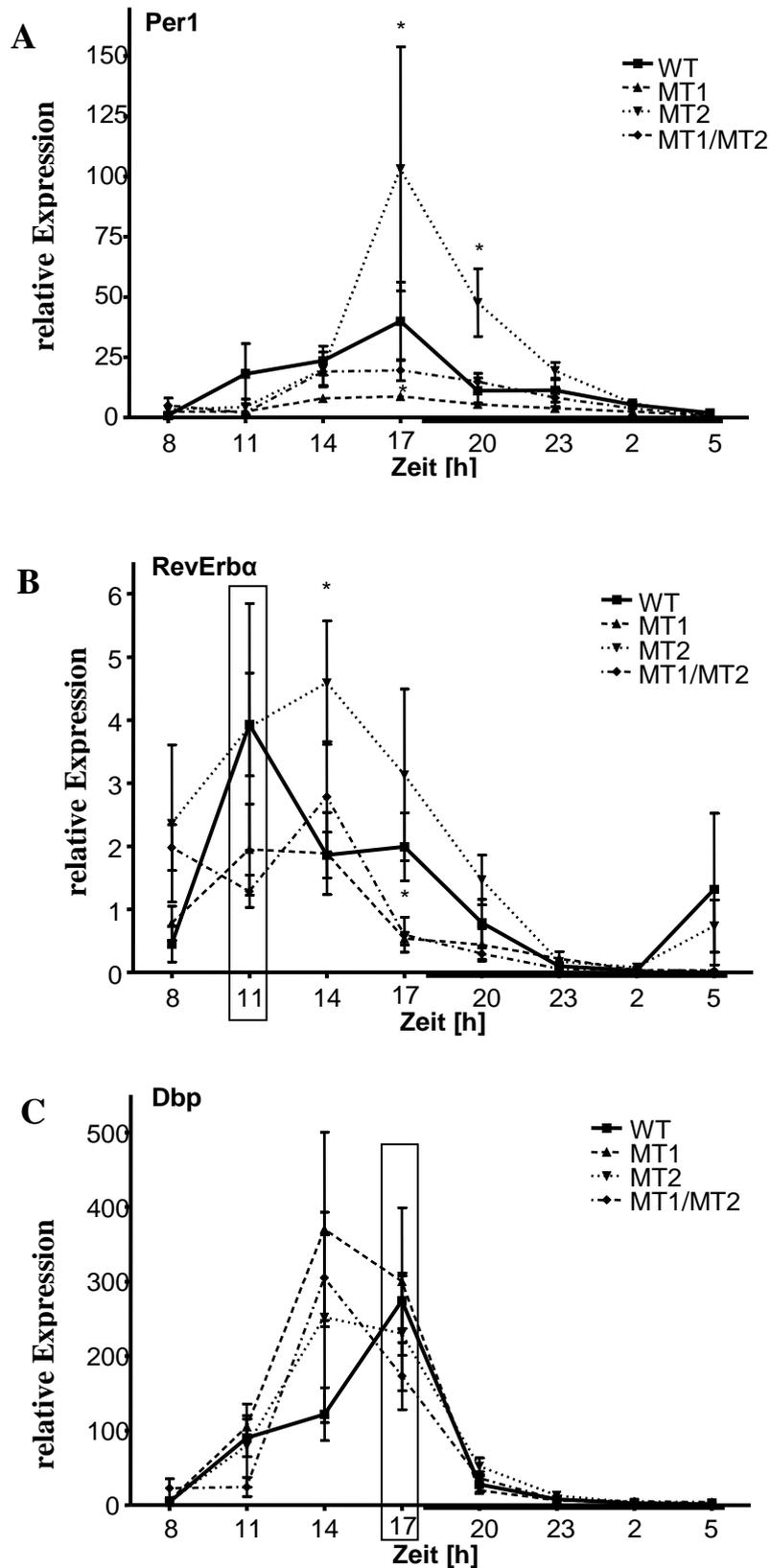


Abb. 16: Graphische Gegenüberstellung der diurnalen Expressionsprofile von Per1 (A), RevErba (B) und Dbp (C) der Leber von Wildtyp- und *knockout*-Linien. Der schwarze Balken gibt die Zeitdauer der Dunkelphase an. Signifikante Linienunterschiede sind durch einen Stern * gekennzeichnet.

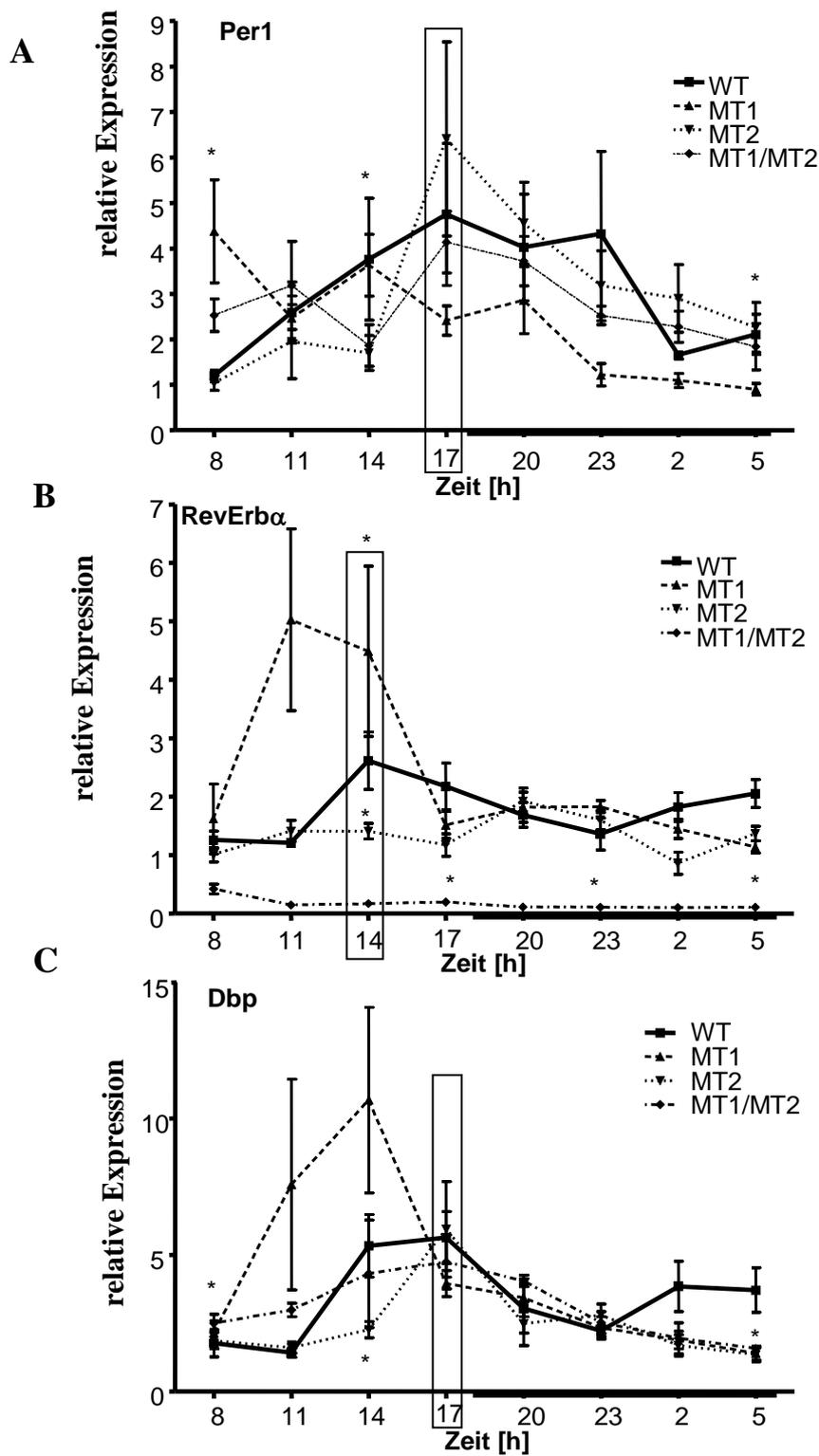


Abb. 17: Graphische Gegenüberstellung der diurnalen Expressionsprofile von Per1 (A), RevErb α (B) und Dbp (C) in Hypothalami von Wildtypieren und den der *knockout*-Linien. Der schwarze Balken gibt die Zeitdauer der Dunkelphase an. Signifikante Linienunterschiede sind durch einen Stern * gekennzeichnet.

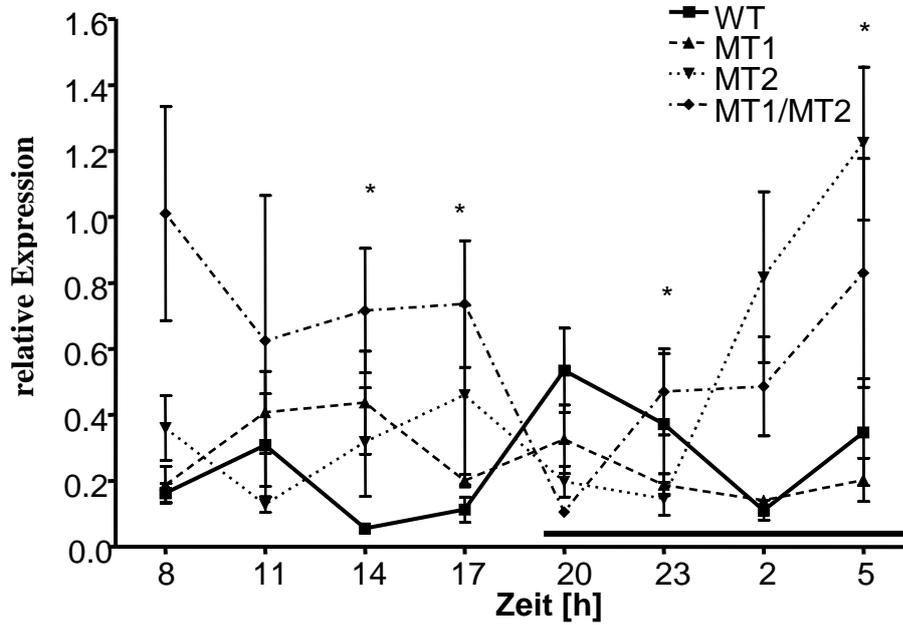
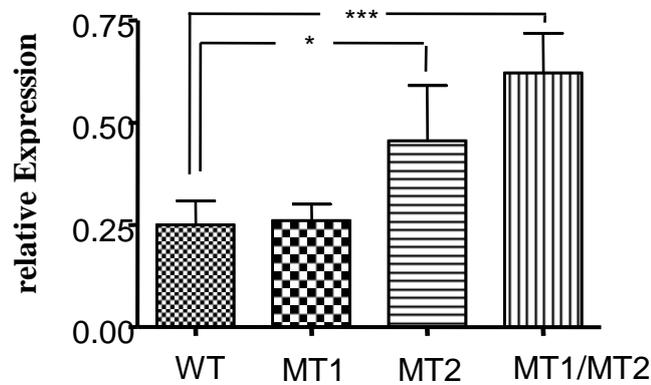
A**B**

Abb. 18: Übersicht über Insulin (*Ins2*)-Expression in Pankreata von Wildtyp- und *knockout*-Tieren. Signifikante Expressionsunterschiede zwischen den Tierlinien wurden mit * ($p < 0,05$) bzw. mit *** ($p < 0,001$) gekennzeichnet.

Der schwarze Balken gibt die Zeitdauer der Dunkelphase an.

(A) Graphische Darstellung der relativen diurnalen Insulin-Expressionsprofile in Pankreata von MT1-, MT2- und Doppel-*knockout*-Tieren im Direktvergleich zum Wildtyp (Kontrolle).

(B) Darstellung der Mittelwerte der Insulin-Expressionspiegel im Balkendiagramm.

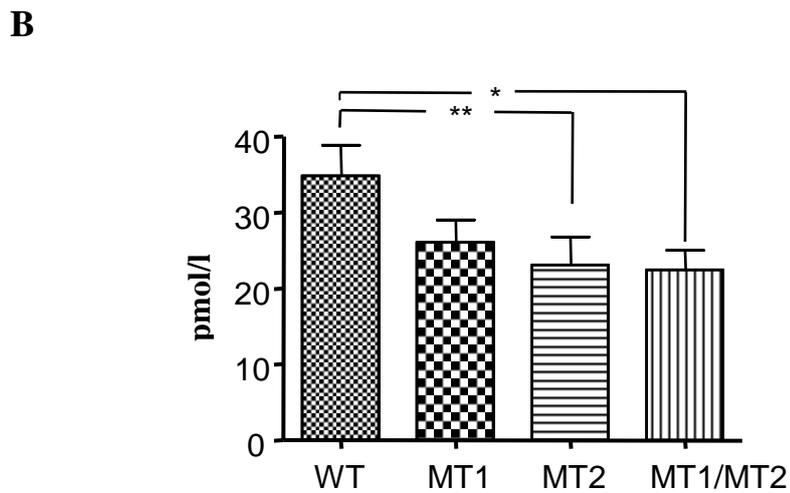
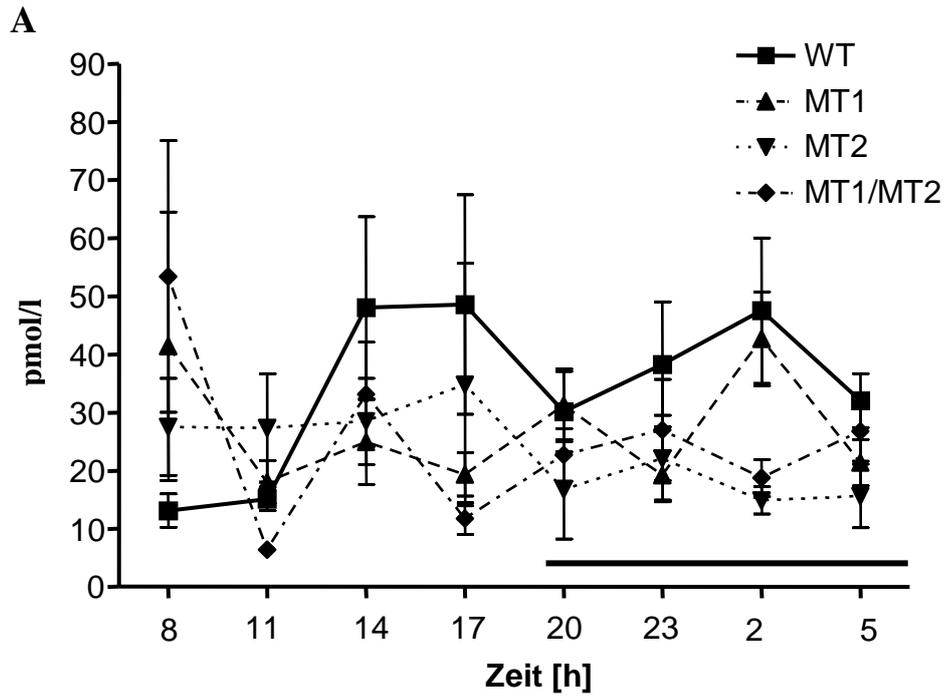


Abb. 19: Übersicht über Insulin-Sekretion bei Wildtyp- und *knockout*-Tieren. Signifikante Expressionsunterschiede zwischen den Tierlinien wurden mit * ($p < 0,05$) bzw. mit ** ($p < 0,01$) gekennzeichnet. Der schwarze Balken gibt die Zeitdauer der Dunkelphase an. (A) Graphische Darstellung der diurnalen Plasma-Insulinprofile in MT1-, MT2- und Doppel-*knockout*-Tieren im Direktvergleich zum Wildtyp (Kontrolle). (B) Darstellung der Mittelwerte der Insulin-Sekretionsspiegel im Balkendiagramm.

