



Leopoldina  
Nationale Akademie  
der Wissenschaften

# NOVA ACTA LEOPOLDINA

Neue Folge | Band 114 | Nummer 389

## Chronobiologie

Elmar Peschke (Hrsg.)



Deutsche Akademie der Naturforscher Leopoldina –  
Nationale Akademie der Wissenschaften, Halle (Saale) 2011

Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft Stuttgart





# NOVA ACTA LEOPOLDINA

Abhandlungen der Deutschen Akademie der Naturforscher Leopoldina

Herausgegeben vom Präsidium der Akademie

---

NEUE FOLGE

NUMMER 389

BAND 114

---

## Chronobiologie

### Leopoldina-Symposium

am 19. März 2010 in Halle (Saale)

Wissenschaftliche Vorbereitung und Organisation:  
Elmar PESCHKE (Halle/Saale)  
Mitglied der Leopoldina

Mit 71 Abbildungen und 2 Tabellen

Herrn Professor Dr. Dr. Dr. h. c. Joachim-Hermann SCHARF,  
Director Ephemeridum der Akademie, zum 90. Geburtstag am  
7. November 2011 in Verehrung gewidmet.



**Deutsche Akademie der Naturforscher Leopoldina –  
Nationale Akademie der Wissenschaften, Halle (Saale) 2011  
Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft Stuttgart**

Redaktion: Dr. Michael KAASCH und Dr. Joachim KAASCH

**Die Schriftenreihe Nova Acta Leopoldina erscheint bei der Wissenschaftlichen Verlagsgesellschaft Stuttgart, Birkenwaldstraße 44, 70191 Stuttgart, Bundesrepublik Deutschland.  
Jedes Heft ist einzeln käuflich!**

Die Schriftenreihe wird gefördert durch das Bundesministerium für Bildung und Forschung sowie das Ministerium für Wissenschaft und Wirtschaft des Landes Sachsen-Anhalt.

Einbandbild:

Eine Blumen-Uhr, wie sie im Jahre 1745 von dem schwedischen Ritter Carl VON LINNÉ – dem „Vater der neuzeitlichen Botanik“ – erfunden und entwickelt wurde „damit man, wenn man auch bei trübem Wetter auf freiem Felde sich befindet, ebenso genau wissen könne, was die Glocke sei, als wenn man eine Uhr bei sich hätte“. Gezeichnet von Ursula SCHLEICHER-BENZ, Lindauer Bilderbogen, Erste Folge, Nr. 5, Herausgeber: Friedrich BOER, Jan Thorbecke Verlag, Lindau, 1948.

#### **Bibliografische Information der Deutschen Nationalbibliothek**

Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <http://dnb.ddb.de> abrufbar.

Die Abkürzung ML hinter dem Namen der Autoren steht für Mitglied der Deutschen Akademie der Naturforscher Leopoldina – Nationale Akademie der Wissenschaften.

Alle Rechte, auch die des auszugsweisen Nachdruckes, der fotomechanischen Wiedergabe und der Übersetzung, vorbehalten.

© 2011 Deutsche Akademie der Naturforscher Leopoldina e. V. – Nationale Akademie der Wissenschaften  
Hausadresse: 06108 Halle (Saale), Emil-Abderhalden-Straße 37, Tel. +49 345 4723934  
Herausgeber: Präsidium der Deutschen Akademie der Naturforscher Leopoldina – Nationale Akademie der Wissenschaften  
Printed in Germany 2011  
Gesamtherstellung: Elbedruckerei Wittenberg  
ISBN: 978-3-8047-2942-1  
ISSN: 0369-5034  
Gedruckt auf chlorfrei gebleichtem Papier.

## Inhalt

BERG, Gunnar: Grußwort .....	7
PESCHKE, Elmar: Einleitung .....	11
VOLLRATH, Lutz: Morphologie und Funktionsmechanismen der „Inneren Uhr“ .....	21
MÜHLBAUER, Eckhard, und PESCHKE, Elmar: Zur Generierung und Bedeutung circadianer Rhythmen unter besonderer Berücksichtigung von Uhrengenen im endokrinen Pankreas .....	71
STEINLECHNER, Stephan: Biologische Bedeutung saisonaler und circannualer Rhythmen bei Tier und Mensch .....	85
PESCHKE, Elmar, und MÜHLBAUER, Eckhard: Einfluss von Melatonin auf Sekretionsrhythmik und Signaltransduktionsprozesse der pankreatischen $\beta$ -Zelle. Melatonin-Insulin-Interaktionen .....	111
HARDELAND, Rüdiger: Über welche Mechanismen wirkt Melatonin protektiv gegenüber oxidativem Stress? .....	137
YOUNG, Peter: Wachen und Schlafen: Erkenntnisse aus der Genetik der circadianen Rhythmik .....	161
MÜLLER, Tilmann: Diagnostik und Therapie chronobiologischer Störungen im schlafmedizinischen Alltag .....	175
<b>Posterbeiträge</b>	
ALBRECHT, Elke, MÜHLBAUER, Eckhard, BAZWINSKY-WUTSCHKE, Ivonne, HOFMANN, Kathleen, und PESCHKE, Elmar: Einfluss des humanen MT2-Rezeptors auf die Insulinsekretion der pankreatischen $\beta$ -Zelle .....	191
BÄHR, Ina, MÜHLBAUER, Eckhard, und PESCHKE, Elmar: Einfluss von Melatonin auf die Glukagon-produzierende $\alpha$ -Zelle des endokrinen Pankreas .....	197
BÄHR, Ina, MÜHLBAUER, Eckhard, BAZWINSKY-WUTSCHKE, Ivonne, und PESCHKE, Elmar: Charakterisierung von Melatonin-Rezeptoren (MT1 und MT2) im Pankreas von Ratte und Mensch .....	201
BAZWINSKY-WUTSCHKE, Ivonne, MÜHLBAUER, Eckhard, LITVAK, Liudmila, und PESCHKE, Elmar: Calciumsignalkomponenten der pankreatischen Insel unter dem Einfluss von Melatonin .....	207

BOLBOREA, Matei, STEINLECHNER, Stephan, PÉVET, Paul, und KLOSEN, Paul: Morphologie der Tanyzyten und die Expression zellulärer Adhäsionsmoleküle wird durch die Photoperiode reguliert .....	215
HOFMANN, Kathleen, BÄHR, Ina, STRECK, Sebastian, MÜHLBAUER, Eckhard, ALBRECHT, Elke, WOLGAST, Sabine, WEDEKIND, Dirk, und PESCHKE, Elmar: Melatonin-Insulin-Interaktionen bei Typ-1-diabetischen Ratten .....	221
LIPOKATIC-TAKACS, Esther, und STEINLECHNER, Stephan: Mögliche Wege der Kommunikation und Synchronisation zwischen Neuronen und Astrozyten im Nucleus suprachiasmaticus von <i>Phodopus sungorus</i> .....	227
LIPPERT, Julian Peter, HALFTER, Hartmut, OSADA, Nani, und YOUNG, Peter: Expression circadianer Rhythmikgene in dermalen Fibroblasten von Patienten mit idiopathischer Hypersomnie und gesunden Kontrollprobanden .....	231
MÜHLBAUER, Eckhard, BÄHR, Ina, BACH, Andreas, und PESCHKE, Elmar: Der Melatonineinfluss auf die Insulinsekretion pankreatischer $\beta$ -Zellen erfolgt über cAMP-, cGMP- und IP3-Signalkaskaden .....	235
MÜHLBAUER, Eckhard, PESCHKE, Dorothee, und PESCHKE, Elmar: Untersuchungen zur Expression von Uhrgenen im Pankreas der Ratte .....	241
PESCHKE, Elmar, FRESE, Thomas, BÄHR, Ina, SCHUCHT, Helena, BAZWINSKY-WUTSCHKE, Ivonne, und MÜHLBAUER, Eckhard: Melatonin-Insulin-Interaktionen bei Typ-2-diabetischen Ratten und Patienten .....	245
PESCHKE, Elmar, und PESCHKE, Dorothee: Die Insulinsekretion isolierter pankreatischer Ratten-Inseln erfolgt circadian-rhythmisch .....	253
PETRI, Ines, SCHERBARTH, Frank, STEINLECHNER, Stephan, und BARRETT, Perry: Photoperiodische Reaktionen werden beim Dsungarischen Zwerghamster ( <i>Phodopus sungorus</i> ) durch freiwilliges Laufen modifiziert .....	257
WOLGAST, Sabine, und PESCHKE, Elmar: Calcium-Imaging mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie in INS1-Insulinomazellen .....	261

## Grußwort

Gunnar BERG ML (Halle/Saale)

Mitglied des Präsidiums der Akademie

Spektabilität,  
Lieber Herr ZIERZ,  
Sehr geehrter Herr Kollege YOUNG,  
Sehr geehrter, lieber Herr Kollege PESCHKE,  
Meine sehr verehrten Damen, meine Herren!

Es ist mir eine Ehre, Sie im Namen des Präsidiums der Deutschen Akademie der Naturforscher Leopoldina, besonders aber im Namen unseres Präsidenten Jörg HACKER, der heute leider nicht anwesend sein kann, obwohl ihn das Thema sicher sehr interessiert hätte, zu begrüßen. Ich freue mich, dass hier im Rahmen der Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Klinische Neurophysiologie und Funktionelle Bildgebung dieses Satellitensymposium stattfinden kann, und ich danke den beiden Moderatoren, Herrn YOUNG aus Münster und Herrn PESCHKE aus Halle, der das Symposium organisiert und die Verbindung zur Leopoldina hergestellt hat, für ihren Einsatz und für ihre Mühe. Die Leopoldina hat diese Initiative gern unterstützt.

Das Thema des Symposiums, die Chronobiologie, ist, soweit ich das sehe, ein Problemkreis, der bereits seit Jahrzehnten als Grundlagenforschung betrieben wird, der aber auch nicht unbedeutende Anwendungen einschließt, denn jede Tätigkeit, die außerhalb unseres evolutionär bestimmten Tätigkeitsablaufes stattfindet, beeinflusst selbstverständlich den circadianen Rhythmus. Das betrifft Nacharbeit ebenso wie die Überwindung mehrerer Zeitzonen durch den Flugverkehr. Doch angesichts der Tatsache, dass hier im Auditorium die Experten zu diesem Arbeitsfeld sitzen und gleich über die Grundlagen und die neuesten Ergebnisse referieren werden, ist es nicht angemessen, wenn ich mich weiterhin zum Thema äußere. Im Gegenteil freue ich mich, von Ihnen dazu etwas zu hören, bin ich doch selbst auch hergekommen, um mich belehren zu lassen.

Gestatten Sie mir stattdessen einige Sätze zur Leopoldina, besonders natürlich für die Gäste, die erstmals an einer Leopoldina-Veranstaltung teilnehmen. Die anderen bitte ich um Entschuldigung, dass sie hier nun einiges Altbekanntes zum wiederholten Male hören.

Die Leopoldina wurde 1652 in der freien Reichsstadt Schweinfurt gegründet und ist mit diesem Gründungsdatum die älteste, ununterbrochen existierende Akademie der Welt, also auch älter als z. B. die *Royal Society* und andere bedeutende Akademien. Die Gründer waren vier Ärzte in Schweinfurt, die zu denen gehört haben, die erkannt hatten, dass für die Medizin naturwissenschaftliche Grundlagen unerlässlich sind, eine Ansicht, die bis heute an Bedeutung nichts verloren hat, wie ja auch Ihr Symposium zeigen wird. So wurde den Mitgliedern die Aufgabe gestellt, jeweils halbjährlich eine Monographie vorzulegen, in der ein Gegenstand



aus dem Mineral-, dem Pflanzen- oder dem Tierreich, der für die Medizin Bedeutung hat, möglichst umfassend dargestellt wird. Man hoffte, auf diese Weise eine Enzyklopädie aller für die Medizin wichtigen Objekte zu erarbeiten. Wie Sie sich leicht denken können, wurde damit aber die intellektuelle Leistungsfähigkeit der Mitglieder total überschätzt, und erst 1661 lag die erste und für lange Zeit einzige Monographie vor, eine Monographie über den Rebstock von dem Breslauer Stadtphysikus SACHS VON LEWENHAIMB. Man erkannte natürlich, dass Monographien die Ausnahme bleiben werden, wollte man die neuesten naturwissenschaftlichen und medizinischen Ergebnisse möglichst aktuell publizieren, und so gründete die Leopoldina 1670 die erste medizinisch-naturwissenschaftliche Zeitschrift der Welt, die *Miscellanea curiosa medico-physica Academiae Naturae Curiosorum sive Ephemeridum medico-physicarum germanicarum curiosarum annus primus*, abgekürzt die Ephemeriden, deren Namen im Laufe der Zeit sich gelegentlich änderte und die als *Nova Acta Leopoldina* bis heute existiert.

Das Bestreben der Gründer und ihrer Nachfolger war aber auch, die Akademie als Reichs-akademie zu etablieren. Man verhandelte mit dem Wiener Hof, und tatsächlich gelang es 1687, die Privilegierung der Akademie durch Kaiser LEOPOLD I. zu erreichen. Neben vielen anderen Rechten – sehr wichtig war für die Akademie die Zensurfreiheit – wurde ihr auch der Name *Sacri Romani Imperii Academia Caesareo-Leopoldina Naturae Curiosorum*, also Kaiserlich-Leopoldinische Akademie der Naturforscher, verliehen und damit war sie Reichsakademie. Diesen Status hielt sie bis zu der durch NAPOLEON erzwungenen Niederlegung der Kaiserkrone durch FRANZ II. im Jahr 1806 und dem damit verbundenen Ende des Heiligen Römischen Reiches Deutscher Nation bei. Doch bereits im 19. Jahrhundert versuchten einige Präsidenten, wieder solch einen reichsunmittelbaren Status zu erreichen, indem sie sich bemühten, aus der Akademie ein Nationales Institut zu machen, bei dem die deutschen Regierungen auf Anforderung Stellungnahmen zu bedeutsamen wissenschaftlichen Themen hätten erarbeiten lassen können, also hier schon die Idee der Politikberatung. Aber offenkundig war die Zeit noch nicht reif. Jedenfalls zerschlugen sich die Pläne, und die Leopoldina blieb zwar eine deutschlandweite Akademie mit internationaler Mitgliedschaft, hielt diesen Status durch eine kluge Politik auch während der DDR-Zeit durch, aber sie war damit eine Akademie unter vielen anderen in Deutschland.

Doch mit der friedlichen Revolution 1989/90 wurden auch hier die Koordinaten neu justiert. Deutschland war eines der wenigen Länder, in der keine der existierenden Akademien mit Selbstverständlichkeit angesprochen werden konnte, wenn es z. B. darum ging, die Wissenschaft in Deutschland in internationalen Angelegenheiten zu vertreten. Das wurde sowohl von der Wissenschaft als auch von der Politik als Defizit angesehen, und so wurde gelegentlich im politischen Raum die Ansicht geäußert, ob nicht die Leopoldina diese Rolle übernehmen solle. Doch die Akademie musste sich in den 1990er Jahren erst einmal unter freiheitlichen Verhältnissen positionieren. Ein erster Erfolg war die überaus positive Evaluierung durch den Wissenschaftsrat. Der damalige Präsident, Benno PARTHIER, verstand es in der Folge, durch eine behutsame, aber zielgerichtete Politik die Akademie auf Aufgaben außerhalb ihres bisherigen Wirkungsbereiches vorzubereiten, z. B. durch Erweiterung des Fächerspektrums. So konnte dann unter seinem Nachfolger Volker TER MEULEN in den 2000er Jahren die Diskussion um eine nationale Akademie wieder aufgenommen werden, die dann nach einem sehr komplizierten und wechselhaft verlaufenden Prozess dazu führte, dass im Jahre 2008 während eines Festaktes hier in Halle die Erhebung der Leopoldina durch Bundesministerin Annette SCHAVAN im Beisein des Bundespräsidenten zur Nationalen Akademie der Wissenschaften erfolgte. Die damit verbundenen Aufgaben sind zweierlei. Zum einen vertritt die Leopoldina

Deutschland in all den internationalen Gremien, in denen die einzelnen Länder durch ihre Akademien vertreten sind. Zum anderen erarbeitet die Leopoldina in Kooperation mit der Union der Länder-Akademien und der Akademie für Technikwissenschaften *acatech* Stellungnahmen zu wissenschaftlichen und wissenschaftspolitischen Problemen, die gesellschaftlich bedeutsam sind oder in Zukunft werden können. Die Leopoldina hat dabei die Federführung, ist aber bestrebt, alle Sachkompetenz, die verfügbar ist, einzubeziehen. Das bedeutet selbstverständlich eine weitaus stärkere Mitarbeit der Mitglieder, als das in der Vergangenheit üblich war.

Ihnen wünsche ich eine erfolgreiche Veranstaltung, viele interessante Vorträge und Diskussionen, anregende Gespräche und einen angenehmen Aufenthalt in Halle. Ich hoffe, dass Sie die Tagung mit vielen neuen Erkenntnissen zur Chronobiologie verlassen werden.

Vielen Dank für Ihre Aufmerksamkeit!

Prof. Dr. Dr.-Ing. Gunnar BERG  
Deutsche Akademie der Naturforscher Leopoldina  
Nationale Akademie der Wissenschaften  
Emil-Abderhalden-Straße 37  
06108 Halle (Saale)  
Bundesrepublik Deutschland  
Tel.: +49 345 47239889  
Fax: +49 345 4723919  
E-Mail: [gunnar.berg@physik.uni-halle.de](mailto:gunnar.berg@physik.uni-halle.de)



## Einleitung

Elmar PESCHKE ML (Halle/Saale)

Mit 1 Abbildung

Die Abbildung der Umwelt durch Sinnesorgane befähigt Lebewesen zu einer gewinnbringenden Einnischung in Raum und Zeit. Ein „Zeitsinn“ oder ein Organ der „Zeitmessung“ im engeren Sinne sind nicht bekannt, dennoch ermöglichen die Sinnesorgane die Kontaktaufnahme nicht nur mit dem Raum, sondern auch mit Zeit-vermittelnden Ereignissen und sind damit von unverzichtbarer Bedeutung für Interaktionen mit der Umwelt sowie eine sinnvolle Integration in sie. Bei dieser Integration in unsere Umwelt kommt dem optischen System, unserem „vornehmsten Sinn“, also nicht nur bei der gnostischen, sondern auch bei der räumlichen und zeitlichen Orientierung eine ganz entscheidende Bedeutung zu. Licht synchronisiert als stärkster Zeitgeber ständig unsere endogen generierten Rhythmen mit der Umwelt und nimmt dadurch koordinierenden Einfluss auf biologische Funktionen sowie physiologische Abläufe und Aktivitätsmuster im Tages- und Jahresgang.

Mit der Etablierung der Chronobiologie als einer medizinisch-biologischen Teildisziplin in der Mitte des 20. Jahrhunderts, begründet von Jürgen ASCHOFF (1913–1998), Erwin BÜNNING (1906–1990) und Colin PITTENDRIGH (1918–1996), den Hauptinitiatoren des 1960 organisierten „Cold Spring Harbor-Symposiums für biologische Uhren“, wurden in den zurückliegenden 5 Jahrzehnten jahrtausendealte Beobachtungen und Erkenntnisse einer wissenschaftlichen Analytik zugeführt. Dabei stand die Frage nach einem Rhythmusgenerator sowie einem möglichen „Zeitsinn“, oftmals im Kontext mit der Bedeutung eines „dritten Auges“, im Fokus des Interesses. Gegenstandslos sind in diesem Zusammenhang Medianaugen, die uns in den Mythen unterschiedlichster Kulturkreise begegnen und sich auf eine Fehlbildung, also auf ein Malheur der ontogenetischen Entwicklung, zurückführen lassen. Entsprechende Terata haben mit Sicherheit Pate gestanden für den wohl bekanntesten Cyclophen, der uns aus der Odyssee als Polyphem bekannt ist (Übersicht mit beispielhafter Darstellung von Missbildungen [Terata] mit Medianäugigkeit [Cyclophenauge] aus der Meckel-Sammlung des Institutes für Anatomie und Zellbiologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg siehe PESCHKE 2004).

Nach heutiger Auffassung gehörten zum morphologischen Substrat der „Inneren Uhr“ neben dem primären Rhythmusgenerator, dem hypothalamischen Nucleus suprachiasmaticus (NSC), vor allem eine epithalamische Struktur, die Epiphysis cerebri, die wegen ihrer Zapfenform auch als Pinealorgan oder Zirbeldrüse bezeichnet wird, und bereits seit mehr als 2000 Jahren bekannt ist. Erste Auseinandersetzungen mit der Epiphysis cerebri finden sich bei den berühmten Anatomen der Alexandrinischen Schule, HEROPHILOS VON CHIOS (309–260 v. Chr.) und ERASISTRATUS VON CHALCEDON (344–280 v. Chr.), die in der Epiphyse ein Ventil sahen, das den Fluss der Erinnerungen kontrolliert. Ähnlich äußerte sich GALEN (139–200), der der Epiphyse ebenfalls eine Ventilfunktion zur Regulierung des Gedankenflusses der Seitenven-

trikel zuerkennt, aber in ihr auch bereits eine Drüse sah. Die Bezeichnung Pinealis stammt von Andreas VESALIUS (1514–1564). Auch in der hinduistischen Mystik begegnet uns die Zirbeldrüse; in ihr wird das 3. Auge gesehen, das der Verbindung zwischen Mensch und Kosmos dient. Schließlich sind jedoch die Abhandlungen zur Philosophie des Lebendigen („Les Traitez de l’Homme et de la Formation du Foetus“ 1632 und „La Description du Corps Humain“ 1648) von René DESCARTES (1596–1650) entscheidend, da sie „als Beginn konsequent kausalanalytischen Denkens in Biologie und Physiologie“ (ROTSCHUH 1969) verstanden werden können. In diesen Schriften ordnete der geniale französische Aufklärer in antizipierender Weise dem optischen System die Epiphysis cerebri zu, die von ihm als „Sitz des erkennenden Teiles der Seele“, der *res cogitantes*, verstanden wurde. Unsere Augen (Lateralaugen) projizierten nach DESCARTES Sinneseindrücke direkt zur median liegenden Epiphyse, „wo sich der Sitz der Vorstellungsvermögen befindet“. Die Epiphyse wird von DESCARTES als „Quellort der *spiritus* in der Mitte des Gehirns liegend und als Zentrum der Sinneswahrnehmung, des *sensorium commune*“, verstanden (ROTSCHUH 1969).

Wird die Stammesentwicklung der Wirbeltiere, die Phylogenese, in die Betrachtungen einbezogen, so wird bald deutlich, dass sich das Pinealorgan tatsächlich auf eine unpaare mediane Augenanlage, ausgestattet mit spezifischen Photorezeptoren und damit den Lichtsinneszellen unserer Lateralaugen vergleichbar, zurückführen lässt. Die höchste Ausprägung erlangt das sogenannte Scheitelauge bei den gegen Ende des Karbon auftretenden Reptilien, also vor 300 bis 400 Jahrmillionen. Bemerkenswert ist, dass das Scheitelauge der Reptilien auf einer Ausstülpung des Epithalamus des Zwischenhirns (Diencephalon) beruht. Seine höchste Entwicklung ist in der Ausstattung mit Linse, lichtperzipierenden Sinneszellen, vergleichbar unserer Retina, sowie davon ausgehenden Nervenfasern zu sehen. In eindrucksvoller Weise kann bei Reptilien eine Öffnung und – zumindest während der frühen Entwicklung – ein deutlich erkennbarer, pigmentarmer Scheitelfleck der Haut zwischen den Lateralaugen auf dem Schädeldach auftreten, der dem einfallenden Licht den Zugang zu den tiefergelegenen lichtempfindlichen Strukturen erleichtert (Übersicht siehe PESCHKE 2004). Die große Ähnlichkeit zur Retina unserer Lateralaugen ist ferner im lamellierten Aufbau der Außenglieder der Sinneszellen zu sehen. Schließlich soll an dieser Stelle unter Weglassung einer Vielzahl von Erscheinungsformen nur noch auf einen Tatbestand hingewiesen werden: Bei Anuren ist ein in der äußeren Haut gelegenes Stirnorgan durch einen Nervus pinealis mit der intrakraniell liegenden Epiphysis cerebri verbunden, eine Situation, die sich wiederum in stark abgewandelter Form als oberflächlicher und tiefer Teil der Epiphyse in der weiteren Entwicklung erhält (DODT 1966).

Nachdem sich aus der Phylogenese das reguläre Auftreten eines dritten (medianen) Auges in der aufsteigenden Wirbeltierreihe bis hin zu den Reptilien nachweisen ließ, ist von Interesse, wie die Entwicklung bei den Vögeln, vor allem aber bei den Säugetieren, *Homo sapiens* eingeschlossen, vonstatten ging. Hier begegnet uns im Zuge der Phylogenese ein beispielloses Phänomen. Die zur Lichtperzeption befähigten, mit lichtempfindlichen zapfenähnlichen Außengliedern ausgestatteten Zellen des Pinealkomplexes der rezenten Fische und Amphibien bzw. des Parietalauges der Reptilien fehlen bei den Säugetieren. Unabhängig vom Auftreten zunehmend reduzierter, aber dennoch zur Lichtperzeption befähigter Pinealozyten der Reptilien und Vögel wurde in den Epiphysen fast aller bisher untersuchten Wirbeltiere die Synthese des Hormons Melatonin (Isolierung: LERNER et al. 1958, Strukturklärung: LERNER et al. 1959) nachgewiesen. Das bedeutet, dass die oftmals simplifizierte Darstellung der Umwandlung einer Sinneszelle in eine Drüsenzelle zu korrigieren ist. Der *photoneuroendokrine Trans-*

*ducer*, die Epiphysis cerebri, ausgestattet mit Sinnes- und endokriner Funktion, wird während der Phylogenese vielmehr dergestalt spezialisiert, dass die Sinnesfunktion bei den niederen Vertebraten zunehmend reduziert wird und die sekretorische Funktion bei den Mammalia beherrschend in den Vordergrund tritt. Aus einem ambivalenten photoneuroendokrinen Pinealocyten bei *Lampetra* entwickelt sich auf der einen Seite die sensorische Zelle des Parietalauges der Reptilien und auf der anderen Seite die inkretorische Zelle der Säugetierepiphyse (UECK 1982).

Das bekannteste und möglicherweise wichtigste Hormon der Säugerepiphyse ist das schon genannte Melatonin (N-Acetyl-5-methoxytryptamin), das sich von der essentiellen Aminosäure Tryptophan ableitet. Es entsteht über die Zwischenstufen 5-Hydroxytryptophan, 5-Hydroxytryptamin (Serotonin) und N-Acetylserotonin, wobei die Enzyme Arylalkyl-N-acetyltransferase (AA-NAT) und 5-Hydroxyindol-O-methyltransferase (HIOMT) bei der Melatoninsynthese von entscheidender Bedeutung sind. Dass Melatonin nicht nur in der Epiphyse, sondern beispielsweise auch in der Retina, dem Darm und einer bei Nagetieren vorkommenden retrobulbären Orbitaldrüse, der Harderschen Drüse, nachgewiesen wurde, sei der Vollständigkeit wegen genannt. Jedoch, welche Funktion erfüllt das Melatonin bei den Säugetieren? Gibt es den beschriebenen Zusammenhang zum optischen System überhaupt noch? Waren die Antizipationen des genialen und seiner Zeit weit vorausseilenden DESCARTES Irrtümer oder ein Glücksfall des Tüchtigen?

Es steht außer Frage, dass der funktionelle Zusammenhang zwischen Epiphyse und optischem System in eindrucksvoller Weise erhalten geblieben ist. Das phylogenetisch alte und über die gesamte Evolution konservierte Hormon Melatonin, das bereits bei Einzellern und Pflanzen in hohen Konzentrationen nachgewiesen wurde, ist bei den Mammalia einer circadianen Sekretionsrhythmik unterworfen, die darin besteht, dass es ausnahmslos in der Dunkelzeit stark erhöht gebildet und freigesetzt wird. Verkürzt könnte man vom „Hormon der Dunkelzeit“ sprechen oder auch von dem Hormon, das unserem Organismus die umgebende Beleuchtungssituation in ein hormonelles Signal umsetzt, einen gegenüber der Lichtzeit exzessiv erhöhten Melatoninspiegel. Eine erstaunliche Besonderheit im Sekretionsmuster des Melatonins ist ferner darin zu sehen, dass sowohl tag- als auch nachtaktive Tiere nur während der Dunkelzeit – also ungeachtet ihres Aktivitätszustandes und damit unabhängig vom Tonus des Sympathicus oder Parasympathicus – erhöhte Plasmaspiegel aufweisen, die schon in Beantwortung kürzester Lichtblitze extrem stark abfallen.

Bevor die Betrachtungen zur Bedeutung der Epiphyse unter phylogenetischem Aspekt mit Fokussierung auf den optischen Sinn fortgesetzt werden, ist zunächst noch ein weiterer Gesichtspunkt zu berücksichtigen, der von unverzichtbarer Wichtigkeit für die Zeitstrukturierung biologischer Abläufe ist. Gemeint sind biologische Rhythmen, ihre Definition und der Ort ihrer Generierung.

Alle physiologischen Abläufe unterliegen biologischen Rhythmen, wobei wir circadiane (circa 24 h, zwischen 20 und 28 h), ultradiane (weniger als 20 h), infradiane (mehr als 28 h), circaseptane (circa eine Woche), circamensuelle (circa ein Monat) und circannuale Rhythmen mit einer Periodenlänge von ungefähr einem Jahr unterscheiden. Aufschlussreich sind in diesem Zusammenhang auch die bedeutungsvollen Bunkerexperimente in der zweiten Hälfte des vorigen Jahrhunderts von Jürgen ASCHOFF.

Dass sich mit dem morphologischen Strukturwandel der Epiphyse funktionelle Änderungen verbinden, war zu erwarten. Bei den Vögeln, die hier nur am Rande und der Vollständigkeit wegen berücksichtigt werden sollen, übernimmt die Epiphyse die Generierung biologischer

Rhythmen. Diese endogen generierten Rhythmen unterliegen exogenen Einflüssen wie zum Beispiel dem Licht, das als stärkster Zeitgeber die endogen generierten Rhythmen mittels Melatonin synchronisiert. Durch Exstirpation der Epiphyse werden nicht nur endokrine Regelkreise und damit Funktionsabläufe, sondern auch die oben charakterisierten Rhythmen beeinflusst, was zu funktionellen Entgleisungen führt.

Bei den Säugetieren fungiert das Pinealorgan als endokrine Drüse, jedoch nicht als Generator circadianer Rhythmen wie bei den Vögeln. Damit stellt sich die Frage, wo bei den Mammalia Rhythmen generiert werden. Ist das Pinealorgan der Säugetiere im Hinblick auf seine ursprüngliche Bedeutung im optischen System als ein atavistisches Relikt der Phylogenese zu betrachten oder ist ihm noch eine Bedeutung im optischen System und darüber hinaus für die Rhythmogenese verblieben? Die Antwort konnte auf Grund intensiver Untersuchungen der vergangenen Jahrzehnte gegeben werden. Die Säugerepiphyse bleibt dem optischen System funktionell verbunden. Die Epiphyse fungiert als *photoneuroendokriner Transducer* und informiert über das Verhältnis von Licht- und Dunkelzeit im Tagesverlauf (Uhrenfunktion) sowie dessen Veränderungen im Jahresverlauf (Kalenderfunktion; REITER 1993). Durch diese Feststellungen ist zwar der uns interessierende enge Zusammenhang zwischen dem optischen Sinn und der Epiphyse hergestellt, jedoch noch nicht der Ort der Rhythmogenese bei den Säugetieren genannt.