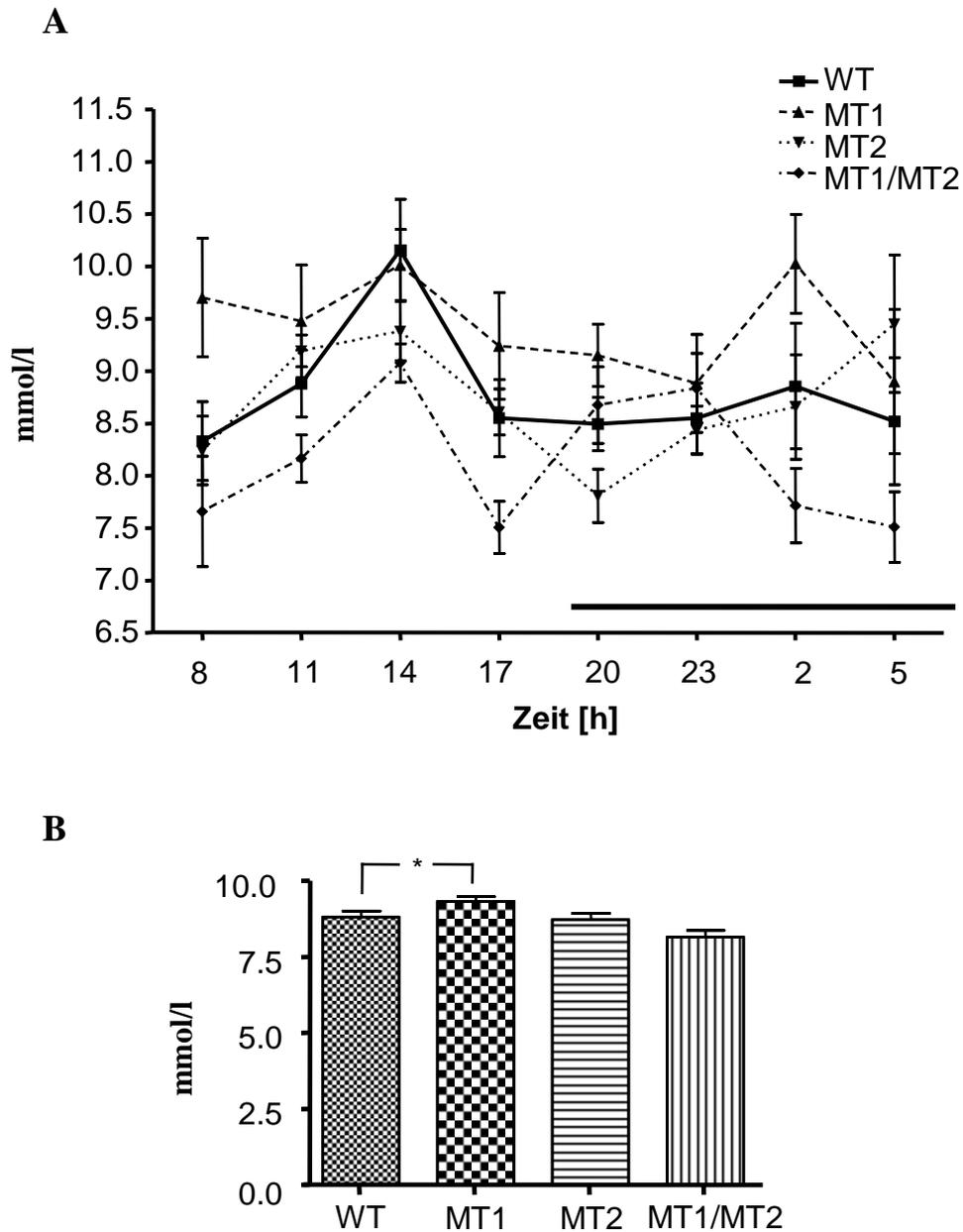


Abb. 20: Übersicht über Glukose-Konzentrationen in Seren der Wildtyp- und *knockout*-Tiere. Signifikante Expressionsunterschiede ($p < 0,05$) zwischen den Tierlinien wurden mit * gekennzeichnet. Der schwarze Balken gibt die Zeitdauer der Dunkelphase an.

- (A) Graphische Darstellung der diurnalen Blutglukose-Profile bei MT1-, MT2- und Doppel-*knockout*-Tieren im Direktvergleich zum Wildtyp (Kontrolle).
 (B) Darstellung der Mittelwerte der Blutglukose-Konzentrationen im Balkendiagramm.

5. Diskussion

Der regelmäßige Wechsel von Tag und Nacht hat tiefgreifende Auswirkungen auf alle Bereiche des Lebens. Infolgedessen laufen zahlreiche physiologische Vorgänge wie z. B. Schlaf/Wachverhalten, Stoffwechselaktivität, Blutdruck, Körpertemperatur und Hormonproduktion rhythmisch ab. Die Rhythmen sind an unsere 24-stündige Photoperiode gekoppelt (Hastings et al., 2003). Melatonin vermittelt Veränderungen in der Photoperiode an den Säugerorganismus. Die Wichtigkeit der tageszeitlichen Abhängigkeit physiologischer Prozesse für die Regulation der Glucose-Homöostase wurde in zahlreichen Publikationen verdeutlicht. Die Arbeitsgruppe um Boden (Boden et al., 1996b, 1999) konnte tagesperiodische Schwankungen der Insulinsekretion beim Menschen nachweisen und folgerte daraus, dass Störungen der endogenen Rhythmik sowie deren Fehlsteuerung ein Teil des Ursachenkomplexes für den Diabetes Typ 2 darstellen. Es ist außerdem bekannt, dass auch der Blutglucosespiegel circadian-rhythmisch reguliert wird (*in vivo*-Versuche Gagliardino et al., 1984; *in vitro*-Versuche Peschke und Peschke 1998). Die bisherigen Untersuchungen sowohl am Menschen, als auch am Tiermodell der Typ 2 diabetischen Ratte, sprechen für einen Antagonismus zwischen Melatonin und Insulin. Es hat sich gezeigt, dass Patienten mit Typ 2 Diabetes bei erhöhten Insulinwerten verringerte Melatoninspiegel während der Nacht aufweisen (Peschke et al., 2006b). Weiterhin sprechen RT-PCR-Analysen von humanem Pankreasmaterial, im Vergleich mit altersgleichen normoglykämischen Kontrollen, für eine Aufregulation von MT1- als auch MT2-Rezeptoren bei Typ 2 diabetischen Patienten (Peschke et al., 2007). Dies ist ein Befund, der als Kompensation des Systems für die in einer früheren Studie gemessenen, erniedrigten Melatoninspiegel gewertet werden kann (Peschke et al., 2006b). Ein ähnliches Bild zeigten Untersuchungen am Tiermodell der Typ 2 diabetischen Goto-Kakizaki (GK)-Ratte. Auch hier wurden erhöhte Insulinspiegel und verringerte Plasma-Melatoninwerte bei erhöhter pankreatischer MT1-Rezeptorexpression registriert (Peschke et al., 2006b), ohne dass bislang die Ursache-Wirkungsbeziehungen vollständig aufgeklärt worden sind. Die erhobenen Befunde sprechen jedoch für eine enge Kopplung beider Hormonsysteme im *in vivo*-System. Schließlich unterstützen Befunde an einem künstlich induzierten Typ 1 diabetischen Modell der Ratte, bei dem durch das radikalgenerierende Streptozotocin die β -Zellen spezifisch zerstört wurden, die zuvor postulierte Hypothese. Hier zeigte sich nämlich, dass, in Umkehrung des NIDDM Typ 2-diabetischen Tiermodells, niedrige oder nicht messbare Insulinspiegel mit sehr hohen Melatoninwerten koinzidieren. Der circadiane Rhythmus der Melatoninsynthese, begleitet von circadianen mRNA-Profilen der Uhrengenenexpression, blieb dabei erhalten. Da sowohl PCR-technisch, als auch immunocytochemisch Insulinrezeptoren im Pinealorgan nachweisbar sind, lassen diese Ergebnisse Rückkopplungseffekte des Insulins auf die Melatoninsynthese vermuten (Peschke et al., 2008). Anfang 2009 wurden mehrere Studien

zur genetischen Assoziation des MT2-Rezeptors mit diabetogenen Veränderungen der Stoffwechsellage des Menschen publiziert und bekräftigen damit mögliche Funktionen des MT2-Rezeptors im Zusammenhang mit den bekannten glukosehomöostatischen Wirkungen der pankreatischen Insel (Bouatia-naji et al., 2009; Lyssenko et al., 2009; Propenko et al., 2009; Staiger et al., 2009). Die Mitarbeiter um Prokopenko analysierten in mehreren Studien das gesamte Erbgut von ca. 37.000 Personen und verglichen das stoffwechselgesunder Personen und Typ 2 Diabetiker. Dabei wurde man auf eine Variante in dem Gen aufmerksam, welches für die Bildung des Melatonin-Rezeptors MT2 verantwortlich ist. Bei Personen, die diese Variante trugen, fanden sich in bis zu 20 % der Fälle ein erhöhtes Nüchtern-Blutzucker oder ein Typ 2-Diabetes (Prokopenko et al., 2009). Eine andere zeitgleich veröffentlichte Publikation liefert eine mögliche Erklärung für den Zusammenhang zwischen Melatonin und dem Risiko, an Typ 2-Diabetes zu erkranken: Lyssenko und Mitarbeiter bestätigten Befunde von Mühlbauer und Peschke (2007), Peschke et al. (2007) sowie Ramracheya et al. (2008), dass die Melatonin-Rezeptoren MT2 auch in den Insulin-produzierenden Zellen des Pankreas vorhanden sind. Die β -Zellen der Personen mit der oben beschriebenen Genvarianten bilden offenbar besonders viele Melatonin-Rezeptoren vom Typ MT2 aus. Durch Versuche mit Zellkulturen wurden frühere Befunde von Peschke et al. (2007), Stumpf et al. (2008, 2009) bestätigt, dass Melatonin die Insulinausschüttung aus den β -Zellen verringert (Lyssenko et al., 2009).

Bislang ist wenig über die synchronisierende Funktion des Melatonins bezüglich anderer Organe oder Zellsysteme bekannt. Da membranständige Melatoninrezeptoren jedoch an mehreren anderen Zellsystemen beschrieben worden sind (Pars tuberalis; von Gall et al., 2002; Gehirn, Herz, Lunge, Leber, und Niere, Naji et al., 2004), ist von einer allgemeinen Zeitgeberfunktion dieses Hormons im Säuger auszugehen. Peschke und Peschke (1998) konnten erstmalig an endokrinen Ratteninseln nachweisen, dass unter *in vitro*-Bedingungen ein peripherer Oszillator die tagesrhythmische Sekretionsleistung der pankreatischen β -Zelle steuert und dass Melatonin eine Zeitgeberfunktion auf die Inselsekretion ausübt, indem es eine Verschiebung (Vorverlegung) der Sekretionsphasen um 9 Stunden bewirken kann. Delattre et al. (1999) sowie Picinato et al. (2002) konnten diese Ergebnisse bestätigen. Eine kausale Erklärung für die beobachteten circadian-rhythmischen Sekretionsprozesse der pankreatischen Insel steht noch aus, man hält aber einen direkten oder indirekten Einfluss von Uhrengenen für möglich. Molekulare Komponenten der „Circadianen Uhr“ mit ihren charakteristischen Expressionsmustern von Uhrengenen konnten am Modell des Rattenpankreas eindeutig nachgewiesen werden (Mühlbauer et al., 2004).

Neben dem endokrinen Pankreas spielt auch die Leber eine wichtige Rolle in der Glucose-Homöostase. Damiola et al. (2000) konnten zeigen, dass Fütterungszeiten bei Ratten ein wesentlicher Zeitgeber für die Expressionsdynamik von Uhrengenen und damit für die Funktion der „Circadianen Uhr“ in der Leber ist. Außerdem liefern sie den Nachweis, dass die

„peripheren Uhren“ anderen Zeitgebern folgen als die (tageslichtabhängige) „Zentraluhr“ im SCN und belegen damit die Existenz peripherer Oszillatoren, mit denen Organe selbst ihre internen Funktionen circadian-rhythmisch steuern. Dieser Aspekt ist insofern von klinischer Bedeutung, als allgemein Störungen circadianer Abläufe im Zusammenhang mit krankheitsgenerierenden Ursachen gesehen werden (Arendt et al., 2006). So könnte die Zunahme Typ 2-diabetischer Erkrankungen beim Menschen als möglicher Ausdruck einer dauerhaften Störung natürlicher tageszeitabhängiger Körperfunktionen erklären. Es ist bekannt, dass der Zeitpunkt der Nahrungsaufnahme wesentlich den circadianen Rhythmus der Leber und mit Sicherheit des Pankreas beeinflusst (Damiola et al., 2000). Über welchen Weg die Einflussnahme erfolgt, ist jedoch noch weitgehend unbekannt.