Die Generierung circadianer Rhythmen erfolgt bei den Säugetieren in dem eingangs genannten Nucleus suprachiasmaticus, einem hypothalamischen Kerngebiet, das sich morphologisch und auf Grund immunhistochemischer Nachweise in Subkerne (Pars ventrolateralis und Pars dorsomedialis) strukturieren lässt. Dieser Kern wurde bereits zu Beginn des vorigen Jahrhunderts beschrieben, aber erst vor etwa 40 Jahren (MOORE und LENN 1972) als primärer *circadian pacemaker* erkannt. Von besonderer Bedeutung für das Verständnis funktioneller Interaktionen zwischen diesem hypothalamischen Kern und der Epiphyse war der Nachweis von Melatoninrezeptoren (REPERT et al. 1995a, b, REPERT 1997) im NSC, die auf eine funktionelle Wechselwirkung der beiden Strukturen hinwiesen. Dass die Dichte der Melatoninrezeptoren im NSC neben einer Vielzahl anderer Funktionsmerkmale am Tage erhöht ist, während im Gegensatz dazu physiologische, biochemische und morphologische Untersuchungen eine Aktivitätserhöhung der Epiphyse während der Nacht belegen, ist mit einem inhibitorischen Melatonineinfluss auf den NSC als zeitbezogenes feinregulatorisches Instrumentarium vereinbar.

Unser heutiger Kenntnisstand über Strukturen, die im Dienste der Rhythmogenese stehen, lässt sich wie folgt zusammenfassen: Die rhythmusgenerierende Bedeutung des Nucleus suprachiasmaticus, sein photischer Input von der Retina über den retinohypothalamischen Trakt (RHT), Afferenzen vom *intergeniculate leaflet* des Corpus geniculatum laterale über den geniculohypothalamischen Trakt, Efferenzen zum Nucleus paraventricularis und weiterführende Verbindungen über das Centrum ciliospinale und das Ganglion cervicale superius bis hin zum *photoneuroendokrinen Transducer* Epiphysis cerebri stellen im Großen und Ganzen das heute anerkannte morphologische Substrat und Kernstück dessen dar, was sich unter dem Begriff „Innere Uhr“ subsumieren lässt (Abb. 1, Übersicht: REUSS 1996).

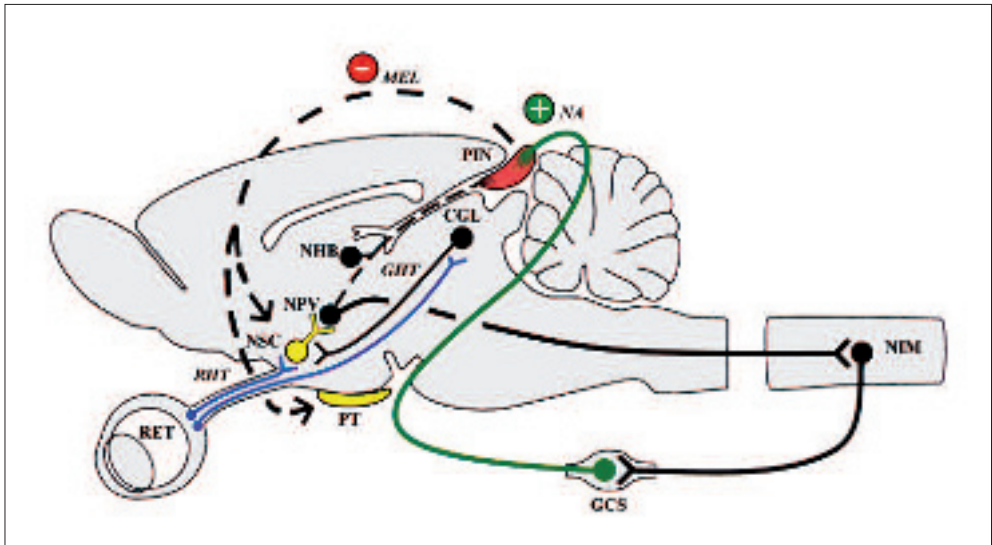


Abb. 1 Vereinfachte Darstellung des photoneuroendokrinen Systems der Ratte in Anlehnung an STEHLE und KORF (1996). Der primäre *circadian pacemaker* der Säugetiere, der Nucleus suprachiasmaticus (NSC), empfängt synchronisierende Impulse von speziellen Zellen der retinalen Ganglienzellen (3. Neuron) der Retina (RET) mit einem speziellen Photopigment, dem Melanopsin, über den retinohypothalamischen Trakt (RHT). Nach Umschaltungen im Nucleus paraventricularis (NPV), Nucleus intermediolateralis (NIM) des Centrum ciliospinale und Ganglion cervicale superius (GCS) erreichen die Informationen über postganglionäre sympathische Fasern, die Nervi conarii, das Pinealorgan (PIN). Die nachts erhöhte Freisetzung von Noradrenalin (NA) aktiviert die Synthese von Melatonin (MEL), das rückwirkend über Melatoninrezeptoren die Aktivität des NSC hemmt und Einfluss auf die Pars tuberalis nimmt. Zusätzliche Verbindungen des NPV mit den Habenularkernen (NHB, zentrale Innervation der Epiphyse) sowie dem *intergeniculate leaflet* des Corpus geniculatum laterale (CGL) über den geniculohypothalamischen Trakt (GHT) werden diskutiert und gehören zum circadianen System, dem morphologischen Substrat der „Inneren Uhr“.

Die bisher vorgestellten Befunde haben Gültigkeit für Untersuchungen am „Ganztier“, also für *In-vivo*-Untersuchungen, womit nicht gesagt sein soll, dass nicht auch dezentralisierte, isolierte Organe bzw. Zellen oder Zellverbände Rhythmen aufweisen können. Neben hochfrequenten Oszillationen im Sekunden- und Minutenbereich wurden circadiane Rhythmen unter *In-vitro*-Bedingungen, beispielsweise an isolierten Vogel-Epiphysen, Insekten-Nervengewebe, Nebennierenrinden-Zellkulturen, Herzzellverbänden sowie Leberzellen von Säugetieren, beobachtet.

Kehren wir jedoch noch einmal zu der eingangs gestellten Frage nach der Existenz eines „dritten Auges“ zurück, nachdem wir die Mythologie und ihre Wurzeln in der Teratologie, den Aufklärer DESCARTES, die Phylogenese und die Ontogenese zu Wort kommen ließen. Wir konnten feststellen, dass in der aufsteigenden Wirbeltierreihe durchaus ein „drittes Auge“, ausgestattet mit nahezu allen morphologischen und physiologischen Merkmalen unserer Lateralaugen, zu finden ist und dass ein solches zusätzliches Medianauge in besonders perfekter Ausstattung bei rezenten Reptilien entwickelt ist. Wir konnten weiter feststellen, dass dieses Lichtsinnesorgan bei den Vögeln und Säugetieren einen Funktionswandel erfahren hat. Aus dem „dritten Auge“ wurde eine endokrine Drüse, die bei den Vögeln endogene Rhythmen generiert und bei den Säugetieren als *photoneuroendokriner Transducer* fungiert. In beiden Fäl-



len bleibt der enge funktionelle Zusammenhang zum optischen System erhalten, wobei die besondere Bedeutung der Epiphyse als Bestandteil der „Inneren Uhr“ im Vordergrund steht.

Die Kenntnis über biologische Rhythmen hat sich in zunehmendem Maße als praxisrelevant erwiesen. Funktionelle Schäden durch häufig wechselnde Schichtarbeit, Leistungsabfall durch Jetlag, mangelnde Effizienz durch nicht zeitgerechte Applikation von Zytostatika im Tagesverlauf und zahlreiche weitere Beispiele unterstreichen die Bedeutung von Chronobiologie und Chronopharmakologie als unverzichtbaren Bestandteil medizinischer Wissenschaft. Die Zielstellung allen medizinischen Handelns wird seit altersher darin gesehen, zur „rechten Zeit“ das „Richtige“ zu tun. In Kenntnis chronobiologischer Gesetzmäßigkeiten wird diese Überzeugung des strengen Zeitbezuges erneut aktuell, was beispielsweise heißen könnte, zu Zeiten höchster Rezeptordichte oder -sensibilität die geringsten, aber noch voll wirksamen Dosen von Medikamenten zwecks Vermeidung von oft schweren Nebeneffekten zu verabreichen. Therapeutische Ansätze bieten sich weiterhin auf Grund eindeutig antikonvulsiver und sedativer Eigenschaften des Melatonins (ARENDE 2000, ARENDT und SKENE 2005). Einen erheblichen Raum nehmen ferner Untersuchungen ein, die eine antiproliferative und davon abgeleitet antitumoröse Bedeutung des Melatonins in den Vordergrund rücken. Auch Einflüsse auf das Immunsystem werden diskutiert. Hinzu kommt eine in jüngerer Zeit, bisher jedoch nur in pharmakologischen Dosen, nachgewiesene protektive Fähigkeit, Sauerstoffradikale, insbesondere Hydroxylradikale, zu neutralisieren, was die schon seit längerem diskutierte Tumor-protektive Bedeutung von Melatonin erklären könnte (REITER et al. 2002, 2005, 2007, 2008). Insgesamt kann festgestellt werden, dass biologische Rhythmen zur Stabilisierung von Funktionsabläufen beitragen und Ereignisse vorhersagbar machen, ebenso wie heute anerkannt wird, dass Desynchronisationen von Krankheitswert sind.

Im vorliegenden Band werden aktuelle Themen aufgegriffen, die auf einem Chronobiologie-Symposium der Leopoldina in Halle (Saale) am 19. März 2010 behandelt wurden. Auf dem Symposium wurden zunächst Vorträge zu Fragen theoretischer Grundlagen behandelt, denen sich Beiträge mit medizinisch-klinischer Fokussierung anschlossen. Die Hauptvorträge wurden durch Poster ergänzt und bildeten die Grundlage intensiver Diskussionen am Ende der Veranstaltung. Nach der Begrüßung des Veranstalters folgte ein Grußwort des Vizepräsidenten der Leopoldina und Altrektors der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Gunnar BERG. Dem schloss sich der Einleitungsvortrag von Lutz VOLLRATH (Mainz) mit dem Thema „Morphologie und Mechanismen der Inneren Uhr“ an, in dem ein Rückblick auf die Entwicklung der Chronobiologie und ihre gegenwärtige Bedeutung skizziert wurde. Im Zentrum standen dabei die Rhythmusgenerierung im Nucleus suprachiasmaticus sowie eine aktuelle Darstellung des morphologischen Substrates, das unsere „Innere Uhr“ ausmacht. Es folgte ein Vortrag von Eckhard MÜHLBAUER und Elmar PESCHKE (Halle/Saale), in dem die Generierung circadianer Rhythmen und die Bedeutung von Uhrengenen für die Insulinsekretion im Mittelpunkt standen: „Zur Generierung und Bedeutung circadianer Rhythmen unter besonderer Berücksichtigung von Uhrengenen im endokrinen Pankreas“. Im dritten Vortrag von Stephan STEINLECHNER (Hannover) „Welche Bedeutung haben circannuale Rhythmen bei Tier und Mensch“ wurde zum gegenwärtigen Wissensstand der Generierung, vor allem aber der biologischen Bedeutung saisonaler und circannualler Rhythmen Stellung bezogen. Es wurde deutlich, dass wir über die Sinnhaftigkeit circannualler Rhythmen recht klare Vorstellungen haben, die Kenntnisse über den Ort der Generierung solcher niederfrequenten infradianen Rhythmen jedoch vergleichsweise gering sind, wenn wir den Vergleich mit unserem heutigen Kenntnisstand über die Generierung circadianer Rhythmen im Nucleus suprachiasmaticus zugrunde

legen. Im folgenden Vortrag von Elmar PESCHKE und Eckhard MÜHLBAUER (Halle/Saale) „Einfluss von Melatonin auf Sekretionsrhythmik und Signaltransduktionsprozesse der pankreatischen  $\beta$ -Zelle. Melatonin-Insulin-Interaktionen“ wurde auf ein Thema eingegangen, das auf Grund der ständig zunehmenden Diabeteserkrankungen von aktueller klinischer Bedeutung ist. Es konnte zusammenfassend festgestellt werden, dass die Insulinsekretion sowohl *in vivo* als auch *in vitro* einem circadianen Rhythmus folgt und dass sich Melatonin und Insulin gegenseitig antagonisieren. Durch den Vortrag von Rüdiger HARDELAND (Göttingen) „Über welche Mechanismen wirkt Melatonin protektiv gegenüber oxidativem Stress“ wurde ein Thema aufgegriffen, das nach wie vor von höchster Aktualität ist, zurückliegend jedoch oft durch Missverständnisse oder ungezügelter wissenschaftliche Leidenschaft überinterpretiert wurde. Gemeint sind solche Feststellungen wie: „Melatonin – das *Anti-aging*-Hormon“ und andere Waghalsigkeiten. HARDELAND, der auf den Gebieten Radikalchemie und oxidativer Stress international ausgewiesen ist, versteht es in hervorragend maßvoller Weise, die protektive Bedeutung von Melatonin gegenüber oxidativem Stress zu charakterisieren und Wunschdenken von gesicherten und belastbaren wissenschaftlichen Kenntnissen abzugrenzen. Mit diesem Vortrag wurde der überwiegend theoretische Grundlagen behandelnde Teil der Veranstaltung beendet.

Es schlossen sich drei weitere, klinisch fokussierte Vorträge an, die sich mit der Bedeutung von Melatonin und Licht im Zusammenhang mit Schlaf beschäftigten. Den ersten Vortrag dazu hielt Peter YOUNG (Münster) „Schlafen und Wachen: Erkenntnisse aus der Genetik der Rhythmusgene“. In diesem Beitrag wurde auf verschiedene Gene sowie Störungen circadianer Rhythmitäten im Zusammenhang mit vorverlagerten sowie verzögerten Schlafphasen, Schlafstörungen, Narkolepsie, Schlafwandeln und das Congenitale-Centrale-Hypoventilations-Syndrom eingegangen, ein wichtiger Beitrag, der die Bedeutung intakter Synchronisation circadianer Rhythmitäten für die Klinik und den medizinischen Alltag in den Vordergrund stellte. In dem Folgevortrag von Dieter KUNZ (Berlin) „Beeinflussung des circadianen Systems durch Melatonin und Licht“ wurde auf klinisch höchst aktuelle und praktisch orientierte Fragen der Bedeutung von Licht und Melatonin für den Menschen eingegangen. Dabei spielen Tageszeitpunkt und Lichtspektrale eine ganz entscheidende Rolle. Beispielsweise konnte nachgewiesen werden, dass kurzwelliges (blauhaltiges) Licht, am Tag appliziert, die Leistungsfähigkeit verbessert. Im Gegensatz dazu kann vergleichbar kurzwelliges Licht, appliziert am Abend oder in der Nacht, einen negativen Einfluss auf den Schlaf entfalten, die Melatonin-ausschüttung unterdrücken, das Tumorrisiko erhöhen und die Entwicklung eines Metabolischen Syndroms, ebenso wie Desynchronisationen infolge Schichtarbeit, erhöhen. Abendlicht sollte „unblau“ sein (Manuskript wurde nicht eingereicht). Der letzte Vortrag von Tilmann MÜLLER (Münster) „Diagnostik und Therapie chronobiologischer Störungen im schlafmedizinischen Alltag“ unterstrich noch einmal die große Bedeutung biologischer Rhythmen für therapeutische Interventionen bei Schlafstörungen. In diesem Vortrag wurde beklagt, dass die Berücksichtigung biologischer Rhythmen (beispielsweise Morgentyp „Lerchen“ oder Abendtyp „Eulen“) bislang in der Diagnostik und Therapie der primären Insomnie, einer der häufigsten Schlafstörungen, oft in sträflicher Weise vernachlässigt blieb.

Den Hauptvorträgen schloss sich eine lebendige engagierte Diskussion an, die an thematisch ergänzenden Postern fortgesetzt wurde.

Im Einzelnen wurden die Vorträge der haleschen Arbeitsgruppe durch Poster ergänzt, die sich mit dem wechselseitigen Einfluss von Melatonin und Insulin beschäftigten und der Bedeutung von Melatoninrezeptoren in der pankreatischen  $\beta$ -Zelle nachgingen. Dazu gehörten

die Poster von Elke ALBRECHT et al. „Einfluss des humanen MT2-Rezeptors auf die Insulinsekretion der pankreatischen  $\beta$ -Zelle“ sowie das Poster von Ina BÄHR et al. „Charakterisierung von Melatonin-Rezeptoren (MT1 und MT2) im Pankreas von Ratte und Mensch“. Signalkaskaden sowie Uhrengene der pankreatischen  $\beta$ -Zelle wurden in Postern von Eckard MÜHLBAUER et al. „Melatoninwirkungen auf die Insulinsekretion werden über cAMP-, cGMP- und IP3-Kaskaden vermittelt“ sowie „Untersuchungen zur Expression von Uhrengenen im Pankreas der Ratte“ vorgestellt und diskutiert. Mit Fragen des Calciumstoffwechsels und Calcium-bindenden Proteinen in der Insel befassten sich die Poster von Ivonne BAZWINSKY-WUTSCHKE et al. „Spezifische Calciumsignalkomponenten der pankreatischen Insel unter dem Einfluss von Melatonin“ sowie von Sabine WOLGAST und Elmar PESCHKE: „Calcium-Imaging mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie in INS1-Insulinomazellen“. Über die Generierung von Insulinrhythmen in der pankreatischen Insel gab das Poster von Elmar PESCHKE und Dorothee PESCHKE Auskunft: „Die Insulinsekretion isolierter pankreatischer Ratten-Inseln erfolgt circadian-rhythmisch.“ Die sehr klinisch fokussierten Poster von Kathleen HOFMANN et al. „Melatonin-Insulin-Interaktionen bei Typ-1-diabetischen Ratten“ sowie Elmar PESCHKE et al. „Melatonin-Insulin-Interaktionen bei Typ-2-diabetischen Ratten und Patienten“ informierten über den gegenwärtigen Wissensstand zum Einfluss von Melatonin für die Insulinsekretion und mögliche Bedeutung für die Diabetogenese. Mit dem Poster von Ina BÄHR et al. „Einfluss von Melatonin auf die Glukagon-produzierende  $\alpha$ -Zelle des endokrinen Pankreas“ wurde festgestellt, dass Melatonin nicht nur hemmenden Einfluss auf die Insulinsekretion, sondern auch steigenden Einfluss auf die Glukagon-Sekretion der pankreatischen Maus-Insel nimmt.

Der Vortrag von Stephan STEINLECHNER über infradiane Rhythmen, insbesondere circannuale Rhythmen, wurde durch Poster seiner Arbeitsgruppe in Hannover begleitet, die sich zum einen mit Photoperiodismus beschäftigten: Ines PETRI et al. „Photoperiodische Reaktionen werden beim Dsugarischen Zwerghamster (*Phodopus sungorus*) durch freiwilliges Laufen modifiziert“ und andererseits Wege der Synchronisation zwischen Neuronen, Astrozyten und Tanyzyten im Hypothalamus analysierten: Mathei BOLBOREA et al. „Morphologie der Tanyzyten und die Expression zellulärer Adhäsionsmoleküle wird durch die Photoperiode reguliert“ sowie von Esther LIPOKATIC-TAKACS et al. „Mögliche Wege der Kommunikation und Synchronisation zwischen Neuronen und Astrozyten im Suprachiasmatischen Nucleus von *Phodopus sungorus*“.

Schließlich wurde der Vortrag von Peter YOUNG, der sich mit Rhythmusgenen und ihrer Bedeutung für die Schlafforschung beschäftigte, von einem Poster seiner Arbeitsgruppe begleitet: Julian P. LIPPERT et al. „Expression circadianer Rhythmikgene in dermalen Fibroblasten von Patienten mit idiopathischer Hypersomnie und gesunden Kontrollprobanden“.

Insgesamt war die Tagung ein großer Erfolg, zu dem die Veranstalter, Referenten und mehr als 150 Teilnehmer aus dem In- und Ausland beigetragen haben. Mit dieser Tagung wurden jahrzehntelange Traditionen halescher Chronobiologie fortgesetzt, die durch das Leopoldina-Symposium „Die Zeit und das Leben“, organisiert von Heinz VON MAYERSBACH (Hannover), Joachim-Hermann SCHARF (Halle) und Bernhard HASSENSTEIN (Freiburg/Br.), im Jahre 1975 einen denkwürdigen Anfang genommen hat. Dem *Director Ephemeridum* der Akademie, Joachim-Hermann SCHARF, ist der vorliegende Band zu seinem 90. Geburtstag am 7. November 2011 in Verehrung gewidmet.

## Literatur

- ARENDDT, J.: Melatonin, circadian rhythms, and sleep. *New Engl. J. Med.* *343*, 1114–1116 (2000)
- ARENDDT, J., and SKENE, D. J.: Melatonin as a chronobiotic. *Sleep Med. Rev.* *9*, 25–39 (2005)
- DODT, E.: Vergleichende Physiologie der lichtempfindlichen Wirbeltier-Epiphyse. *Nova Acta Leopoldina NF 31*, 219–235 (1966)
- LERNER, A. B., CASE, J. D., and HEINZELMAN, R. V.: Structure of melatonin. *J. Amer. Chem. Soc.* *81*, 6084–6092 (1959)
- LERNER, A. B., CASE, J. D., TAKAHASHI, Y., LEE, T. H., and MORI, W.: Isolation of melatonin, the pineal gland factor that lightens melanocytes. *J. Amer. Chem. Soc.* *80*, 2587 (1958)
- MOORE, R. Y., and LENN, N. J.: A retinohypothalamic projection in the rat. *J. Comp. Neurol.* *146*, 1–14 (1972)
- PESCHKE, E.: Über den phylogenetischen Funktionswandel des Pinealorgans und seine Bedeutung für die Insulinsekretion bei Mammalia. *Sitzungsberichte Sächs. Akad. Wiss. Leipzig, Math-nat. Klasse*, *129/3*, 34 S., 22 Abb. Stuttgart, Leipzig: S. Hirzel 2004
- REITER, R. J.: The melatonin rhythm: both a clock and a calendar. *Experientia* *49*, 654–664 (1993)
- REITER, R. J., TAN, D. X., and MALDONADO, M. D.: Melatonin as an antioxidant: physiology versus pharmacology. *J. Pineal Res.* *39*, 215–216 (2005)
- REITER, R. J., TAN, D. X., MANCHESTER, L. C., and EL-SAWI, M. R.: Melatonin reduces oxidant damage and promotes mitochondrial respiration: implications for aging. *Ann. New York Acad. Sci.* *959*, 238–250 (2002)
- REITER, R. J., TAN, D. X., MANCHESTER, L. C., and TAMURA, H.: Melatonin defeats neurally-derived free radicals and reduces the associated neuromorphological and neurobehavioral damage. *J. Physiol. Pharmacol.* *58* (Suppl 6), 5–22 (2007)
- REITER, R. J., TAN, D. X., JOU, M. J., KORKMAZ, A., MANCHESTER, L. C., and PAREDES, S. D.: Biogenic amines in the reduction of oxidative stress: melatonin and its metabolites. *Neuro-Endocrinol. Lett.* *29*, 391–398 (2008)
- REPPERT, S. M.: Melatonin receptors: molecular biology of a new family of G protein-coupled receptors. *J. Biol. Rhythms* *12*, 528–531 (1997)
- REPPERT, S. M., WEAVER, D. R., CASSONE, V. M., GODSON, C., and KOLAKOWSKI, L. F. Jr.: Melatonin receptors are for the birds: molecular analysis of two receptor subtypes differentially expressed in chick brain. *Neuron* *15*, 1003–1015 (1995a)
- REPPERT, S. M., GODSON, C., MAHLE, C. D., WEAVER, D. R., SLAUGENHAUPT, S. A., and GUSELLA, J. F.: Molecular characterization of a second melatonin receptor expressed in human retina and brain: the Mel1b melatonin receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *92*, 8734–8738 (1995b)
- REUSS, S.: Components and connections of the circadian timing system in mammals. *Cell Tissue Res.* *285*, 353–378 (1996)
- ROTSCHUH, K. E.: René Descartes: Über den Menschen (1632) sowie Beschreibung des menschlichen Körpers (1648). Nach der ersten französischen Ausgabe von 1664 übersetzt und mit einer historischen Einleitung und Anmerkungen versehen von Karl E. Rotschuh. Heidelberg: Lambert Schneider 1969
- STEHLE, J. H., und KORF, H. W.: Neuroendokrine Signaltransduktion: Das Pinealorgan als Modell für cAMP-modulierte Genexpression. *Neuroforum* *4*, 13–22 (1996)
- UECK, M.: Morphologie und Physiologie des Pinealorgans in der Evolution der Wirbeltiere. *Verh. Dtsch. Zool. Ges.* 51–80. Stuttgart: Gustav Fischer 1982

Prof. Dr. Elmar PESCHKE  
 Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg  
 Institut für Anatomie und Zellbiologie  
 Große Steinstraße 52  
 06097 Halle (Saale)  
 Bundesrepublik Deutschland  
 Tel.: +49 345 5571709  
 Fax: +49 345 5574053  
 E-Mail: elmar.peschke@medizin.uni-halle.de



## Morphologie und Funktionsmechanismen der „Inneren Uhr“

Lutz VOLLRATH (Mainz)

Mit 4 Abbildungen und 2 Tabellen

### *Zusammenfassung*

Um sich auf die unterschiedlichen physiologischen Erfordernisse eines 24-h-Tages vorbereiten und einstellen zu können, benötigen Organismen einen eingebauten Uhrenmechanismus, die sogenannte Innere Uhr. Bei Vertebraten ist die zentrale Innere Uhr eine bilaterale Ansammlung von Nervenzellen im Hypothalamus des Gehirns, Nucleus suprachiasmaticus (NSC) genannt. Viele der NSC-Nervenzellen generieren circadiane Rhythmen mit Perioden von circa 24 h Dauer, aber mit zeitlich unterschiedlichen Phasen. Diese sogenannten Uhrenzellen produzieren die Rhythmik mit Hilfe der bekannten Proteinsynthesemechanismen und den nachfolgenden posttranslationalen Modifikationen. Vom morgendlichen Lichtbeginn an sind Uhrengene so lange aktiv, bis sich ausreichende Mengen von Uhrenproteinen angesammelt haben. Diese hemmen dann die Expression der Uhrengene bis zum Anfang eines neuen circadianen Zyklus. Von der Netzhaut zum NSC gelangende Lichtinformation wandelt den circadianen in einen genau 24-h-Rhythmus um. Die NSC-Nervenzellen geben ihre Zeitinformation auf zwei Wegen weiter: erstens über parakrine Sekretion zu unterschiedlichen Zeiten freigesetzter Überträgerstoffe an benachbarte Nervenzellen im Gehirn und zweitens auf strikt neuronalen, teilweise multisynaptischen Bahnen. Da im NSC „präautonome“ sympathische und parasympathische Nervenzellen vorkommen, kann die zentrale Innere Uhr über das autonome Nervensystem weitreichende und zeitlich genau determinierte Einflüsse auf periphere Organe und deren lokale Innere Uhr ausüben.

### *Abstract*

To prepare for, and to adapt to, physiological requirements imposed by the environmental changes of the 24-h solar days the organism needs an inbuilt 24-h timing mechanism, the so-called biological clock. In vertebrates, the central biological clock is a bilateral accumulation of hypothalamic neurons termed suprachiasmatic nucleus (SCN). Many of the SCN neurons generate self-sustained circadian rhythms with periods of circa 24 h, yet with temporally different activity peaks. These so-called clock neurons generate their circadian rhythms by making use of the well established mechanisms of protein synthesis and posttranslational modification. From the onset of morning light onwards, clock genes are active until sufficient amounts of clock proteins have accumulated. The clock proteins stop clock gene expression until after about 24 h clock gene expression is resumed and a new circadian cycle starts. The SCN receives photic input from the retina to transform the circadian rhythm into one of precisely 24 h duration. The SCN neurons transmit their temporal signals by two ways: (i) diffusion of timely released active principles to neighbouring neurons in the brain and (ii) by strictly neuronal, partly multisynaptic pathways. As preautonomic sympathetic and parasympathetic neurons are present in the SCN, this central master biological clock can exert wide-ranging and temporally distinct influences on peripheral organs including their local biological clock, via the autonomic nervous system.

## 1. Einleitung

Rhythmische Verläufe vieler Lebensvorgänge sind ein hervorstechendes biologisches Merkmal. Der sich mit diesen rhythmischen Phänomenen befassende Wissenschaftszweig ist die Chronobiologie. Neben physiologischen Vorgängen können sich aber auch das „Gemäuer“

oder die verschiedenen Strukturen des Körpers rhythmisch verändern, sodass es nicht belanglos ist, zu welchem Zeitpunkt Untersuchungen durchgeführt werden. Klassifiziert werden die Rhythmen an Hand ihrer mit tau ( $\tau$ ) bezeichneten Periodenlänge, die den Zeitabschnitt zwischen dem Beginn und dem Ende einer rhythmischen Schwingung umfasst. Chronobiologisch und medizinisch wichtige Rhythmen sind in Tabelle 1 aufgeführt. Ihnen allen ist gemeinsam, dass sie vom Körper selbst erzeugt werden und damit endogener Natur sind. Die Rhythmen sind jedoch nicht vollständig autonom, sondern werden von äußeren Faktoren beeinflusst. Der phänomenologisch am besten untersuchte chronobiologische Rhythmus ist der circadiane Rhythmus. Circadian (abgeleitet von *circa diem*) heißt er, weil seine Periode eine Länge von nur annähernd 24 h hat (Tab. 1). Will man die Periodik genau bestimmen, so müssen Versuchspersonen oder -tiere für die Messungen möglichst vollständig von Umweltreizen abgeschirmt sein.

Tab. 1 Chronobiologisch wichtige Rhythmen,  $\tau$  = Periode (nach TOUITOU und HAUS 1992)

Chronobiologischer Rhythmus	Periode
Ultradianer Rhythmus	$\tau < 20$ h
Circadianer Rhythmus	$\tau = 20 - 28$ h
Infradianer Rhythmus	$\tau > 28$ h
Circatrigintaner Rhythmus	$\tau = 30 \pm 5$ Tage
Circannualer Rhythmus	$\tau = 1$ Jahr $\pm 3$ Monate

Bahnbrechende Untersuchungen zur circadianen Rhythmik des Menschen sind u. a. von Jürgen ASCHOFF und Mitarbeitern vom Max-Planck-Institut für Verhaltensphysiologie, Seewiesen und Erling-Andechs, Anfang der 1960er Jahre des letzten Jahrhunderts in sogenannten Bunker-Versuchen durchgeführt worden (ASCHOFF und WEVER 1962). In einem ersten Versuch hielten sich dazu Versuchspersonen 8 bis 19 Tage einzeln und ohne Uhr in einem bunkerartigen Tiefkeller der Chirurgischen Universitätsklinik München in einer eingebauten Wohnzelle auf. Sie mussten sich selbst ihr Essen bereiten und waren angewiesen, „regelmäßig“ zu leben und beim Zubettgehen das Licht aus- und beim Aufstehen einzuschalten. Dabei zeigte sich u. a., dass die Probanden jeden Tag etwas später aufstanden bzw. zu Bett gingen als am Tag zuvor. Dies war darauf zurückzuführen, dass die Periodendauer des Schlaf-Wach-Rhythmus nicht genau 24 h betrug, sondern, ohne Zeitgeber, im Mittel zwischen 24,2 und 25,9 h lag. Damit war bewiesen, dass der Rhythmik eine individuell leicht unterschiedliche Spontanperiodik von circa 25 h zugrunde liegt.

Da derartige Untersuchungen sehr aufwändig sind, wird häufig nicht der „reine“ circadiane, sondern der auf 24 h angepasste Rhythmus untersucht, kurz als 24-h-Rhythmus bezeichnet. Diese Anpassung an genau 24 h ist notwendig, damit Körper- und Umweltrhythmik im Gleichklang schwingen. Eine wichtige Aufgabe der circadianen Rhythmik ist es dabei, den Körper auf tageszeitabhängige Erfordernisse vorzubereiten und die erforderlichen Umstellungen, z. B. von Hormonhaushalt und Stoffwechsel, zeitgerecht vorzunehmen.

Alles, was an lebenden Organismen mess- oder zählbar ist, kann im Hinblick auf eine 24-h-Rhythmik untersucht werden. Eine einfache, aber sehr wichtige physiologische Untersuchungsmethode an Labortieren ist die Messung der Bewegungsaktivität in Laufrädern unter verschiedenen experimentellen Bedingungen. Die Aktivitätsmessungen reflektieren nämlich genau die von der „Inneren Uhr“ vorgegebenen Aktivitätsrhythmen. Als wichtiges Nebenpro-

dukt solcher Untersuchungen ergab sich, dass es Tiere mit 20- oder 22-stündigen Laufrhythmen gibt, die gezielt weiter gezüchtet und so zu wichtigen chronobiologischen Versuchsubjekten wurden. Für circadiane Untersuchungen eignen sich weiterhin die Körpertemperatur, der bereits erwähnte Schlaf-Wach-Rhythmus, die Nahrungsaufnahme, die Urinbildung, die Zellteilung, viele Hormone, die elektrischen Aktivitätsänderungen von Nervenzellen, etc. Quasi „in Stein gemeißelte“ 24-h-Rhythmen finden sich in Zahnbein (OHTSUKA-ISOYA et al. 2001) und -schmelz (SMITH 2006).

Während lange Zeit die Phänomenologie der circadianen Rhythmen im Vordergrund stand, sind gegenwärtig die Erzeugung dieser Rhythmen und deren Weitergabe innerhalb des Organismus Mittelpunkt chronobiologischer Forschung. Bei Säugern wird diese komplizierte Thematik zumeist an Ratten, Mäusen und syrischen Goldhamstern bearbeitet. Große Fortschritte wurden und werden dadurch erzielt, dass viele einschlägige Untersuchungen nicht am Ganztier, sondern an isolierten und in Kultur gehaltenen Organteilen und deren Zellen durchgeführt werden (*In-vitro*-Studien). Nicht hoch genug einzuschätzen ist auch, dass es mit Hilfe gentechnischer Verfahren möglich ist, Genexpressionsvorgänge zum Leuchten zu bringen (Biolumineszenzstudien) und fortlaufend über viele Tage zu registrieren und auszuwerten.

Zum besseren Verständnis der folgenden Beiträge des Chronobiologie-Symposiums wird zunächst eine Einführung in die zentrale Schaltstelle der circadianen Rhythmik gegeben, die so genannte „Innere Uhr“. Dieser Begriff ist aber nicht präzise genug für das, was hier behandelt werden soll. Neuere Erkenntnisse zeigen nämlich, dass es im Körper viele in Gang befindliche „Innere Uhren“ gibt (DIBNER et al. 2010). Auf sie wird nicht eingegangen. Im Mittelpunkt steht hier nur die Hauptuhr, die für die Erzeugung der Haupt-24-h-Rhythmik im Körper verantwortlich ist. Sie wird in diesem Beitrag entweder als circadianer Hauptoszillator bezeichnet oder mit dem Namen der Hirnstruktur benannt, die den Hauptoszillator verkörpert, nämlich Nucleus suprachiasmaticus (NSC). Folgende Aspekte werden näher beleuchtet:

- Wie der circadiane Hauptoszillator identifiziert wurde und wie er aufgebaut ist;
- welche Rhythmik er aufweist;
- welche Mechanismen Grundlage der Circadianik sind;
- wie der Hauptoszillator als Ganzes funktioniert und welche Interaktionen zwischen dessen Unterbereichen bestehen;
- wie der circadiane Rhythmus zu einem 24-stündigen Rhythmus wird;
- wodurch Licht-unabhängige Phasenverschiebungen und Synchronisation des NSC zustande kommen; und schließlich
- wie der circadiane Hauptoszillator seine Rhythmik den übrigen Teilen des Körpers vermittelt.

Neuere Übersichtsartikel finden sich u. a. bei REUSS (2003), STEHLE et al. (2003), SHIBATA (2004), KORF und STEHLE (2005), SAPER et al. (2005), BUIJS et al. (2006), DE LA IGLESIA und SCHWARTZ (2006), KALSBECK et al. (2006), KO und TAKAHASHI (2006), MORIN und ALLEN (2006), CHALLET (2007), HASTINGS et al. (2007), MAYWOOD et al. (2007), MORIN (2007), YAN et al. (2007), HASTINGS et al. (2008), ANTLE et al. (2009), LEMMER (2009), WEBER (2009), ALBRECHT (2010), DIBNER et al. (2010), KALSBECK et al. (2010), WELSH et al. (2010).



## 2. Identifizierung und Aufbau des circadianen Hauptoszillators

Anfang der 1970er Jahre war der circadiane Hauptoszillator noch unbekannt. Man vermutete zwar, dass es im vorderen Anteil des zum Zwischenhirn gehörenden Hypothalamus eine für die 24-h-Rhythmik wichtige Zone geben müsse, da verschiedene neuroendokrine Parameter nach Abtrennung des vorderen vom mediobasalen Hypothalamus nicht mehr rhythmisch schwankten. Der Durchbruch kam 1972, als in zwei Studien an Ratten gezielt die im Hypothalamus über der Sehnervenkreuzung (Chiasma opticum) gelegenen bilateralen NSC (vgl. Abb. 1) zerstört wurden und danach bei den Versuchstieren die Rhythmik des Trinkverhaltens, der lokomotorischen Aktivität (STEPHAN und ZUCKER 1972) und des Corticosterongehalts der Nebenniere verschwanden (MOORE und EICHLER 1972). Kurze Zeit später wurde nachgewiesen, dass auch der Schlaf-Wach-Rhythmus vom NSC gesteuert wird (IBUKA et al. 1977). Andererseits konnte durch Implantation von NSC-Gewebe die Circadianik des Empfängers wieder vollständig oder teilweise in Gang gesetzt werden (DRUCKER-COLIN et al. 1984, SAWAKI et al. 1984, AGUILAR-ROBLERO et al. 1986, LEHMAN et al. 1987, RALPH et al. 1990, LESAUTER et al. 1996, MEYER-BERNSTEIN et al. 1999, SUJINO et al. 2003). Lange herrschte die Ansicht vor, dass, wenn nach Läsionen 25 % des NSC-Gewebes erhalten bleiben, die circadiane Organisation des Organismus bestehen bliebe. Dies ist nach neueren Untersuchungen nicht der Fall. Heute weiß man, dass nicht alle Regionen des NSC funktionell gleichwertig sind (LESAUTER und SILVER 1999) und dass dies bei Versuchsplanungen zu berücksichtigen ist.

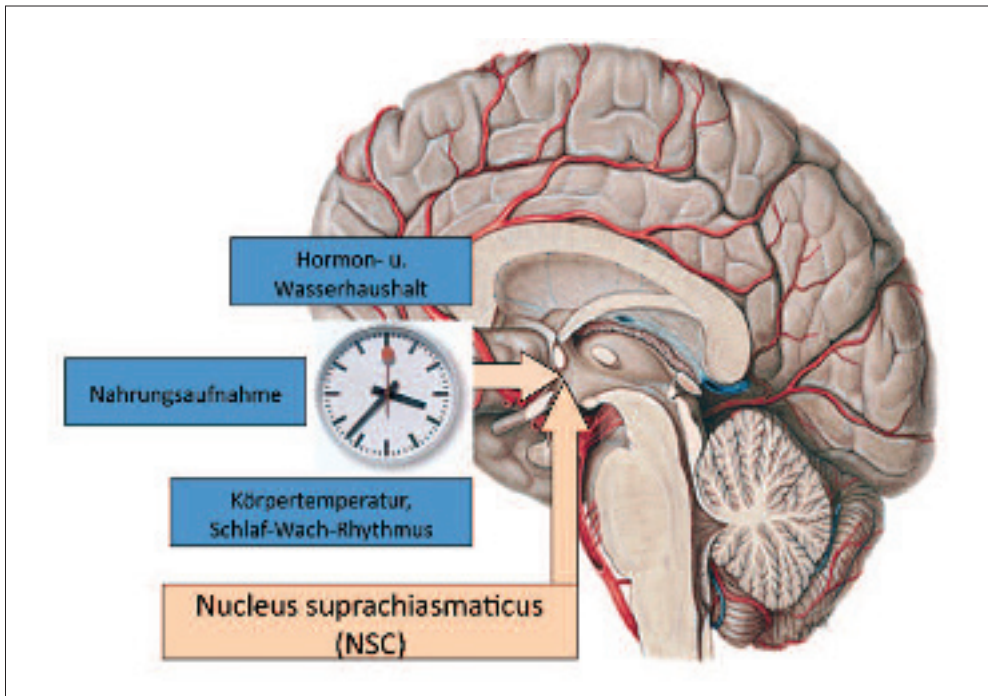


Abb. 1 Schematische Darstellung der Lage der zentralen „Inneren Uhr“ (Nucleus suprachiasmaticus, NSC) in der rechten Gehirnhälfte eines Menschen (siehe Treffpunkt der Pfeilspitzen). In unmittelbarer Nachbarschaft des NSC liegen die Regulationszentren der angegebenen Funktionen. Unter Verwendung einer Abbildung aus *Sobotta Atlas* 1993.

Die NSC bestehen ausschließlich aus kleinzelligen Neuronen, die im Gegensatz zu den in der Nachbarschaft liegenden klassischen neurosekretorischen magnozellularen Neuronen des Nucleus supraopticus (NSO) und des Nucleus paraventricularis hypothalami (NPVh) nur relativ kurze Axone haben und auch nur wenig Sekret produzieren. Die Anzahl der NSC-Neurone pro Kern beträgt beim Menschen etwa 45000 (HOFMAN und SWAAB 1989) und bei Mäusen (ABRAHAMSON und MOORE 2001) und Ratten ca. 11000 (GULDNER 1983, MOORE et al. 2002). Da das menschliche Gehirn etwa 1000-mal größer als das von Mäusen und Ratten ist, liegt die Anzahl der NSC-Neurone in etwa in der gleichen Größenordnung, was vermuten lässt, dass „during evolution the computational performance of the SCN has reached an optimal level at a small size“ (YAN et al. 2007).

Die NSC-Neurone sind chemisch recht heterogen. Zwar verwenden knapp 80 % von ihnen  $\gamma$ -Aminobuttersäure (GABA) als Neurotransmitter (VAN DEN POL 1986, MOORE und SPEH 1993, MOORE et al. 2002), aber sie exprimieren eine Vielzahl von Neuropeptiden und deren Rezeptoren und können mehr als ein Neuropeptid enthalten (Kokalisation). Im menschlichen NSC sind u. a. Arginin-Vasopressin (AVP), Vasointestinales Polypeptid (VIP), Neurotensin (NT), Calbindin (CalB), Neuropeptid Y (NPY), Somatostatin (SS) und Substanz P (SP) nachgewiesen worden (MAI et al. 1991). Der Ratten-NSC enthält 37 % AVP-, 24 % VIP-, jeweils 14 % Calretinin (CalR)- und *Gastrin Releasing Peptide* (GRP)- sowie jeweils zwischen 2 und 4 % NT-, Enkephalin (ENK)-, SS- und SP-Neurone (MOORE et al. 2002). Etwa 32 % der AVP- und 66 % der VIP-Neurone enthalten GABA (CASTEL und MORRIS 2000). Im Prinzip dieselben Zelltypen kommen bei Mäusen vor (SILVER et al. 1999). Die NSC-Neurone von Nerzen fallen insofern aus dem Rahmen, als sie kein AVP, ENK und SS enthalten (MARTINET et al. 1995). Beim tagaktiven Nager *Arvicanthus niloticus* fehlen neben MetENK- auch SP-haltige Neurone im NSC (SMALE und BOVERHOF 1999).

Die den gasförmigen Botenstoff Stickstoffmonoxid (NO) synthetisierenden Zellen kommen im NSC (DECKER und REUSS 1994, REUSS et al. 1995, CASTEL et al. 1997) oder um den NSC herum vor (CAILLOL et al. 2000). Unterscheiden lassen sich die neuronale (nNOS), endotheliale (eNOS) und induzierbare (iNOS) NO-Synthase (NOS) (KRIEGSFELD et al. 1999, 2001, STARKEY et al. 2001), wobei die eNOS auch in Astrozyten nachweisbar ist (CAILLOL et al. 2000). Ausläufer der NO-Neurone bilden einen dichten Plexus innerhalb des NSC (CHEN et al. 1997). (Zur Funktion des NO siehe unten.)

## 2.1 Kokalisationen

VIP ist häufig mit Peptid Histidin-Isoleuzin (PHI) kolokalisiert (ROMIJN et al. 1996), die beide einen gemeinsamen Vorläufer haben. AVP kolokalisiert mit seinem Trägerprotein Neurophysin II (SOFRONIEW und WEINDL 1978). CalB-haltige Neurone, von denen viele zusätzlich SP enthalten, sind bei Goldhamstern besonders gut ausgeprägt und bilden innerhalb des NSC einen Subnukleus, der speziell die Circadianik der lokomotorischen Aktivität reguliert (siehe unten; LESAUTER und SILVER 1999, JOBST und ALLEN 2002).

Alle Typen von neuropeptidhaltigen Neuronen treten über dichte reziproke Faserverbindungen miteinander in heterologen synaptischen Kontakt, aber Kontakte bestehen auch zwischen homologen Neuronen (ROMIJN et al. 1997).

Elektronenmikroskopisch weisen NSC-Neurone keine funktionell wichtigen ultrastrukturellen Besonderheiten auf (UEDA und IBATA 1989). AVP-Neurone z. B. enthalten elektronendichte AVP-Neurophysin-Granula von weniger als 100 nm Durchmesser, die deutlich kleiner als die

in den magnozellulären Neuronen von NSO und NPVh sind und häufiger in Zellfortsätzen als in Perikarya liegen (VAN LEEUWEN et al. 1978). Exozytose von Neuropeptidgranula findet, örtlich unabhängig von Synapsen, an Perikarya, Dendriten und Axonen statt (CASTEL et al. 1996).

*Gap junctions* koppeln NSC-Neurone untereinander (COLWELL 2000, RASH et al. 2007). In Kulturen dissoziierter NSC-Zellen kommen sie nur zwischen Astrozyten vor (WELSH und REPPERT 1996). Detaillierte Informationen über NSC-Synapsen finden sich u. a. bei GULDNER (1976, 1978) und VAN DEN POL und GORCS (1986). Jedes NSC-Neuron weist im Mittel 1264 synaptische Kontakte auf (GULDNER 1984). Neuronperikarya des NSC sind stärker von Astrozyten bedeckt als die im anterioren Hypothalamus (ELLIOTT und NUNEZ 1994). Im Hinblick auf Efferenzen des NSC ist wichtig, dass dessen GABA- (BUIJS et al. 1994), VIP- (CARD et al. 1981), GRP- und AVP-Axone (MUNCH et al. 2002) nicht auf den Kern beschränkt bleiben, sondern extranukleäre Projektionen aufweisen. Bei Ratten projizieren u. a. alle Arten von Neuropeptid-haltigen Neuronen des NSC zum kontralateralen NSC (VAN DEN POL und TSUJIMOTO 1985).

## 2.2 Regionale Unterschiede im NSC

Der aus chemisch sehr heterogenen Neuronen bestehende NSC ist auch insgesamt kompliziert aufgebaut, dem die häufig verwendeten Unterteilungen in ventrolaterale und dorsomediale Bereiche oder in *core* (Kern) und *shell* (Schale) aufgrund von Spezies- und zeitlichen Unterschieden nicht immer gerecht werden und deshalb problematisch sind (MORIN 2007). Aus terminologischen Gründen wird das im Englischen viel gebrauchte Wort *core* hier nicht in Übersetzung verwendet, da der Begriff Kern bereits für Zell- und Gehirnerne vergeben ist. Als vereinfachende Nomenklatur wird von ventrolateralen (vNSC) und dorsomedialen Bereichen (dmNSC) des NSC gesprochen, auf die bei Ratten 43 bzw. 57 % der NSC-Neurone entfallen (MOORE et al. 2002). Bei Goldhamstern ist im caudozentralen Bereich des NSC der bereits erwähnte Subnukleus mit SP- (MORIN 1992) bzw. CalB-haltigen Neuronen (SILVER et al. 1996b) zu unterscheiden. Bezüglich der Untergliederung des menschlichen NSC siehe VAN DEN POL (1980) und MAI et al. (1991).

Eine wichtige Grundlage für die Unterscheidung verschiedener NSC-Regionen ist die unterschiedliche Lokalisation der Neuropeptide exprimierenden NSC-Neurone. Während im vNSC annäherungsweise vor allem VIP-, GRP- und SP-haltige Neurone liegen, sind im dmNSC AVP-Neurone besonders zahlreich (REUSS 1996). GABAerge Perikarya sind relativ gleichmäßig im NSC verteilt (OKAMURA et al. 1989).

Aber auch die Lokalisation von Afferenzen hat zur Unterscheidung von NSC-Regionen beigetragen. Im vNSC enden z. B. bevorzugt Fasern des Tractus retinohypothalamicus (Trh), des NPY-haltigen Tractus geniculohypothalamicus, der im Folium intergeniculatum (= intergeniculate leaflet, IGL) des Thalamus entspringt, sowie serotonerge Fasern von Raphekernen des Mittelhirns (siehe unten).

## 3. Der NSC und seine Rhythmik

Wie zu erwarten, weist der als circadianer Hauptoszillator apostrophierte NSC selbst eine circadiane Rhythmik auf. Morphofunktionelle Untersuchungen zeigen z. B., dass die Aufnahme der für die Neuronenfunktion wichtigen Glukose im NSC tagsüber deutlich stärker als nachts

ist (SCHWARTZ und GAINER 1977), was damit zusammen hängt, dass der Kern vor allem tagsüber elektrisch aktiv ist (siehe unten). Auf komplexe funktionelle Unterschiede innerhalb des NSC weist bereits hin, dass bei Ratten die Perikarya von VIP-Neuronen tags größer als nachts sind und die Perikarya und Dendriten tags mit mehr Axonterminalen in Kontakt treten, während die AVP-Neurone ein zeitlich genau gegensätzliches Verhalten zeigen (BECQUET et al. 2008). Bei Goldhamstern wurden nachts mehr Kontakte von CalB-haltigen Fasern mit AVP-Zellen als am Tag gefunden, während die Kontakte mit VIP-, GPR- und Cholezystokinin (CCK)-Neuronen sich zahlenmäßig nicht änderten, genauso wie die peptiderge Innervation der CalB-Neurone unverändert blieb (LESAUTER et al. 2009). AVP-Somata weisen nachts mehr Synapsen als am Tage auf (GIRARDET et al. 2010). Der für Astrozyten typische GFAP (*Glial Fibrillary Acidic Protein*)-Nachweis zeigt, dass die Dendriten von VIP-Neuronen nachts von mehr und die von AVP-Neuronen von weniger Astrozytenfortsätzen als am Tage bedeckt werden (BECQUET et al. 2008). Die Gesamtanfärbbarkeit des NSC mit GFAP-Antikörpern hat zu keinen einheitlichen Ergebnissen hinsichtlich der Circadianik geführt (LAVIALLE und SERVIERE 1993, MORIYA et al. 2000, LEONE et al. 2006), vielleicht weil die vNSC und dmNSC nicht gesondert betrachtet wurden. Bei Ratten wurde jedenfalls im vNSC nachts eine starke Zunahme der GFAP-Anfärbbarkeit gefunden, nicht jedoch im dmNSC (BECQUET et al. 2008). Möglicherweise spielen jahreszeitliche Faktoren eine Rolle, da die GFAP-Anfärbbarkeit im Winter tagsüber niedrig und nachts hoch ist, während im Sommer das Gegenteil der Fall ist (GERICS et al. 2005, 2006).

Im Hinblick auf die für die interneuronale Kommunikation wichtigen Nexus oder *Gap junctions* ist festzuhalten, dass tags eine deutlich stärkere Farbstoffkopplung besteht als nachts (COLWELL 2000, SHINOHARA et al. 2000).

Von den intrinsischen Neuropeptiden und Neurotransmittern des NSC weisen AVP-Gehalt, -Synthese und -Freisetzung die am besten dokumentierten Tag/Nacht-Unterschiede auf, und zwar *in vivo* (KALSBECK et al. 1995, YAMBE et al. 2002) und *in vitro* (EARNEST und SLADEK 1986, GILLETTE und REPERT 1987, SHINOHARA et al. 1994, 1998). Spitzenwerte finden sich am Tage und Minimalwerte in der Nacht. Für eine endogene AVP-Rhythmik spricht, dass sie unter Dauerdunkelheit (DD) bestehen bleibt (YAMASE et al. 1991, TOMINAGA et al. 1992, CAGAMPANG et al. 1994). Bei Hamstern ist die AVP-Circadianik nur schwach ausgeprägt (VAN DER ZEE et al. 2002). Für eine Beteiligung des NSC an saisonalen Rhythmen könnte sprechen, dass die AVP-mRNA-Expression unter kurzen Photoperioden morgens später einsetzt als unter langen (JAC et al. 2000).

VIP-Synthese und -Freisetzung sind zwar tags höher als nachts (KRAJNAK et al. 1998), diese Rhythmik ist jedoch nicht endogen, sondern lichtabhängig, da sie unter DD nicht nachzuweisen ist (OKAMOTO et al. 1991, TAKEUCHI et al. 1992, FUKUHARA et al. 1994b, SHINOHARA und INOUE 1995, FRANCL et al. 2010a). Der Befund, dass SS-Depletion unter konstanten Bedingungen zum Auftreten von circadianen VIP-Rhythmen führt, wurde dahingehend interpretiert, dass intrinsische Faktoren das Auftreten einer circadianen Rhythmik verhindern (FUKUHARA et al. 1994b). Hierfür könnte sprechen, dass es in der Gewebekultur von Ratten-NSC zu einer circadianen Freisetzung von VIP mit einer Periodik von ca. 22 h kommt (SHINOHARA et al. 1994). Interessanterweise wird vom Ratten-NSC innerhalb von 24 h sechsmal mehr VIP als AVP freigesetzt (SHINOHARA et al. 1994), obwohl der prozentuale Anteil der VIP-Neurone deutlich geringer als der von AVP-Neuronen ist (siehe oben).

Ähnlich wie VIP weisen auch GRP (OKAMURA und IBATA 1994, DARDENTE et al. 2004) und seine Rezeptoren (KARATSOREOS et al. 2006) eine lichtinduzierte Rhythmik mit höheren

Tag- als Nachtwerten auf. Endogene circadiane Rhythmen finden sich dagegen bei SS mit höheren Tag- als Nachtwerten (SHINOHARA et al. 1991, TAKEUCHI et al. 1992, FUKUHARA et al. 1993, YANG et al. 1994, NISHIWAKI et al. 1995). NPY-Werte weisen dagegen in der Nacht ein Maximum auf (SHINOHARA und INOUE 1994). Keine Rhythmik war bei SP nachweisbar (OTORI et al. 1993). Die wenigen einschlägigen Untersuchungen zu GABA-Gehalt sowie den Isoenzymen GAD65 und GAD67 (Glutamatdecarboxylase) (GAO und MOORE 1996) ergeben kein einheitliches Rhythmusbild. GABA-Maxima sind nachts unter Licht-Dunkel-Exposition (LD) und unter DD (AGUILAR-ROBLERO et al. 1993) sowie unter konstantem schwachen Licht am Tag beschrieben worden (IKEDA et al. 1997). GAD65, aber nicht GAD67, ist aufgrund der Tageslichtexposition tags stärker als nachts ausgeprägt, aber unter DD sind beide ohne Rhythmik (HUHMAN et al. 1996b, 1999). Elektrophysiologische Untersuchungen zeigen, dass die spontane GABA-Freisetzung keiner Rhythmik zu unterliegen scheint (KRETSCHMANNOVA et al. 2005). Dagegen ist für die  $\beta_1$ -Untereinheit des GABA<sub>A</sub>-Rezeptors unter LD und DD ein nächtliches Überwiegen festgestellt worden (NAUM et al. 2001). Auf die Funktion dieser Neuropeptide und -transmitter wird unten eingegangen.

Für die Aufklärung des Uhrenmechanismus des NSC waren zunächst elektrophysiologische Ableitungen zu verschiedenen Tages- und Nachtzeiten richtungweisend (INOUE und KAWAMURA 1979). Sie ergaben, dass NSC-Neurone tags stärker als nachts feuern und deren Rhythmik erhalten bleibt, wenn der NSC durch Umschneidung von anderen Hirnarealen isoliert worden war oder die Tiere geblendet oder unter DD gehalten wurden. Die Autonomie des circadianen Feuerns wurde bald danach an dünnen Scheiben von NSC-Gewebe (GROOS und HENDRIKS 1982) und an isolierten, in Kultur gehaltenen NSC-Neuronen bestätigt (WELSH et al. 1995). Hieraus entwickelte sich die lange vorherrschende Ansicht, dass alle oder die meisten NSC-Neurone intrinsische circadiane Oszillatoren seien und dass deren funktionelle Kopplung die makroskopische Circadianik des Organismus erzeuge (vgl. MORIN 2007). Die Annahme einer funktionell homogenen NSC-Neuronenpopulation wurde dadurch gestützt, dass die meisten NSC-Neurone GABAerg sind (siehe oben). Heute ist davon auszugehen, dass die NSC-Neurone auch elektrophysiologisch nicht homogen sind. Aufgrund von *In-vitro*-Langzeituntersuchungen dissoziierter NSC-Neurone steht außer Frage, dass es circadian feuernde NSC-Neurone mit einer mittleren Periodenlänge von 24,35 h (Spanne von 21,25 bis 26,25 h) gibt (WELSH et al. 1995). Diese Zellen machen aber nur etwa die Hälfte der spontanaktiven Neurone aus, und es besteht keine Korrelation zwischen Feuer-rate/-muster und Neuropeptidphänotyp, was sich schon daraus ergibt, dass den etwa 50 % spontanaktiven Zellen nur 23 % Neuropeptid-exprimierende Zellen gegenüberstehen. Die elektrophysiologische Heterogenität der circadian feuernden NSC-Neurone wird vor allem daran deutlich, dass bei ihnen Phasenunterschiede von bis zu 12 h existieren (WELSH et al. 1995). Weiterhin unterscheiden sich die Neurone hinsichtlich der Breite ihrer Spitzenaktivität und der Dauer ihres Feuerns. Beispielsweise fanden sich tags und nachts Zellen, die nur etwa 5 h lang feuern (SCHAAP et al. 2003). Paare von circadian synchron feuernden Neuronen sind mittels GABA und GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren synaptisch miteinander verbunden (SHIRAKAWA et al. 2000).

Detaillierte *In-vivo*-Einzelzelleitungen von NSC-Neuronen von Ratten vervollständigen das Bild in folgender Weise (SAEB-PARSY und DYBALL 2003): Ein hoher Prozentsatz (27 %) von NSC-Neuronen bleibt während der ganzen Untersuchungszeit (bis zu mehreren Stunden) stumm, kann aber ortho- oder antidrom zum Feuern gebracht werden. Hier wird angenommen, dass es sich um Reservezellen handelt, die nur zu bestimmten Zeiten aktiv werden, z. B. wenn

Phasenverschiebungen stattfinden: Sehr langsam feuern Zellen ( $< 0,1$  Hz) machen 11,5 % aus, und 1,3 % feuern nur zeitweise. Die am häufigsten vorkommenden circadianen Neurone weisen Aktivitätsmaxima am Ende und Minima am Anfang der Lichtphase auf. Neurone, die zum NSO bzw. zum Nucleus arcuatus projizieren, haben gleichermaßen zwei Aktivitätsmaxima, und zwar nämlich jeweils beim Wechsel der Hell-Dunkel-Phase. Neurone, die ihre Information von der Retina erhalten, zeigen keine robuste circadiane Rhythmik.

#### 4. Die der Circadianik im NSC zugrundeliegenden Mechanismen

Dass die Circadianik der elektrischen Aktivität nicht mit dem Uhrwerk des circadianen Hauptoszillators gleichzusetzen ist, erhellt u. a. daraus, dass, wenn das Feuern der NSC-Neurone *in vitro* durch Tetrodotoxin (TTX)-Gabe für zweieinhalb Tage unterbrochen worden war, die Neurone wieder im selben Rhythmus wie vorher feuerten (WELSH et al. 1995). Dies deutet darauf hin, dass während der zweieinhalb-tägigen Feuerpause das Uhrwerk im NSC-Neuron zeitlich unverändert weiter gelaufen ist und das rhythmische Feuern der Zelle lediglich mit den Zeigern einer Uhr, nicht jedoch mit dem Uhrwerk selbst vergleichbar ist.

Seit etlichen Jahren ist bekannt, dass die Generierung der Circadianik eine genetische Basis hat. Dies zeigt sich u. a. daran, dass Tiere, die aufgrund einer tau-Mutation Laufaktivitätsrhythmen von 22 (heterozygote) bzw. oder 20 h (homozygote) haben (RALPH und MENAKER 1988, LIU et al. 1997), weitergezüchtet werden können und dieselbe Periodik aufweisen wie die Eltern. Für den Menschen kann u. a. als Beweis gelten, dass eineiige männliche Zwillinge identische Plasmacortisolrhythmen haben (LINKOWSKI et al. 1993).

Während zunächst die Rolle der *immediate early genes*, wie z. B. *c-fos* und *b-jun*, im NSC untersucht wurde, stehen seit der Mitte der 1990er Jahre die aus der *Drosophila*-Rhythmusforschung bekannten Uhrengene und deren Genprodukte im Mittelpunkt der NSC-Untersuchungen. Wenn auch längst nicht alle Einzelheiten der Circadianogenese geklärt sind, so stehen doch die Haupteckpunkte fest. Festzuhalten ist zunächst, dass die „Innere Uhr“ eine aus etlichen Produkten bestehende „Eiweißuhr“ ist. Dies wird z. B. daran deutlich, dass in den NSC injizierte Proteinsynthesemmer in den Uhrenmechanismus eingreifen und dessen Rhythmik verändern (INOUE et al. 1988, YAMAGUCHI et al. 2003). Die für die Rhythmogenese wichtigen Uhrenproteine müssen, wie weiter unten genauer ausgeführt wird, zumeist immer wieder neu gebildet werden. Dabei laufen prinzipiell dieselben Schritte wie bei der Proteinbiosynthese im Allgemeinen ab, nämlich Genaktivierung, Transkription und Translation. Wichtig sind aber auch posttranslationale Vorgänge wie Phosphorylierung, Ubiquitinierung und proteasomaler Abbau der Uhrenproteine, die für die zeitlichen Abläufe in der Uhr entscheidend sind.

Der „Uhrenmechanismus“ erstreckt sich auf zwei Zellkompartimente, den Zellkern und das im Zelleib vorhandene Zytosol mit seinen Ribosomen. Die im Zellkern liegenden Uhrengene müssen aktiviert und in die entsprechende mRNA (Boten-Ribonukleinsäure) transkribiert werden. Die mRNA verlässt den Zellkern über Kernporen und gelangt ins Zytosol, wo an Ribosomen die Translation, d. h. die Zusammensetzung von Aminosäuren zu Uhrenproteinen, erfolgt. Uhrenproteine bleiben nicht auf das Zytosol beschränkt, sondern gelangen durch Kernporen in den Zellkern und entfalten dort ihre Wirkung.

Wie läuft der Uhrenmechanismus im NSC-Neuron nun im Einzelnen ab? Die daran beteiligten Uhrengene und Uhrenproteine sind in Tabelle 2 aufgeführt. Im Wesentlichen besteht der Mechanismus aus zwei Anteilen (vgl. Abb. 2): Ein quasi „stationärer Schalter“ leitet den

Beginn und nach etwa 12 h die zweite Hälfte eines circadianen Zyklus ein. Ein zweiter, „beweglicher“ Anteil ist durch 24-h-Schwingungen charakterisiert.