Ziele dieser Arbeit waren Untersuchungen an MT-Rezeptor-*knockout*-Mäusen (Linien MT1, MT2 und MT1/MT2), um festzustellen, welchen Einfluß fehlende Melatonin-Rezeptoren auf die Glucose-Homöostase im Tiermodell haben.

Zwei vorrangige Fragen galt es zu beantworten:

- (1) Wie äußert sich der durch Rezeptor-*knockout* fehlende Melatonin-Einfluss auf die Expression der Uhrengene, resultieren daraus organspezifische Amplituden- und/oder Phasenveränderungen?
- (2) In wiefern wird die Glucose-Homöostase durch den Wegfall der Melatonin-Signaltransduktionskaskaden beeinflusst?

Die hier vorliegenden Ergebnisse der Experimente an Melatonin-Rezeptor-*knockout*-Mäusen sollten in Hinblick auf diese Fragen diskutiert werden.

Es soll aber auch vergleichend betrachtet werden, in wie weit die in der vorliegenden Arbeit dokumentierten Befunde vergleichbar sind mit den Daten, die bereits zuvor von anderen Arbeitsgruppen erhoben wurden, bzw. ob die gewonnenen Befunde zur kausalanalytischen Klärung offener Fragen beitragen können.

5.1. Das untersuchte Tiermodell

Die bereits oben angesprochenen Fragestellungen dieser Arbeit wurden an den ebenfalls zuvor charakterisierten transgenen Tiermodellen der Hausmaus (*Mus musculus*) untersucht. Die 4 Tierlinien der ursprünglich im Labor der Arbeitsgruppe um Steven M. Reppert (Laboratory of Developmental Chronobiology, Pediatric Service Massachusetts General Hospital and Harvard Medical School, Boston, Massachusetts, USA) erzeugten (melatoninprofizienten) Stämme, nämlich die des Wildtyps (WT), sowie die des MT1-Rezeptor-*knockouts*, des MT2-Rezeptor-*knockouts* und des Doppel-*knockouts* standen uns aufgrund einer Kooperation mit Jörg Stehle

(Goethe-Universität Frankfurt) zur Verfügung. Die Vorteile der Nutzung dieses Tiermodells liegen zum einen darin, dass das reproduktive System der Hausmaus verhältnismäßig unempfindlich gegenüber Änderungen der Photoperiode ist.

Das reproduktive Alter ist bei der Maus mit ca. 6 Wochen nach der Geburt erreicht, pro Wurf sind ca. 6 bis 8 Jungtiere zu erwarten, was eine zügige Zusammenstellung der zu untersuchenden Zeit-Gruppen ermöglicht. Zum anderen bietet sich die Maus als Versuchstier an, da die genetische Manipulation dieser Spezies dank embryonaler Stammzelllinien gut etabliert ist, so dass *knockout*-Modelle erzeugt werden können.

Nachteilig wirken sich vor allem Zuchtschwierigkeiten wie beispielsweise Kannibalismus und Viruserkrankungen aus, die unter Umständen längere Arbeitspausen nach sich ziehen, sowie geringe Blut- und Organvolumina der Tiere.

5.2. Melatonin-Rezeptor-*knockout* und nachfolgende Auswirkungen auf die Uhrengenenexpression

Seit dem Nachweis der MT1-Rezeptor-Expression in verschiedenen Organen wie der pankretischen β -Zelle (Peschke et al., 2000, 2002; Kemp et al., 2002), dem Hypothalamus (Liu et al., 1997) und der Leber (Naji et al., 2004), war es nur eine Frage der Zeit bis zur Generierung eines *knockouts* dieser Isoform. Man erhoffte sich damit, einen besseren Einblick in die organspezifischen Funktionen zu gewinnen, die Melatonin über diesen Rezeptor moduliert, vor allem aber die Bedeutung für den SCN. Aber auch der *knockout* der zweiten Rezeptor-Isoform, des MT2-Rezeptors, war vom großen Interesse, denn er trug maßgeblich zur Aufklärung der synchronisierenden Melatonin-Wirkung bei.

Naji und Mitarbeiter konnten jedoch im Gegensatz zu den Befunden dieser Arbeit keine MT2-Rezeptor-Transkripte im Lebergewebe der Maus nachweisen (Naji et al., 2004), was möglicherweise durch eine, verglichen mit der des MT1, viel schwächere MT2-Rezeptor-mRNA-Expression, auch verbunden mit einem wenig spezifischen Primerdesign, zu erklären ist. Analog zu den charakteristischen Expressions-Profilen der molekularen Komponenten der „Circadianen Uhr“ im Rattenpankreas (Mühlbauer et al., 2004) konnten auch in dieser Arbeit vergleichbare Expressionsmuster der Uhren- sowie Uhrengen-kontrollierter-Gene in den untersuchten Organsystemen sowohl im Wildtyp als auch in den Melatonin-Rezeptor-*knockout*-Linien nachgewiesen werden. Dies spricht für den Erhalt der intakten circadianen Uhr in diesen Mausorganen, auch für den Fall der Melatoninrezeptordeletion (MT1, MT2, MT1/MT2). Im Einklang mit den in dieser Arbeit erhobenen Ergebnissen an Leber und Pankreas beobachteten Dinet und Korf (2007) ebenfalls eine intakte Tag/Nacht-Rhythmik der CREB- und Uhrengen-Proteine, allerdings einhergehend mit einer Amplituden-Erhöhung in der Retina von MT1- oder MT2-*knockout*-Mäusen.

5.2.1. Melatonin-Rezeptor-*knockout* und die Uhrengenenexpression im Pankreas

Hinsichtlich der pankreatischen *Per1*-Expression in *MT1-knockout*-Mäusen konnte nur eine geringfügige Phasenverschiebung beobachtet werden, auch das Amplitudenprofil blieb weitgehend unverändert, was wiederum für eine funktionell intakte „Circadiane Uhr“ in diesem Organ trotz des *MT1*-Rezeptor-*knockouts* spricht. Auch die Expressionsmuster von *RevErb α* und dem „Output-Gen“ *Dbp* zeigen nur marginale Veränderungen: für *RevErb α* eine leichte Erhöhung der Amplitude sowie, wie auch für *Dbp*, eine Phasen-Vorverlagerung um 3 Stunden. Ausgehend von den erhobenen Expressionsbefunden kann man von einer weitgehenden *MT1*-Rezeptor-Unabhängigkeit der „Circadianen Uhr“ im Maus-Pankreas sprechen.

Effekte des *MT2*-Rezeptor-*knockouts* überschreiten die des *MT1-knockouts* insofern, als eine starke (signifikante) Erhöhung der Expressionsamplitude für *RevErb α* und *Dbp* beobachtet wurde, was für ein mögliches Indiz für Fehlfunktion der „Inneren Uhr“ im Pankreas auf Grund der *MT2*-Rezeptordeletion angesehen werden kann. Im Expressionsmuster von *Per1* in den Pankreata von *MT2-knockout*-Tieren deutet sich auch eine leichte Phasenverschiebung (im Sinne einer Rückverlagerung um 3 Stunden des Expressionsmaximums) an.

Der Melatonin-Rezeptor-Doppel-*knockout* führt zu einer Phasen-Rückverlagerung von 6 Stunden im Expressionsmuster des Uhrengens *Per1*. Die Tatsache, dass Melatonin einen synchronisierenden Effekt auf das Pankreas und die pankreatische Insel ausübt (Peschke und Peschke, 1998), wird vor allem durch diesen *in vivo* Befund unterstrichen. Die Überzeugung, dass synchronisierende Wirkungen des Melatonins im *SCN* ausnahmslos über *MT2*-Rezeptorsignale vermittelt werden (Liu et al., 1997; Jin et al., 2003), erwies sich mehr als überraschend, berücksichtigt man die sehr schwachen Expressionsergebnisse dieser Rezeptor-Isoform. Die im Rahmen dieser Arbeit erzielten Daten sprechen dafür, dass dieser Sachverhalt auch für das Pankreas zutreffen könnte. Die Ergebnisse dieser Arbeit sprechen auch dafür, dass der synchronisierende Effekt des Melatonins vorwiegend *MT2*-Rezeptor mediiert ist. Dabei ist die *MT2*-Rezeptor-Expression in diesem Tiermodell vergleichbar niedrig, verglichen mit Ratten- oder humanem Material (Mühlbauer und Peschke, 2007; Peschke et al., 2007). Dem *MT1*-Rezeptor fällt hier eine eher unterstützende Rolle zu. Bezüglich der Expression von Melatonin-Rezeptoren in der humanen pankreatischen β -Zelle existieren kontroverse Vorstellungen. Während einige Autoren die Expression beider Rezeptor-Isoformen in der β -Zelle nachweisen konnten (Lyssenko et al., 2008), gehen andere Wissenschaftler davon aus, dass die *MT1*-Rezeptor-Isoform gar nicht in der β -Zelle des Menschen, aber in der der Maus (*Min6* β -Zelllinie der Maus) exprimiert wird (Ramracheya et al., 2008).

5.2.2. Melatonin-Rezeptor-*knockout* und die hepatische Uhrengenenexpression

In der Leber führt der *MT1-knockout* zu einer schweren Dämpfung der *Per1*-Amplitude, ein ähnliches Bild kann auch bei Doppel-*knockout*-Tieren beobachtet werden. Dies lässt auf eine

stärker ausgeprägte Funktion dieser Rezeptor-Isoform im Lebergewebe schließen. Zu ähnlichen Ergebnissen kommen auch die Mitarbeiter der Arbeitsgruppe um von Gall, die sich mit den Pinealorganen der Melatonin-Rezeptor-*knockout*-Tiere beschäftigten. Sie untersuchten die Pars tuberalis (PT) von Mäusen als Modellsystem eines Melatonin-abhängigen peripheren circadianen Oszillators mit der Fragestellung nach Funktion der Melatonin-Rezeptoren für die Regulation der Uhrengenenexpression in der Pars tuberalis. Dabei konnten sie feststellen, dass die MT1-*knockout*-Tiere im Gegensatz zum Wildtyp eine stark reduzierte Expression von *Per1* und einen erhöhten Prolaktinspiegel im Plasma aufwiesen (von Gall et al., 2002). Die Deletion des MT1-Rezeptors hat auch massive Auswirkungen auf die Expression der übrigen Uhrengene in der Pars tuberalis. In der PT der MT1-*knockout*-Maus ist die Expression vom *Cry1* sowie die der positiven Regulatorgene *Bmal1* und *Clock* gegenüber dem Wildtyp drastisch reduziert (von Gall et al., 2005). Daher wird der MT1-Rezeptor maßgeblich für die Aktivierung der Expression dieser Uhrengene in der Pars tuberalis sein. Im Gegensatz dazu sind jedoch sowohl die *Per2*- als auch die *Cry2*-mRNA in der Pars tuberalis durch die Deletion des MT1-Rezeptors nicht beeinträchtigt (Jilg et al., 2005).

Der MT2-Rezeptor scheint für die Regulation der Uhrengenenexpression in der PT der Maus entbehrlich zu sein (von Gall et al., 2005). Im Gegensatz dazu verursacht der MT2-*knockout* in der vorliegenden Arbeit eine starke Erhöhung der *Per1*-Expression zum Zeitpunkt des Expressionsmaximums im Lebergewebe der Wildtyp-Maus.

RevErb α -Expressionsprofile zeigen entweder eine leichte Amplitudendämpfung (MT1-*knockout*) oder eine geringe Phasen-Verspätung um drei Stunden, wohingegen *Dbp*-Expressionsprofile aller *knockout*-Linien eine 3stündige Phasen-Vorverlagerung aufweisen. Zusammengefasst lässt sich feststellen, dass aufgrund der vorgestellten Untersuchungen der MT1-Rezeptor-*knockout* (auch sichtbar bei Doppel-*knockout*-Tieren) einen stark dämpfenden Effekt auf die *Per1*-Expression als Indikator circadianer Schwingung im Lebergewebe ausübt, und das im Gegensatz zum MT2-Rezeptor-*knockout*. Analysen der diurnalen Rhythmen der drei in dieser Arbeit untersuchten Uhren- bzw. -Uhrengen-kontrollierten Gene in Pankreas und Leber unterstützen den Zusammenhang zwischen einer unverzichtbar wichtigen Melatoninwirkung sowohl in Bezug auf Periodizität als auch auf die Amplitude der gemessenen Transkripte. Da Leber und Pankreas in einer engen Kooperation bezüglich Sicherstellung und Aufrecht-erhaltung von Blutglucosespiegel arbeiten, würde man eine Rhythmus-Synchronisation in diesen Organen erwarten. Bei Wildtyp-Mäusen scheint eine entsprechende Rhythmus-synchronisation zwischen den beiden Organen vorzuliegen, denn *Per1*-, RevErb α - und *Dbp*-Expressionsprofile folgen in beiden Organsystemen einem ähnlichen Muster mit einem Expressionsmaximum um die Tagesmitte. Bei den *knockout*-Tieren ist dieses jedoch verändert, was wiederum als Indiz für eine fehlende synchronisierende Wirkung des Melatonins für die Zusammenarbeit dieser beiden Organsysteme gewertet werden muß.