Tab. 2 Die wichtigsten im NSC von Säugern vorkommenden *Uhrengene* und UHRENPROTEINE

Name <sup>[1]</sup>	Herleitung	GENPRODUKT <sup>[2]</sup>
<i>Per1,2,3</i>	Periode	PER1,2,3
<i>Cry1,2</i>	Cryptochrom	CRY1,2
<i>Clock</i>	Circadian Locomotor Output Cycle Kaput	CLOCK
<i>Bmal1</i>	Brain-Muscle-ARNT-LikeProtein	BMAL1
<i>Tau</i>	ARNT = Aryl hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator $\tau$ = Periode	CaseinkinasenI $\delta, \epsilon$

Uhrengennamen werden in der Regel kursiv und mit kleinen Buchstaben geschrieben [1] und Uhrenproteine mit Versalien [2]

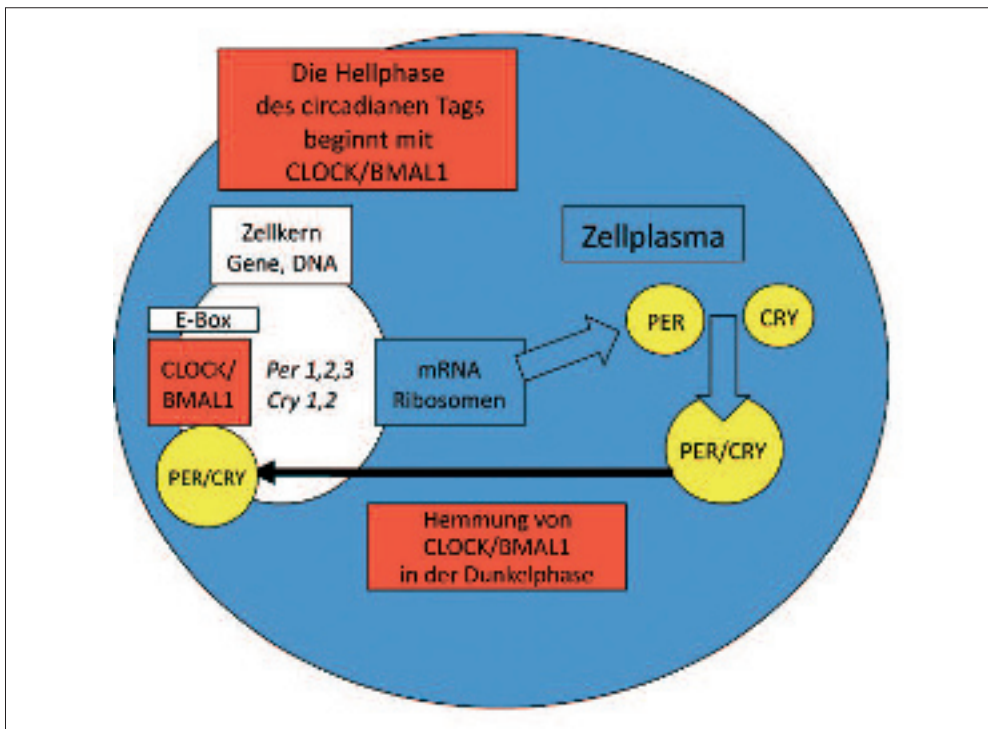


Abb. 2 Schematische Darstellung der Hauptschritte des circadianen Uhrenmechanismus in Nervenzellen des Nucleus suprachiasmaticus. Die Hellphase eines circadianen Zyklus beginnt damit, dass im Zellkern das Uhrproteindimer CLOCK/BMAL1 mit der E-Box in einer Promotorregion entsprechender Uhrengene (*Per1,2,3* und *Cry1,2*) interagiert und deren Transkription in Boten-Ribonukleinsäure (mRNA) stimuliert. An im Zellplasma gelegenen Ribosomen erfolgt die Translation, an denen unter Mitwirkung von mRNA Aminosäuren zu den UHRENPROTEINEN PER und CRY zusammengefügt werden. Diese bilden dann dimere Komplexe (PER/CRY). Wenn am Ende der Hellphase genügend PER/CRY vorhanden ist, wird es durch Kernporen in den Zellkern transloziert und hemmt dort das Uhrproteindimer CLOCK/BMAL1, sodass die Expression der Uhrengene *Per* und *Cry* bis zum Beginn der nächsten Lichtphase blockiert ist.

Der stationäre Schalter wird durch das Uhrenproteinheterodimer CLOCK/BMAL1 verkörpert. Seine Einzelteile werden im Zytosol synthetisiert, wo sie auch dimerisieren und innerhalb von 30 min über Kernporen in den Zellkern transloziert werden (LEE et al. 2010). Das Heterodimer bindet an eine E-Box der Promotorregion der Uhrengene *Per1*, *Per2*, *Per3* und *Cry1*, *Cry2*, wo es als Transkriptionsfaktor fungiert (GEKAKIS et al. 1998). Als „stationär“ bezeichne ich den Schalter, weil er während des gesamten 24-h-Rhythmus an die DNA gekoppelt bleibt (FIELD et al. 2000) und CLOCK Tag und Nacht konstitutiv auf niedrigem Niveau gebildet wird und keine ausgeprägte circadiane Rhythmik aufweist (DUNLAP 1999). BMAL1 zeigt ein differentes Verhalten, indem es bei Maus (DUNLAP 1999, PREITNER et al. 2002) und Ratte (ABE et al. 1998) circadian deutlich schwankt und nachts ein Maximum aufweist.

Zum circadianen Zeitpunkt null (CT 0), der definitionsgemäß mit dem Beginn der Hellphase identisch ist, beginnt CLOCK/BMAL1 die Expression der Uhrengene *Per1*, *2*, *3* (DUNLAP 1999) und – zeitlich verzögert – von *Cry1*, *2* (ETCHEGARAY et al. 2003) zu stimulieren und die entsprechenden RNA zu bilden. *Per1*, *2* und *3*-mRNA-Bildung steigen zeitversetzt an und weisen circadiane Rhythmen mit jeweiligen Maxima zwischen CT 4-6 (*Per1*), CT 4-8 (*Per3*) bzw. um CT 8 (*Per2*) auf (DUNLAP 1999). Einen vergleichbaren circadianen Rhythmus zeigt die *Cry1*- (MIYAMOTO und SANCAR 1998), nicht aber die *Cry2*-mRNA (MIYAMOTO und SANCAR 1999). Die Uhrenproteine PER2, PER3, CRY1 und CRY2 erreichen ihr Maximum erst ca. 6 h später, gegen Ende der Lichtphase (HASTINGS et al. 1999). Dies ist auf posttranslationale Vorgänge wie Phosphorylierung, Ubiquitinierung (= Anlagerung des Proteins Ubiquitin zur Markierung abzubauen Proteine) und proteasomalen Abbau zurückzuführen, die die Ansammlung ausreichender Uhrenprotein-Mengen verzögern (TAMANINI et al. 2005). Diese Verzögerung ist jedoch nicht nachteilig, sondern ist für die Erzeugung der 24-h-Periodik von entscheidender Bedeutung. Sie führt nämlich dazu, dass aus einer 20-stündigen Rhythmik eine 24-stündige wird. Für die Verzögerung verantwortlich ist die Caseinkinase 1 (CK1), die zur Phosphorylierung und damit zu einer Destabilisierung der PER- und CRY-Proteine führt (vgl. Abb. 3), gefolgt von deren proteasomalem Abbau (MENG et al. 2008). Die Wichtigkeit der Phosphorylierung wird dadurch unterstrichen, dass Menschen mit einer mutierten Bindungsstelle der CK1 $\epsilon$  am Uhrenprotein PER2 einen auf 21 bis 22 h verkürzten circadianen Rhythmus haben und ca. 4 h früher zu Bett gehen bzw. aufstehen (FASPS, *Familial Advanced Sleep Phase Syndrome*) als genetisch intakte Personen (TOH et al. 2001). Der tau-Mutante von Goldhamstern mit einem 20-h-Rhythmus liegt dagegen eine Mutation der CK1 $\epsilon$  zugrunde, die den proteasomalen Abbau von PER-Proteinen stimuliert (LOWREY et al. 2000), nicht aber den von CRY (LOUDON et al. 2007).

Ein weiterer wichtiger Aspekt des Uhrenmechanismus ist, dass, wenn gegen Ende der Hellphase genügend CRY im Zytosol akkumuliert ist, CRY und PER unter Mitwirkung von CK1 $\epsilon$  stabile PER/CRY-Heterodimere bilden (KUME et al. 1999) und zusammen mit CK1 $\epsilon$  über Kernporen in den Zellkern überführt werden (FU und LEE 2003), wo CRY1-, CRY2-, PER1- und PER2-Proteine hinsichtlich ihrer Menge nahezu synchrone circadiane Muster aufweisen (FIELD et al. 2000).

CK1 $\epsilon$  beeinflusst die circadianen Abläufe in NSC-Neuronen aber auch dadurch, dass sie die Importsignalsequenzen der PER-Proteine in den Zellkern maskieren und so den Übertritt der PER-Proteine in den Zellkern verzögern (VIELHABER et al. 2000). CK1 $\epsilon$  trägt ferner dazu bei, dass PER-Proteine den Zellkern verlassen (DEY et al. 2005). Die hierfür benötigten Exportsignalsequenzen sind vorhanden (VIELHABER et al. 2001).



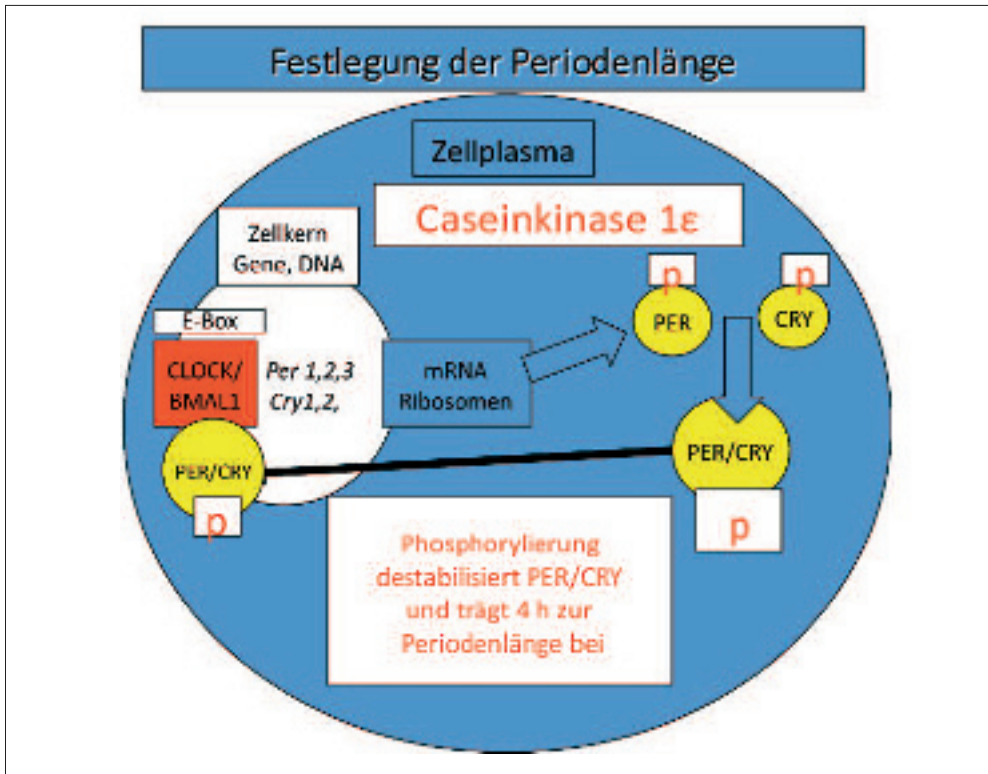


Abb. 3 Die ca. 24 h lange Periode des circadianen Rhythmus kommt dadurch zustande, dass die neu gebildeten Uhrproteine PER und CRY durch Caseinkinase 1ε phosphoryliert (p) und damit destabilisiert und schließlich teilweise abgebaut werden. Aus diesem Grund dauert es ca. 4 h länger, bis die erforderliche Menge an Uhrprotein PER und CRY erreicht ist und CLOCK/BMAL1 im Zellkern gehemmt werden kann. Abkürzungen siehe Abb. 2.

Neuere Untersuchungen zeigen, dass bei Mäusen CK1δ eine wichtigere Rolle als CK1ε spielt (ETCHEGARAY et al. 2010), indem sie, im Gegensatz zu CK1ε, die Aufenthaltsdauer von PER2 im Zellkern und die Periode der lokomotorischen Aktivität verlängert (MENG et al. 2010). CK1ε und -δ weisen weder unter LD noch DD eine Circadianik auf (ISHIDA et al. 2001). Gleiches gilt für CK1ε der Ratte (TAKANO et al. 2000). Goldhamster weisen Spitzenwerte von CK1ε um CT 12 auf (AGOSTINO et al. 2008).

Nach der Translokation von PER/CRY in den Zellkern am Ende der Hellphase bindet das Heterodimer an den CLOCK/BMAL1-Komplex und hemmt diesen über seinen CRY-Anteil (Ausschalten des Schalters), sodass die von CLOCK/BMAL1 gesteuerte *Per*- und *Cry*-Genexpression in der Dunkelpphase zum Erliegen kommt. Da im Laufe der Nacht der Nachschub von PER/CRY nachlässt und PER/CRY außerdem den Zellkern verlässt und im Zytosol proteasomal abgebaut wird, lässt die hemmende Wirkung von PER/CRY auf CLOCK/BMAL1 nach, sodass es am Ende der Dunkel- bzw. zu Beginn der Hellphase (durch Anschalten des Schalters) zu einem erneuten Zyklus der *Per*- und *Cry*-Genexpression und damit zu einer weiteren circadianen Schwingung kommt. Wie der CLOCK/BMAL1-Schalter genau funktioniert, ist nicht bekannt (HASTINGS et al. 2007). Zusammenfassend ist für die circadianen Hauptoszillationen festzuhalten, dass ihnen eine 24 h dauernde Schleife zugrunde liegt, deren erster

Teil die Expression/Transkription der Uhrgene *Per* und *Cry* und die Bildung der Uhrenproteine PER und CRY beinhaltet. Der zweite Teil umfasst einen negativen Rückkopplungsmechanismus, bei dem PER und CRY über CLOCK/BMAL1 ihre eigenen Gene hemmen.

#### 4.1 Sicherung des Uhrenmechanismus

Es ist einleuchtend, dass ein so wichtiger Vorgang wie der circadiane Uhrenmechanismus abgesichert sein muss. Dieser Sicherung dient einerseits die Tatsache, dass bestimmte Uhrgene doppelt (*Cry1*, *Cry2*) bzw. dreifach (*Per1*, *Per2*, *Per3*) vorhanden sind. Fällt nur eines dieser Gene aus, so beeinträchtigt dies die circadiane Rhythmik des Hauptoszillators nur geringfügig, indem sich die Periodenlänge in gewissen Grenzen ändert (ALBRECHT 2002). Die Rhythmik stoppt beim Ausfall von *Cry1* plus *Cry2* sowie von *Per1* plus *Per2* (BAE et al. 2001, KO und TAKAHASHI 2006). Dies ist ebenso der Fall, wenn das nur einmal vorhandene Gen *Bmal1* betroffen ist (BUNGER et al. 2000). Fehlt *Clock* bei Mäusen, so bleibt ein robuster circadianer Rhythmus der lokomotorischen Aktivität überraschenderweise erhalten, bei dem die Periode aber etwas kürzer als normal ist (DEBRUYNE et al. 2006). Dies ist darauf zurückzuführen, dass CLOCK durch das ebenfalls im NSC vorhandene NPAS2 (Neuronales Per-Arnt-Sim-Domänen-Protein 2) ersetzt werden kann (DEBRUYNE et al. 2007).

Weiterhin dient der Sicherung des Uhrenmechanismus, dass er über akzessorische Stoffwechselwege verstärkt und stabilisiert wird (HASTINGS et al. 2007, 2008). Darin sind u. a. die Gene der nukleären Waisenrezeptoren *Rev-Erba* (PREITNER et al. 2002) und *Rora* (SATO et al. 2004) involviert. *Rev-Erba* und *Rora* werden einerseits phasengleich mit *Per* und *Cry* durch CLOCK/BMAL1 aktiviert, andererseits beeinflussen sie die *Bmal1*-Expression in unterschiedlicher Weise. Während RORA die *Bmal1*-Expression stimuliert, hemmt REV-ERB $\alpha$  diese am Tage und am frühen Abend. Die nächtliche Abnahme von REV-ERB $\alpha$  führt schließlich dazu, dass *Bmal1*/BMAL1 spät in der Nacht aktiviert wird und somit kurz vor dem Beginn eines neuen circadianen Zyklus eine „Auffrischung“ für die nun folgende Genexpression erhält.

#### 4.2 Phänotypen Uhrengen-exprimierender NSC-Neurone

Nachdem geklärt war, worauf der circadiane Uhrenmechanismus beruht, begann die Suche nach der typischen circadianen Schrittmacherzelle. In ersten kombinierten elektrophysiologischen, immunhistochemischen (AVP und VIP) und *Per2*-Expressionsstudien *in vitro* zeigte sich, dass nur 65 % der *Per2* exprimierenden Neurone circadian sind und nur 23 % AVP oder VIP enthalten (WEBB et al. 2009). Hieraus ergibt sich, dass ein großer Teil der *Per2*-exprimierenden NSC-Neurone weder VIP noch AVP enthält. Da andere Neuropeptide nur in wenigen Zellen nachweisbar sind, muss man davon ausgehen, dass diese *Per2*-Neurone keine oder bisher nicht bekannte Neuropeptide exprimieren. Auf Grund dieser Ergebnisse ist davon auszugehen, dass es nicht die typische circadiane Schrittmacherzelle zu geben scheint, zumal sich der Phänotyp von NSC-Neuronen verändern kann (WEBB et al. 2009).

## 5. Wie der NSC im Ganzen funktioniert

Für diesen Aspekt ist wichtig, dass die beiden Hauptbereiche des NSC häufig als *Input*- (vNSC) bzw. *Output*-Region (dmNSC) apostrophiert werden und dass im vNSC VIP-, GRP- und CalB-Neurone und im dmNSC AVP-Neurone bevorzugt vorkommen (siehe oben). Unterschiede zwischen den beiden Regionen bestehen weiterhin darin, dass die Neurone des vNSC unter LD 12:12 elektrophysiologisch stärker synchronisiert sind als die des dmNSC (BROWN und PIGGINS 2009). Ferner bestehen Phasenunterschiede. Elektrophysiologisch sind Unterschiede von  $0,89 \pm 1,65$  h nachweisbar, ohne dass eine Region generell vorseilt oder hinterherhinkt (SCHAAP et al. 2003). Biolumineszenzstudien zeigen, dass die *Per1*- und *Per2*-Expression nicht im ganzen NSC gleichzeitig erfolgt. Am Anfang eines circadianen Zyklus beginnt sie in einem kleinen Bereich der äußeren Zone des dmNSC, breitet sich dann in dessen innerer Zone aus und erscheint schließlich abgeschwächt im vNSC (YAN und OKAMURA 2002, YAN und SILVER 2002, YAMAGUCHI et al. 2003, YAN et al. 2007, YAN 2009). Circadiane *Per1* und *Per2*-mRNA-Oszillationen sind im vNSC deutlich geringer ausgeprägt als im dmNSC (YAN et al. 1999). Im vNSC wird das *FosB*-Gen konstitutiv exprimiert (SCHWARTZ et al. 2000). CK1 $\epsilon$ , CK1 $\delta$  und GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren kommen dagegen vor allem im dmNSC vor (NING et al. 2004).

Der vNSC von Goldhamstern fällt u. a. dadurch auf, dass hier gehäuft Calbindin-D28K-haltige (CalB)-Neurone vorkommen. Sie sind in den Mittelpunkt des Interesses gerückt, da sie für die Aufrechterhaltung der Circadianik der lokomotorischen Aktivität verantwortlich sind (LESAUTER und SILVER 1999), aber selbst nicht circadian feuern (JOBST und ALLEN 2002) und keine Uhrgene exprimieren (KRIEGSFELD et al. 2004b). Im Vergleich zu benachbarten CalB-negativen Neuronen haben sie mehr und vor allem nach dorsal projizierende Dendriten. CalB-Neurone sind GABAerg, und GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren befinden sich in der Nachbarschaft. CalB-positive und -negative Neurone scheinen nicht unabhängig voneinander zu agieren, da sie untereinander mit *Gap junctions* verbunden sind (JOBST et al. 2004). Im Hinblick auf die circadiane Regulation der lokomotorischen Aktivität ist das Vorkommen von *Transforming Growth Factor alpha* (TGF $\alpha$ ) von Interesse, da er die lokomotorische Aktivität hemmt (KRAMER et al. 2001). TGF $\alpha$  wird offenbar von Astrozyten gebildet (LINDLEY et al. 2008). Afferenzen erhalten die CalB-positiven Neurone von der Retina (BRYANT et al. 2000). Nach Lichtgaben in der Nacht exprimierten 75 % von ihnen *c-Fos* und 50 % der *Fos*-exprimierenden Zellen enthielten CalB (SILVER et al. 1996b). Efferenzen dieser Zellen ziehen zum dmNSC (KRIEGSFELD et al. 2004a). Möglicherweise sind die CalB-Neurone an saisonalen Regulationsvorgängen beteiligt, da sie in Kurztagsexperimenten CalB stärker exprimieren als unter Langtagbedingungen (MENET et al. 2003). Bezüglich der Verhältnisse bei Mäusen siehe KRIEGSFELD et al. (2008), STADLER et al. (2010) und einem Primaten CAYETANOT et al. (2007).

### 5.1 Interaktionen zwischen vNSC und dmNSC

Für eine geordnete Funktion des NSC sind Interaktionen zwischen seinen verschiedenen Bereichen unerlässlich. Wird beispielsweise der NSC am Übergang vom oberen zum mittleren Drittel durchschnitten, so tritt im oberen Bereich eine vollständige Desynchronisation des *Per1*-Rhythmus auf (YAMAGUCHI et al. 2003), sodass man davon ausgehen kann, dass der vNSC den dmNSC synchronisiert. In dieselbe Richtung weist, dass, wenn der vNSC vom Rest des NSC abgetrennt wird, sich der circadiane Rhythmus der AVP-Freisetzung im dmNSC

von  $23,84 \pm 00,03$  auf  $23,22 \pm 00,08$  h verkürzt (NOGUCHI et al. 2004). Dieser Effekt ist auf die vorwiegend im vNSC vorkommenden VIP-Neurone zurückzuführen, da Verabreichung von VIP-Antagonisten die Periode der AVP-Freisetzung in gleicher Weise verändert wie die Abtrennung des vNSC (NOGUCHI und WATANABE 2008). Wird dagegen der dmNSC entfernt, so ändert sich die Rhythmik im vNSC nicht (NOGUCHI et al. 2004).

### Zur Rolle von Neuropeptiden und GABA im NSC

Für die circadiane Organisation des NSC und des Gesamtorganismus spielen die bevorzugt im vNSC vorkommenden VIP-Neurone eine führende Rolle. Die Bedeutung von VIP erhellt daraus, dass mutierte Mäuse mit VIP- und VIP-Rezeptordefizienz keine Circadianik ihres Ruhe/Aktivitätsrhythmus, der Expression ihrer Uhrgene *Per1* (HARMAR et al. 2002, MAYWOOD et al. 2006), *Per2* und *Cry1* sowie von AVP (HARMAR et al. 2002), ACTH und Corticosteron haben (LOH et al. 2008). Die elektrische Aktivität der NSC-Neurone ist reduziert (CUTLER et al. 2003, BROWN et al. 2007), sodass nur noch ca. 50 % der NSC-Neurone circadian „feuern“ und die Synchronisation zwischen rhythmischen Neuronen reduziert ist (ATON et al. 2005). Verabreichung von VIP-Rezeptor-Agonisten kann die Circadianik und die Synchronie wiederherstellen (ATON et al. 2006). Die Bedeutung von VIP wird dadurch unterstrichen, dass VIP-Rezeptoren in 32 % der VIP-, 31 % der CalR und 45 % der AVP-Neurone vorkommen, wobei das Vorhandensein von VIP-Rezeptoren in VIP-Neuronen an autoregulatorische Vorgänge denken lässt (KALLO et al. 2004). Bei Ratten weist die mRNA-Bildung für VIP-Rezeptoren 2 Spitzen, und zwar in der Mitte der Hell- und am Ende der Dunkelphase auf (CAGAMPANG et al. 1998) und, wie bei Mäusen (PAKHOTIN et al. 2006), wird das Feuern der Neurone durch VIP reguliert (REED et al. 2002). Weiterhin ist VIP an Phasenverschiebungen innerhalb des NSC beteiligt (PIGGINS et al. 1995, WATANABE et al. 2000, REED et al. 2001), sodass Tiere mit VIP-Rezeptordefizienz durch Lichtverabreichung nicht synchronisiert werden können (SHEWARD et al. 2007).

Das fast immer mit VIP kolokalisierte PHI (ROMJN et al. 1996, 1997, 1998) besitzt dieselben Rezeptoren wie VIP und PACAP (*Pituitary Adenylate Cyclase Activating Polypeptide*). Mäuse mit VIP/PHI-Deletionen haben unter LD praktisch keine veränderte Circadianik, aber unter DD setzt die lokomotorische Aktivität 8 h früher ein als unter LD und ist weniger präzise (COLWELL et al. 2003). Elektrophysiologisch zeigt sich eine Abnahme rhythmischer NSC-Neurone von 91 % auf 62 % (BROWN und PIGGINS 2007). PHI-Injektion in den NSC um CT 12-14 führte zu einer moderaten Phasenverzögerung (PIGGINS et al. 1995). Die Phasenverschiebende Wirkung von GRP wird durch PHI verstärkt (ALBERS et al. 1995), und die von VIP/PHI/GRP ist GABA<sub>A</sub>-Rezeptor-abhängig (GILLESPIE et al. 1996).

GPR stimuliert und synchronisiert das Feuern der NSC-Neurone (BROWN et al. 2005) und die molekularen Vorgänge des *Timekeeping* (MAYWOOD et al. 2006, GAMBLE et al. 2007). Es führt zu Phasenverschiebungen mit zeitabhängiger Beschleunigung oder Verzögerung (ALBERS et al. 1995, PIGGINS et al. 1995, MCARTHUR et al. 2000, AIDA et al. 2002, KALLINGAL und MINTZ 2007). Die Phasenverschiebende Wirkung von GRP wird durch SP-Verabreichung am Anfang der Nacht nicht beeinflusst, aber gegen Ende der Nacht vermindert (STERNICZUK et al. 2010).

Das ursprünglich als Neurohormon apostrophierte AVP hat innerhalb des NSC und in dessen extranukleären Projektionen Neurotransmitterfunktion. Die etwa 30 % der NSC-Neurone ausmachenden AVP-Neurone kommen zumeist im dmNSC vor (siehe oben), bei der Maus,

aber auch im vNSC (VAN DER ZEE und BULT 1995). Tagbetonte circadiane Rhythmen weisen AVP-mRNA-Bildung (UHL und REPERT 1986, DARDENTE et al. 2004), AVP-Gehalt (YAMASE et al. 1991, ISOBE und ISOBE 1998) und AVP-Freisetzung *in vivo* (KALSBECK et al. 1995) und *in vitro* auf (EARNEST und SLADEK 1986, GILLETTE und REPERT 1987). Bei CLOCK-mutanten Mäusen fehlt der circadiane Rhythmus, und der AVP-Gehalt ist vermindert (JIN et al. 1999). Schwach ausgebildet ist die AVP-Komponente bei Hamstern (VAN DER ZEE et al. 2002). Für eine Wirkung des AVP innerhalb des NSC spricht, dass AVP-Rezeptoren in AVP- und VIP-Neuronen vorkommen (YOUNG et al. 1993) und dass bei AVP-V1a-Rezeptordefizienz die circadiane Rhythmik der lokomotorischen Aktivität vermindert ist (LI et al. 2009). Die AVP-Rezeptormenge schwingt circadian, aber ihre Rhythmik ist zu der des AVP-Gehalts um 12 h verschoben (YOUNG et al. 1993, LI et al. 2009). Wie elektrophysiologische Untersuchungen zeigen, stimuliert AVP etwa 50 % der NSC-Neurone (LIOU und ALBERS 1989, MIHAI et al. 1994a, b). Es wird angenommen, dass AVP unter Mitwirkung anderer Peptide die Circadianik des NSC verstärkt und synchronisiert (INGRAM et al. 1998). Relativiert werden diese Befunde jedoch dadurch, dass die Circadianik bei AVP-defizienten Brattleboro-Ratten nicht gestört ist (INGRAM et al. 1998). Die extranukleären AVP-Neurone werden weiter unten besprochen.

NSC-Neurone werden auch entscheidend von dem in der Mehrheit der NSC-Neurone vorkommenden Neurotransmitter GABA beeinflusst. Die elektrische Aktivität der meisten NSC-Neurone wird durch die in der Regel inhibitorisch wirkende GABA gehemmt (BOS und MIRMIRAN 1993, CHOI et al. 2008). Eine Stimulierung wurde bei lediglich 17 % der spontan-aktiven Neurone gefunden (SHIRAKAWA et al. 2000). Die genauen Effekte von GABA sind noch unklar. Einerseits wurde gefunden, dass GABA tagsüber die elektrische Aktivität stimuliert und nachts hemmt, woraus vergrößerte Feueramplituden resultieren (WAGNER et al. 1997). Andererseits zeigte sich, dass GABA das Feuern von NSC-Neuronen vermindert, aber zugleich synchronisiert (LIU und REPERT 2000). Schließlich wurde gefunden, dass die synchronisierende Wirkung nicht auf GABA, sondern auf  $G_{i/o}$ -Proteinen beruht. Interessanterweise führt GABA-Hemmung zu einer Zunahme der Rhythmusstabilität (ATON et al. 2006). Möglicherweise sind die Diskrepanzen auf nicht berücksichtigte regionale Unterschiede im NSC zurückzuführen, da GABA die elektrische Aktivität der Neurone im vNSC stimuliert, im dmNSC aber hemmt (ALBUS et al. 2005). Unerwartete Effekte können auch dadurch zustande kommen, dass GABA-Applikation in NSC-Neuronen die funktionell wichtigen intrazellulären Calciumionenkonzentrationen erhöhen, erniedrigen oder unbeeinflusst lassen kann (IRWIN und ALLEN 2009). Von Bedeutung dürfte auch sein, dass die wichtigen CK1 $\delta$  und CK1 $\epsilon$  mit GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren Komplexe bilden und dadurch die GABA-Wirkung hemmen (NING et al. 2004). Hierzu könnte passen, dass gestörte Circadianik durch Hemmung von CK1 $\delta$  normalisiert werden kann (MENG et al. 2010).

Hinweise gibt es auch, dass GABA an Phasenverschiebungen im NSC beteiligt ist (RALPH und MENAKER 1989, LIU und REPERT 2000). Möglicherweise läuft auch ein auf NPY zurückzuführender Phasenvorschub über GABA ab (GRIBKOFF et al. 1998).

Zur Bedeutung von SP, SS, ENK, NT, CCK, CalR und NO: In nicht wenigen Studien ist das Vorkommen dieser Substanzen in NSC-Neuronen nachgewiesen worden, aber insgesamt sind die vorliegenden Daten nicht aussagekräftig genug, um ihre Bedeutung abschließend zu beurteilen. Deshalb werden hier nur wenige Aspekte hervorgehoben.

SP ist in Fasern des Rht (TAKATSUJI et al. 1991) und in NSC-Neuronen nachgewiesen worden (MIKKELSEN und LARSEN 1993, OTORI et al. 1993, REUSS und BURGER 1994), aber das Vorkommen im Rht ist bezweifelt worden (HANNIBAL und FAHRENKRUG 2002). SP stimuliert

die elektrische Aktivität der NSC-Neurone (SHIRAKAWA und MOORE 1994, KIM et al. 1999), hemmt sie aber bei 11 % (SHIRAKAWA und MOORE 1994). Etwas mehr als die Hälfte aller SP-Neurone ist kolokalisiert mit GRP, und SP vermindert spät nachts die Phasen-verschiebende Wirkung von GRP (STERNICZUK et al. 2010). Phasen-verschiebende Wirkungen von SP sind auch elektrophysiologisch nachgewiesen worden (KIM et al. 2001). SP-Rezeptorantagonisten hemmen die lichtinduzierte *c-fos* Expression (ABE et al. 1996). SP-Rezeptoren fehlen offenbar fast vollständig im vNSC (MICK et al. 1995). Unter Kurztagsbedingungen nimmt die SP-Immunreaktivität ab (REUSS und BURGER 1994).

Die meisten SS-haltigen NSC Neurone sind GABAerg (TANAKA et al. 1996) und exprimieren die mRNA des SP-Vorläufers Präprotachykinin A (SHIGEYOSHI et al. 1997a). Selten enthalten sie AVP oder VIP (TANAKA et al. 1996). SS- und AVP-Neurone innervieren sich gegenseitig (DAIKOKU et al. 1992, ROMIJN et al. 1997). Weiterhin innervieren die SS-Neurone VIP/PHI- und GRP-Zellen (ROMIJN et al. 1997). Injektion von SS steigert nur nachts die Glukoseaufnahme des NSC und führt am Anfang der Nacht zur Phasenverzögerung und am Ende der Nacht zu einem Phasenvorschub des Feuerrhythmus (HAMADA et al. 1993). Pharmakologische SS-Depletion führt dagegen zu Phasenvorschüben der lokomotorischen Aktivität und des Feuerns (FUKUHARA et al. 1994a). Lichtpulse in der Nacht scheinen außerhalb des NSC gelegene und in die Wachstumshormon(GH)-Regulierung involvierte Neurone zu beeinflussen, da es unter diesen Bedingungen zu einem Absinken des GH-Spiegels kommt (DAVIES et al. 2004).

ENK und Opioidrezeptoren im NSC werden mit der Modulation circadianer Abläufe in Verbindung gebracht (CUTLER et al. 1999, BYKU et al. 2000, VANSTEENSEL et al. 2005).

NT stimuliert die elektrische Aktivität von 50 % und hemmt sie bei 10 % der NSC-Neurone (COOGAN et al. 2001). NT-Rezeptoren finden sich postsynaptisch an Somata und Dendriten von VIP-Neuronen und präsynaptisch an 5-HT-Axonon (FRANCOIS-BELLAN et al. 1992).

Die im NSC vorkommenden (VAN DEN POL und TSUJIMOTO 1985, REUSS 1991) und von CalB-Fasern innervierten (LESAUTER et al. 2009) Cholezystokinin (CCK)-Neurone exprimieren bei Mäusen weder AVP und VIP noch PER1 und werden nicht von der Retina, dem Folium intergeniculatum (*intergeniculate leaflet*) und den Raphekernen aus innerviert (HANNIBAL et al. 2010). CCK-defiziente Mäuse unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Circadianik nicht von Wildtypen (HANNIBAL et al. 2010). Möglicherweise reguliert CCK die Nahrungsaufnahme, da Infusionen von CCK die nächtliche Nahrungsaufnahme unterdrücken (MORI et al. 1986). Bei *Phodopus* nimmt die CCK-Immunreaktivität unter Kurztagbedingungen drastisch ab, was auf eine saisonale Regulation der Nahrungsaufnahme hinweisen könnte (REUSS 1991). Neuerdings wird aber auch diskutiert, dass CCK-A-Rezeptoren lichtabhängige Vorgänge im NSC beeinflussen, da die lichtinduzierte *Per1/Per2*-Expression im NSC, die Phasenverschiebungen der motorischen Aktivität und die Pupillenreflexe signifikant vermindert waren (SHIMAZOE et al. 2008).

CalR-Zellen (SILVER et al. 1999, ABRAHAMSON und MOORE 2001, CAVALCANTE et al. 2008) sind nicht auf eine bestimmte Region des NSC beschränkt (MARSHALL et al. 2000). Sie kolokalisieren mit GABA (MOORE et al. 2002) und werden von NPY- und 5-HT-Fasern innerviert (ABRAHAMSON und MOORE 2001). CalR findet sich in 2 bzw. 12 % der  $\beta$ - bzw.  $\alpha$ -Oestrogenrezeptor-positiven NSC-Neurone (VIDA et al. 2008). Die Rolle des gasförmigen Botenstoffs NO wird weiter unten abgehandelt.

## 6. Licht stellt den circadianen Rhythmus auf genau 24 Stunden ein und kann zu Phasenverschiebungen führen

Der regelmäßig alle 24 Stunden erfolgende Dunkel/Hell-Wechsel der Umwelt stellt den nur annähernd 24-stündigen circadianen Rhythmus des NSC auf genau 24 h ein. Wird Licht dem Organismus dagegen in der Nacht verabreicht, so resultieren Phasenverschiebungen des circadianen Rhythmus, und zwar führen Lichtgaben in der frühen Dunkelphase zu Phasenverzögerung und solche in der späten Nacht zu Phasenvorschub. Die Anpassung des Uhrenmechanismus an Phasen-verschiebende Impulse erfolgt innerhalb von 2 h (BEST et al. 1999). Auch UV-Licht kann als Zeitgeber fungieren (AMIR und ROBINSON 1995).

Lichtinformation wird dem NSC von der Netzhaut des Auges auf zwei Wegen vermittelt: Einmal auf direktem Wege über die zunächst im Sehnerven verlaufende Nervenverbindung Tractus retinohypothalamicus (Trh), wobei der größere Teil der Trh-Fasern im Chiasma opticum auf die Gegenseite kreuzt (WENISCH 1976), sodass jeder NSC von beiden Augen Informationen erhält. Beim Erdhörnchen *Spermophilus lateralis* existiert dagegen nur eine kontralaterale Innervation (SMALE et al. 1991). Der indirekte zweite Weg verläuft über das IGL (siehe unten).

Die Ursprungszellen des von der Netzhaut auf direktem Weg zum NSC ziehenden Trh sind die vor 10 Jahren entdeckten, direkt lichtempfindlichen, Melanopsin-haltigen retinalen Ganglienzellen (PROVENCIO et al. 2000). Trh-Fasern treten hauptsächlich im vNSC mit VIP- (IBATA et al. 1989), non-VIP- (TANAKA et al. 1993), GRP- (TANAKA et al. 1997, AIOUN et al. 1998) und bei Hamstern auch mit CalB-Neuronen in synaptischen Kontakt (BRYANT et al. 2000). Die wesentlichen, kolokalisierten Neurotransmitter des Trh sind Glutamat (EBLING 1996) und PACAP (HANNIBAL 2002).

Die Bedeutung von Glutamat für die „Lichtweiterleitung“ erhellt u. a. daraus, dass die Injektion von Glutamat-Agonisten in den NSC die bekannten Lichteffekte in NSC und Zirbeldrüse (siehe unten) zeitigt (PAUL et al. 2003). PACAP moduliert die Glutamatwirkung (HANNIBAL 2002). Die Komplexität der Glutamat-PACAP-Interaktionen wird u. a. an *In-vitro*-Studien zur CREB(cAMP Response Element Binding Protein)-Phosphorylierung deutlich: Während Glutamat besonders effektiv am subjektiven späten Nachmittag ist, ist dies bei PACAP während der subjektiven Nacht der Fall. Außerdem wird die PACAP-, nicht aber die Glutamat-induzierte CREB-Phosphorylierung durch Melatonin (MEL) gehemmt (VON GALL et al. 1998).

Wie ausführlich dargelegt (ANTLE et al. 2009), führt die Lichtverabreichung in der Nacht in einem Teil der Zielzellen des Trh vor allem durch Beeinflussung von iono- und metabotropen Glutamatrezeptoren zur Stimulierung der elektrischen Aktivität (AGGELOPOULOS und MEISSL 2000). Außerdem führt sie zu Veränderungen von intrazellulären sekundären Botenstoffen und nachgeschalteten Reaktionen, die die Calciumionen, Calcium/Calmodulin-abhängige Proteinkinase II (CaMKII), Proteinkinase C (PKC), cyclisches Guanosinmonophosphat (cGMP), NO, Phospholipidhydrolyse, extrazelläre Signal-regulierte Kinasen 1/2 (ERK1/2) sowie CREB und Genexpression beeinflussen.

Lichtgabe in der Nacht stimuliert die Expression der *immediate early genes c-fos* (KORNHAUSER et al. 1990, RUSAK et al. 1990), *junB* (MIKKELSEN et al. 1995, WOLLNIK et al. 1995), *fra-2* (SCHWARTZ et al. 2000) und der Uhrengene *Per1* und *Per2* (SHIGEYOSHI et al. 1997b, SHEARMAN et al. 1997), aber nicht von *Bmal1* (ABE et al. 1998). Diese Reaktionen sind weitestgehend auf den vNSC beschränkt (SHIGEYOSHI et al. 1997b, YAN et al. 1999, SCHWARTZ et al. 2000).

Für eine Involvierung von GABAergen NSC-Neuronen spricht, dass die Licht-induzierte *c-Fos*- und *Per1*-Expression bei Mäusen durch GABA<sub>B</sub>-Agonisten (CROSIO et al. 2000) und bei Goldhamstern die von *Per1* durch GABA<sub>A</sub>-Aktivierung gehemmt werden (EHLEN et al. 2008).

#### *Weiterleitung der Lichtinformation innerhalb des NSC*

Für die Weiterleitung der Lichtinformation vom vNSC zum dmNSC sind vor allem VIP-, GRP-, PER- und NO-haltige Neurone von Bedeutung. Eine wichtige modulierende Rolle spielen NPY und Serotonin. Die Bedeutung der in den meisten NSC-Neuronen vorkommenden GABA ist wegen vieler gegensätzlicher Wirkungen unklar (ANTLE et al. 2009).

Für eine Beteiligung von VIPergen Neuronen und VIP spricht, dass sie direkt von retinalen Axonen innerviert (IBATA et al. 1989) und durch Phasen-verschiebende Lichtgaben elektrisch stimuliert werden (KUHLMAN et al. 2003) und wenigstens ein Teil der Zellen zur Uhrengensexpression angeregt wird (KAWAMOTO et al. 2003, KUHLMAN et al. 2003). VIP-induzierte Uhrengensexpression kommt offenbar über Proteinkinase A und Phospholipase C zustande (NIELSEN et al. 2002).

GRP-Neurone werden nicht nur direkt von retinalen Fasern innerviert (TANAKA et al. 1997), sondern weisen auch Anzeichen auf, dass Lichtinformation auf sie einwirkt (AIDA et al. 2002, DARDENTE et al. 2002, GUILLAUMOND et al. 2007). Auf die Phasen-verschiebende Wirkung von GRP ist bereits oben hingewiesen worden.

PERs sind vor allem für eine Phasen-verschiebende Wirkung einer nächtlichen Lichtgabe auf Verhaltensrhythmen wichtig. Während die zunächst im vNSC stattfindende *Per1*-Expression zu allen Zeitpunkten in der Nacht stimuliert werden kann, ist dies für *Per2* nur am Anfang der Nacht der Fall. Es schließt sich die *Per*-Expression im dmNSC an, wo eine Phasen-verzögernde Lichtgabe keine *Per1*-, sondern nur eine *Per2*-Expression stimuliert, während eine Phasenvorschub erzeugende Lichtgabe genau das Gegenteil bewirkt (YAN und SILVER 2002).

NO ist entscheidend an der Weiterleitung nächtlicher Lichtinformation im NSC und an der Erzeugung von entsprechenden Phasenverschiebungen beteiligt (AMIR 1992, DING et al. 1994, WATANABE et al. 1994, WEBER et al. 1995, AMIR und EDELSTEIN 1997, DING et al. 1997, PLANO et al. 2007, 2010). Lichtpulse in der Nacht führen zu einer Phosphorylierung von nNOS (AGOSTINO et al. 2004). Bei eNOS- und nNOS-defizienten Mäusen fanden sich jedoch keine Hinweise, dass NO an Licht-bedingten Phasenverschiebungen der lokomotorischen Aktivität mitwirkt (KRIEGSFELD et al. 1999, 2001). Offenbar ist NO aber bei den durch Melatonin- und Serotonin(5-HT)-Rezeptoragonisten induzierten Phasenvorschüben involviert (STARKEY 1996). Hemmung der nNOS hemmt die durch TNF $\alpha$  gesteigerte Feuerrate der NSC-Neurone (NYGARD et al. 2009). nNOS zeigt unter LD und DD einen Tag/Nacht-Rhythmus mit höheren Nachtwerten (MITOME et al. 2001).

Licht-induzierte Phasenverschiebungen können durch Verabreichung von NPY gehemmt werden (WEBER und REA 1997, YANNIELLI und HARRINGTON 2000, FUKUHARA et al. 2001, BREWER et al. 2002, LALL und BIELLO 2002, 2003a, b, GAMBLE et al. 2005), und beim Fehlen von NPY erfolgt die Synchronisation auf geänderte Photoperiodiken hin langsamer als bei Kontrolltieren (KIM und HARRINGTON 2008).

Wie Licht hemmt NPY die MEL-Bildung der Zirbeldrüse (GAMBLE et al. 2006). Die Wirkungen von NPY auf lichtinduzierte Phasenverschiebungen kommen nachts über Y5-Rezeptoren zustande (YANNIELLI und HARRINGTON 2001, YANNIELLI et al. 2004, GAMBLE et al. 2005,



2006). – NPY hemmt den Phasen-verschiebenden Effekt von PACAP (HARRINGTON und HOQUE 1997).

Schließlich beeinflusst auch 5-HT Licht-induzierte Vorgänge im NSC (MORIN 1999, SOL-LARS et al. 2006a, b, GRAFF et al. 2007, CUESTA et al. 2008, GARDANI und BIELLO 2008, MENDOZA et al. 2008, STERNICZUK et al. 2008, FRANCL et al. 2010b). Es wird angenommen, dass 5-HT die Empfindlichkeit der NSC-Neurone auf Licht steigert (STERNICZUK et al. 2008).

## 7. Licht-unabhängige Phasenverschiebungen und Synchronisation des NSC

Neuere Untersuchungen zeigen, dass die Circadianik des NSC z. B. auch durch andere Faktoren als Licht synchronisiert werden kann, beispielsweise durch erzwungene lokomotorische Aktivität (MARCHANT et al. 1997) oder Nahrungsaufnahme (KUHLMAN et al. 2003, ANDRADE et al. 2004, ANGELES-CASTELLANOS et al. 2010), Schlafentzug (KNOCH et al. 2006), generelle Aktivierung (= arousal) des Versuchstiers (HASTINGS et al. 1992, EDELSTEIN et al. 2003), Ethanolingestion (MCELROY et al. 2009) sowie Injektionen von Kochsalz (SUMOVA et al. 1994), Opioiden (BYKU und GANNON 2000a, b, VANSTEENSEL et al. 2005) oder anderen Substanzen wie z. B. *Thyrotropin Releasing Hormone* (TRH) (GARY et al. 1996, CUESTA et al. 2008).

Diese synchronisierenden Faktoren werden dem NSC auf 2 Wegen vermittelt: Einmal über das Folium intergeniculatum (*intergeniculate leaflet*) des Thalamus mittels des Tractus geniculohypothalamicus (MOGA und MOORE 1997) und zum anderen über Axone von serotonergen Neuronen aus mesenzephalen Raphekernen. Letztere können direkt zum NSC ziehen oder im IGL mit zum NSC projizierenden Neuronen interagieren.

Das IGL (MORIN et al. 1992, MOORE und CARD 1994, STAMP et al. 1997, EDELSTEIN und AMIR 1998, VRANG et al. 2003, MORIN und ALLEN 2006, BLASIAK et al. 2007, 2009) erhält die verschiedensten Afferenzen, von denen hier vor allem die von Melanopsin-haltigen retinalen Ganglienzellen ausgehenden Axone interessieren. Sie verlaufen im Nervus und Tractus opticus als Tractus retinogeniculatus, enthalten PACAP (HANNIBAL und FAHRENKRUG 2004) sowie Glutamat (BLASIAK et al. 2009) und enden im IGL vor allem an MetENK-Neuronen, ganz wenige an NPY-Neuronen (JUHL et al. 2007). Ihre Aufgabe könnte es sein, vom IGL zum NSC projizierende Neurone mit Lichtinformation zu versorgen und auf diese Weise nicht-photische Synchronisatoren auf die Lichtverhältnisse abzustimmen. Das IGL erhält auch Afferenzen aus dem dorsalen Raphenukulus (BLASIAK und LEWANDOWSKI 2003). Wenn das IGL entfernt worden ist, ist es Tieren unmöglich, sich mit erzwungener lokomotorischer Aktivität zu synchronisieren (MARCHANT et al. 1997).

Der vom IGL zum NSC ziehende Tractus geniculohypothalamicus enthält NPY- und nichtNPY-haltige Axone (CARD und MOORE 1989). Im NSC enden die NPY-haltigen Axone vorwiegend im vNNSC (UEDA et al. 1986, HARRINGTON et al. 1987, KAWATA et al. 1987, CARD und MOORE 1988, IBATA et al. 1988, REUSS et al. 1989, MIKKELSEN und O'HARE 1991, MORIN und BLANCHARD 1995, WOLLNIK und BIHLER 1996), der auch das Zielgebiet der Neurone des Trh ist. Im Hinblick darauf, dass NPY und 5-HT im NSC interagieren (siehe unten), verwundert nicht, dass deren Axone im NSC synaptisch verbunden sind (GUY et al. 1987). Die Bedeutung von NPY erhellt u. a. daraus, dass durch nicht-photische Einflüsse erzeugte Phasenverschiebungen (z. B. durch erzwungene lokomotorische Aktivität) bei NPY-defizienten Mäusen nicht zum Tragen kommen (HARRINGTON et al. 2007). Weiterhin führen Mikroinjektionen von NPY in den NSC zu Phasenverschiebungen (HUHMAN et al. 1996a, GAMBLE et al.

2004), die durch den NPY-Rezeptor Y2 vermittelt werden (HUHMAN et al. 1996a). Offenbar kommt der NPY-Effekt durch eine Beeinflussung von GABAergen Mechanismen zustande (HUHMAN et al. 1995, BIGGS und PROSSER 1999). In dieselbe Richtung deutet, dass, wenn das Feuern von GABAergen NSC-Neuronen durch Tetrodotoxin ausgeschaltet wird, NPY keine Phasenverschiebung erzeugt (HUHMAN et al. 1997). Interaktionen bestehen auch zwischen NPY und Glutamat. So hemmt der Glutamatagonist NMDA tags den NPY-induzierten Phasenvorschub der lokomotorischen Aktivität, und nachts mikroinjiziertes NPY hemmt NMDA-induzierte Phasenverschiebungen (GAMBLE et al. 2004). Wie Lichtimpulse beeinflusst NPY die Expression von *Per1* und *Per2*, jedoch nicht stimulierend, sondern hemmend (MAYWOOD et al. 2002).

Die serotonergen (5-HT) Raphe-NSC-Neurone sind auch für Licht-unabhängige Phasenverschiebungen des NSC während der Hellphase von Bedeutung. Die Perikarya der zum NSC ziehenden Fasern liegen in den dorsalen (dRK) und medialen Raphekernen (mRK) des Mittelhirns (MEDANIC und GILLETTE 1992, KAWANO et al. 1996, WEBER et al. 1998, DUDLEY et al. 1999, SU und LIU 2001, HAY-SCHMIDT et al. 2003, YAMAKAWA und ANTLE 2010), aber nur etwa die Hälfte enthält 5-HT (SU und LIU 2001, YAMAKAWA und ANTLE 2010). Bei Ratten endigen die vom dRK ausgehenden Axone im vNNSC (MEDANIC und GILLETTE 1992). Deutlich wird der Einfluss der RK nach deren Zerstörung. Dann beginnt die nächtliche lokomotorische Aktivität früher und endet später (MEYER-BERNSTEIN und MORIN 1996). Auch die Benzodiazepin-induzierte Phasenverschiebung hängt von einer intakten 5-HT-Innervation des NSC ab (CUTRERA et al. 1994). Unterstrichen wird die Tag-abhängige Zeitgeberfunktion von 5-HT durch Verabreichung von 5-HT selbst (MEDANIC und GILLETTE 1992) oder diverser 5-HT-Rezeptoragonisten (EDGAR et al. 1993, HORIKAWA et al. 2000, SPROUSE et al. 2004, 2005, VARCOE und KENNAWAY 2008) sowie von 5-HT-Wiederaufnahmehemmern (SPROUSE et al. 2006). Wie bei anderen Versuchsansätzen zeigen elektrophysiologische Untersuchungen, dass nur etwa 40 % der NSC-Neurone auf 5-HT ansprechen, wobei jeweils die Hälfte der Zellen stimuliert oder gehemmt wird (HSIEH und PAN 1990). Der 5-HT-bedingte Phasenvorschub ist offenbar NO-abhängig (STARKEY 1996). Die durch erzwungene lokomotorische Aktivität erzeugte Synchronisierung des NSC erfordert das Zusammenwirken von 5-HT und NPY (MARCHANT et al. 1997). In dieselbe Richtung deutet, dass NPY 5-HT-bedingte Phasenverschiebungen blockt (PROSSER 1998).

### *Synchronisation der beiden NSC*

Da der NSC bilateral angelegt ist, erhebt sich die Frage, ob und gegebenenfalls wie sich die beiden Kerne die Arbeit teilen und ob deren Aktivitäten synchronisiert sind. Elektrophysiologische Untersuchungen zeigen, dass zwischen rechtem und linkem NSC ein Phasenunterschied von  $1,13 \pm 0,2$  h (Spanne: 0,25 bis 3,4 h) besteht, der nur geringfügig größer ist als der zwischen vNNSC und dmNSC (SCHAAP et al. 2003). Man kann also davon ausgehen, dass die Funktion der beiden Kerne gleichsinnig verläuft.

Dies ändert sich, wenn Tiere, zumeist an Goldhamstern untersucht, unter LL gehalten werden. Dann zeigen sich bei einem hohen Prozentsatz der Tiere nicht nur ein, sondern zwei circadiane Aktivitätsmaxima, z. B. von Trinkverhalten und lokomotorischer Aktivität (SHIBUYA et al. 1980), Körpertemperatur (PICKARD et al. 1984), Luteinisierungshormonsekretion (SWANN und TUREK 1985), elektrophysiologischer Aktivität (ZLOMANCZUK et al. 1991) sowie gegenläufige Uhrengensexpression in den beiden NSC (DE LA IGLESIA et al. 2000). Dass das Auftreten

von zwei verschiedenen Rhythmen auf das bilaterale Vorhandensein des NSC zurückzuführen ist, wird daran deutlich, dass unilaterale Läsion des Kerns einen der beiden Rhythmen zum Verschwinden bringt (PICKARD und TUREK 1982, 1983). Ob die Synchronisation über beide Kerne verbindende Kommissurenfasern (siehe oben) zustande kommt, ist mir nicht bekannt.

## 8. Wie der circadiane Hauptoszillator seine Rhythmik den übrigen Teilen des Körpers vermittelt

Dies geschieht prinzipiell auf zwei Wegen. Wie Transplantationsexperimente nach Zerstörung des NSC zeigen, können zwar die *circadianen* Rhythmen der lokomotorischen Aktivität (RALPH et al. 1990), nicht aber die von neuroendokrin regulierten Hormonen (MEYER-BERNSTEIN et al. 1999) wieder hergestellt werden. Diese Unterschiede sind darauf zurückzuführen, dass der NSC erstere über diffundierende Wirkstoffe und letztere neural reguliert.

Die Wirksamkeit von diffundierenden NSC-Faktoren wurde u. a. dadurch nachgewiesen, dass von einer semipermeablen Membran umgebene NSC transplantiert wurden, sodass keine Axone in die Nachbarschaft aussprossen und synaptische Kontakte mit in der Nachbarschaft des Transplantats liegenden Neuronen bilden konnten (SILVER et al. 1996a).

Welcher der NSC-Wirkstoffe für die Regulierung des lokomotorischen Rhythmus verantwortlich ist, ist noch nicht abschließend geklärt (KALSBECK et al. 2006). In Frage kommen TGF $\alpha$  (KRAMER et al. 2001, 2005), Prokineticin 2 (CHENG et al. 2002, 2005, LI et al. 2006), ein Cardiotrophin-ähnliches Zytokin (KRAVES und WEITZ 2006) sowie das im NSC reichlich vorkommende AVP (REPPERT et al. 1981, JIN et al. 1999, TOUSSON und MEISSL 2004).

Efferenzen des NSC (SAPER et al. 2005): Zielgebiet der Hauptefferenzen des NSC ist die nach dorsal weisende, gewölbte und unter dem NPVh gelegene subparaventriculäre Zone (SPZ), die eine NSC-nahe ventrale SPZ (vSPZ) und eine dorsale SPZ (dSPZ) unterscheiden lässt, an die sich der dorsomediale hypothalamische Kern (DMH) anschließt. Ein kleinerer Teil der Fasern zieht zu dorsalen parvozellulären Neuronen im NPVh und ist der Anfangsteil des hypothalamopinealen Trakts (siehe unten). Die Fasern der vSPZ ziehen zum DHM, von wo aus sie drei Zielregionen ansteuern:

- GABAerge Neurone ziehen zum Schlaf-fördernden Nucleus praeopticus ventrolateralis.
- Glutamaterge und TRH- (*Thyrotropin Releasing Hormone*)-haltige Fasern projizieren zunächst zur Area hypothalamica lateralis, wo sie auf MCH (*Melanin-Concentrating Hormone*)- und Orexin-haltige Neurone umgeschaltet werden, die Wachheit und Futteraufnahme stimulieren.
- Als Letztes ziehen Fasern zu CRH (*Corticotropin Releasing Hormone*)-bildenden Zellen im medialen parvozellulären Bereich des NPVh (siehe unten).

Die dSPZ, die Zuflüsse über Leptin und den Nucleus ventromedialis erhält, projiziert zur Area praeoptica medialis, die in die Thermoregulation involviert ist. In Übereinstimmung hiermit zeigen experimentell-funktionelle Untersuchungen der SPZ von Ratten, dass Läsionen der vSPZ zu einer Abnahme der circadianen Indices von Schlaf (–90%), lokomotorischer Aktivität (–75%) und Körpertemperatur (–50%) führen, während solche der dSPZ die Indices um 70% (Körpertemperatur), 45% (lokomotorische Aktivität) bzw. lediglich um weniger als 5% (Schlaf) reduzierten (LU et al. 2001). Die Ausschaltung des insgesamt stimulierenden DMH

führt zu einer 78–89%igen Verminderung der circadianen Rhythmik von Wachheit, Futteraufnahme, lokomotorischer Aktivität und Serumkorticosteroiden, während Körpertemperatur (CHOU et al. 2003) und MEL-Sekretion nicht beeinflusst werden (MOTA et al. 2001, CHOU et al. 2003). Da SPZ und DMH zusätzlich zur Weiterleitung circadianer Informationen Verhaltens-relevante Signale erhalten (z. B. über Leptin und Ghrelin), wird angenommen, dass es dem Organismus hierdurch ermöglicht wird, sich unter bestimmten Bedingungen dem vom NSC vorgegebenen Zeitraster zu entziehen (vgl. CHOU et al. 2003). – Der Vollständigkeit halber sei erwähnt, dass zwischen NSC und Nucleus arcuatus reziproke Verbindungen bestehen (SAEB-PARSY et al. 2000).

### *8.1 Hypothalamopinealer Trakt (HPT)*

Der vom NSC zur im Epithalamus gelegenen hormonbildenden Zirbeldrüse (Glandula pinealis) ziehende HPT war die erste nachgewiesene, vom NSC ausgehende *Neuronenkette* mit klar definierter Funktion (Abb. 4). Über diese Kette überträgt der NSC seine Rhythmik auf die MEL-Synthese der Zirbeldrüse, die so zu einem bevorzugten circadianen Untersuchungsobjekt wurde. Charakteristisch für die pineale MEL-Rhythmik ist, dass tagsüber äußerst wenig, nachts dagegen viel Hormon gebildet wird (siehe unten). Beidseitige Zerstörung der NSC (MOORE und KLEIN 1974) oder Durchtrennung distaler Anteile des HPT führen zu einem Verschwinden des circadianen MEL-Rhythmus (PERREAU-LENZ et al. 2003). Für eine Regulierung der MEL-Bildung durch den NSC spricht auch, dass beim Fehlen der Uhrengene *Cry1* und *Cry2* der MEL-Rhythmus gestört ist und nächtliche Lichtgabe die MEL-Synthese nicht hemmt (YAMANAKA et al. 2010).

Die Regulierung der Zirbeldrüse durch den NSC ist von besonderer Bedeutung, da pineales MEL auf humoralem Wege auf den NSC zurückwirkt (siehe unten).

Der erste Teil des multisynaptischen HPT verläuft vom NSC zu parvozellulären Neuronen des NPVh, wo die erste Umschaltung erfolgt. Dessen Neurotransmitter sind Glutamat, GABA (BUIJS et al. 1994, HERMES et al. 1996), AVP (KALSBECK et al. 1992) und VIP (KALSBECK et al. 1993b, TECLEMARIAM-MESBAH et al. 1997). Von dort ziehen Oxytocin- und AVP-enhaltende Axone parvozellulärer Neurone (SIMONNEAUX und RIBELAYGA 2003) durch den Hirnstamm zu den Nuclei intermediolaterales medullae spinalis des oberen Thorakalbereichs, wo die zweite Umschaltung erfolgt. Hier setzt sich der HPT durch präganglionäre cholinerge sympathische Fasern fort, die zum Ganglion cervicale superius (GCS) ziehen, wo die dritte synaptische Umschaltung erfolgt. Der vierte und letzte Teil des HPT geht vom GCS aus und besteht aus postganglionären noradrenergen sympathischen Fasern (= Nervus pinealis), die in der Zirbeldrüse enden und dort vor allem nachts ihr Noradrenalin ausschütten (KLEIN 1985, DRIJFHOUT et al. 1996a, b, LARSEN et al. 1998, SIMONNEAUX und RIBELAYGA 2003).

Für die nächtlich gesteigerte MEL-Bildung der Zirbeldrüse sind eine verstärkte elektrische Aktivität des NSC und des nachgeschalteten HPT sowie die damit verbundene gesteigerte Noradrenalinfreisetzung in der Zirbeldrüse verantwortlich. Die lange Zeit bestehende Diskrepanz, dass der die Zirbeldrüse innervierende NSC nachts geringer als tags feuert (siehe oben), die die Zirbeldrüse innervierenden, postganglionären sympathischen Nervenfasern dagegen nachts stimuliert sind, scheint dahingehend geklärt zu sein, dass im NSC elektrisch nachtaktive Neurone vorkommen (siehe oben) und dass es diese sind, die letztlich die Zirbeldrüse nachts

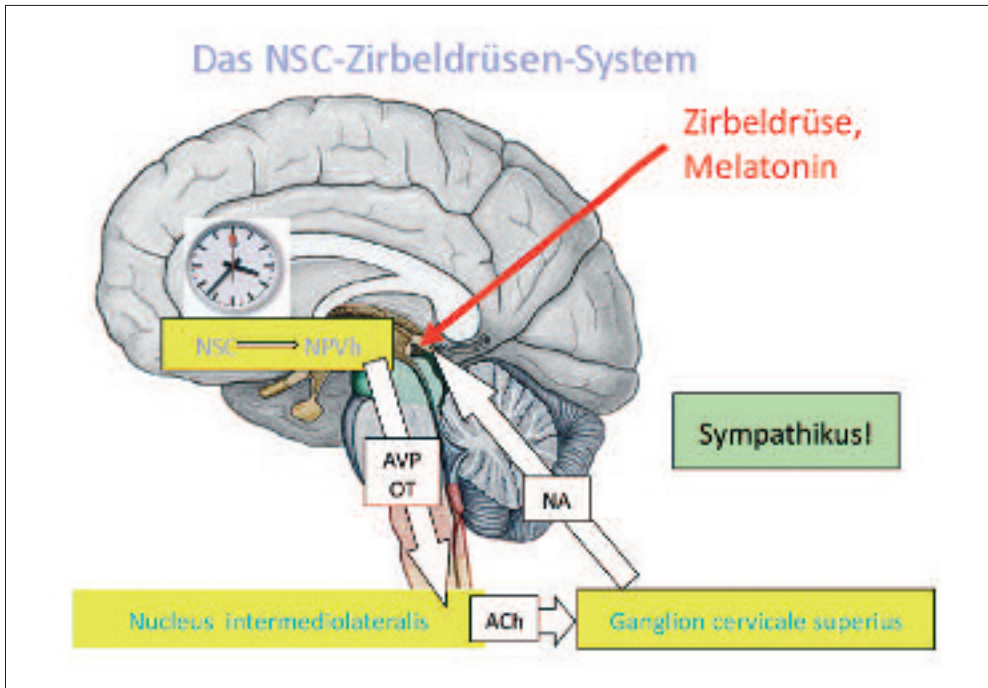


Abb. 4 Schematische Darstellung der multisynaptischen neuronalen Verbindung von Nucleus suprachiasmaticus (NSC) zur zum Epithalamus gehörenden, Melatonin produzierenden Zirbeldrüse. Diese Neuronenkette zieht vom NSC zum Nucleus paraventricularis hypothalami (NPVh) und von dort mit Arginin-Vasopressin (AVP) und Oxytocin (OT) als Neurotransmitter zum Nucleus intermediolateralis der oberen thorakalen Segmente des Rückenmarks. Hier entspringen präganglionäre sympathische Fasern mit Azetylcholin (ACh) als Neurotransmitter und enden im Ganglion cervicale superius. Hier erfolgt die letzte Umschaltung auf postganglionäre sympathische Neurone, die die Zirbeldrüse direkt innervieren und mit ihrem Neurotransmitter Noradrenalin (NA) die Melatoninbildung nachts stimulieren. Unter Verwendung einer Abbildung aus *Sobotta Atlas* 1993.

stimulieren (vgl. KALSBECK et al. 2006). Dass das nächtlich gesteigerte Feuern von NSC- und NPV-Neuronen für die gesteigerte MEL-Bildung wichtig ist, erhellt daraus, dass es nach Ausschalten des Feuerns in diesen Kernen durch TTX in der Nacht zu einer drastischen Abnahme der MEL-Bildung kommt (PERREAU-LENZ et al. 2004).