5.2.3. Melatonin-Rezeptor-*knockout* und die Uhrengenenexpression im Hypothalamus

Im Hypothalamus führt der MT1-*knockout* zu einer Phasen-Vorverlagerung im Per1-Expressionsmuster mit einem ähnlichen, jedoch geringeren Effekt bei MT2- und Doppel-*knockout*-Tieren. Deletion des MT2-Rezeptors verursacht im Hypothalamus eine signifikante Erhöhung des Per1-Transkripts zum Zeitpunkt des Expressions-Maximums. Diese Beobachtung kann zum einen als organspezifische MT2-Rezeptor-medierte Wirkung des Melatonins interpretiert werden, nämlich eine primär synchronisierende Funktion des Melatonins im Pankreas und ein primär Amplituden-regulierender Effekt sowohl in der Leber als auch im Hypothalamus. RevErb α und Dbp-Expressionsprofile zeigen eine Phasen-Vorverlagerung in den MT1-*knockout*-Tieren und eine Amplitudendämpfung nach der MT2-Rezeptor-Deletion, die noch stärker ausgeprägt ist in der Doppel-*knockout*-Linie. Melatonin könnte als verbindender, synchronisierender Faktor für die drei in dieser Arbeit untersuchten Organe fungieren. Allerdings ist denkbar, dass auch Glukose (Hirota et al., 2002) oder Glucocorticoide (Rutter et al., 2002) als synchronisierende Substanzen wirken.

5.3. Melatonin-Rezeptor-*knockout* und sein Einfluss auf die Glucose-Homöostase

Zahlreiche zurückliegende Arbeiten machen deutlich, dass die pankreatische β -Zelle Melatonin-Rezeptoren vom MT1-Typ aufweist und dass Melatonin-Applikation zu einer Senkung der Insulinsekretion führt (Peschke et al., 2000, 2002; Kemp et al., 2002). Der beschriebene Mechanismus der Senkung der Insulinsekretion beruht auf einer Bindung der membranständigen MT1-Rezeptoren an hochaffine Pertussistoxin-sensitive inhibitorische GTP-bindende (Gi)-Proteine. Die weitere Signaltransduktion erfolgt über das Adenylatcyclase-cAMP-System mit nachfolgender cAMP-Senkung.

Lange Zeit konnten keine Anhaltspunkte für die Existenz von MT2-Rezeptor auf der β -Zelle gefunden werden (Kemp et al., 2003, Peschke et al., 2000). Aber auch diese Rezeptor-Isoform wird in der pankreatischen Insel der Ratte exprimiert, allerdings bleibt die Expressionshöhe stark hinter derjenigen des MT1-Rezeptors, nämlich um das 86fache zurück (Mühlbauer und Peschke, 2007). Diese Befunde wurden kurz darauf am menschlichen Pankreas bzw. der Insel bestätigt (Peschke et al., 2007).

Auch in der vorliegenden Arbeit gelang der Nachweis beider Melatonin-Rezeptor-Isoformen in der pankreatischen Insel der Wildtyp-Maus (Abb. 11A), was zur Annahme führt, dass die Insulin-Expression, welche CREB moduliert abläuft (Oetjen et al., 2006), direkt durch Melatonin beeinflusst werden könnte. Auch wenn die Diskussion um den Einfluss von Melatonin auf den Glukosestoffwechsel noch nicht abgeschlossen ist, erfreut sich dieses Themengebiet eines wachsenden Interesses. Dass sich die beiden Hormonsysteme, die des Pineals und der Insel gegenseitig beinflussen, konnte bereits eindrücklich in den anfangs erwähnten Publikationen verdeutlicht werden. Einige neuere Arbeiten diskutieren einen

Zusammenhang zwischen Diabetes und Genvarianten des MT2-Rezeptors, ohne allerdings einen Funktionszusammenhang zu liefern (Bouatia-Naji et al., 2009; Lyssenko et al., 2009; Prokopenko et al., 2009). Versucht man jedoch die Datenlage in Bezug auf die Veränderungen im Glukosestoffwechsel bei den Melatonin-Rezeptor-*knockout*-Tieren systematisch zu analysieren, so findet man keine vergleichbaren Studien. Insofern sind die Ergebnisse dieser Arbeit Neuland, die den Weg für weitere Untersuchungen vorbereiten.

In der vorliegenden Arbeit führt insbesondere der Doppel-Rezeptor-*knockout* und der damit verbundene Wegfall der inhibierenden Funktion des Melatonins auf das Adenylatcyclase-cAMP-System zu einer stark signifikanten Erhöhung der Insulin-Transkripte (Abb. 18A/18B). Der steigernde Effekt ist beim MT2-*knockout* ebenfalls (signifikant) nachweisbar, jedoch nicht so ausgeprägt. Die Expressionsunterschiede zwischen dem Wildtyp und der MT1-*knockout*-Linie sind hingegen nur marginal und statistisch nicht signifikant. Dieser Befund unterstreicht die cAMP-medierte regulierende Rolle des Melatonins und verdeutlicht seine MT2-Rezeptor vermittelte Wirkung. Sheynzon und Korf (2006) beschrieben ebenfalls CREB-Veränderungen in lactotrophen Zellen der MT1/MT2-*knockout*-Mäuse. Sie konnten zeigen, dass beide Melatonin-Rezeptor-Isoformen in die Kontrolle des Aktivitätszustandes der lactotrophen Zellen sowie von Zellen der Pars intermedia involviert sind, jedoch mit unterschiedlichem Ausprägungsgrad. Während der MT1-Rezeptor für die Aufregulierung der Aktivität der lactotropen Zellen eine signifikante Rolle spielt, kommt dem MT2-Rezeptor, analog zu den in der Pars tuberalis erhobenen Befunden der Arbeitsgruppe um von Gall (von Gall et al., 2005) nur eine marginale Bedeutung zu.

Abgesehen von den Veränderungen der Uhrengen-Expression sind auch die im Rahmen dieser Arbeit erhobenen pankreatischen diurnalen Insulin-mRNA-Profile bei MT2- und Doppel-*knockout*-Tieren gegenüber dem Wildtyp betroffen. Die Beantwortung der Frage, ob eine Dysregulation der „Circadianen Uhr“ den erhobenen Befunden zugrunde liegt, muss durch weiterführende Untersuchungen geklärt werden.

Die Tatsache, dass in allen drei *knockout*-Linien im Vergleich zum Wildtyp reduzierte Insulin-Plasma-Spiegel vorliegen (Abb. 19A/19B), lässt vermuten, dass die registrierte Erhöhung der Insulin-Transkripte hauptsächlich kompensatorischer Natur ist.

Die erzielten Daten stehen im Einklang mit Beobachtungen von Kennaway et al. (2007), die eine Störung der Insulin-Sekretion in *clock-knockout* Mäusen beobachteten.

Diese Tierlinie wies einen erheblich reduzierten nächtlichen Plasma-Insulin-Spiegel sowie eine reduzierte GLUT4-mRNA-Menge in der Skelettmuskulatur auf, die eine herabgesetzte Glucose-Toleranz in diesem Maus-Modell erklären könnte. Es bleibt weiteren Untersuchungen vorenthalten, ob die in unserer Arbeit gemessenen erniedrigten Insulin-Plasma-Spiegel auf der reduzierten Synthese oder Sekretion beruhen. Trotz starker Veränderungen, die zu einer reduzierten Insulin-Sekretion in *knockout*-Tieren im Vergleich zum Wildtyp führen, lassen sich

erhöhte Blutglucose-Spiegel nur in MT1-*knockout*-Tieren feststellen (Abb. 20A/20B). Es scheint demnach eine gewisse Toleranz in diesem Rezeptor-*knockout*-Typ gegenüber relativem Insulinmangel in Bezug auf Glucoseverbrauch vorzuliegen. Ursächlich für solche Befunde könnten Anpassungsreaktionen des Organismus auf den systemischen Rezeptor-*knockout* sein, die möglicherweise zu einem antagonistischen Mechanismus führen, unter anderem einer Hochregulation von Insulin-Rezeptor sowie Glucose-Transporter. Man könnte auch annehmen, dass bei den MT1-*knockout*-Tieren die MT2-Rezeptor-Dichte kompensatorisch erhöht ist und dass es, analog zu den Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen, zu erhöhten Blutzuckerwerten im Serum kommt (Lyssenko et al., 2009; Prokopenko et al., 2009). Auch die Beantwortung dieser Frage bleibt weiteren Untersuchungen vorbehalten. Dennoch ist es bereits heute sicher, dass Melatonin- und Insulin-Sekretion auf engste funktionell-physiologisch zusammenhängen und dass sich beide Hormone antagonisieren.

6. Zusammenfassung

Diabetes mellitus und damit einhergehende schwerwiegende Spätkomplikationen gehören weltweit zu den häufigsten Erkrankungen. Die hohen Erkrankungszahlen und die steigende Prävalenz sowie mit der Erkrankung einhergehende Folgeschäden stellen ein großes medizinisches, soziales und gesellschaftspolitisches Problem dar. Damit gewinnt die Forschung zu Ätiologie, Prävention sowie diagnostischer und therapeutischer Behandlungsmöglichkeiten des Diabetes mellitus und seiner akuten und chronischen Komplikationen zunehmend an Bedeutung. Die Steuerung des Glukosehaushaltes durch Inselhormone ist ein tageszeitabhängiger Prozess. Das pineale Hormon Melatonin steuert Tag/Nacht-Rhythmen peripherer Systeme der Glukosehomöostase, z.B. Pankreas und Leber durch Wirkung an spezifischen Rezeptoren (MT1 und/oder MT2). Circadiane Rhythmen werden durch das Zusammenwirken von Uhrengenenprodukten wie *Per1* und *RevErb α* in diesen Organen erzeugt. Es ist bekannt, dass die Rhythmusstörungen der Insulin-produzierenden β -Zellen auch zu Sekretionsstörungen führen können. Damit lässt sich ein hypothetischer Zusammenhang zwischen möglicher Desynchronisation der Uhrengenenexpression und Entwicklung von Stoffwechselstörungen, wie beispielsweise Diabetes mellitus, vermuten.

Ziele dieser Arbeit waren Untersuchungen des fehlenden Melatonin-Einflusses auf die „Innere Uhr“ der Maus sowie dessen Auswirkungen auf die Glukosehomöostase dieser Tiere in Abhängigkeit von Melatonin-Rezeptor-Deletion.

Im Ergebnis konnte der Nachweis einer funktionellen „Circadiane Uhr“ in verschiedenen Organsystemen der Maus erbracht werden. Die Expression der Uhrengene *Per1* und *RevErb α*

bleibt trotz der Melatonin-Rezeptor-Deletion erhalten. Es zeigt sich jedoch eine Desynchronisation der circadianen Rhythmik bei den *knockout*-Tieren im Vergleich zum Wildtyp, die sich in Phasenverschiebungen sowie Amplitudenveränderungen der Expressionsmuster äußert. Diese Untersuchungsergebnisse lassen darauf schließen, dass Melatonin für die Aufrechterhaltung der circadianen Rhythmik in den untersuchten Organen nicht erforderlich zu sein scheint. Die beobachteten Desynchronitätseffekte lassen jedoch eine deutliche Zeitgeberfunktion des Melatonins erkennen.

Des weiteren gelang der Nachweis einer organspezifischen Melatonin-Rezeptor-Wirkung. Während der MT1-Rezeptor-Verlust zu einer starken Dämpfung der Expressionsamplitude im hepatischen Gewebe der Tiere führt, funktioniert die „Circadiane Uhr“ im Pankreas weitgehend MT1-Rezeptor unabhängig. Der MT2-Rezeptor vermittelt die synchronisierende Wirkung des Melatonins im Pankreas, wohingegen diese Rezeptor-Isoform in der Leber sowie Hypothalamus eine primär amplitudenregulierende Funktion ausübt.

Der durch Melatonin-Rezeptor-Deletion verursachte, fehlende inhibierende Melatonin-Einfluß auf das Adenylatcyclase/cAMP-System führt zur Steigerung der Insulin-Transkription. Diese erweist sich jedoch nur als kompensatorisch, da in allen drei untersuchten *knockout*-Linien im Relation zum Wildtyp reduzierte Insulin-Plasmaspiegel registriert wurden.

Die zu erwartenden erhöhten Blutglukose-Spiegel bleiben bei den MT2- und Doppel-*knockout*-Tieren aus. Diese lassen sich nur bei dem MT1-*knockout*-Typ nachweisen, was für eine gewisse Toleranz in diesem Rezeptor-*knockout*-Typ gegenüber relativem Insulinmangel in Bezug auf Glucoseverbrauch spricht. Die Klärung dieses Sachverhaltes bleibt weiterführenden Untersuchungen vorbehalten.

Wenn auch die seit Jahrzehnten geführte Diskussion über den Einfluss von Melatonin auf die Insulinsekretion noch lange nicht geklärt ist und die Bedeutung des Hormons beim Diabetes mellitus ebensowenig erschöpfend aufgedeckt wurde, so leistet diese Arbeit doch einen kleinen Beitrag zur Aufhellung der Wirkungen von Melatonin an der pankreatischen β -Zelle und ebnet den Weg für weiterführende Untersuchungen.