Während lange Zeit angenommen wurde, dass die MEL-Bildung nur nachts beeinflusst werden kann (z. B. Hemmung durch kurzzeitige Lichtgabe), wurde nun gefunden, dass die MEL-Bildung tagsüber durch Gabe von GABA-Antagonisten stimuliert werden kann (KALSBECK et al. 2000b). Die nächtlich gesteigerte MEL-Bildung kann durch Injektion von AVP oder VIP in den NSC noch verstärkt werden (KALSBECK et al. 1993a).

Lichtverabreichung in der Nacht führt nicht nur zu einer hier nicht näher betrachteten Phasenverschiebung des pinealen MEL-Rhythmus, sondern auch zu einer akuten Hemmung der MEL-Synthese (SIMONNEAUX und RIBELAYGA 2003).

## 8.2 Wirkung von Melatonin auf den NSC

Das Vorkommen von MEL-Bindungsstellen bzw. -Rezeptoren im NSC (REPPERT et al. 1988, WEAVER und REPPERT 1996, Gerdin et al. 2004) und deren Tag/Nacht-Rhythmik (GAUER et al. 1993, 1994, MASANA et al. 2000, POIREL et al. 2002), die tageszeitabhängige Hemmung der elektrischen Aktivität von NSC-Neuronen durch MEL *in vivo* (STEHLE et al. 1989) und *in vitro* (SHIBATA und MOORE 1988) werfen die Frage auf, ob die Zirbeldrüse mit ihrer circadianen MEL-Bildung die Circadianik des NSC und damit des Gesamtkörpers beeinflusst (CASSONE 1990). Es gibt klare Hinweise, dass MEL, zur richtigen Zeit eingenommen oder verabreicht, die „Innere Uhr“ beeinflussen kann. Es kann durch Unterstützung der Rhythmusverschiebung die Jetlag-Symptome mildern und bei vollständig Blinden den freilaufenden circadianen Rhythmus mit dem 24-h-Rhythmus der Umwelt synchronisieren und so das Leben angenehmer gestalten (ARENDE und SKENE 2005). Tierversuche zeigen ebenfalls, dass Phasenverschiebungen oder Rhythmusanpassung durch Gaben von MEL (ARMSTRONG und REDMAN 1985, CASSONE et al. 1986a, b, MCARTHUR et al. 1991, STARKEY 1996, MCARTHUR et al. 1997, SLOTTEN et al. 1999, 2000, 2002, BOTHOREL et al. 2002, DUBOCOVICH et al. 2005) oder MEL-Rezeptoragonisten (RAWASHDEH et al. 2010) erzeugt werden können. MEL-bedingte Phasenverschiebungen laufen über MT2-MEL-Rezeptoren (GERDIN et al. 2004) und NO ab (STARKEY 1996). Weiterhin vermindert MEL-Gabe die Glukoseaufnahme des NSC (CASSONE et al. 1987, 1988), was auf eine allgemein reduzierte neuronale Aktivität hinweist.

Das Entfernen der Zirbeldrüse (= Pinealektomie) und das daraus resultierende weitgehende Verschwinden von MEL aus dem Organismus hat unter normalen Bedingungen relativ wenig Einfluss auf den NSC (CHEUNG und MCCORMACK 1982, REDLIN und LYNCH 1997, DUNCAN 1998). Anders ist die Situation, wenn z. B. in Dauerlicht gehaltene Tiere pinealektomiert werden. Dann kann dies zu einer Dissoziierung des circadianen und zum Auftreten einer ultradianen Rhythmik der lokomotorischen Aktivität führen (CASSONE 1992).

## 8.3 NSC-Nebennieren-Projektion

Retrograde Markierungsstudien haben gezeigt, dass vom NSC, ähnlich wie bei der Zirbeldrüse, eine multisynaptische Bahn zur Hormon-produzierenden Nebennierenrinde (NNR) zieht (BUIJS et al. 1999). Hierbei handelt es sich um VIP- und AVP-haltige Nervenfasern, die zum vegetativen Anteil des NPVh ziehen, hier auf oxytocinerge, zum Nucleus intermediolateralis spinalis ziehende Fasern umschalten, wo sie nach erneuter Umschaltung als präganglionäre sympathische Nervi splanchnici die NNR erreichen. Über diesen Weg führt Lichtgabe zu einer vom Adrenocorticotropen Hormon (ACTH)-unabhängigen Abnahme des Corticosterongehalts der NNR (BUIJS et al. 1999, ISHIDA et al. 2005). Somit wird die NNR von zwei Systemen reguliert: dem Corticotropinreleasinghormon (CRH)- und ACTH-verwendenden hypothalamo-adenohypophysären System unter Einschaltung der Eminentia mediana und dem portalen Gefäßsystem der Hypophyse sowie der hier geschilderten neuronalen NSC-NNR-Projektion. Diese neuronale Verbindung steigert die Empfindlichkeit der NNR auf ACTH (ULRICH-LAI et al. 2006).

#### 8.4 NSC-Leber-Projektionen

Ähnlich wie bei Zirbeldrüse und NNR sind auch für die Leber vom NSC ausgehende präsympathische Neurone nachgewiesen worden (KALSBECK et al. 2004). Über zentrale GABAerge Mechanismen obliegt ihnen die dem Aufwachen vorausgehende Glukosemobilisation in der Leber, die zu einer Erhöhung des Blutzuckerspiegels führt und so dem Organismus die für Tagesaktivitäten benötigte schnell verwertbare Energie zuführt. Die Glukosemobilisation in den Morgenstunden kommt dadurch zustande, dass, Uhren-gesteuert, der GABAerge Einfluss auf die präsympathischen Neurone nachlässt und so die sympathischen Neurone stimuliert werden. Obwohl auch der Parasympathikus von speziellen NSC-Neuronen gesteuert wird (siehe unten) und die Leber innerviert, ist dieser nicht an der Glukosemobilisation beteiligt (KALSBECK et al. 2004).

#### 8.5 Der NSC als Ursprungsort präparasympathischer Nervenfasern

Die hier für das sympathische Nervensystem geschilderten Befunde treffen im Prinzip auch für das parasympathische Nervensystem zu (BUIJS et al. 2003). Auch hier entspringen präparasympathische Neurone im NSC in der Region, in der AVP-Neurone gehäuft vorkommen, projizieren zum NPVh und von dort zu Neuronen des Nucleus posterior (dorsalis) nervi vagi. Wie die präsympathischen im NSC entspringenden Neurone enthalten sie AVP und 30 % von ihnen GABA.

Aufgrund der Tatsache, dass präsympathische und präparasympathische Neurone im NSC klar getrennt voneinander existieren, bestehen offenbar exzellente Möglichkeiten für NSC-Uhrenneurone, die prävegetativen Neurone zeitlich unterschiedlich zu stimulieren und zu hemmen und so die Tagaktivität des Sympathikus und die Nachtaktivität des Parasympathikus zu steuern.

#### 8.6 Projektionen des NSC zu Hormon-bildenden Neuronen des Hypothalamus

Als letztes soll kurz auf funktionelle Beziehungen des NSC zu den verschiedenen im Hypothalamus gebildeten Hormonen eingegangen werden. Von den beiden in magnozellulären NPVh- und NSO-Neuronen synthetisierten Hormonen Oxytocin und antidiuretisches AVP weist beim Menschen lediglich AVP einen ausgeprägten circadianen Rhythmus mit erhöhten Nachtwerten auf (LANDGRAF et al. 1982), wodurch die nächtliche Urinproduktion vermindert ist. Vom NSC zu NSO und NPV ziehende Neurone sind morphologisch nachgewiesen (BERK und FINKELSTEIN 1981, WATTS und SWANSON 1987, WATTS et al. 1987) und elektrophysiologisch als inhibitorische (GABAerge) und exzitatorische (glutamaterge) Neurone identifiziert worden (HERMES et al. 1996, CUI et al. 1997). *In vitro* kann die circadiane Rhythmik von NPV-Neuronen durch AVP induziert und durch AVP-Rezeptorantagonisten zum Erliegen gebracht werden. Wird jedoch von einem intakten NSC-NPV-Präparat in Gegenwart eines AVP-Rezeptorantagonisten abgeleitet, so bleibt die NPV-Circadianik erhalten, was nach Ansicht der Autoren dafür spricht, dass das elektrische Signal der NSC-Neurone offenbar stärker als deren humorales AVP-Signal ist (TOUSSON und MEISSL 2004).

Die für den circadianen Rhythmus der Hypophysenvorderlappen-NNR(HVL-NNR)-Achse wichtigen ca. 2000 CRH-Neurone (SWANSON et al. 1983) liegen in den medialen und dorsalen parvozellulären Subnuklei des NPVh und werden von einem kleinen Kontingent von NSC-

Axonen direkt innerviert, während der größte Teil der zum NPVh projizierenden NSC-Fasern bereits unterhalb des NPVh, im sogenannten Subnukleus des NPVh endet (VRANG et al. 1995a). Wie Tracerstudien vermuten lassen, haben die zu den CRH-Neuronen projizierenden NSC-Neurone ihren Ursprung im dmNSC, während die im NPVh-Subnukleus endenden NSC-Axone dem vNSC entstammen (VRANG et al. 1995b). Die Bedeutung des NSC für die HVL-NNR-Achse wird daran deutlich, dass dessen Zerstörung den circadianen Rhythmus des Corticosterongehalts zum Verschwinden bringt (MOORE und EICHLER 1972, SZAFARCZYK et al. 1981, WATANABE und HIROSHIGE 1981, FILIPSKI et al. 2002). An der circadianen Regulation der HVL-NNR-Achse sind verschiedene Neurotransmitter beteiligt (KALSBECK und BUIJS 2002). Für die während der Ruhephase verminderte Aktivität der HVL-NNR-Achse sind bei nachaktiven Tieren offenbar AVP-NSC-Neurone verantwortlich, da sie, wie Läsionen des NSC und AVP-Depletion des NSC zeigen, einen hemmenden Einfluss auf die HVL-NNR-Achse haben (BUIJS et al. 1993, GOMEZ et al. 1997). Beim tagaktiven Nager *Arvicanthis ansorgei* stimuliert AVP dagegen die Corticosteronbildung (KALSBECK et al. 2008). In der zweiten Hälfte der Ruhephase bis zum Anfang der Aktivitätsphase kommt es bei Ratten trotz Verabreichung eines AVP-Rezeptorantagonisten zu einer Aktivierung der HVL-NNR-Achse, woraus geschlossen wurde, dass nun andere, stimulierende Neurotransmitter wie z. B. VIP, GRP oder Neuromedin U in Aktion treten (KALSBECK et al. 2006). An der circadianen Regulierung der HVL-NNR-Achse sind der zwischen NSC und NPVh eingeschaltete Nucleus dorsomedialis hypothalami und dessen inhibitorischen GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren beteiligt (KALSBECK et al. 1996, KEIM und SHEKHAR 1996, CHOU et al. 2003). GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren sind auch im NPVh nachgewiesen worden (CULLINAN 2000), wo GABA die CRH-Freisetzung *in vitro* hemmt (CALOGERO et al. 1988).

Die für die Schilddrüsenfunktion wichtigen *Thyrotropin Releasing Hormone*(TRH)-Neurone, in medial und periventriculär gelegenen kleinzelligen Bereichen des NPVh lokalisiert, werden nicht in erster Linie vom NSC aus innerviert (LECHAN und FEKETE 2006). Für die Existenz einer funktionell wichtigen Verbindung zwischen NSC und TRH-Zellen spricht u. a., dass Läsionen des NSC die Schilddrüsenfunktion beeinträchtigen (ABE et al. 1979, PESCHKE et al. 1989, KALSBECK et al. 2000a). Diese Verbindung könnte durch VIPerge NSC-Neurone verkörpert werden, da diese TRH-Neurone im NPVh innervieren (KALSBECK et al. 2000a). Beim Menschen wurden TRH-Neurone auch innerhalb des NSC gefunden (FLIERS et al. 1994, 1998). Wie für Leber und NNR beschrieben, bestehen zwischen NSC und Schilddrüse auch Verbindungen über das autonome Nervensystem (KALSBECK et al. 2000a).

Die für eine normale Fortpflanzung unerlässlichen, *Gonadotropin Releasing Hormone* (GnRH oder LHRH)-synthetisierenden, verstreut in der Area praeoptica hypothalami liegenden Perikarya stellen ihre zyklische GnRH-Freisetzung nach NSC-Läsionen (BROWN-GRANT und RAISMAN 1977, GRAY et al. 1978, KAWAKAMI et al. 1980, WIEGAND und TERASAWA 1982) oder VIP-Depletion des NSC ein (GERHOLD et al. 2005). Für eine Beteiligung von VIP an der GnRH-Regulation spricht auch, dass GnRH-Neurone von VIPergen Fasern aus dem NSC innerviert werden (VAN DER BEEK et al. 1993, HORVATH et al. 1998, KRAJNAK et al. 2001), VIP-Rezeptoren besitzen (SMITH et al. 2000) und durch VIP elektrophysiologisch stimuliert werden (CHRISTIAN und MOENTER 2008). Kokulturen von NSC-Gewebe und GnRH enthaltendem Hypothalamusgewebe zeigen allerdings, dass VIP-Freisetzung, im Gegensatz zu AVP, nicht mit der GnRH-Sekretion parallel läuft (FUNABASHI et al. 2000). Gegen eine Rolle von VIP und für AVP spricht, dass AVP, nicht aber VIP, die GnRH-Sekretion steigert (FUNABASHI et al. 2000). Klar ist, dass die Beeinflussung der GnRH-Neurone durch den NSC neuronal und nicht



humoral erfolgt (DE LA IGLESIA et al. 2003). Im Hinblick darauf, dass die Entfernung der Keimdrüsen (Gonadektomie) und der damit verbundene Ausfall der Keimdrüsenhormone circadiane Effekte nach sich zieht, die sich nach Keimdrüsenhormongaben wieder normalisieren (KARATSOREOS et al. 2007), war naheliegend, nach Rückkoppelungsmechanismen auf den NSC zu fahnden. Für einen Feedback von GnRH auf den NSC scheint zu sprechen, dass GnRH-Axone im NSC im Bereich der VIP- und AVP-Neurone synaptisch enden (VAN DER BEEK et al. 1997). Bei weiblichen Tieren erhöht Estradiolverabreichung unter bestimmten experimentellen Bedingungen die Menge der Transkriptionsfaktoren FOS und pCREB im NSC (ABIZAID et al. 2004). Estrogenrezeptoren (ER $\alpha$  und ER $\beta$ ) sind bei Mäusen im dmNSC in Neuronen nachgewiesen worden, die teilweise CalB, CalR und AVP enthalten. Nach Estrogengaben nimmt die Nachweisbarkeit der ER $\beta$ -Neurone ab (VIDA et al. 2008). Bei männlichen Tieren bilden Androgenrezeptor-haltige GRP-Neurone einen dichten Plexus im vNSC, dessen Fasern den NSC nach dorsal verlassen. Die in diesen Zellen nach Lichtgabe verstärkt erfolgende FOS-Bildung wird durch Gonadektomie vermindert und durch Androgengabe wieder normalisiert (KARATSOREOS et al. 2007). Androgengabe normalisiert auch den bei männlichen Tieren durch Gonadektomie hervorgerufenen, stark verminderten lokomotorischen Aktivitätsschub zu Beginn der Dunkelphase (IWAHANA et al. 2008). Im Hinblick auf die besondere Bedeutung von KiSSpeptin und KiSSpeptin-haltigen Neuronen für die GnRH-Sekretion (POPA et al. 2005, 2008, KAUFFMAN et al. 2007) verdient Beachtung, dass KiSSpeptin-Neurone von NSC-AVP-Neuronen innerviert werden (VIDA et al. 2010), die im Hypothalamus reichlich vorkommenden KiSSpeptin-Fasern den NSC aber aussparen. KiSSpeptin-Perikarya sind im NSC offenbar nicht vorhanden, kommen jedoch verstreut in dem mit dem NSC gekoppelten DMH vor (BODEN und KENNAWAY 2006, CLARKSON et al. 2009). Für zusammenfassende Darstellungen von neuronalen Mechanismen bei der Fortpflanzung siehe SMITH und JENNES (2001), BODEN und KENNAWAY (2006).

Obwohl die von SS- und GHRH-haltigen hypothalamischen Neuronen gesteuerte Sekretion des Wachstumshormons circadiane und ausgeprägte ultradiane Rhythmen aufweist, finden sich praktisch keinerlei Hinweise auf funktionelle Beziehungen zwischen NSC und diesen Neuronen (MULLER et al. 1999, FODOR et al. 2006). Ob die im NSC vorkommenden SS-haltigen Neurone (siehe oben) die Wachstumshormonsekretion beeinflussen, bleibt abzuklären.

## 9. Abschließende Bemerkungen

Zum richtigen Verständnis von Funktionsweise und Bedeutung des NSC als circadianem Hauptoszillator soll zusammenfassend noch einmal auf zwei Aspekte hingewiesen werden. Es steht jetzt außer Frage, dass der als „Innere Uhr“ apostrophierte Hauptoszillator nicht aus einer einzigen, sondern aus etlichen „Inneren Uhren“ besteht. Im Prinzip stellt die Mehrzahl aller NSC-Nervenzellen jeweils einen einzelligen circadianen Oszillator dar. Daneben gibt es aber auch nicht-circadiane Nervenzellen, die nur ca. 5 Stunden und zu unterschiedlichen Tages- und Nachtzeiten in Aktion treten (SCHAAP et al. 2003). Möglicherweise abhängig von der Größe ihres „Einflussbereiches“, schließt sich eine unterschiedliche Anzahl von NSC-Nervenzellen zu zeitlich genau synchronisierten Zellpopulationen zusammen. Unterschiedliche und zu unterschiedlichen Zeitpunkten anfallende Aufgaben erfordern zeitlich unterschiedlich programmierte NSC-Neuronpopulationen. KALSBECK und Mitarbeiter (KALSBECK et al. 2006)

unterscheiden aufgrund von elektrophysiologischen Befunden wenigstens vier Gruppen von NSC-Neuronen mit zeitlich unterschiedlichen Akrophasen und Funktionen: Population 1 (Akrophase um ~ZT 2, zwei Stunden nach Lichtbeginn) ist durch AVP und GABA charakterisiert und hemmt die Corticosteronfreisetzung der NNR und die Glukoseproduktion in der Leber. Die wahrscheinlich größte Population 2 (Akrophase um ~ZT 6) soll, wenigstens teilweise, über GABA die MEL-Bildung während der Hellphase hemmen. Population 3 (Akrophase um ~ZT 10) soll, mit noch unbekanntem Neurotransmitter, die HVL-NNR zum Zeitpunkt der maximalen Aktivität stimulieren. Die vor allem in der Dunkelphase aktive Population 4 (Akrophase um ~ZT 18), von der einige Zellen Glutamat enthalten, ist für die nächtlich gesteigerte MEL-Produktion verantwortlich. Wie auch die Existenz von separaten präsympathischen und präparasympathischen Neuronen im NSC zeigt (BUIJS et al. 2003), scheint der Hauptoszillator vollständig „durchstrukturiert“ zu sein und, was dessen Zielorgane angeht, aus einem Mosaik funktionell unterschiedlicher NSC-Neurone zu bestehen. Ziel künftiger Studien wird es daher sicher sein, in wenigen ausgewählten Spezies die Ursprungszellen für bestimmte Funktionsbereiche im NSC zu lokalisieren und morphologisch, biochemisch und elektrophysiologisch zu charakterisieren.

Der zweite zu betonende Aspekt ist quasi eine Antwort auf eine mich als jungen Medizinstudenten in der Anatomie beschäftigende Frage, wo denn der Sympathikus seine Fortsetzung im Gehirn habe. Aufgrund der Untersuchungen des circadianen Hauptoszillators wissen wir jetzt, dass dem Sympathikus und dem Parasympathikus vom NSC ausgehende Neurone vorgeschaltet sind und das periphere autonome Nervensystem damit zeitliche Informationen gleichsam „aus erster Hand“ erhält, um seinen Tonus tageszeitgerecht anzupassen. Man könnte daher das periphere autonome Nervensystem als „verlängerten Arm“ des circadianen Hauptoszillators ansehen. Dadurch, dass der NSC wichtige Funktionen des endokrinen Systems reguliert, trägt er entscheidend zur humoralen Informationsweitergabe im Organismus bei. Über die nun nachgewiesene „Rekrutierung“ des peripheren autonomen Nervensystems erweitert der NSC seine Einflussnahme auf periphere Organe erheblich über neuronale Wege (vgl. BARTNESS et al. 2001).

## *Literatur*

- ABE, H., HONMA, S., NAMIHIRA, M., TANAHASHI, Y., IKEDA, M., and HONMA, K.: Circadian rhythm and light responsiveness of BMAL1 expression, a partner of mammalian clock gene clock, in the suprachiasmatic nucleus of rats. *Neuroscience Lett.* 258, 93–96 (1998)
- ABE, H., HONMA, S., SHINOHARA, K., and HONMA, K.: Substance P receptor regulates the photic induction of Fos-like protein in the suprachiasmatic nucleus of Syrian hamsters. *Brain Res.* 708, 135–142 (1996)
- ABE, K., KRONING, J., GREER, M. A., and CRITCHLOW, V.: Effects of destruction of the suprachiasmatic nuclei on the circadian rhythms in plasma corticosterone, body temperature, feeding and plasma thyrotropin. *Neuroendocrinology* 29, 119–131 (1979)
- ABIZAID, A., MEZEI, G., and HORVATH, T. L.: Estradiol enhances light-induced expression of transcription factors in the SCN. *Brain Res.* 1010, 35–44 (2004)
- ABRAHAMSON, E. E., and MOORE, R. Y.: Suprachiasmatic nucleus in the mouse: retinal innervation, intrinsic organization and efferent projections. *Brain Res.* 916, 172–191 (2001)
- AGGELOPOULOS, N. C., and MEISSEL, H.: Responses of neurones of the rat suprachiasmatic nucleus to retinal illumination under photopic and scotopic conditions. *J. Physiol.* 523 Pt 1, 211–222 (2000)
- AGOSTINO, P. V., FERREYRA, G. A., MURAD, A. D., WATANABE, Y., and GOLOMBEK, D. A.: Diurnal, circadian and photic regulation of calcium/calmodulin-dependent kinase II and neuronal nitric oxide synthase in the hamster suprachiasmatic nuclei. *Neurochem. Int.* 44, 617–625 (2004)

- AGOSTINO, P. V., PLANO, S. A., and GOLOMBEK, D. A.: Circadian and pharmacological regulation of casein kinase I in the hamster suprachiasmatic nucleus. *J. Genet.* 87, 467–471 (2008)
- AGUILAR-ROBLERO, R., GARCIA-HERNANDEZ, F., AGUILAR, R., ARANKOWSKY-SANDOVAL, G., and DRUCKER-COLIN, R.: Suprachiasmatic nucleus transplants function as an endogenous oscillator only in constant darkness. *Neuroscience Lett.* 69, 47–52 (1986)
- AGUILAR-ROBLERO, R., VERDUZCO-CARBAJAL, L., RODRIGUEZ, C., MENDEZ-FRANCO, J., MORAN, J., and DE LA MORA, M. P.: Circadian rhythmicity in the GABAergic system in the suprachiasmatic nuclei of the rat. *Neuroscience Lett.* 157, 199–202 (1993)
- AIDA, R., MORIYA, T., ARAKI, M., AKIYAMA, M., WADA, K., WADA, E., and SHIBATA, S.: Gastrin-releasing peptide mediates photic entrainable signals to dorsal subsets of suprachiasmatic nucleus via induction of Period gene in mice. *Mol. Pharmacol.* 61, 26–34 (2002)
- AIOUN, J., CHAMBILLE, I., PEYTEVIN, J., and MARTINET, L.: Neurons containing gastrin-releasing peptide and vasoactive intestinal polypeptide are involved in the reception of the photic signal in the suprachiasmatic nucleus of the Syrian hamster: an immunocytochemical ultrastructural study. *Cell Tissue Res.* 291, 239–253 (1998)
- ALBERS, H. E., GILLESPIE, C. F., BABAGBEMI, T. O., and HUHMANN, K. L.: Analysis of the phase shifting effects of gastrin releasing peptide when microinjected into the suprachiasmatic region. *Neuroscience Lett.* 191, 63–66 (1995)
- ALBRECHT, U.: Invited review: regulation of mammalian circadian clock genes. *J. Appl. Physiol.* 92, 1348–1355 (2002)
- ALBRECHT, U.: Circadian clocks in mood-related behaviors. *Annals Medicine* 42, 241–251 (2010)
- ALBUS, H., VANSTEENSEL, M. J., MICHEL, S., BLOCK, G. D., and MEIJER, J. H.: A GABAergic mechanism is necessary for coupling dissociable ventral and dorsal regional oscillators within the circadian clock. *Curr. Biol.* 15, 886–893 (2005)
- AMIR, S.: Blocking NMDA receptors or nitric oxide production disrupts light transmission to the suprachiasmatic nucleus. *Brain Res.* 586, 336–339 (1992)
- AMIR, S., and EDELSTEIN, K.: A blocker of nitric oxide synthase, NG-nitro-L-arginine methyl ester, attenuates light-induced Fos protein expression in rat suprachiasmatic nucleus. *Neuroscience Lett.* 224, 29–32 (1997)
- AMIR, S., and ROBINSON, B.: Ultraviolet light entrains rodent suprachiasmatic nucleus pacemaker. *Neuroscience* 69, 1005–1011 (1995)
- ANDRADE, J. P., PEREIRA, P. A., SILVA, S. M., SA, S. I., and LUKOYANOV, N. V.: Timed hypocaloric food restriction alters the synthesis and expression of vasopressin and vasoactive intestinal peptide in the suprachiasmatic nucleus. *Brain Res.* 1022, 226–233 (2004)
- ANGELES-CASTELLANOS, M., SALGADO-DELGADO, R., RODRIGUEZ, K., BUIJS, R. M., and ESCOBAR, C.: The suprachiasmatic nucleus participates in food entrainment: a lesion study. *Neuroscience* 165, 1115–1126 (2010)
- ANTLE, M. C., SMITH, V. M., STERNICZUK, R., YAMAKAWA, G. R., and RAKAI, B. D.: Physiological responses of the circadian clock to acute light exposure at night. *Rev. Endocr. Metab. Disord.* 10, 279–291 (2009)
- ARENDT, J., and SKENE, D. J.: Melatonin as a chronobiotic. *Sleep Med. Rev.* 9, 25–39 (2005)
- ARMSTRONG, S. M., and REDMAN, J.: Melatonin administration: effects on rodent circadian rhythms. *Ciba Found. Symp.* 117, 188–207 (1985)
- ASCHOFF, J., and WEVER, R.: Spontanperiodik des Menschen bei Ausschluß aller Zeitgeber. *Naturwissenschaften* 49, 337–342 (1962)
- ATON, S. J., COLWELL, C. S., HARMAR, A. J., WASCHEK, J., and HERZOG, E. D.: Vasoactive intestinal polypeptide mediates circadian rhythmicity and synchrony in mammalian clock neurons. *Nature Neuroscience* 8, 476–483 (2005)
- ATON, S. J., HUETTNER, J. E., STRAUME, M., and HERZOG, E. D.: GABA and Gi/o differentially control circadian rhythms and synchrony in clock neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103, 19188–19193 (2006)
- BAE, K., JIN, X., MAYWOOD, E. S., HASTINGS, M. H., REPPERT, S. M., and WEAVER, D. R.: Differential functions of mPer1, mPer2, and mPer3 in the SCN circadian clock. *Neuron* 30, 525–536 (2001)
- BARTNESS, T. J., SONG, C. K., and DEMAS, G. E.: SCN efferents to peripheral tissues: implications for biological rhythms. *J. Biol. Rhythms* 16, 196–204 (2001)
- BECQUET, D., GIRARDET, C., GUILLAUMOND, F., FRANCOIS-BELLAN, A. M., and BOSLER, O.: Ultrastructural plasticity in the rat suprachiasmatic nucleus. Possible involvement in clock entrainment. *Glia* 56, 294–305 (2008)
- BERK, M. L., and FINKELSTEIN, J. A.: Afferent projections to the preoptic area and hypothalamic regions in the rat brain. *Neuroscience* 6, 1601–1624 (1981)
- BEST, J. D., MAYWOOD, E. S., SMITH, K. L., and HASTINGS, M. H.: Rapid resetting of the mammalian circadian clock. *J. Neuroscience* 19, 828–835 (1999)
- BIGGS, K. R., and PROSSER, R. A.: Neuropeptide Y blocks GABAB-induced phase-shifts of the suprachiasmatic circadian clock in vitro. *Brain Res.* 821, 461–466 (1999)

- BLASIAK, A., BLASIAK, T., and LEWANDOWSKI, M. H.: Electrophysiology and pharmacology of the optic input to the rat intergeniculate leaflet in vitro. *J. Physiol. Pharmacol.* *60*, 171–180 (2009)
- BLASIAK, A., PEKALA, D., and LEWANDOWSKI, M. H.: The responsiveness of the rat intergeniculate leaflet neurons to glutamatergic agonists. *J. Physiol. Pharmacol.* *58*, 669–681 (2007)
- BLASIAK, T., and LEWANDOWSKI, M. H.: Dorsal raphe nucleus modulates neuronal activity in rat intergeniculate leaflet. *Behav. Brain Res.* *138*, 179–185 (2003)
- BODEN, M. J., and KENNAWAY, D. J.: Circadian rhythms and reproduction. *Reproduction* *132*, 379–392 (2006)
- BOS, N. P., and MIRMIRAN, M.: Effects of excitatory and inhibitory amino acids on neuronal discharges in the cultured suprachiasmatic nucleus. *Brain Res. Bull.* *31*, 67–72 (1993)
- BOTHOREL, B., BARASSIN, S., SABOUREAU, M., PERREAU, S., VIVIEN-ROELS, B., MALAN, A., and PEVET, P.: In the rat, exogenous melatonin increases the amplitude of pineal melatonin secretion by a direct action on the circadian clock. *Eur. J. Neuroscience* *16*, 1090–1098 (2002)
- BREWER, J. M., YANNIELLI, P. C., and HARRINGTON, M. E.: Neuropeptide Y differentially suppresses per1 and per2 mRNA induced by light in the suprachiasmatic nuclei of the golden hamster. *J. Biol. Rhythms* *17*, 28–39 (2002)
- BROWN-GRANT, K., and RAISMAN, G.: Abnormalities in reproductive function associated with the destruction of the suprachiasmatic nuclei in female rats. *Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Science* *198*, 279–296 (1977)
- BROWN, T. M., COLWELL, C. S., WASCHEK, J. A., and PIGGINS, H. D.: Disrupted neuronal activity rhythms in the suprachiasmatic nuclei of vasoactive intestinal polypeptide-deficient mice. *J. Neurophysiol.* *97*, 2553–2558 (2007)
- BROWN, T. M., HUGHES, A. T., and PIGGINS, H. D.: Gastrin-releasing peptide promotes suprachiasmatic nuclei cellular rhythmicity in the absence of vasoactive intestinal polypeptide-VPAC2 receptor signaling. *J. Neuroscience* *25*, 11155–11164 (2005)
- BROWN, T. M., and PIGGINS, H. D.: Electrophysiology of the suprachiasmatic circadian clock. *Prog. Neurobiol.* *82*, 229–255 (2007)
- BROWN, T. M., and PIGGINS, H. D.: Spatiotemporal heterogeneity in the electrical activity of suprachiasmatic nuclei neurons and their response to photoperiod. *J. Biol. Rhythms* *24*, 44–54 (2009)
- BRYANT, D. N., LE SAUTER, J., SILVER, R., and ROMERO, M. T.: Retinal innervation of calbindin-D28K cells in the hamster suprachiasmatic nucleus: ultrastructural characterization. *J. Biol. Rhythms* *15*, 103–111 (2000)
- BUIJS, R. M., HOU, Y. X., SHINN, S., and RENAUD, L. P.: Ultrastructural evidence for intra- and extranuclear projections of GABAergic neurons of the suprachiasmatic nucleus. *J. Comp. Neurol.* *340*, 381–391 (1994)
- BUIJS, R. M., KALSBECK, A., VAN DER WOUDE, T. P., VAN HEERIKHUIZE, J. J., and SHINN, S.: Suprachiasmatic nucleus lesion increases corticosterone secretion. *Amer. J. Physiol.* *264*, R1186–1192 (1993)
- BUIJS, R. M., LA FLEUR, S. E., WORTEL, J., VAN HEYNINGEN, C., ZUIDDAM, L., METTENLEITER, T. C., KALSBECK, A., NAGAI, K., and NIJIMA, A.: The suprachiasmatic nucleus balances sympathetic and parasympathetic output to peripheral organs through separate preautonomic neurons. *J. Comp. Neurol.* *464*, 36–48 (2003)
- BUIJS, R. M., SCHEER, F. A., KREIER, F., YI, C., BOS, N., GONCHARUK, V. D., and KALSBECK, A.: Organization of circadian functions: interaction with the body. *Prog. Brain Res.* *153*, 341–360 (2006)
- BUIJS, R. M., WORTEL, J., VAN HEERIKHUIZE, J. J., FEENSTRA, M. G., TER HORST, G. J., ROMIJN, H. J., and KALSBECK, A.: Anatomical and functional demonstration of a multisynaptic suprachiasmatic nucleus adrenal (cortex) pathway. *Eur. J. Neuroscience* *11*, 1535–1544 (1999)
- BUNGER, M. K., WILSBACHER, L. D., MORAN, S. M., CLENDENIN, C., RADCLIFFE, L. A., HOGENESCH, J. B., SIMON, M. C., TAKAHASHI, J. S., and BRADFIELD, C. A.: Mop3 is an essential component of the master circadian pacemaker in mammals. *Cell* *103*, 1009–1017 (2000)
- BYKU, M., and GANNON, R. L.: Opioid induced non-photic phase shifts of hamster circadian activity rhythms. *Brain Res.* *873*, 189–196 (2000a)
- BYKU, M., and GANNON, R. L.: SNC 80, a delta-opioid agonist, elicits phase advances in hamster circadian activity rhythms. *Neuroreport* *11*, 1449–1452 (2000b)
- BYKU, M., LEGUTKO, R., and GANNON, R. L.: Distribution of delta opioid receptor immunoreactivity in the hamster suprachiasmatic nucleus and intergeniculate leaflet. *Brain Res.* *857*, 1–7 (2000)
- CAGAMPANG, F. R., SHEWARD, W. J., HARMAR, A. J., PIGGINS, H. D., and COEN, C. W.: Circadian changes in the expression of vasoactive intestinal peptide 2 receptor mRNA in the rat suprachiasmatic nuclei. *Brain Res. Mol. Brain Res.* *54*, 108–112 (1998)
- CAGAMPANG, F. R., YANG, J., NAKAYAMA, Y., FUKUHARA, C., and INOUE, S. T.: Circadian variation of arginine-vasopressin messenger RNA in the rat suprachiasmatic nucleus. *Brain Res. Mol. Brain Res.* *24*, 179–184 (1994)
- CAILLOL, M., DEVINOY, E., LACROIX, M. C., and SCHIRAR, A.: Endothelial and neuronal nitric oxide synthases are present in the suprachiasmatic nuclei of Syrian hamsters and rats. *Eur. J. Neuroscience* *12*, 649–661 (2000)

- CALOGERO, A. E., GALLUCCI, W. T., CHROUSOS, G. P., and GOLD, P. W.: Interaction between GABAergic neurotransmission and rat hypothalamic corticotropin-releasing hormone secretion in vitro. *Brain Res.* 463, 28–36 (1988)
- CARD, J. P., BRECHA, N., KARTEN, H. J., and MOORE, R. Y.: Immunocytochemical localization of vasoactive intestinal polypeptide-containing cells and processes in the suprachiasmatic nucleus of the rat: light and electron microscopic analysis. *J. Neuroscience* 1, 1289–1303 (1981)
- CARD, J. P., and MOORE, R. Y.: Neuropeptide Y localization in the rat suprachiasmatic nucleus and periventricular hypothalamus. *Neuroscience Lett.* 88, 241–246 (1988)
- CARD, J. P., and MOORE, R. Y.: Organization of lateral geniculate-hypothalamic connections in the rat. *J. Comp. Neurol.* 284, 135–147 (1989)
- CASSONE, V. M.: Effects of melatonin on vertebrate circadian systems. *Trends Neuroscience* 13, 457–464 (1990)
- CASSONE, V. M.: The pineal gland influences rat circadian activity rhythms in constant light. *J. Biol. Rhythms* 7, 27–40 (1992)
- CASSONE, V. M., CHESWORTH, M. J., and ARMSTRONG, S. M.: Entrainment of rat circadian rhythms by daily injection of melatonin depends upon the hypothalamic suprachiasmatic nuclei. *Physiol. Behav.* 36, 1111–1121 (1986a)
- CASSONE, V. M., CHESWORTH, M. J., and ARMSTRONG, S. M.: Dose-dependent entrainment of rat circadian rhythms by daily injection of melatonin. *J. Biol. Rhythms* 1, 219–229 (1986b)
- CASSONE, V. M., ROBERTS, M. H., and MOORE, R. Y.: Melatonin inhibits metabolic activity in the rat suprachiasmatic nuclei. *Neuroscience Lett.* 81, 29–34 (1987)
- CASSONE, V. M., ROBERTS, M. H., and MOORE, R. Y.: Effects of melatonin on 2-deoxy-[1-14C]glucose uptake within rat suprachiasmatic nucleus. *Amer. J. Physiol.* 255, R332–337 (1988)
- CASTEL, M., BELENKY, M., COHEN, S., WAGNER, S., and SCHWARTZ, W. J.: Light-induced c-Fos expression in the mouse suprachiasmatic nucleus: immunoelectron microscopy reveals co-localization in multiple cell types. *Eur. J. Neuroscience* 9, 1950–1960 (1997)
- CASTEL, M., MORRIS, J., and BELENKY, M.: Non-synaptic and dendritic exocytosis from dense-cored vesicles in the suprachiasmatic nucleus. *Neuroreport* 7, 543–547 (1996)
- CASTEL, M., and MORRIS, J. F.: Morphological heterogeneity of the GABAergic network in the suprachiasmatic nucleus, the brain's circadian pacemaker. *J. Anat.* 196 (Pt. 1), 1–13 (2000)
- CAVALCANTE, J. S., BRITTO, L. R., TOLEDO, C. A., NASCIMENTO, E. S., JR., LIMA, R. R., PONTES, A. L., and COSTA, M. S.: Calcium-binding proteins in the circadian centers of the common marmoset (*Callithrix jacchus*) and the rock cavy (*Kerodon rupestris*) brains. *Brain Res. Bull.* 76, 354–360 (2008)
- CAYETANOT, F., DEPREZ, J., and AUJARD, F.: Calbindin D28K protein cells in a primate suprachiasmatic nucleus: localization, daily rhythm and age-related changes. *Eur. J. Neuroscience* 26, 2025–2032 (2007)
- CHALLET, E.: Minireview: Entrainment of the suprachiasmatic clockwork in diurnal and nocturnal mammals. *Endocrinology* 148, 5648–5655 (2007)
- CHEN, D., HURST, W. J., DING, J. M., FAIMAN, L. E., MAYER, B., and GILLETTE, M. U.: Localization and characterization of nitric oxide synthase in the rat suprachiasmatic nucleus: evidence for a nitrergic plexus in the biological clock. *J. Neurochem.* 68, 855–861 (1997)
- CHENG, M. Y., BITTMAN, E. L., HATTAR, S., and ZHOU, Q. Y.: Regulation of prokineticin 2 expression by light and the circadian clock. *BMC Neuroscience* 6, 6–17 (2005)
- CHENG, M. Y., BULLOCK, C. M., LI, C., LEE, A. G., BERMAK, J. C., BELLUZZI, J., WEAVER, D. R., LESLIE, F. M., and ZHOU, Q. Y.: Prokineticin 2 transmits the behavioural circadian rhythm of the suprachiasmatic nucleus. *Nature* 417, 405–410 (2002)
- CHEUNG, P. W., and McCORMACK, C. E.: Failure of pinealectomy or melatonin to alter circadian activity rhythm of the rat. *Amer. J. Physiol.* 242, R261–264 (1982)
- CHOI, H. J., LEE, C. J., SCHROEDER, A., KIM, Y. S., JUNG, S. H., KIM, J. S., KIM DO, Y., SON, E. J., HAN, H. C., HONG, S. K., COLWELL, C. S., and KIM, Y. I.: Excitatory actions of GABA in the suprachiasmatic nucleus. *J. Neuroscience* 28, 5450–5459 (2008)
- CHOU, T. C., SCAMMELL, T. E., GOOLEY, J. J., GAUS, S. E., SAPER, C. B., and LU, J.: Critical role of dorsomedial hypothalamic nucleus in a wide range of behavioral circadian rhythms. *J. Neuroscience* 23, 10691–10702 (2003)
- CHRISTIAN, C. A., and MOENTER, S. M.: Vasoactive intestinal polypeptide can excite gonadotropin-releasing hormone neurons in a manner dependent on estradiol and gated by time of day. *Endocrinology* 149, 3130–3136 (2008)
- CLARKSON, J., D'ANGLEMONT DE TASSIGNY, X., COLLEDGE, W. H., CARATY, A., and HERBISON, A. E.: Distribution of kisspeptin neurons in the adult female mouse brain. *J. Neuroendocrinol.* 21, 673–682 (2009)
- COLWELL, C. S.: Rhythmic coupling among cells in the suprachiasmatic nucleus. *J. Neurobiol.* 43, 379–388 (2000)
- COLWELL, C. S., MICHEL, S., ITRI, J., RODRIGUEZ, W., TAM, J., LELIEVRE, V., HU, Z., LIU, X., and WASCHEK, J. A.: Disrupted circadian rhythms in VIP- and PHI-deficient mice. *Amer. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 285, R939–949 (2003)

- COOGAN, A. N., RAWLINGS, N., LUCKMAN, S. M., and PIGGINS, H. D.: Effects of neurotensin on discharge rates of rat suprachiasmatic nucleus neurons in vitro. *Neuroscience* 103, 663–672 (2001)
- CROSIO, C., CERMAKIAN, N., ALLIS, C. D., and SASSONE-CORSI, P.: Light induces chromatin modification in cells of the mammalian circadian clock. *Nature Neuroscience* 3, 1241–1247 (2000)
- CUESTA, M., MENDOZA, J., CLESSE, D., PEVET, P., and CHALLET, E.: Serotonergic activation potentiates light resetting of the main circadian clock and alters clock gene expression in a diurnal rodent. *Exp. Neurol.* 210, 501–513 (2008)
- CUI, L. N., SAEB-PARSY, K., and DYBALL, R. E.: Neurons in the supraoptic nucleus of the rat are regulated by a projection from the suprachiasmatic nucleus. *J. Physiol.* 502 (Pt. 1), 149–159 (1997)
- CULLINAN, W. E.: GABA(A) receptor subunit expression within hypophysiotropic CRH neurons: a dual hybridization histochemical study. *J. Comp. Neurol.* 419, 344–351 (2000)
- CUTLER, D. J., HARAURA, M., REED, H. E., SHEN, S., SHEWARD, W. J., MORRISON, C. F., MARSTON, H. M., HARMAR, A. J., and PIGGINS, H. D.: The mouse VPAC2 receptor confers suprachiasmatic nuclei cellular rhythmicity and responsiveness to vasoactive intestinal polypeptide in vitro. *Eur. J. Neuroscience* 17, 197–204 (2003)
- CUTLER, D. J., MUNDEY, M. K., and MASON, R.: Electrophysiological effects of opioid receptor activation on Syrian hamster suprachiasmatic nucleus neurons in vitro. *Brain Res. Bull.* 50, 119–125 (1999)
- CUTRERA, R. A., KALSBECK, A., and PEVET, P.: Specific destruction of the serotonergic afferents to the suprachiasmatic nuclei prevents triazolam-induced phase advances of hamster activity rhythms. *Behav. Brain Res.* 62, 21–28 (1994)
- DAIKOKU, S., HISANO, S., and KAGOTANI, Y.: Neuronal associations in the rat suprachiasmatic nucleus demonstrated by immunoelectron microscopy. *J. Comp. Neurol.* 325, 559–571 (1992)
- DARDENTE, H., MENET, J. S., CHALLET, E., TOURNIER, B. B., PEVET, P., and MASSON-PEVET, M.: Daily and circadian expression of neuropeptides in the suprachiasmatic nuclei of nocturnal and diurnal rodents. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 124, 143–151 (2004)
- DARDENTE, H., POIREL, V. J., KLOSEN, P., PEVET, P., and MASSON-PEVET, M.: Per and neuropeptide expression in the rat suprachiasmatic nuclei: compartmentalization and differential cellular induction by light. *Brain Res.* 958, 261–271 (2002)
- DAVIES, J. S., CARTER, D. A., and WELLS, T.: Photic stimulation inhibits growth hormone secretion in rats: a hypothalamic mechanism for transient entrainment. *Endocrinology* 145, 2950–2958 (2004)
- DE LA IGLESIA, H. O., MEYER, J., CARPINO, A. Jr., and SCHWARTZ, W. J.: Antiphase oscillation of the left and right suprachiasmatic nuclei. *Science* 290, 799–801 (2000)
- DE LA IGLESIA, H. O., MEYER, J., and SCHWARTZ, W. J.: Lateralization of circadian pacemaker output: Activation of left- and right-sided luteinizing hormone-releasing hormone neurons involves a neural rather than a humoral pathway. *J. Neuroscience* 23, 7412–7414 (2003)
- DE LA IGLESIA, H. O., and SCHWARTZ, W. J.: Minireview: Timely ovulation: Circadian regulation of the female hypothalamo-pituitary-gonadal axis. *Endocrinology* 147, 1148–1153 (2006)
- DEBRUYNE, J. P., NOTON, E., LAMBERT, C. M., MAYWOOD, E. S., WEAVER, D. R., and REPERT, S. M.: A clock shock: mouse CLOCK is not required for circadian oscillator function. *Neuron* 50, 465–477 (2006)
- DEBRUYNE, J. P., WEAVER, D. R., and REPERT, S. M.: CLOCK and NPAS2 have overlapping roles in the suprachiasmatic circadian clock. *Nature Neuroscience* 10, 543–545 (2007)
- DECKER, K., and REUSS, S.: Nitric oxide-synthesizing neurons in the hamster suprachiasmatic nucleus: a combined NOS- and NADPH- staining and retinohypothalamic tract tracing study. *Brain Res.* 666, 284–288 (1994)
- DEY, J., CARR, A. J., CAGAMPANG, F. R., SEMIKHODSKII, A. S., LOUDON, A. S., HASTINGS, M. H., and MAYWOOD, E. S.: The tau mutation in the Syrian hamster differentially reprograms the circadian clock in the SCN and peripheral tissues. *J. Biol. Rhythms* 20, 99–110 (2005)
- DIBNER, C., SCHIBLER, U., and ALBRECHT, U.: The mammalian circadian timing system: organization and coordination of central and peripheral clocks. *Annu. Rev. Physiol.* 72, 517–549 (2010)
- DING, J. M., CHEN, D., WEBER, E. T., FAIMAN, L. E., REA, M. A., and GILLETTE, M. U.: Resetting the biological clock: mediation of nocturnal circadian shifts by glutamate and NO. *Science* 266, 1713–1717 (1994)
- DING, J. M., FAIMAN, L. E., HURST, W. J., KURIASHKINA, L. R., and GILLETTE, M. U.: Resetting the biological clock: mediation of nocturnal CREB phosphorylation via light, glutamate, and nitric oxide. *J. Neuroscience* 17, 667–675 (1997)
- DRIJFHOUT, W. J., VAN DER LINDE, A. G., DE VRIES, J. B., GROU, C. J., and WESTERINK, B. H.: Microdialysis reveals dynamics of coupling between noradrenaline release and melatonin secretion in conscious rats. *Neuroscience Lett.* 202, 185–188 (1996a)
- DRIJFHOUT, W. J., VAN DER LINDE, A. G., KOOI, S. E., GROU, C. J., and WESTERINK, B. H.: Norepinephrine release in the rat pineal gland: the input from the biological clock measured by in vivo microdialysis. *J. Neurochem.* 66, 748–755 (1996b)

- DRUCKER-COLIN, R., AGUILAR-ROBLERO, R., GARCIA-HERNANDEZ, F., FERNANDEZ-CANCINO, F., and BERMUDEZ RATONNI, F.: Fetal suprachiasmatic nucleus transplants: diurnal rhythm recovery of lesioned rats. *Brain Res.* *311*, 353–357 (1984)
- DUBOCOVICH, M. L., HUDSON, R. L., SUMAYA, I. C., MASANA, M. I., and MANNA, E.: Effect of MT1 melatonin receptor deletion on melatonin-mediated phase shift of circadian rhythms in the C57BL/6 mouse. *J. Pineal Res.* *39*, 113–120 (2005)
- DUDLEY, T. E., DINARDO, L. A., and GLASS, J. D.: In vivo assessment of the midbrain raphe nuclear regulation of serotonin release in the hamster suprachiasmatic nucleus. *J. Neurophysiol.* *81*, 1469–1477 (1999)
- DUNCAN, M. J.: Photoperiodic regulation of hypothalamic neuropeptide messenger RNA expression: effect of pinealectomy and neuroanatomical location. *Brain Res. Mol. Brain Res.* *57*, 142–148 (1998)
- DUNLAP, J. C.: Molecular bases for circadian clocks. *Cell* *96*, 271–290 (1999)
- EARNEST, D. J., and SLADEK, C. D.: Circadian rhythms of vasopressin release from individual rat suprachiasmatic explants in vitro. *Brain Res.* *382*, 129–133 (1986)
- EBLING, F. J.: The role of glutamate in the photic regulation of the suprachiasmatic nucleus. *Prog. Neurobiol.* *50*, 109–132 (1996)
- EDELSTEIN, K., and AMIR, S.: Glutamatergic antagonists do not attenuate light-induced fos protein in rat intergeniculate leaflet. *Brain Res.* *810*, 264–268 (1998)
- EDELSTEIN, K., DE LA IGLESIA, H. O., SCHWARTZ, W. J., and MROSOVSKY, N.: Behavioral arousal blocks light-induced phase advances in locomotor rhythmicity but not light-induced Per1 and Fos expression in the hamster suprachiasmatic nucleus. *Neuroscience* *118*, 253–261 (2003)
- EDGAR, D. M., MILLER, J. D., PROSSER, R. A., DEAN, R. R., and DEMENT, W. C.: Serotonin and the mammalian circadian system: II. Phase-shifting rat behavioral rhythms with serotonergic agonists. *J. Biol. Rhythms* *8*, 17–31 (1993)
- EHLEN, J. C., NOVAK, C. M., KAROM, M. C., GAMBLE, K. L., and ALBERS, H. E.: Interactions of GABA A receptor activation and light on period mRNA expression in the suprachiasmatic nucleus. *J. Biol. Rhythms* *23*, 16–25 (2008)
- ELLIOTT, A. S., and NUNEZ, A. A.: An ultrastructural study of somal appositions in the suprachiasmatic nucleus and anterior hypothalamus of the rat. *Brain Res.* *662*, 278–282 (1994)
- ETCHEGARAY, J. P., LEE, C., WADE, P. A., and REPPERT, S. M.: Rhythmic histone acetylation underlies transcription in the mammalian circadian clock. *Nature* *421*, 177–182 (2003)
- ETCHEGARAY, J. P., YU, E. A., INDIC, P., DALLMANN, R., and WEAVER, D. R.: Casein kinase 1 delta (CK1delta) regulates period length of the mouse suprachiasmatic circadian clock in vitro. *PLoS One* *5*, e10303 (2010)
- FIELD, M. D., MAYWOOD, E. S., O'BRIEN, J. A., WEAVER, D. R., REPPERT, S. M., and HASTINGS, M. H.: Analysis of clock proteins in mouse SCN demonstrates phylogenetic divergence of the circadian clockwork and resetting mechanisms. *Neuron* *25*, 437–447 (2000)
- FILIPSKI, E., KING, V. M., LI, X., GRANDA, T. G., MORMONT, M. C., LIU, X., CLAUSTRAT, B., HASTINGS, M. H., and LEVI, F.: Host circadian clock as a control point in tumor progression. *J. Natl. Cancer Inst.* *94*, 690–697 (2002)
- FLIERS, E., NOPPEN, N. W., WIERSINGA, W. M., VISSER, T. J., and SWAAB, D. F.: Distribution of thyrotropin-releasing hormone (TRH)-containing cells and fibers in the human hypothalamus. *J. Comp. Neurol.* *350*, 311–323 (1994)
- FLIERS, E., WIERSINGA, W. M., and SWAAB, D. F.: Physiological and pathophysiological aspects of thyrotropin-releasing hormone gene expression in the human hypothalamus. *Thyroid* *8*, 921–928 (1998)
- FODOR, M., KORDON, C., and EPELBAUM, J.: Anatomy of the hypophysiotropic somatostatinergic and growth hormone-releasing hormone system minireview. *Neurochem. Res.* *31*, 137–143 (2006)
- FRANCL, J. M., KAUR, G., and GLASS, J. D.: Roles of light and serotonin in the regulation of gastrin-releasing peptide and arginine vasopressin output in the hamster SCN circadian clock. *Eur. J. Neuroscience* *32*, 1170–1179 (2010a)
- FRANCL, J. M., KAUR, G., and GLASS, J. D.: Regulation of vasoactive intestinal polypeptide release in the suprachiasmatic nucleus circadian clock. *Neuroreport* *21*, 1055–1059 (2010b)
- FRANCOIS-BELLAN, A. M., BOSLER, O., TONON, M. C., WEI, L. T., and BEAUDET, A.: Association of neurotensin receptors with VIP-containing neurons and serotonin-containing axons in the suprachiasmatic nucleus of the rat. *Synapse* *10*, 282–290 (1992)
- FU, L., and LEE, C. C.: The circadian clock: pacemaker and tumour suppressor. *Nature Rev. Cancer* *3*, 350–361 (2003)
- FUKUHARA, C., BREWER, J. M., DIRDEN, J. C., BITTMAN, E. L., TOSINI, G., and HARRINGTON, M. E.: Neuropeptide Y rapidly reduces Period 1 and Period 2 mRNA levels in the hamster suprachiasmatic nucleus. *Neuroscience Lett.* *314*, 119–122 (2001)
- FUKUHARA, C., HAMADA, T., SHIBATA, S., WATANABE, S., AOKI, K., and INOUE, S. I.: Phase advances of circadian rhythms in somatostatin depleted rats: effects of cysteamine on rhythms of locomotor activity and electrical discharge of the suprachiasmatic nucleus. *J. Comp. Physiol. A* *175*, 677–685 (1994a)

- FUKUHARA, C., NISHIWAKI, T., CAGAMPANG, F. R., and INOUE, S. T.: Emergence of VIP rhythmicity following somatostatin depletion in the rat suprachiasmatic nucleus. *Brain Res.* 645, 343–346 (1994b)
- FUKUHARA, C., SHINOHARA, K., TOMINAGA, K., OTORI, Y., and INOUE, S. T.: Endogenous circadian rhythmicity of somatostatin like-immunoreactivity in the rat suprachiasmatic nucleus. *Brain Res.* 606, 28–35 (1993)
- FUNABASHI, T., DAIKOKU, S., SHINOHARA, K., and KIMURA, F.: Pulsatile gonadotropin-releasing hormone (GnRH) secretion is an inherent function of GnRH neurons, as revealed by the culture of medial olfactory placode obtained from embryonic rats. *Neuroendocrinology* 71, 138–144 (2000)
- GALL, C. VON, DUFFIELD, G. E., HASTINGS, M. H., KOPP, M. D., DEGHANI, F., KORF, H. W., and STEHLE, J. H.: CREB in the mouse SCN: a molecular interface coding the phase-adjusting stimuli light, glutamate, PACAP, and melatonin for clockwork access. *J. Neuroscience* 18, 10389–10397 (1998)
- GAMBLE, K. L., ALLEN, G. C., ZHOU, T., and MCMAHON, D. G.: Gastrin-releasing peptide mediates light-like resetting of the suprachiasmatic nucleus circadian pacemaker through cAMP response element-binding protein and Per1 activation. *J. Neuroscience* 27, 12078–12087 (2007)
- GAMBLE, K. L., EHLEN, J. C., and ALBERS, H. E.: Circadian control during the day and night: Role of neuropeptide Y Y5 receptors in the suprachiasmatic nucleus. *Brain Res. Bull.* 65, 513–519 (2005)
- GAMBLE, K. L., NOVAK, C. M., and ALBERS, H. E.: Neuropeptide Y and N-methyl-D-aspartic acid interact within the suprachiasmatic nuclei to alter circadian phase. *Neuroscience* 126, 559–565 (2004)
- GAMBLE, K. L., PAUL, K. N., KAROM, M. C., TOSINI, G., and ALBERS, H. E.: Paradoxical effects of NPY in the suprachiasmatic nucleus. *Eur. J. Neuroscience* 23, 2488–2494 (2006)
- GAO, B., and MOORE, R. Y.: Glutamic acid decarboxylase message isoforms in human suprachiasmatic nucleus. *J. Biol. Rhythms* 11, 172–179 (1996)
- GARDANI, M., and BIELLO, S. M.: The effects of photic and nonphotic stimuli in the 5-HT7 receptor knockout mouse. *Neuroscience* 152, 245–253 (2008)
- GARY, K. A., SOLLARS, P. J., LEXOW, N., WINOKUR, A., and PICKARD, G. E.: Thyrotropin-releasing hormone phase shifts circadian rhythms in hamsters. *Neuroreport* 7, 1631–1634 (1996)
- GAUER, F., MASSON PEVET, M., SKENE, D. J., VIVIEN ROELS, B., and PEVET, P.: Daily rhythms of melatonin binding sites in the rat pars tuberalis and suprachiasmatic nuclei; evidence for a regulation of melatonin receptors by melatonin itself. *Neuroendocrinology* 57, 120–126 (1993)
- GAUER, F., MASSON PEVET, M., STEHLE, J., and PEVET, P.: Daily variations in melatonin receptor density of rat pars tuberalis and suprachiasmatic nuclei are distinctly regulated. *Brain Res.* 641, 92–98 (1994)
- GEKAKIS, N., STAKNIS, D., NGUYEN, H. B., DAVIS, F. C., WILSBACHER, L. D., KING, D. P., TAKAHASHI, J. S., and WEITZ, C. J.: Role of the CLOCK protein in the mammalian circadian mechanism. *Science* 280, 1564–1569 (1998)
- GERDIN, M. J., MASANA, M. I., RIVERA-BERMEDEZ, M. A., HUDSON, R. L., EARNEST, D. J., GILLETTE, M. U., and DUBOCOVICH, M. L.: Melatonin desensitizes endogenous MT2 melatonin receptors in the rat suprachiasmatic nucleus: relevance for defining the periods of sensitivity of the mammalian circadian clock to melatonin. *FASEB J.* 18, 1646–1656 (2004)
- GERHOLD, L. M., ROSEWELL, K. L., and WISE, P. M.: Suppression of vasoactive intestinal polypeptide in the suprachiasmatic nucleus leads to aging-like alterations in cAMP rhythms and activation of gonadotropin-releasing hormone neurons. *J. Neuroscience* 25, 62–67 (2005)
- GERICS, B., SZALAY, F., and HAJOS, F.: Seasonal fluctuations of glial fibrillary acidic protein (GFAP) immunoreactivity in the rat suprachiasmatic nucleus. *Acta Biol. Hung.* 56, 199–204 (2005)
- GERICS, B., SZALAY, F., and HAJOS, F.: Glial fibrillary acidic protein immunoreactivity in the rat suprachiasmatic nucleus: circadian changes and their seasonal dependence. *J. Anat.* 209, 231–237 (2006)
- GILLESPIE, C. F., HUHMANN, K. L., BABAGBEMI, T. O., and ALBERS, H. E.: Bicuculline increases and muscimol reduces the phase-delaying effects of light and VIP/PHI/GRP in the suprachiasmatic region. *J. Biol. Rhythms* 11, 137–144 (1996)
- GILLETTE, M. U., and REPPERT, S. M.: The hypothalamic suprachiasmatic nuclei: circadian patterns of vasopressin secretion and neuronal activity in vitro. *Brain Res. Bull.* 19, 135–139 (1987)
- GIRARDET, C., BECQUET, D., BLANCHARD, M. P., FRANCOIS-BELLAN, A. M., and BOSLER, O.: Neuroglial and synaptic rearrangements associated with photic entrainment of the circadian clock in the suprachiasmatic nucleus. *Eur. J. Neuroscience* 32, 2133–2142 (2010)
- GOMEZ, F., CHAPLEUR, M., FERNETTE, B., BURLET, C., NICOLAS, J. P., and BURLET, A.: Arginine vasopressin (AVP) depletion in neurons of the suprachiasmatic nuclei affects the AVP content of the paraventricular neurons and stimulates adrenocorticotrophic hormone release. *J. Neuroscience Res.* 50, 565–574 (1997)
- GRAFF, C., CHALLET, E., PEVET, P., and WOLLNIK, F.: 5-HT3 receptor-mediated photic-like responses of the circadian clock in the rat. *Neuropharmacology* 52, 662–671 (2007)