7. Literaturverzeichnis

- Acuna-Castroviejo, D.,** R. J. Reiter, A. Menendez-Pelaez, M. Pablos, A. Burgos (1994) Characterisation of high-affinity melatonin binding sites in purified cell nuclei of rat liver. *J. Pineal Res.* 16: 100-112.
- Arendt, J.,** (2006) Melatonin and human rhythms. *Chronobiol. Int.* 23: 21-37.
- Akashi, M.,** T. Takumi (2005) The orphan nuclear receptor ROR-alpha regulates circadian transcription of the mammalian core-clock *Bmal1*. *Nature Struct. Mol. Biol.* 12: 441-448.
- Anisimov, V. N.,** N. Y. Zavarzina, M. A. Zabezhinski, I. G. Popovich, O. A. Zimina, A. V. Shtylick, A. V. Arutjunyan, T. I. Oparina, V. M. Prokopenko, A. I. Mikhalski, A. I. Yashin (2001) Melatonin increases both life span and tumor incidence in female CBA mice. *Journal of Gerontology* 56A: 311-323.
- Arendt, J.** (1988) Melatonin. *Clinical Endocrinology* 29: 295-299.
- Arendt, J.** (1995) Melatonin and the mammalian pineal gland. Chapman and Hall, London, pp. 201-285.
- Aschoff, J.** (1965) Circadian clocks. Elsevier/North Holland, Amsterdam.
- Aschoff, J.,** U. Von Saint Paul, D. R. Weaver (1971) Die Lebensdauer von Fliegen unter dem Einfluß von Zeitverschiebungen. *Naturwiss.* 58: 574.
- Axelrod, J.** (1974) The pineal gland: a neurochemical transducer. *Science* 184: 1341-1348.
- Bach, A. G.,** S. Wolgast, E. Muhlbauer, E. Peschke (2005) Melatonin stimulates inositol-1,4,5-trisphosphate and Ca²⁺ release from INS1 insulinoma cells. *J. Pineal Res.* 39: 316-323.
- Basalobre, A.,** S. A. Brown, I. Marcacci, F. Tronche, C. Kellendonk, H. M. Reichardt, G. Schulz, U. Schibler (2000a) Resetting of circadian time in peripheral tissues by glucocorticoid signaling. *Science* 289: 2344-2347.
- Basalobre, A.,** F. Damiola, U. Schibler (1998) A serum shock induces circadian gene expression in mammalian tissue culture cells. *Cell* 93: 929-937.
- Bartsch, H.,** C. Bartsch (1981) Effect of melatonin on experimental tumours under different photoperiods and time of administration. *Journal of Neural Transmission* 52: 269-279.
- Boden, G.,** X. Chen, M. Polansky (1999) Disruption of circadian insulin secretion is associated with reduced glucose uptake in first-degree relatives of patients with type 2 diabetes. *Diabetes* 48: 2182-2188.
- Boden, G.,** J. Ruiz, J. L. Urbain, X. Chen (1996) Evidence for a circadian rhythm of insulin secretion. *Am. J. Physiol.* 271: 246-252.
- Bonilla, E.,** S. Medina-Leendertz, S. Diaz (2002) Extension of life span and stress resistance of *Drosophila melanogaster* by long term supplementation with melatonin. *Experim. Geront.* 37: 629-638.

- Borjigin, J.,** M. M. Wang, S. H. Snyder (1995) Diurnal variation in mRNA encoding serotonin N-acetyltransferase in pineal gland. *Nature* 378: 783-785.
- Bouatia-Naji, N.,** Bonnefond A, Cavalcanti-Proença C, Sparsø T, Holmkvist J, Marchand M, Delplanque J, Lobbens S, Rocheleau G, Durand E, De Graeve F, Chèvre JC, Borch-Johnsen K, Hartikainen AL, Ruokonen A, Tichet J, Marre M, Weill J, Heude B, Tauber M, Lemaire K, Schuit F, Elliott P, Jørgensen T, Charpentier G, Hadjadj S, Cauchi S, Vaxillaire M, Sladek R, Visvikis-Siest S, Balkau B, Lévy-Marchal C, Pattou F, Meyre D, Blakemore AI, Jarvelin MR, Walley AJ, Hansen T, Dina C, Pedersen O, Froguel P. (2009) A variant near MTNR1B is associated with increased fasting plasma glucose levels and type 2 diabetes risk. *Nat. Genet.* 41: 89-94.
- Brömme, H. J.,** W. Mörke, D. Peschke, H. Ebel, E. Peschke (2000a) Scavenging effect of melatonin on hydroxyl radicals generated by alloxan. *J. Pineal Res.* 29: 201-208.
- Brzezinski, A.,** H. J. Lynch, M. M. Seibel, M. H. Deng, T. M. Nader (1988) The circadian rhythm of plasma melatonin during the normal menstrual cycle and in amenorrheic women *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 66: 891-895.
- Brydon, L.,** L. Petit, P. Delagrèze, A. D. Strosberg, R. Jockers (2001) Functional expression of MT2 (Mel1b) melatonin receptors in human PAZ6 adipocytes. *Endocrinology* 10: 4264-4271.
- Buchi, K. N.,** J. G. Moore, W. J. Hrushesky, R. B. Sothorn, N. H. Rubin (1991) Circadian rhythm of cellular proliferation in the human rectal mucosa. *Gastroenterology* 101: 410-415.
- Buijs, R. M.,** M. H. Hermes, A. Kalsbeck (1998) The suprachiasmatic nucleus-paraventricular nucleus interaction: a bridge to the neuroendocrine and autonomic nervous system. *Prog. Brain Res.* 119: 365-382.
- Bunger, M.,** L. D. Wilsbacher, S. M. Moran, C. Clendenin, L. A. Radcliffe, J. B. Hogenesch, M. C. Simon, J. S. Takahashi, C. A. Bradfield (2000) Mop3 is an essential component of the master circadian pacemaker in mammals. *Cell* 103: 1009-1017.
- Cagnacci, A.,** J. A., Elliot, S., S., C., Yen (1992) Melatonin: a major regulator of the circadian rhythm of the core temperature in humans. *Journ. Clin. Endocrin. and Metabol.* 75: 447-452.
- Caroleo, M.,** C. D. Frasca, G. Nistico, G. Doria (1992) Melatonin as immunomodulator in immunodeficient mice. *Immunopharmacology* 23: 81-89.
- Carpentier, J.,** P. Cazamian (1981) *Nachtarbeit- Ihre Auswirkungen auf Gesundheit und Wohlbefinden* (1977). Rationalisierungskuratorium der deutschen Wirtschaft (RKW). Eschborn
- Carter, D.,** S. B. D. Goldman (1983) Antigonadal effects of timed melatonin infusion in pinealectomized male Djungarian hamsters (*Phodopus sungorus sungorus*): duration is the critical parameter. *Endocrinology* 113: 457-1267.
- Cassone, V. M.** (1990) Effects of melatonin on the vertebrate circadian systems. *Trends Neurosci.* 13: 457-464.

- Chomczynski, P., N. Sacchi (1987)** Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem.* 162: 156-159.
- Clemens, J. W., M. J. Jarzynka, P. A. Witt-Enderby (2001)** Down-regulation of mt1 melatonin receptors in rat ovary following estrogen exposure. *Life Sci* 69: 27-35.
- Clemens, W. (1981)** Arbeitsbelastung und gesundheitliche Auswirkungen bei Schichtarbeit. *Sozialer Fortschritt* 30: 25-29.
- Conway, S., J. E. Drew, E. S. Morvat, P. Barrett, P. Delagrang, P. J. Morgan (2000)** Chimeric melatonin mt1 and melatonin-related receptors. Identification of domains and residues participating in ligand binding and receptor activation of the melatonin mt1 receptor. *J. Biol. Chem.* 275(27): 20602-20609.
- Coon, S. L., P. H. Roseboom, R. Baler, J. L. Weller, M. A. A. Namboodiri, E. V. Koonin, D. C. Klein (1995)** Pineal serotonin N-acetyltransferase: expression cloning and molecular analysis. *Science* 270: 1681-1683.
- Costa, E. J., R. H. Lopes, M. T. Lamy-Freund (1995)** Permeability of pure lipid bilayers to melatonin. *J. Pineal Res.* 19: 123-126.
- Damiola, F., N. Le Minh, N. Preitner, B. Kornmann, F. Fleury-Olela, U. Schibler (2000)** Restricted feeding uncouples circadian oscillators in peripheral tissues from the central pacemaker in the suprachiasmatic nucleus. *Genes Dev.* 14: 2950-2500.
- Delattre, E., J. Cipolla-Neto, A. C. Boschero (1999)** Diurnal variations in insulin secretion and K⁺ permeability in isolated rat islets. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 26: 505-510.
- Dinet, V., H. W. Korf (2007)** Impact of melatonin receptors on pCREB an clock-gene protein levels in the murine retina. *Cell and Tissue Res.* 330: 29-34.
- Drijfhout, W. J., A. G. Van der Linde, S. E. Kooi, C. J. Grol, B. H. C. Westernik (1996)** Norepinephrine release in the pineal gland: the input from the biological clock measured by in vivo microdialysis. *J. Neurochem.* 66: 748-755.
- Dvornyk, V., O. Vinogradova, E. Nevo (2003)** Origin and evolution of circadian clock genes in prokaryotes. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 100: 2495-2500.
- Dubocovich, M. L., D. P. Cardinali, B. Guardiola-Lemaitre, R. M. Hagan, D. N. Krause, D. Sudgen, P. M. Vanhoutte, F. D. Yocca (1998a)** In: *The IUPHAR compendium of receptor characterization and classification.* IUPHAR Media, London, pp. 187-193.
- Duncan, M. J., J. S. Takahashi, M. L. Dubocovich (1986)** Characterization of 2- [¹²⁵ I] iodmelatonin binding sites in hamster brain. *Eur. J. Pharmacol.* 132: 333-334.
- Duncan, M. J., J. S. Takahashi, M. L. Dubocovich (1988)** 2- [¹²⁵ I]iodmelatonin binding sites in hamster brain membranes: pharmacological characteristics and regional distribution. *Endocrinology* 122: 1825-1833.
- Dunlap, J.C. (1999)** Molecular bases for circadian clocks. *Cell* 96: 271-290.
- Ebisawa, T., S. Karne, M. R. Lerner, S. M. Reppert (1994)** Expression cloning of a high-

- affinity melatonin receptor from *Xenopus* dermal melanophores. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 91: 6133-6137.
- Evans, B. K., R. Mason, V. G. Wilson (1992)** Evidence for direct vasoconstrictor activity of melatonin in “pressurized” segments of isolated artery from juvenile rats. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 346: 362-365.
- Fauteck, J.-D., A. Lerchl, M. Bergmann, W. Wittkowski, B. Stankov (1994)** High-affinity melatonin binding sites in the molecular layer of the human cerebellar cortex. In: Moller, M. and Pevet, P. (eds.) *Advances in Pineal Research*. John Libbey & Co. Ltd. Vol. 8: 457-463.
- Foster, R. G., A. M. Timmers, J. J. Schalken, W. J. de Grip (1989)** A comparison of some photoreceptor characteristics in the pineal and retina. II. The Djungarian hamster (*Phodopus surgorus*). *J. Comp. Physiol.* 165: 565-572.
- Gagliardino, J. J., R. E. Hernandez, O. R. Rebolledo (1984)** Chronobiological aspects of blood glucose regulation: a new scope for the study of diabetes mellitus. *Chronobiologia* 11: 357-379.
- Ganguly, S., S. L. Coon, D. C. Klein (2002)** Control of melatonin synthesis in the mammalian pineal gland: the critical role of serotonin acetylation. *Cell Tissue Res.* 309: 127-137.
- Garcia, M. N., C. G. Barbeito, L. A. Andrini, A. F. Badran (2001)** Circadian rhythm of DNA synthesis and mitotic activity in tongue keratinocytes. *Cell Biol. Int.* 25: 179-183.
- Gastel, J. A., P. H. Roseboom, P. A. Rinaldi, J. L. Weller, D. C. Klein (1998)** Melatonin production: proteasomal proteolysis in serotonin N-acetyltransferase regulation. *Science* 279: 1358-1360.
- Gekakis, N., D. Staknis, H. B. Nguyen, F. C. Davis, L. D. Wilsbacher, D. P. King, J. S. Takahashi, C. J. Weitz (1998)** Role of the CLOCK protein in the mammalian circadian mechanism. *Science* 280: 1564-1569.
- Gooley, J. J., J. Lu, T. C. Chou, T. E. Scammell, C. B. Saper (2001)** Melanopsin in cells of origin of the retinohypothalamic tract. *Nat. Neurosci.* 4: 1165.
- Grundschober, C., F. Delaunay, A. Puhlhofer, G. Triqueneaux, V. Laudet, T. Bartfai, P. Nef (2001)** Circadian regulation of diverse gene products revealed by mRNA expression profiling of synchronized fibroblasts. *J. Biol. Chem.* 276: 46751-46758.
- Güldner, F. H., J. R. Wolff (1996)** Complex synaptic arrangements in the rat suprachiasmatic nucleus: a possible basis for the “Zeitgeber” and non-synaptic synchronization of neuronal activity. *Cell Tissue Res.* 284: 203-214.
- Gurdjian, E. S. (1927)** The diencephalons of the albino rat. *J. Comp. Neurol.* 43: 1-114.
- Gutzeit, R. (1896)** Ein Teratom der Zirbeldrüse. *Med. Diss. Königsberg.*
- Hannibal, J., M. Moller, O. P. Ottersen, J. Fahrenkrug (2000)** PACAP and glutamate are

- costored in the retinohypothalamic tract. *J. Comp. Neurol.* 418: 147-155.
- Hannibal, J. (2002)** Neurotransmitters of the retino-hypothalamic tract. *Cell Tissue Res.* 309: 73-88.
- Harderland, R., I. Balzer, B. Fuhrberg, I. Antolin (1996a)** Melatonin and other methoxyindoles in non-vertebrates. In: *Metabolism and cellular dynamics of indoles*, R. Harderland, eds. University of Göttingen, Göttingen, pp. 162-172.
- Hastings, M. H., G. E. Duffield, F. J. P. Ebling, A. Kidd, E. S. Maywood, I. Schurov (1997)** Non-photic signaling in the suprachiasmatic nucleus. *Biol. Cell* 89: 495-503.
- Hastings, M. H., A. B. Reddy, M. Garabette, V. M. King, S. Chahad-Ehlers, J. O'Brien, E. S. Maywood (2003)** Expression of clock gene products in the suprachiasmatic nucleus in relation to circadian behaviour. *Novartis Found. Symp.* 253: 203-217.
- Hattar, S., H. W. Liao, M. Takao, D. M. Berson, K. W. Yau (2002)** Melanopsin-containing retinal ganglion cells: architecture, projections and intrinsic photosensitivity. *Science* 295: 1065-1070.
- Hattori, A., D.C. Herbert, M. K. Vaughan, K. Yaga, R. J. Reiter (1995)** Melatonin inhibits luteinizing hormone releasing hormone (LHRH) induction of LH release from fetal rat pituitary cells. *Neurosci. Lett.* 184: 109-112.
- Hirota, T., T. Okano, K. Kokame, H. Shirotani-Ikejima, T. Miyata, Y. Fukada (2002)** Glucose down-regulates Per1 and Per2 mRNA levels and induced circadian gene expression in cultured Rat-1 fibroblasts. *J. Biol. Chem.* 277: 44244-44251.
- Hogenesch, J. B., Y. Z. Gu, S. M. Moran, K. Shimomura, L. A. Radcliff, J. S. Takahashi, C. A. Bradfield (2000)** The basic helix-loop-helix-PAS protein MOP9 is a brain-specific heterodimeric partner of circadian and hypoxia factors. *J. Neurosci* 20 RC83.
- Hoorneman, E. M., R. M. Buijs (1982)** Vasopressin fiber pathways in the rat brain following suprachiasmatic nucleus lesioning. *Brain Res.* 243: 235-241.
- Hunt, A. E., W. M. Al-Ghoul, M. U. Gillette, M. L. Dubocovich (2001)** Activation of MT(2) melatonin receptor in rat suprachiasmatic nucleus phase advances the circadian clock. *Am J. Physiol. Cell Physiol.* 280(1): C110-8.
- Ibuca, N., S. Inouye, H. Kawamura (1977)** Analysis of sleep-wakefulness rhythms in male rats after suprachiasmatic nucleus lesions and ocular enucleation. *Brain Res.* 122: 33-47.
- Iguchi, H., K. I. Kato, H. Ibayashi (1982)** Melatonin serum levels and metabolic clearance rate in patients with liver cirrhosis. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 54: 1025-1027.
- Illnerova, H., J. Vanecek, J. Krecek, L. Wetterberg, M. Vanbo (1978)** Melatonin in rat pineal gland and serum: rapid parallel decline after light exposure at night. *Neurosci. Lett.* 9: 189-193.
- Illnerova, H., J. Vanecek, J. Krecek, L. Wetterberg, J. Saaf (1979)** Effect of one minute exposure to light at night on rat pineal serotonin N-acetyltransferase and melatonin. *J.*

- Neurochem. 32: 673-675.
- Jiang, Z. G., Y. Yang, Z. P. Liu, C. N. Allen (1997)** Membrane properties and synaptic inputs of suprachiasmatic nucleus neurons in rat brain slices. *J. Physiol.* 499: 141-159.
- Jin, X., C. von Gall, R. L. Pieschl, V. K. Gribkoff, J. H. Stehle, S. M. Reppert, D. R. Weaver (2003)** Targeted disruption of the mouse Mel1b melatonin receptor. *Mol. Cell Biol.* 23: 1054-1060.
- Jin, X., L. P. Shearman, D. R. Weaver, M. J. Zylka, G. J. de Vries, S. M. Reppert (1999)** A molecular mechanism regulating rhythmic output from the suprachiasmatic circadian clock. *Cell* 98: 57-68.
- Johnson, R. F., R. Y. Moore, L. P. Morin (1988)** Loss of entrainment and anatomical plasticity after lesions of the hamster retinohypothalamic tract. *Brain Res.* 460: 297-313.
- Johnson, C. H., S. S. Golden (1999)** Circadian programs in cyanobacteria: adaptiveness and mechanisms. *Ann. Rev. Microbiol.* 53: 389-409.
- Jolkkonen, J., L. Tuomisto, T. B. van Wimersma Greidanus, P. J. Riekkinen (1988)** Vasopressin levels in the cerebrospinal fluid of the rats with lesions of the paraventricular and suprachiasmatic nuclei. *Neurosci Lett.* 86: 184-188.
- Kalsbeek, A., R. M. Buijs, M. Engelmann, C. T. Wotjak, R. Landgraf (1995)** In vivo measurement of a diurnal variation in vasopressin release in the rat suprachiasmatic nucleus. *Brain Res.* 682: 75-82.
- Kemp, D.M., M. Ubeda, J. F. Habener (2002)** Identification and functional characterization of melatonin Mel 1a receptors in pancreatic beta cells: potential role in incretin-mediated cell function by sensitization of cAMP signaling. *Mol. Cell. Endocrinol.* 191: 157-166.
- Kennaway, D. J., J. A. Owens, A. Voultsios, M. J. Boden, T. J. Varcoe (2007)** Metabolic homeostasis in mice with disrupted Clock gene expression in peripheral tissues. *Amer. Jour. Physiol. Regul., Integr. and Comp. Physiol.* 293: 1528-1537.
- King, D. P., Y. Zhao, A. M. sangoram, L. D. Wilsbacher, M. Tanaka, M. P. Antoch, T. D. Steeves, M. H. Vitaterna, J. M. Kornhauser, P. L. Lowery, F. W. Turek, J. S. Takahashi (1997)** Positional cloning of the mouse circadian *Clock* gene. *Cell* 89: 641-653.
- Klein, D. C., D. A. Auerbach, M. A. A. Nambodiri, G. H. T. Wheler (1981)** Indole metabolism in the mammalian pineal gland. In R. J. Reiter, eds. *The Pineal Gland: Vol. I Anatomy and Biochemistry*, CRC Press, Florida, S. 199-226.
- Klein, D. C., R. Y. Moore, S. M. Reppert (1991)** *Suprachiasmatic nucleus: the mind's clock*. Oxford Univ. Press, New York Oxford.
- Kokkola, T., J. T. Laitinen (1998)** Melatonin receptor genes. *Ann. Med.* 30: 88-94.
- Kopin, I. J., C. M. Pare, J. Axelrod, H. Weissbach (1961)** The fate of melatonin in animals. *J. Biol. Chem.* 236: 3072-3075.
- Korf, H. W. (1994)** The pineal organ as a component of the biological clock. *Phylogenetic*

- and ontogenic considerations. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 719: 13-42.
- Kramm, C. M., W. J. de Grip, H. W. Korf (1993)** Rodopsin immunoreaction in the pineal organ of the pigmented mouse does not indicate the presence of a functional photopigment. *Cell Tissue Res.* 274: 71-78.
- Krause, D. N., G. G. Geary, S. Dollen, S. P. Duckles (2000)** Melatonin and cardiovascular function. In: Olcese, eds.: *Melatonin after Four Decades: Advances in Experimental Medicine and Biology* 460: 299-310.
- Krieg, W. J. S. (1932)** The hypothalamus of the albino rat. *J. Comp. Neurol.* 55: 19-89.
- Kruisbrink, J., M. Mirmiran, T. P. van der Woude, G. J. Boer (1987)** Effects of enhanced cerebrospinal fluid levels of vasopressin, vasopressin antagonist or vasoactive intestinal polypeptide on circadian sleep-wake rhythm in the rat. *Brain Res.* 419: 76-86.
- Laakso, M. L., T. Hätönen, A. Alila (1994)** Uncoupling of the pineal melatonin synthesis of rats from the circadian regulation. *Neurosci. Lett.* 179: 5-8.
- Lee, P. P., S. F. Pang (1992)** Identification and characterization of melatonin binding sites in the gastrointestinal tract of ducks. *Life Sci.* 50: 117-125.
- Lee, C., D. R. Weaver, S. M. Reppert (2004)** Direct association between mouse PERIOD and CK1 ϵ is critical for a functioning circadian clock. *Mol. Cell. Biol.* 24(2): 584-594.
- Lehman, M. N., R. Silver, W. R. Gladstone, R. M. Kahn, M. Gibson, E. L. Bittman (1987)** Circadian rhythmicity restored by neural transplant. Immunocytochemical characterization of the graft and its integration with the host brain. *J. Neurosci.* 7: 1626-1638.
- Lerner, A. B., J. D. Case, Y. Takahashi, T. H. Lee, W. Mori (1958)** Isolation of melatonin, the pineal gland factor that lightens melanocytes. *J. Am. Chem. Soc.* 80: 2587.
- Lewy, A. J., S. Ahmed, J. M. Jackson, R. L. Sack (1992)** Melatonin shifts human circadian rhythms according to a phase response curve. *Chronobiol. Int.* 9: 380-392.
- Liou, S. Y., S. Shibata, K. Iwasaki, S. Ueki (1986)** Optic nerve stimulation-induced increase of release of 3H-glutamate and 3H-aspartate but not 3H-GABA from the suprachiasmatic nucleus in slices of rat hypothalamus. *Brain Res. Bull.* 16: 527-531.
- Liu, C., S. M. Reppert (2000)** GABA synchronizes clock cells within the suprachiasmatic circadian clock. *Neuron* 25: 123-128.
- Liu, C., D. R. Weaver, S. H. Strogatz, S. M. Reppert (1997)** Cellular construction of a circadian clock: period determination in the suprachiasmatic nuclei. *Cell* 91: 855-860.
- Liu, C., D. R. Weaver, X. Jin, L. P. Shearman, R. L. Pieschl, V. K. Gribkoff, S. M. Reppert (1997)** Molecular dissection of two distinct actions of melatonin on the suprachiasmatic circadian clock. *Neuron* 19: 91-102.
- Livak, K. J., T. D. Schmittgen (2001)** Analysis of relative gene expression data using real-time-quantitative PCR and the 2^{-Delta Delta C(T)} Method. *Methods.* 25(4): 402-408.

- Lyssenko, V., C. L. Nagorny, M. R. Erdos, N. Wierup, A. Jonsson, P. Spéjel, M. Bugliani, R. Saxena, M. Fex, N. Pulizzi, B. Isomaa, T. Tuomi, P. Nilsson, J. Kuusisto, J. Tuomilehto, M. Boehnke, D. Altshuler, F. Sundler, J. G. Eriksson, A. U. Jackson, M. Laakso, P. Marchetti, R. M. Watanabe, H. Mulder, L. Groop (2009)** Common variant in MTNR1B associated with increased risk of type 2 diabetes and impaired early insulin secretion. *Nat. Genet.* 41: 82-88.
- Maestroni, G. J. (2000)** Mlt and the immune-hematopoietic system. In: Olcese eds.: *Melatonin after Foer Decades: Advances in Experimental Medicine and Biology* 460: 395-405.
- Maronde, E., M. Pfeffer, J. Olcese, C. A. Molina, F. Schlotter, F. Dehghani, H.-W. Korf, J. H. Stehle (1999a)** Transcription factors in neuroendocrine regulation: rhythmic changes in PhosphoCREB and ICER levels frame melatonin synthesis. *J. Neurosci.* 19 : 3326-3336.
- Matsuo, T., S. Yamaguchi, S. Mitsui, A. Emi, F. Shimoda, H. Okamura (2003)** Control mechanism of the circadian clock for timing of cell division in vivo. *Science* 302: 255-259.
- McNamara, P., S. B. Seo, R. D. Rudic, A. Sehgal, D. Chakravarti, G. A. Fitzgerald (2001)** Regulation of CLOCK and MOP4 by nuclear hormone receptors in the vasculature: a humoral mechanism to reset a peripheral clock. *Cell.* 105(7): 877-889.
- Meijer, J. H., W. J. Rietveld (1989)** Neurophysiology of the suprachiasmatic circadian pacemaker in rodents. *Physiol. Rev.* 69: 671-707.
- Mendelewicz, J. P. Linkowski, L. Branchey, U. Weinberg, E. D. Weitzman, M. Branchey (1979)** Abnormal 24 hour pattern of melatonin secretion in depression. *Lancet*: 1362.
- Menendez-Pelaez, A., B. Poeggeler, R. J. Reiter, L. Barlow-Walden, M. I. Pablos, D. X. Tan (1993)** Nuclear localization of melatonin in different mammalian tissues: immunocytochemical and radioimmunoassay evidence. *J. Cell Biochem.* 53: 373-382.
- Menendez-Pelaez, A., R. J. Reiter (1993)** Distribution of melatonin in mammalian tissues: the relative importance of nuclear versus cytosolic localization. *J. Pineal Res.* 15: 59-69.
- Mitsui, S., S. Yamaguchi, T. Matsuo, Y. Ishida, H. Okamura (2001)** Antagonistic role of E4BP4 and PARproteins in the circadian oscillatory mechanism. *Genes Dev.* 15: 995-1006.
- Moore, R. Y., V. B. Eichler (1972)** Loss of circadian adrenal corticosterone rhythm following suprachiasmatic nucleus lesions in the rat. *Brain Res.* 42: 201-206.
- Moore, R. Y., N. J. Lenn (1972)** A retinohypothalamic projection in the rat. *J. Comp. Neurol.* 146: 1-14.
- Moore, R. Y., J. C. Speh, J. P. Card (1995)** The retinohypothalamic tract originates from a distinct subset of retinal ganglion cells. *J. Comp. Neurol.* 352: 351-366.
- Morgan, P. J., P. Barrett, H. E. Howell, R. Helliwell (1994)** Melatonin receptors: Localization, molecular pharmacology and physiological significance. *Neurochem. Int.* 24: 101-146.

- Mühlbauer, E., E. Peschke (2007)** Evidence for the expression of both the MT1- and in addition, the MT2-melatonin receptor, in the rat pancreas, islet and beta-cell. *J. Pineal Res.* 42: 105-106.
- Mühlbauer, E., S. Wolgast, U. Finckh, D. Peschke, E. Peschke (2004)** Indication of circadian oscillations in the rat pancreas. *FEBS Lett* 564: 91-96.
- Murakami, N., M. Takamura, K. Takahashi, K. Utunomiya, H. Kuroda, T. Etoh (1991)** Longterm cultured neurons from rat suprachiasmatic nucleus retain the capacity for circadian oscillation of vasopressin release. *Brain Res.* 545: 347-350.
- Mutoh, T., S. Shibata, H.-W. Korf, H. Okamura (2003)** Melatonin modulates the light-induced sympathoexcitation and vagal suppression with participation of the suprachiasmatic nucleus in mice. *J. Physiol.* 547: 317-332.
- Niedziela, M., A. Lerchl, E. Nieschlag (1995)** Direct effects of the pineal hormone melatonin on testosterone synthesis of Leydig cells in Djungarian hamsters (*Phodopus sungorus*) in vitro. *Neurosci. Lett.* 201: 247-250.
- Naji, L., A. Carrillo-Vico, J. M. Guerrero, J. R. Calvo (2004)** Expression of membrane and nuclear melatonin receptors in mouse peripheral organs. *Life Sci* 74: 2227-2236.
- Niles, L. P., D. S. Pickering, B. G. Sayer (1987)** HPLC-purified 2- [¹²⁵I]iodmelatonin labels multiple binding sites in hamster brain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 147: 949-956.
- Nonaka, H., N. Emoto, K. Ikeda, H. Fukuya, M. S. Rohman, S. B. Raharjo, K. Yagita, H. Okamura, M. Yokoyama (2001)** Angiotensin II induces circadian gene expression of clock genes in cultured vascular smooth muscle cells. *Circulation* 104(15): 1746-1748.
- Oetjen, E., A. Lechleiter, R. Blume, D. Nihalani, L. Holzman, W. Knepel (2006)** Inhibition of membrane depolarisation-induced transcriptional activity of cyclic AMP response element binding protein (CREB) by the dual-leucine-zipper-bearing kinase in a pancreatic islet beta cell line. *Diabetologia* 49: 332-342.
- Oishi, K., H. Fukui, N. Ishida (2000)** Rhythmic expression of Bmal1 mRNA is altered in Clock mutant mice: differential regulation in the suprachiasmatic nucleus and peripheral tissues. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 268: 164-171.
- Oishi, K., K. Sakamoto, T. Okada, T. Nagase, N. Ishida (1998b)** Humoral signals mediate the circadian expression of rat period homolog (rPer2) mRNA in peripheral tissues. *Neurosci. Lett* 256(2): 117-119.
- Oksche, A. (1983)** Aspects of evolution of the pineal organ. In: *The pineal gland and its endocrine role.* J. Axelrod, F. Fraschini, G. P. Velo, eds, Plenum Press., New York, pp. 15-35.
- Oksche, A., H.-W. Korf, E. M. Rodriguez (1987)** Pinealocytes as photoneuroendocrine units of neuronal origin: concepts and evidence. *Adv. Pineal Res.* 2: 1-18.
- Ouyang, Y., C. R. Andersson, T. Kondo, S. S. Golden, C. H. Johnson (1998)** Resonating

- circadian clocks enhance fitness in cyanobacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 8660-8664.
- Pang, S. F., F. Tang, P. L. Tang (1984)** Negative correlation of age and the levels of pineal melatonin, pineal-N-acetylserotonin and serum melatonin in male rats. *J. Exp. Zool.* 229: 41-47.
- Pardridge, W. M., L. J. Mietus (1980)** Transport of albumin-bound melatonin through the blood-brain barrier. *J. Neurochem.* 34: 1761-1763.
- Peschke, E., J. D. Fauteck, U. Musshoff, F. Schmidt, A. Beckmann, D. Peschke (2000)** Evidence for a melatonin receptor within pancreatic islets of neonate rats: functional, autoradiographic and molecular investigations. *J. Pineal Res.* 28: 156-164.
- Peschke, E., T. Frese, E. Chankiewicz, D. Peschke, U. Preiss, U. Schneyer, R. Spessert, E. Mühlbauer (2006b)** Diabetic Goto Kakizaki rats as well as type 2 diabetic patients show a decreased diurnal serum melatonin level and an increased pancreatic melatonin-receptor status. *J. Pineal Res.* 40: 135-143.
- Peschke, E., E. Mühlbauer, U. Musshoff, V. Csernus, E. Chankiewicz, D. Peschke (2002)** Receptor (MT1) mediated influence of melatonin on cAMP concentration and insulin secretion of rat insulinoma cells INS-1. *J. Pineal Res.* 33: 63-71.
- Peschke, E., D. Peschke (1998)** Evidence for a circadian rhythm of insulin release from perfused rat pancreatic islets. *Diabetologia* 41: 1085-1092.
- Peschke, E., I. Stumpf, I. Bazwinsky, L. Litvak, H. Dralle, E. Mühlbauer (2007)** Melatonin and type 2 diabetes – a possible link? *J. Pineal Res.* 42: 350-358.
- Peschke, E., S. Wolgast, I. Bazwinsky, K. Pönicke, E. Mühlbauer (2008)** Increased melatonin synthesis in pineal glands of rats in streptozotocin induced type 1 diabetes. *J. Pineal Res.* 45: 439-448.
- Picinato, M. C., E. P. Haber, A. R. Carpinelli, J. Cipolla-Neto (2002)** Daily rhythm of glucose-induced insulin secretion by isolated islets from intact and pinealectomized rat. *J. Pineal Res.* 33: 172-177.
- Pickering, D. S., L. P. Niles (1989)** 2- [¹²⁵I]iodmelatonin binding sites in hamster and chick exhibit differential sensitivity to prazosin. *J. Pharm. Pharmacol.* 41: 356-357.
- Pickering, D. S., L. P. Niles (1990)** Pharmacological characterization of melatonin binding sites in Syrian hamster hypothalamus. *Eur. J. Pharmacol.* 175: 71-77.
- Pittendrigh, C. S. (1993)** Temporal organization-Reflection of a Darwinian clock-watcher. *Ann. Rev. Physiol.* 55: 16-54.
- Pittendrigh, C. S. (1960)** Circadian rhythms and the organization of the circadian system. *Gold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 25: 159-184.
- Popova, J. S., M. L. Dubocovich (1995)** Melatonin receptor-mediated stimulation of phosphoinositide breakdown in chick brain slices. *J. Neurochem.* 64: 130-138.

- Preitner, N., F. Damiola, L. Lopez-Molina, J. Zakany, D. Duboule, U. Albrecht, U. Schiebler (2002)** The orphan nuclear receptor REV-ERB α controls circadian transcription within the positive limb of the mammalian circadian oscillator. *Cell* 110: 251-260.
- Prokopenko, I., Langenberg C, Florez JC, Saxena R, Soranzo N, Thorleifsson G, Loos RJ, Manning AK, Jackson AU, Aulchenko Y, Potter SC, Erdos MR, Sanna S, Hottenga JJ, Wheeler E, Kaakinen M, Lyssenko V, Chen WM, Ahmadi K, Beckmann JS, Bergman RN, Bochud M, Bonnycastle LL, Buchanan TA, Cao A, Cervino A, Coin L, Collins FS, Crisponi L, de Geus EJ, Dehghan A, Deloukas P, Doney AS, Elliott P, Freimer N, Gateva V, Herder C, Hofman A, Hughes TE, Hunt S, Illig T, Inouye M, Isomaa B, Johnson T, Kong A, Krestyaninova M, Kuusisto J, Laakso M, Lim N, Lindblad U, Lindgren CM, McCann OT, Mohlke KL, Morris AD, Naitza S, Orrù M, Palmer CN, Pouta A, Randall J, Rathmann W, Saramies J, Scheet P, Scott LJ, Scuteri A, Sharp S, Sijbrands E, Smit JH, Song K, Steinthorsdottir V, Stringham HM, Tuomi T, Tuomilehto J, Uitterlinden AG, Voight BF, Waterworth D, Wichmann HE, Willemsen G, Witteman JC, Yuan X, Zhao JH, Zeggini E, Schlessinger D, Sandhu M, Boomsma DI, Uda M, Spector TD, Penninx BW, Altshuler D, Vollenweider P, Jarvelin MR, Lakatta E, Waeber G, Fox CS, Peltonen L, Groop LC, Mooser V, Cupples LA, Thorsteinsdottir U, Boehnke M, Barroso I, Van Duijn C, Dupuis J, Watanabe RM, Stefansson K, McCarthy MI, Wareham NJ, Meigs JB, Abecasis GR. (2009)** Variants in MTNR1B influence fasting glucose levels. *Nat Genet.* 41: 77-81.
- Provencio, I., G. Jiang, W. J. De Grip, W. P. Hayes, M. D. Rollag (1998)** Melanopsin: An opsin in melanophores, brain and eye. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 340-345.
- Proventio, I., I. R. Rodriguez, G. Jiang, W. P. Hayes, E. F. Moreira, M. D. Rollag (2000)** A novel human opsin in the inner retina. *J. Neurosci.* 20: 600-605.
- Putilov, A. A., G. S. Russkikh, K. V. Danilenko (2000)** Phase of melatonin rhythm in winter depression. *Adv. Exp. Med. Biol.* 460: 441-458.
- Ramracheya, R.D., D. S. Muller, P. E. Squires, H. Brereton, D. Sugden, G. C. Huang, S. A. Amiel, P. M. Jones, S. J. Persaud (2008)** Function and expression of melatonin receptors on human pancreatic islets. *J. Pineal Res.* 44: 273-279.
- Reiter, R. J. (1993)** Antioxidant capacity of melatonin. *Neuroendocrinol. Lett.* 15: 103-116.
- Reiter, R. J. (1991c)** Melatonin: the chemical expression of darkness. *Mol. Cell. Endocrinol.* 79: C153-158.
- Reiter, R. J., C. M. Craft, J. E. Johnson Jr., T. S. King, B. A. Richardson, G. M. Vaughan, M. K. Vaughan (1981)** Age-associated reduction in nocturnal pineal melatonin levels in female rats. *Endocrinology* 109: 1295-1297.
- Reppert, S. M., D. R. Weaver, T. Ebisawa (1994)** Cloning and characterization of a mammalian melatonin receptor that mediates reproductive and circadian responses. *Neuron*

13: 1177-1185.

- Reppert, S. M., C. Godson, C. D. Mahle, D. R. Weaver, S. A. Slaugenhaupt, J. F. Gusella (1995a)** Molecular characterization of a second melatonin receptor expressed in human retina and brain: the Mel_{1b} melatonin receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 92: 8734-8738.
- Reppert, S. M., D. R. Weaver (2001)** Molecular analysis of mammalian circadian rhythms. *Ann. Rev. Physiol.* 63: 647-676.
- Reppert, S. M., D. R. Weaver (2002)** Coordination of circadian timing in mammals. *Nature* 418: 935-941.
- Reppert, S. M., D. R. Weaver, S. A. Rivkees, E. G. Stopa (1988)** Putative melatonin receptors in a human biological clock. *Science* 242: 78-81.
- Rickwood, D., B. D. Hames (1990)** Gel electrophoresis of nucleic acids-a practical approach. IRL Press, Washington D. C..
- Roca, A. L., C. Godson, D. R. Weaver, S. M. Reppert (1996)** Structure, characterization and expression of the gene encoding the mouse Mel_{1a} melatonin receptor. *Endocrinology* 137: 3469-3477.
- Roenneberg, T., R. G. Foster (1997)** Twilight times: light and the circadian system. *Photochem. Photobiol.* 66: 549-561.
- Rollag, M. D., M. H. Stetson (1981)** Ontogeny of the pineal melatonin rhythm in golden hamsters. *Biol. Reprod.* 24: 311-314.
- Roseboom, P. H., S. L. Coon, R. Baler, S. K. McCune, J. L. Weller, D. C. Klein (1996)** Melatonin synthesis. Analysis of the more than 150-fold nocturnal increase in serotonin N-acetyltransferase messenger ribonucleic acid in the rat pineal gland. *Endocrinology* 137: 3033-3045.
- Rutter, J., M. Reick, S. L. McKnight (2002)** Metabolism and the control of circadian rhythms. *Ann. Rev. Biochem.* 71: 307-331.
- Sack, R. L., A. J. Lewy, M. L. Blood, L. D. Keith, H. Nakagawa (1992)** Circadian rhythm abnormalities in totally blind people: incidence and clinical significance. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 75: 127-134.
- Sambrook, J., E. F. Fritsch, T. Maniatis (1989)** Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold spring Harbor, New York.
- Sasaki, M., A. Masuda, T. Oishi (1995)** Circadian rhythms of corneal mitotic rate, retinal melatonin and immunoreactive visual pigments and the effect of melatonin on the rhythms in the Japanese quail. *J. Comp. Physiol. [A]* 176: 465-471.
- Sato, T. K., S. Panda, L. J. Miraglia, T. M Reyes, R. D. Rudic, P. McNamara, K. A. Naik, G. A. FitzGerald, S. A. Kay, J. B. Hogenesch (2004)** A functional genomic strategy reveals ROR α as a component of the mammalian circadian clock. *Neuron* 43: 527-537.
- Sawaki, Y., I. Nihonmatsu, H. Kawamura (1984)** Transplantation of the neonatal

- suprachiasmatic nuclei into rats with complete bilateral suprachiasmatic lesions. *Neurosci Res.* 1: 67-72.
- Schibler, U., J. Ripperger, S. A. Brown (2003)** Peripheral circadian oscillators in mammals: time and food. *J. Biol. Rhythms* 18: 250-260.
- Schomerus, C., E. Laedtke, H.-W. Korf (1995)** Calcium responses of isolated, immunocytochemically identified rat pinealocytes to noradrenergic, cholinergic and vasopressinergic stimulations. *Neurochem. Int.* 27: 163-175.
- Schomerus, C., H.-W. Korf, E. Laedtke, J. L. Weller, D.C. Klein (2000)** Selective adrenergic/cAMP-dependent switch-off of proteasomal proteolysis alone switches on neural signal transduction: an example from the pineal gland. *J. Neurochem.* 75: 2123-2132.
- Schwartz, W. J., S. M. Reppert (1985)** Neural regulation of the circadian vasopressin rhythm in cerebrospinal fluid: a pre-eminent role for the suprachiasmatic nuclei. *J. Neurosci.* 5: 2771-2778.
- Shearman, L. P., S. Sriram, D. R. Weaver, E. S. Maywood, I. Chaves, B. Zheng, K. Kume, C. C. Lee, G. T. Van der Horst, M. H. Hastings, S. M. Reppert (2000b)** Interacting molecular loops in the mammalian circadian clock. *Science* 288: 1013-1019.
- Shearman, L. P., M. J. Zylka, S. M. Reppert, D. R. Weaver (1999)** Expression of basic helix-loop-helix/PAS genes in the mouse suprachiasmatic nucleus. *Neuroscience* 89: 387-397.
- Sheynzon, P., H. W. Korf (2006)** Targeted deletion of Mel1a and Mel1b melatonin receptors affect pCREB levels in lactotroph and pars intermedia cells of mice. *Neurosci. Lett.* 407: 48-52.
- Shiu, S. Y., L. Li, J. N. Xu, C. S. Pang, J. T. Wong, S. F. Pang (1999)** Melatonin-induced inhibition of proliferation and G1/S cell cycle transition delay of human choriocarcinoma JAR cells: possible involvement of MT2 (MEL1B) receptor. *J. Pineal Res.* 3: 183-192.
- Staiger, H., F. Machicao, S. A. Schäfer, K. Kirchhoff, K. Kantartzis, M. Guthoff, G. Silbernagel, N. Stefan, H. U. Häring, A. Fritsche (2008)** Polymorphisms within the novel type 2 diabetes risk locus MTNR1B determine beta-cell function. *PLoS ONE.* 3: e3962.
- Stehle, J. H., C. Von Gall, C. Schomerus, H.-W. Korf (2001a)** Of rodents and ungulates and melatonin: creating a uniform code for darkness by different signaling mechanism. *J. Biol. Rhythms* 16: 312-325.
- Stumpf, I., I. Bazwinsky, E. Peschke (2009)** Modulation of the cGMP signaling pathway by melatonin in pancreatic β -cell. *J. Pineal Res.* 46: 140-147
- Stumpf, I., E. Mühlbauer, E. Peschke (2008)** Involvement of the cGMP signaling cascade in mediating the insulin-inhibiting effect of melatonin in pancreatic β -cells. *J. Pineal Res.* 45: 318-327.
- Sudgen, D. (1983)** Psychopharmacological effects of melatonin in mouse and rat. *J.*

- Pharmacol. Ther. 227: 587-591.
- Sudgen, D. (1989)** Melatonin biosynthesis in the mammalian pineal gland. *Experientia* 45: 922-931.
- Takano, A., Y. Isojima, K. Nagai (2004)** Identification of *mPer1* phosphorylation site responsible for nuclear entry. *J. Biol. Chem.* 279(31): 32578-32585.
- Tamarkin, L., C. J. Baird, O. F. Almeida (1985)** Melatonin: a coordinating signal for mammalian reproduction? *Science* 227: 714-720.
- Tamarkin, L., M. Cohen, D. Roselle, C. Reichert, M. Lippman, Chabner (1981)** Melatonin inhibition and pinealectomy enhancement of 7,12-dimethylbenz(a)anthracene-induced mammary tumors in rat. *Cancer Res.* 41: 4432-4436.
- Tei, H., H. Okamura, Y. Shigeyoshi, C. Fukuhara, R. Ozawa, M. Hirose, Y. Sakaki (1997)** Circadian oscillation of mammalian homologue of the *Drosophila* period gene. *Nature* 389: 512-516.
- Toh, K. L., C. R. Jones, Y. He, E. J. Eide, W. A. Hinze, D. M. Virshup, L. J. Ptacek, Y.-H. Fu (2001)** An hPer2 phosphorylation site mutation in familial advanced sleep phase syndrome. *Science* 291: 1040-1043.
- Tosini, G., M. Menaker (1996)** Circadian rhythms in cultured mammalian retina. *Science* 272: 419-421.
- Toutou, Y. (2001)** Human aging and melatonin. Clinical relevance. *Exp. Gerontol.* 36: 1083-1100.
- Ueda, H. R., W. Chen, A. Adachi, H. Wakamatsu, S. Hayashi, T. Takasugi, M. Nagano, K. Nakahama, Y. Suzuki, S. Sugano, M. Iino, Y. Shigeyoshi, S. Hashimoto (2002)** A transcription factor response element for gene expression during circadian night. *Nature* 418: 534-539.
- Vakkuri, O., E. Lamsa, E. Rahkamaa, H. Ruotsalainen, J. Leppaluoto (1984a)** Iodinated melatonin: preparation and characterization of the molecular structure by mass and ¹HNMR spectroscopy. *Anal. Biochem.* 142: 284-289.
- Vanacek, J. (1988)** Melatonin binding sites. *J. Neurochem.* 51: 1436-1440.
- Viswanathan, M., J. T. Laitinen, J. M. Saavedra (1990)** Expression of melatonin receptors in arteries involved in thermoregulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 6200-6203.
- Vollrath, L. (1981)** The pineal organ. In: *Handbuch der mikroskopischen Anatomie des Menschen*. A. Oksche, L. Vollrath, eds. VI/7. Springer, Berlin/Heidelberg/New York, pp. 311-314.
- Von Gall, C., M. L. Garabette, C. A. Kell, S. Frenzel, F. Dehghani, P. M. Schumm-Draeger, D. R. Weaver, H. W. Korf, M. H. Hastings, J. H. Stehle (2002)** Rhythmic gene expression in pituitary depends on heterologous sensitization by the neurohormone melatonin.

Nat. Neurosci. 5: 234-238.

- Waldhauser, F., M. Waldhauser (1988)** Melatonin and aging. In: A. Miles, D. R. S. Philbrinck, C. Thompson, eds. Melatonin: clinical Perspectives. Oxford University Press, New York.
- Watts, A. G. (1991)** The efferent projections of the suprachiasmatic nucleus: anatomical insights into the control of circadian rhythms. In: D. C. Klein, R. Y. Moore, S. M. Reppert, eds. Suprachiasmatic nucleus: the mind's clock. Oxford University Press, New York, pp. 77-106.
- Watts, A. G., L. W. Swanson, G. Sanchez-Watts (1987)** Efferent projections of the suprachiasmatic nucleus: I. Studies using anterograde transport of Phaseolus vulgaris leucoagglutinin in the rat. J. Comp. Neurol. 258: 204-229.
- Weaver, D. R. (1998)** The suprachiasmatic nucleus. a 25-years retrospective. J. Biol. Rhythms 13: 100-112.
- Weaver, D. R., S. A. Rivkees, S. M. Reppert (1989)** Localization and characterization of melatonin receptors in rodent brain by in vitro autoradiography. J. Neurosci 9: 2581-2590.
- Weaver, D. R., J. H. Stehle, E. G. Stopa, S. M. Reppert (1993)** Melatonin receptors in human hypothalamus and pituitary: implications for circadian and reproductive responses to melatonin. J. Clin. Endocrinol. Metab. 76: 295-301.
- Welsh, M. G. (1985)** Pineal calcification: structural and functional aspects. Pineal Res. Rev. 41-67.
- Welsh, D. K., D. E. Logothetis, M. Meister, S. M. Reppert (1995)** Individual neurons dissociated from rat suprachiasmatic nucleus express independently phased circadian firing rhythms. Neuron 14: 697-706.
- Wiechmann, A. F., L. D. Campbell, D. M. Defoe (1999)** Melatonin receptor RNA expression in Xenopus retina. Brain Res. Mol. Brain Res. 2: 297-303.
- Williams, L. M. (1989)** Melatonin-binding sites in the brain and pituitary mapped by in-vitro autoradiography. J. Mol. Endocrinol. 3: 71-75.
- Wirz-Justice, A., J. Arendt (1979)** Diurnal, menstrual cycle and seasonal indole rhythms in man and their modifications in affective disorders. In: J. Obiols, C. Ballus, E. Gonzales Monclus, J. Pujol, eds. Biological Psychiatry Today. Elsevier/North Holland, Amsterdam.
- Wurtman, R. J., J. Axelrod, L. S. Phillips (1963)** Melatonin synthesis in the pineal gland: control by light. Science 142: 1071-1073.
- Yagita, K., H. Okamura (2000)** Forscolin induces circadian gene expression of rPer1, rPer2 and dbp in mammalian rat-1 fibroblasts. FEBS Lett. 465: 79-82.
- Yamaguchi, S., S. Mitsui, L. Yan, K. Yagita, S. Miyake, H. Okamura (2000)** Role of DBP in the circadian oscillatory mechanism. Mol. Cell. Biol. 20: 4773-4781.
- Yu, W., M. Nomura, M. Ikea (2002)** Interacting feedback loops within the mammalian

clock: BMAL1 is negatively autoregulated and unregulated by CRY1, CRY2 und PER2.
Biochem. Biophys. Res. Comm. 290: 933-942.

Zylka, M. J., L. P. Shearman, D. R. Weaver, S. M. Reppert (1998b) Three period homologs in mammals: differential light responses in the suprachiasmatic circadian clock and oscillating transcripts outside of brain. *Neuron* 20(6): 1103-1110.

Zanoboni, A., W. Zanoboni-Muciaccia (1967) Experimental hypertension in pinealectomized rats. *Life Sci.* 6: 2327-2331.

Zawilska, J. B., A. Jarmak, A. Woldan-Tambor, J. Z. Nowak (1995) Light-induced suppression of nocturnal serotonin N-acetyltransferase activity in chicken pineal gland and retina: a wavelength comparison. *J. Pineal Res.* 19: 87-92.

8. Thesen

1. Die Expression der beiden Melatonin-Rezeptor-Isoformen (MT1 und MT2) findet in verschiedenen Organsystemen der Maus, einschließlich der pankreatischen Langerhansschen Insel statt.
2. Die Uhrgene *Per1* und *RevErb α* sowie Uhrengen-kontrolliertes Gen *Dbp* werden ebenfalls in verschiedenen Organsystemen der Maus exprimiert.
3. Die „Circadiane Uhr“ in verschiedenen Organsystemen der Maus bleibt auch nach einer Melatonin-Rezeptor-Deletion funktionell intakt.
4. Die „Circadiane Uhr“ im Pankreas funktioniert weitgehend MT1-Rezeptor unabhängig; dagegen ist der MT2-Rezeptor für die Synchronisation der circadianen Rhythmen im Pankreas unverzichtbar.
5. Die MT1-Rezeptor-Deletion ist mit einer starken Dämpfung der *Per1*-Expression in der Leber verbunden und weist damit auf eine stärker ausgeprägte Funktion dieser Rezeptor-Isoform im Lebergewebe als im Pankreas hin. Über den MT2-Rezeptor wird sowohl in der Leber als auch im Hypothalamus der amplitudenregulierende Effekt des Melatonins vermittelt.
6. Die bei den Wildtyp-Tieren vorhandene Rhythmus-Synchronisation zwischen Leber und Pankreas, die der Aufrechterhaltung von Blutglukose-Spiegel dienen, ist in den *knockout*-Tieren gestört.
7. Der Melatonin-Rezeptor-knockout führt zum Wegfall der hemmenden Funktion des Melatonins auf das Adenylatcyclase/cAMP-System und bewirkt damit eine konsekutive Steigerung der Insulin-Transkripte; dabei wird insbesondere die MT2-Rezeptor-medierte regulierende Wirkung des Melatonins unterstrichen.
8. In allen drei *knockout*-Linien lassen sich reduzierte Plasma-Insulin-Spiegel registrieren; dies lässt vermuten, dass die beobachtete Steigerung der Insulin-Transkripte hauptsächlich kompensatorischer Natur ist.
9. Erhöhte Blutglukose-Spiegel lassen sich nur bei der MT1-Rezeptor-*knockout*-Linie feststellen.

9. Lebenslauf

Persönliche Daten

Elena Groß (geb. Michajlov)
Ärztin
geboren am 01.02.1982 in Uschtobe (Kasachstan)
verheiratet, 2 Kinder

Schulbildung

1988-1997 Mittelschule in Uschtobe (Kasachstan)
1997 Umsiedlung nach Deutschland
1998-2001 Jugenddorf Christophorusschule Elze (Gymnasium)
Abschluss: Abitur

Studium und Promotion

10/2001-03/2008 Studium der Humanmedizin an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

09/2003 Ärztliche Vorprüfung

2004 Wissenschaftliche Hilfsassistentin im Kursus der mikroskopischen Anatomie

01/2004 Beginn der Dissertation unter Leitung von Prof. Dr. Elmar Peschke im Institut für Anatomie und Zellbiologie der Medizinischen Fakultät

08/2006-07/2007 Praktisches Jahr:

- 1. Tertial Chirurgie: Diakoniekrankenhaus Halle
- 2. Tertial Dermatologie: Städtisches Klinikum Dessau
- 3. Tertial Innere Medizin: Städtisches Klinikum Dessau

04/2008 Staatsexamen

Seit 06/2009 Assistenzärztin in Marienhospital Osnabrück/Kardiologie

Osnabrück, den

Elena Groß

10. Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre, dass ich die dem Fachbereich Medizin der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg zur Promotionsprüfung eingereichte Dissertation mit dem Titel „Molekularbiologische Untersuchungen an Melatonin-Rezeptor-*knockout*-Mäusen“ im Institut für Anatomie, unter Betreuung und Leitung von Prof. Dr. Elmar Peschke 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 Universität ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht.

Die vorliegende Arbeit wurde bisher nicht als Dissertation eingereicht.

Osnabrück, den

.....
Elena Groß

11. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich ganz herzlich bei allen bedanken, die mich bei der Durchführung und Erstellung dieser Arbeit unterstützt haben.

Ausdrücklich möchte ich mich ganz herzlich bei meinem Doktorvater, Prof. Dr. Elmar Peschke, für die Überlassung des interessanten Themas und die Schaffung der nötigen Voraussetzungen für die Erstellung dieser Dissertation bedanken.

Mein ganz spezieller Dank gilt meinem Mitbetreuer, Dr. Eckhard Mühlbauer, für sein nie nachlassendes Engagement und seine besondere Geduld, die hilfreichen Anregungen und Beratungen, sowie die Einarbeitung in wissenschaftliche Methoden der Molekularbiologie.

Allen medizinisch-technischen Assistentinnen, insbesondere Candy Rothgänger und Annika Jordan, danke ich ganz herzlich für Hilfsbereitschaft im Laboralltag und Lars Bieseke bei der Durchführung der Tierversuche.

Selbstverständlich bedanke ich mich von Herzen bei meinen Eltern sowie bei meiner einmaligen Schwester für die stetige Unterstützung jeglicher Art.

Nicht zuletzt möchte ich meinem Mann danken, für seine liebevolle Geduld und den nie endenden Zuspruch während der Erstellung dieser Arbeit.