- GRAY, G. D., SODERSTEIN, P., TALLENTIRE, D., and DAVIDSON, J. M.: Effects of lesions in various structures of the suprachiasmatic-preoptic region on LH regulation and sexual behavior in female rats. *Neuroendocrinology* 25, 174–191 (1978)
- GRIBKOFF, V. K., PIESCHL, R. L., WISIALOWSKI, T. A., VAN DEN POL, A. N., and YOCCA, F. D.: Phase shifting of circadian rhythms and depression of neuronal activity in the rat suprachiasmatic nucleus by neuropeptide Y: mediation by different receptor subtypes. *J. Neuroscience* 18, 3014–3022 (1998)
- GROOS, G., and HENDRIKS, J.: Circadian rhythms in electrical discharge of rat suprachiasmatic neurones recorded in vitro. *Neuroscience Lett.* 34, 283–288 (1982)
- GUILLAUMOND, F., BECQUET, D., BLANCHARD, M. P., ATTIA, J., MORENO, M., BOSLER, O., and FRANCOIS-BELLAN, A. M.: Nocturnal expression of phosphorylated-ERK1/2 in gastrin-releasing peptide neurons of the rat suprachiasmatic nucleus. *J. Neurochem.* 101, 1224–1235 (2007)
- GULDNER, F. H.: Synaptology of the rat suprachiasmatic nucleus. *Cell. Tissue Res.* 165, 509–544 (1976)
- GULDNER, F. H.: Synapses of optic nerve afferents in the rat suprachiasmatic nucleus. I. Identification, qualitative description, development and distribution. *Cell. Tissue Res.* 194, 17–35 (1978)
- GULDNER, F. H.: Numbers of neurons and astroglial cells in the suprachiasmatic nucleus of male and female rats. *Exp. Brain Res.* 50, 373–376 (1983)
- GULDNER, F. H.: Suprachiasmatic nucleus: numbers of synaptic appositions and various types of synapses. A morphometric study on male and female rats. *Cell Tissue Res.* 235, 449–452 (1984)
- GUY, J., BOSLER, O., DUSTICIER, G., PELLETIER, G., and CALAS, A.: Morphological correlates of serotonin-neuropeptide Y interactions in the rat suprachiasmatic nucleus: combined radioautographic and immunocytochemical data. *Cell Tissue Res.* 250, 657–662 (1987)
- HAMADA, T., SHIBATA, S., TSUNEYOSHI, A., TOMINAGA, K., and WATANABE, S.: Effect of somatostatin on circadian rhythms of firing and 2-deoxyglucose uptake in rat suprachiasmatic slices. *Amer. J. Physiol.* 265, R1199–1204 (1993)
- HANNIBAL, J.: Neurotransmitters of the retino-hypothalamic tract. *Cell Tissue Res.* 309, 73–88 (2002)
- HANNIBAL, J., and FAHRENKRUG, J.: Immunoreactive substance P is not part of the retinohypothalamic tract in the rat. *Cell Tissue Res.* 309, 293–299 (2002)
- HANNIBAL, J., and FAHRENKRUG, J.: Target areas innervated by PACAP-immunoreactive retinal ganglion cells. *Cell Tissue Res.* 316, 99–113 (2004)
- HANNIBAL, J., HUNDAHL, C., FAHRENKRUG, J., REHFELD, J. F., and FRIIS-HANSEN, L.: Cholecystokinin (CCK)-expressing neurons in the suprachiasmatic nucleus: innervation, light responsiveness and entrainment in CCK-deficient mice. *Eur. J. Neuroscience* 32, 1006–1017 (2010)
- HARMAR, A. J., MARSTON, H. M., SHEN, S., SPRAIT, C., WEST, K. M., SHEWARD, W. J., MORRISON, C. F., DORIN, J. R., PIGGINS, H. D., REUBI, J. C., KELLY, J. S., MAYWOOD, E. S., and HASTINGS, M. H.: The VPAC(2) receptor is essential for circadian function in the mouse suprachiasmatic nuclei. *Cell* 109, 497–508 (2002)
- HARRINGTON, M., MOLYNEUX, P., SOSCIA, S., PRABAKAR, C., MCKINLEY-BREWSTER, J., and LALL, G.: Behavioral and neurochemical sources of variability of circadian period and phase: studies of circadian rhythms of npy<sup>-/-</sup> mice. *Amer. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 292, R1306–1314 (2007)
- HARRINGTON, M. E., and HOQUE, S.: NPY opposes PACAP phase shifts via receptors different from those involved in NPY phase shifts. *Neuroreport* 8, 2677–2680 (1997)
- HARRINGTON, M. E., NANCE, D. M., and RUSAK, B.: Double-labeling of neuropeptide Y-immunoreactive neurons which project from the geniculate to the suprachiasmatic nuclei. *Brain Res.* 410, 275–282 (1987)
- HASTINGS, M., O'NEILL, J. S., and MAYWOOD, E. S.: Circadian clocks: regulators of endocrine and metabolic rhythms. *J. Endocrinol.* 195, 187–198 (2007)
- HASTINGS, M. H., FIELD, M. D., MAYWOOD, E. S., WEAVER, D. R., and REPERT, S. M.: Differential regulation of mPER1 and mTIM proteins in the mouse suprachiasmatic nuclei: new insights into a core clock mechanism. *J. Neuroscience* 19, RC11, 11–17 (1999)
- HASTINGS, M. H., MAYWOOD, E. S., and REDDY, A. B.: Two decades of circadian time. *J. Neuroendocrinol.* 20, 812–819 (2008)
- HASTINGS, M. H., MEAD, S. M., VINDLACHERUVU, R. R., EBLING, F. J., MAYWOOD, E. S., and GROSSE, J.: Non-photic phase shifting of the circadian activity rhythm of Syrian hamsters: the relative potency of arousal and melatonin. *Brain Res.* 591, 20–26 (1992)
- HAY-SCHMIDT, A., VRANG, N., LARSEN, P. J., and MIKKELSEN, J. D.: Projections from the raphe nuclei to the suprachiasmatic nucleus of the rat. *J. Chem. Neuroanat.* 25, 293–310 (2003)
- HERMES, M. L., CODERRE, E. M., BUIJS, R. M., and RENAUD, L. P.: GABA and glutamate mediate rapid neurotransmission from suprachiasmatic nucleus to hypothalamic paraventricular nucleus in rat. *J. Physiol.* 496 (Pt. 3), 749–757 (1996)
- HOFMAN, M. A., and SWAAB, D. F.: The sexually dimorphic nucleus of the preoptic area in the human brain: a comparative morphometric study. *J. Anat.* 164, 55–72 (1989)

- HORIKAWA, K., YOKOTA, S., FUJI, K., AKIYAMA, M., MORIYA, T., OKAMURA, H., and SHIBATA, S.: Nonphotic entrainment by 5-HT<sub>1A/7</sub> receptor agonists accompanied by reduced Per1 and Per2 mRNA levels in the suprachiasmatic nuclei. *J. Neuroscience* 20, 5867–5873 (2000)
- HORVATH, T. L., CELA, V., and VAN DER BEEK, E. M.: Gender-specific apposition between vasoactive intestinal peptide-containing axons and gonadotrophin-releasing hormone-producing neurons in the rat. *Brain Res.* 795, 277–281 (1998)
- HSIEH, T. F., and PAN, J. T.: Extracellular single-unit studies of suprachiasmatic neurons in brain slices. Effects of serotonin, dopamine, carbachol and LHRH. *Chin. J. Physiol.* 33, 255–268 (1990)
- HUHMANN, K. L., BABAGBEMI, T. O., and ALBERS, H. E.: Bicyculline blocks neuropeptide Y-induced phase advances when microinjected in the suprachiasmatic nucleus of Syrian hamsters. *Brain Res.* 675, 333–336 (1995)
- HUHMANN, K. L., GILLESPIE, C. F., MARVEL, C. L., and ALBERS, H. E.: Neuropeptide Y phase shifts circadian rhythms in vivo via a Y<sub>2</sub> receptor. *Neuroreport* 7, 1249–1252 (1996a)
- HUHMANN, K. L., HENNESSEY, A. C., and ALBERS, H. E.: Rhythms of glutamic acid decarboxylase mRNA in the suprachiasmatic nucleus. *J. Biol. Rhythms* 11, 311–316 (1996b)
- HUHMANN, K. L., JASNOW, A. M., SISITSKY, A. K., and ALBERS, H. E.: Glutamic acid decarboxylase mRNA in the suprachiasmatic nucleus of rats housed in constant darkness. *Brain Res.* 851, 266–269 (1999)
- HUHMANN, K. L., MARVEL, C. L., GILLESPIE, C. F., MINTZ, E. M., and ALBERS, H. E.: Tetrodotoxin blocks NPY-induced but not muscimol-induced phase advances of wheel-running activity in Syrian hamsters. *Brain Res.* 772, 176–180 (1997)
- IBATA, Y., TAKAHASHI, Y., OKAMURA, H., KAWAKAMI, F., TERUBAYASHI, H., KUBO, T., and YANAIHARA, N.: Vasoactive intestinal peptide (VIP)-like immunoreactive neurons located in the rat suprachiasmatic nucleus receive a direct retinal projection. *Neuroscience Lett.* 97, 1–5 (1989)
- IBATA, Y., TAKAHASHI, Y., OKAMURA, H., KUBO, T., and KAWAKAMI, F.: Fine structure of NPY-containing neurons in the lateral geniculate nucleus and their terminals in the suprachiasmatic nucleus of the rat. *Brain Res.* 439, 230–235 (1988)
- IBUKA, N., INOUE, S. I., and KAWAMURA, H.: Analysis of sleep-wakefulness rhythms in male rats after suprachiasmatic nucleus lesions and ocular enucleation. *Brain Res.* 122, 33–47 (1977)
- IKEDA, M., AZUMA, S., and INOUE, S.: Vitamin B12 enhances GABA content but reduces glutamate content in the rat suprachiasmatic nucleus. *Amer. J. Physiol.* 273, R359–363 (1997)
- INGRAM, C. D., CIOBANU, R., COCULESCU, I. L., TANASESCU, R., COCULESCU, M., and MIHAI, R.: Vasopressin neurotransmission and the control of circadian rhythms in the suprachiasmatic nucleus. *Prog Brain Res.* 119, 351–364 (1998)
- INOUE, S. T., and KAWAMURA, H.: Persistence of circadian rhythmicity in a mammalian hypothalamic „island“; containing the suprachiasmatic nucleus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76, 5962–5966 (1979)
- INOUE, S. T., TAKAHASHI, J. S., WOLLNIK, F., and TUREK, F. W.: Inhibitor of protein synthesis phase shifts a circadian pacemaker in mammalian SCN. *Amer. J. Physiol.* 255, R1055–1058 (1988)
- IRWIN, R. P., and ALLEN, C. N.: GABAergic signaling induces divergent neuronal Ca<sup>2+</sup> responses in the suprachiasmatic nucleus network. *Eur. J. Neuroscience* 30, 1462–1475 (2009)
- ISHIDA, A., MUTOH, T., UHEYAMA, T., BANDO, H., MASUBUCHI, S., NAKAHARA, D., TSUJIMOTO, G., and OKAMURA, H.: Light activates the adrenal gland: timing of gene expression and glucocorticoid release. *Cell Metab.* 2, 297–307 (2005)
- ISHIDA, Y., YAGITA, K., FUKUYAMA, T., NISHIMURA, M., NAGANO, M., SHIGEYOSHI, Y., YAMAGUCHI, S., KOMORI, T., and OKAMURA, H.: Constitutive expression and delayed light response of casein kinase Iepsilon and Idelta mRNAs in the mouse suprachiasmatic nucleus. *J. Neuroscience Res.* 64, 612–616 (2001)
- ISOBE, Y., and ISOBE, M.: Circadian rhythm of Arg-vasopressin contents in the suprachiasmatic nucleus in relation to corticosterone. *Brain Res.* 800, 78–85 (1998)
- IWAHANA, E., KARATSOREOS, I., SHIBATA, S., and SILVER, R.: Gonadectomy reveals sex differences in circadian rhythms and suprachiasmatic nucleus androgen receptors in mice. *Horm Behav.* 53, 422–430 (2008)
- JAC, M., KISS, A., SUMOVA, A., ILLNEROVA, H., and JEZOVA, D.: Daily profiles of arginine vasopressin mRNA in the suprachiasmatic, supraoptic and paraventricular nuclei of the rat hypothalamus under various photoperiods. *Brain Res.* 887, 472–476 (2000)
- JIN, X., SHEARMAN, L. P., WEAVER, D. R., ZYLKA, M. J., VRIES, G. J. DE, and REPPERT, S. M.: A molecular mechanism regulating rhythmic output from the suprachiasmatic circadian clock. *Cell* 96, 57–68 (1999)
- JOBST, E. E., and ALLEN, C. N.: Calbindin neurons in the hamster suprachiasmatic nucleus do not exhibit a circadian variation in spontaneous firing rate. *Eur. J. Neuroscience* 16, 2469–2474 (2002)
- JOBST, E. E., ROBINSON, D. W., and ALLEN, C. N.: Potential pathways for intercellular communication within the calbindin subnucleus of the hamster suprachiasmatic nucleus. *Neuroscience* 123, 87–99 (2004)

- JUHL, F., HANNIBAL, J., and FAHRENKRUG, J.: Photic induction of c-Fos in enkephalin neurons of the rat intergeniculate leaflet innervated by retinal PACAP fibres. *Cell Tissue Res.* 329, 491–502 (2007)
- KALLINGAL, G. J., and MINTZ, E. M.: Gastrin releasing peptide and neuropeptide Y exert opposing actions on circadian phase. *Neuroscience Lett.* 422, 59–63 (2007)
- KALLO, I., KALAMATIANS, T., WILTSHIRE, N., SHEN, S., SHEWARD, W. J., HARMAR, A. J., and COEN, C. W.: Transgenic approach reveals expression of the VPAC2 receptor in phenotypically defined neurons in the mouse suprachiasmatic nucleus and in its efferent target sites. *Eur. J. Neuroscience* 19, 2201–2211 (2004)
- KALSBECK, A., and BUIJS, R. M.: Output pathways of the mammalian suprachiasmatic nucleus: coding circadian time by transmitter selection and specific targeting. *Cell Tissue Res.* 309, 109–118 (2002)
- KALSBECK, A., BUIJS, R. M., ENGELMANN, M., WOTJAK, C. T., and LANDGRAF, R.: In vivo measurement of a diurnal variation in vasopressin release in the rat suprachiasmatic nucleus. *Brain Res.* 682, 75–82 (1995)
- KALSBECK, A., BUIJS, R. M., VAN HEERIKHUIZE, J. J., ARTS, M., and VAN DER WOUDE, T. P.: Vasopressin-containing neurons of the suprachiasmatic nuclei inhibit corticosterone release. *Brain Res.* 580, 62–67 (1992)
- KALSBECK, A., DRIJFHOUT, W. J., WESTERINK, B. H., VAN HEERIKHUIZE, J. J., VAN DER WOUDE, T. P., VAN DER VLIET, J., and BUIJS, R. M.: GABA receptors in the region of the dorsomedial hypothalamus of rats are implicated in the control of melatonin and corticosterone release. *Neuroendocrinology* 63, 69–78 (1996)
- KALSBECK, A., FLIERS, E., FRANKE, A. N., WORTEL, J., and BUIJS, R. M.: Functional connections between the suprachiasmatic nucleus and the thyroid gland as revealed by lesioning and viral tracing techniques in the rat. *Endocrinology* 141, 3832–3841 (2000a)
- KALSBECK, A., FLIERS, E., HOFMAN, M. A., SWAAB, D. F., and BUIJS, R. M.: Vasopressin and the output of the hypothalamic biological clock. *J. Neuroendocrinol.* 22, 362–372 (2010)
- KALSBECK, A., GARIDOU, M. L., PALM, I. F., VAN DER VLIET, J., SIMONNEAUX, V., PEVET, P., and BUIJS, R. M.: Melatonin sees the light: blocking GABA-ergic transmission in the paraventricular nucleus induces daytime secretion of melatonin. *Eur. J. Neuroscience* 12, 3146–3154 (2000b)
- KALSBECK, A., LA FLEUR, S., VAN HEIJNINGEN, C., and BUIJS, R. M.: Suprachiasmatic GABAergic inputs to the paraventricular nucleus control plasma glucose concentrations in the rat via sympathetic innervation of the liver. *J. Neuroscience* 24, 7604–7613 (2004)
- KALSBECK, A., PALM, I. F., LA FLEUR, S. E., SCHEER, F. A., PERREAU-LENZ, S., RUITER, M., KREIER, F., CAILOTTO, C., and BUIJS, R. M.: SCN outputs and the hypothalamic balance of life. *J. Biol. Rhythms* 21, 458–469 (2006)
- KALSBECK, A., RIKKERS, M., VIVIEN ROELS, B., and PEVET, P.: Vasopressin and vasoactive intestinal peptide infused in the paraventricular nucleus of the hypothalamus elevate plasma melatonin levels. *J. Pineal Res.* 15, 46–52 (1993a)
- KALSBECK, A., TECELMARIAM-MESBAH, R., and PEVET, P.: Efferent projections of the suprachiasmatic nucleus in the golden hamster (*Mesocricetus auratus*). *J. Comp. Neurol.* 332, 293–314 (1993b)
- KALSBECK, A., VERHAGEN, L. A., SCHALIJ, I., FOPPEN, E., SABOUREAU, M., BOTHOREL, B., BUIJS, R. M., and PEVET, P.: Opposite actions of hypothalamic vasopressin on circadian corticosterone rhythm in nocturnal versus diurnal species. *Eur. J. Neuroscience* 27, 818–827 (2008)
- KARATSOREOS, I. N., ROMEO, R. D., MCEWEN, B. S., and SILVER, R.: Diurnal regulation of the gastrin-releasing peptide receptor in the mouse circadian clock. *Eur. J. Neuroscience* 23, 1047–1053 (2006)
- KARATSOREOS, I. N., WANG, A., SASANIAN, J., and SILVER, R.: A role for androgens in regulating circadian behavior and the suprachiasmatic nucleus. *Endocrinology* 148, 5487–5495 (2007)
- KAUFFMAN, A. S., CLIFTON, D. K., and STEINER, R. A.: Emerging ideas about kisspeptin-GPR54 signaling in the neuroendocrine regulation of reproduction. *Trends Neuroscience* 30, 504–511 (2007)
- KAWAKAMI, M., ARITA, J., and YOSHIOKA, E.: Loss of estrogen-induced daily surges of prolactin and gonadotropins by suprachiasmatic nucleus lesions in ovariectomized rats. *Endocrinology* 106, 1087–1092 (1980)
- KAWAMOTO, K., NAGANO, M., KANDA, F., CHIHARA, K., SHIGEYOSHI, Y., and OKAMURA, H.: Two types of VIP neuronal components in rat suprachiasmatic nucleus. *J. Neuroscience Res.* 74, 852–857 (2003)
- KAWANO, H., DECKER, K., and REUSS, S.: Is there a direct retina-raphé-suprachiasmatic nucleus pathway in the rat? *Neuroscience Lett.* 212, 143–146 (1996)
- KAWATA, M., UEDA, S., YAMASHITA, H., and SANO, Y.: Immunohistochemical studies on the distribution of neuropeptides and serotonin in the suprachiasmatic nucleus of the Brattleboro rat. *Arch. Histol. Jpn.* 50, 1–14 (1987)
- KEIM, S. R., and SHEKHAR, A.: The effects of GABAA receptor blockade in the dorsomedial hypothalamic nucleus on corticotrophin (ACTH) and corticosterone secretion in male rats. *Brain Res.* 739, 46–51 (1996)
- KIM, D. Y., KANG, H. C., SHIN, H. C., LEE, K. J., YOON, Y. W., HAN, H. C., NA, H. S., HONG, S. K., and KIM, Y. I.: Substance p plays a critical role in photic resetting of the circadian pacemaker in the rat hypothalamus. *J. Neuroscience* 21, 4026–4031 (2001)

- KIM, H. J., and HARRINGTON, M. E.: Neuropeptide Y-deficient mice show altered circadian response to simulated natural photoperiod. *Brain Res.* 1246, 96–100 (2008)
- KIM, Y. I., KIM, S. H., KIM, D. Y., LEE, H. W., SHIN, H. C., CHUNG, J. M., HAN, H. C., NA, H. S., and HONG, S. K.: Electrophysiological evidence for the role of substance P in retinohypothalamic transmission in the rat. *Neuroscience Lett.* 274, 99–102 (1999)
- KLEIN, D. C.: Photoneural regulation of the mammalian pineal gland. *Ciba Found. Symp.* 117, 38–56 (1985)
- KNOCH, M. E., SIEGEL, D., DUNCAN, M. J., and GLASS, J. D.: Serotonergic mediation of constant light-potiated nonphotic phase shifting of the circadian locomotor activity rhythm in Syrian hamsters. *Amer. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 291, R180–188 (2006)
- KO, C. H., and TAKAHASHI, J. S.: Molecular components of the mammalian circadian clock. *Hum. Mol. Genet.* 15/Spec. No. 2, R271–277 (2006)
- KORF, H.-W., and STEHLE, J. H.: Das circadiane System der Säugetiere – integraler Bestandteil des neuroendokrinen Systems. *Abh. Sächs. Akad. Wiss. Leipzig Math.-nat.wiss. Kl.* 63/2, 9–31 (2005)
- KORNHAUSER, J. M., NELSON, D. E., MAYO, K. E., and TAKAHASHI, J. S.: Photic and circadian regulation of c-fos gene expression in the hamster suprachiasmatic nucleus. *Neuron.* 5, 127–134 (1990)
- KRAJNAK, K., KASHON, M. L., ROSEWELL, K. L., and WISE, P. M.: Sex differences in the daily rhythm of vasoactive intestinal polypeptide but not arginine vasopressin messenger ribonucleic acid in the suprachiasmatic nuclei. *Endocrinology* 139, 4189–4196 (1998)
- KRAJNAK, K., ROSEWELL, K. L., and WISE, P. M.: Fos-induction in gonadotropin-releasing hormone neurons receiving vasoactive intestinal polypeptide innervation is reduced in middle-aged female rats. *Biol. Reprod.* 64, 1160–1164 (2001)
- KRAMER, A., YANG, F. C., KRAVES, S., and WEITZ, C. J.: A screen for secreted factors of the suprachiasmatic nucleus. *Methods Enzymol.* 393, 645–663 (2005)
- KRAMER, A., YANG, F. C., SNOGRASS, P., LI, X., SCAMMELL, T. E., DAVIS, F. C., and WEITZ, C. J.: Regulation of daily locomotor activity and sleep by hypothalamic EGF receptor signaling. *Science* 294, 2511–2515 (2001)
- KRAVES, S., and WEITZ, C. J.: A role for cardiotrophin-like cytokine in the circadian control of mammalian locomotor activity. *Nature Neuroscience* 9, 212–219 (2006)
- KRETSCHMANNOVA, K., SVOBODOVA, I., BALIK, A., MAZNA, P., and ZEMKOVA, H.: Circadian trythmicity of AVP secretion and GABAergic synaptic transmission in the rat suprachiasmatic nucleus. *Ann. New York Acad. Sci.* 1048, 103–115 (2005)
- KRIEGSFELD, L. J., DEMAS, G. E., LEE, S. E. Jr., DAWSON, T. M., DAWSON, V. L., and NELSON, R. J.: Circadian locomotor analysis of male mice lacking the gene for neuronal nitric oxide synthase (nNOS<sup>-/-</sup>). *J. Biol. Rhythms* 14, 20–27 (1999)
- KRIEGSFELD, L. J., DRAZEN, D. L., and NELSON, R. J.: Circadian organization in male mice lacking the gene for endothelial nitric oxide synthase (eNOS<sup>-/-</sup>). *J. Biol. Rhythms* 16, 142–148 (2001)
- KRIEGSFELD, L. J., LEAK, R. K., YACKULIC, C. B., LESAUTER, J., and SILVER, R.: Organization of suprachiasmatic nucleus projections in Syrian hamsters (*Mesocricetus auratus*): an anterograde and retrograde analysis. *J. Comp. Neurol.* 468, 361–379 (2004a)
- KRIEGSFELD, L. J., LESAUTER, J., and SILVER, R.: Targeted microlesions reveal novel organization of the hamster suprachiasmatic nucleus. *J. Neuroscience* 24, 2449–2457 (2004b)
- KRIEGSFELD, L. J., MEI, D. F., YAN, L., WITKOVSKY, P., LESAUTER, J., HAMADA, T., and SILVER, R.: Targeted mutation of the calbindin D28K gene disrupts circadian rhythmicity and entrainment. *Eur. J. Neuroscience* 27, 2907–2921 (2008)
- KUHLMAN, S. J., SILVER, R., LE SAUTER, J., BULT-ITO, A., and MCMAHON, D. G.: Phase resetting light pulses induce Per1 and persistent spike activity in a subpopulation of biological clock neurons. *J. Neuroscience* 23, 1441–1450 (2003)
- KUME, K., ZYLKA, M. J., SRIRAM, S., SHEARMAN, L. P., WEAVER, D. R., JIN, X., MAYWOOD, E. S., HASTINGS, M. H., and REPPERT, S. M.: mCRY1 and mCRY2 are essential components of the negative limb of the circadian clock feedback loop. *Cell* 98, 193–205 (1999)
- LALL, G. S., and BIELLO, S. M.: Attenuation of phase shifts to light by activity or neuropeptide Y: a time course study. *Brain Res.* 957, 109–116 (2002)
- LALL, G. S., and BIELLO, S. M.: Neuropeptide Y, GABA and circadian phase shifts to photic stimuli. *Neuroscience* 120, 915–921 (2003a)
- LALL, G. S., and BIELLO, S. M.: Attenuation of circadian light induced phase advances and delays by neuropeptide Y and a neuropeptide Y Y1/Y5 receptor agonist. *Neuroscience* 119, 611–618 (2003b)
- LANDGRAF, R., HACKER, R., and BUHL, H.: Plasma vasopressin and oxytocin in response to exercise and during a day-night cycle in man. *Endokrinologie* 79, 281–291 (1982)

- LARSEN, P. J., ENQUIST, L. W., and CARD, J. P.: Characterization of the multisynaptic neuronal control of the rat pineal gland using viral transneuronal tracing. *Eur. J. Neuroscience* *10*, 128–145 (1998)
- LAVIALLE, M., and SERVIERE, J.: Circadian fluctuations in GFAP distribution in the Syrian hamster suprachiasmatic nucleus. *Neuroreport* *4*, 1243–1246 (1993)
- LECHAN, R. M., and FEKETE, C.: The TRH neuron: a hypothalamic integrator of energy metabolism. *Prog. Brain Res.* *153*, 209–235 (2006)
- LEE, Y., LEE, J., KWON, I., NAKAJIMA, Y., OHMIYA, Y., SON, G. H., LEE, K. H., and KIM, K.: Coactivation of the CLOCK-BMAL1 complex by CBP mediates resetting of the circadian clock. *J. Cell Sci.* *123*, 3547–3557 (2010)
- LEHMAN, M. N., SILVER, R., GLADSTONE, W. R., KAHN, R. M., GIBSON, M., and BRITTMAN, E. L.: Circadian rhythmicity restored by neural transplant. Immunocytochemical characterization of the graft and its integration with the host brain. *J. Neuroscience* *7*, 1626–1638 (1987)
- LEMMER, B.: The clock that times us – impact of circadian rhythms on drug medication in cardiovascular diseases. *Abh. Sächs. Akad. Wiss. Leipzig Math.-nat.wiss. Kl.* *65/3*, 76–98 (2009)
- LEONE, M. J., MARPEGAN, L., BEKINSCHTEIN, T. A., COSTAS, M. A., and GOLOMBEK, D. A.: Suprachiasmatic astrocytes as an interface for immune-circadian signalling. *J. Neuroscience Res.* *84*, 1521–1527 (2006)
- LESAUTER, J., BHUIYAN, T., SHIMAZOE, T., and SILVER, R.: Circadian trafficking of calbindin-ir in fibers of SCN neurons. *J. Biol. Rhythms* *24*, 488–496 (2009)
- LESAUTER, J., LEHMAN, M. N., and SILVER, R.: Restoration of circadian rhythmicity by transplants of SCN „micro-punches“. *J. Biol. Rhythms* *11*, 163–171 (1996)
- LESAUTER, J., and SILVER, R.: Localization of a suprachiasmatic nucleus subregion regulating locomotor rhythmicity. *J. Neuroscience* *19*, 5574–5585 (1999)
- LI, J. D., BURTON, K. J., ZHANG, C., HU, S. B., and ZHOU, Q. Y.: Vasopressin receptor V1a regulates circadian rhythms of locomotor activity and expression of clock-controlled genes in the suprachiasmatic nuclei. *Amer. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* *296*, R824–830 (2009)
- LI, J. D., HU, W. P., BOEHMER, L., CHENG, M. Y., LEE, A. G., JILEK, A., SIEGEL, J. M., and ZHOU, Q. Y.: Attenuated circadian rhythms in mice lacking the prokineticin 2 gene. *J. Neuroscience* *26*, 11615–11623 (2006)
- LINDLEY, J., DEURVEILHER, S., RUSAK, B., and SEMBA, K.: Transforming growth factor- $\alpha$  and glial fibrillary acidic protein in the hamster circadian system: daily profile and cellular localization. *Brain Res.* *1197*, 94–105 (2008)
- LINKOWSKI, P., VAN ONDERBERGEN, A., KERKHOFS, M., BOSSON, D., MENDLEWICZ, J., and VAN CAUTER, E.: Twin study of the 24-h cortisol profile: evidence for genetic control of the human circadian clock. *Amer. J. Physiol.* *264*, E173–181 (1993)
- LIU, S. Y., and ALBERS, H. E.: Single unit response of suprachiasmatic neurons to arginine vasopressin (AVP) is mediated by a V1-like receptor in the hamster. *Brain Res.* *477*, 336–343 (1989)
- LIU, C., and REPPERT, S. M.: GABA synchronizes clock cells within the suprachiasmatic circadian clock. *Neuron.* *25*, 123–128 (2000)
- LIU, C., WEAVER, D. R., STROGATZ, S. H., and REPPERT, S. M.: Cellular construction of a circadian clock: period determination in the suprachiasmatic nuclei. *Cell* *91*, 855–860 (1997)
- LOH, D. H., ABAD, C., COLWELL, C. S., and WASCHEK, J. A.: Vasoactive intestinal peptide is critical for circadian regulation of glucocorticoids. *Neuroendocrinology* *88*, 246–255 (2008)
- LOUDON, A. S., MENG, Q. J., MAYWOOD, E. S., BECHTOLD, D. A., BOOT-HANDFORD, R. P., and HASTINGS, M. H.: The biology of the circadian *Ck1epsilon* tau mutation in mice and Syrian hamsters: a tale of two species. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* *72*, 261–271 (2007)
- LOWREY, P. L., SHIMOMURA, K., ANTOCH, M. P., YAMAZAKI, S., ZEMENIDES, P. D., RALPH, M. R., MENAKER, M., and TAKAHASHI, J. S.: Positional syntenic cloning and functional characterization of the mammalian circadian mutation tau. *Science* *288*, 483–492 (2000)
- LU, J., ZHANG, Y. H., CHOU, T. C., GAUS, S. E., ELMQUIST, J. K., SHIROMANI, P., and SAPER, C. B.: Contrasting effects of ibotenate lesions of the paraventricular nucleus and subparaventricular zone on sleep-wake cycle and temperature regulation. *J. Neuroscience* *21*, 4864–4874 (2001)
- MAI, J. K., KEDZIORA, O., TECKHAUS, L., and SOFRONIEW, M. V.: Evidence for subdivisions in the human suprachiasmatic nucleus. *J. Comp. Neurol.* *305*, 508–525 (1991)
- MARCHANT, E. G., WATSON, N. V., and MISTLBERGER, R. E.: Both neuropeptide Y and serotonin are necessary for entrainment of circadian rhythms in mice by daily treadmill running schedules. *J. Neuroscience* *17*, 7974–7987 (1997)
- MARSHALL, S. T., FA'ANUNU, A. I., and BULT, A.: Calretinin is not a marker for subdivisions within the suprachiasmatic nucleus. *Brain Res.* *854*, 216–219 (2000)
- MARTINET, L., BONNEFOND, C., PEYTEVIN, J., MONNERIE, R., and MARCILLOUX, J. C.: Vasoactive intestinal polypeptide in the suprachiasmatic nucleus of the mink (*Mustela vison*) could play a key role in photic induction. *J. Neuroendocrinol.* *7*, 69–79 (1995)

- MASANA, M. I., BENLOUCIF, S., and DUBOCOVICH, M. L.: Circadian rhythm of mt1 melatonin receptor expression in the suprachiasmatic nucleus of the C3H/HeN mouse. *J. Pineal. Res.* 28, 185–192 (2000)
- MAYWOOD, E. S., O'NEILL, J. S., CHESHAM, J. E., and HASTINGS, M. H.: Minireview: The circadian clockwork of the suprachiasmatic nuclei—analysis of a cellular oscillator that drives endocrine rhythms. *Endocrinology* 148, 5624–5634 (2007)
- MAYWOOD, E. S., OKAMURA, H., and HASTINGS, M. H.: Opposing actions of neuropeptide Y and light on the expression of circadian clock genes in the mouse suprachiasmatic nuclei. *Eur. J. Neuroscience* 15, 216–220 (2002)
- MAYWOOD, E. S., REDDY, A. B., WONG, G. K., O'NEILL, J. S., O'BRIEN, J. A., MCMAHON, D. G., HARMAR, A. J., OKAMURA, H., and HASTINGS, M. H.: Synchronization and maintenance of timekeeping in suprachiasmatic circadian clock cells by neuropeptidergic signaling. *Curr. Biol.* 16, 599–605 (2006)
- MCARTHUR, A. J., COOGAN, A. N., AJPRU, S., SUGDEN, D., BIELLO, S. M., and PIGGINS, H. D.: Gastrin-releasing peptide phase-shifts suprachiasmatic nuclei neuronal rhythms in vitro. *J. Neuroscience* 20, 5496–5502 (2000)
- MCARTHUR, A. J., HUNT, A. E., and GILLETTE, M. U.: Melatonin action and signal transduction in the rat suprachiasmatic circadian clock: activation of protein kinase C at dusk and dawn. *Endocrinology* 138, 627–634 (1997)
- MCELROY, B., ZAKARIA, A., GLASS, J.D., and PROSSER, R. A.: Ethanol modulates mammalian circadian clock phase resetting through extrasynaptic GABA receptor activation. *Neuroscience* 164, 842–848 (2009)
- MEDANIC, M., and GILLETTE, M. U.: Serotonin regulates the phase of the rat suprachiasmatic circadian pacemaker in vitro only during the subjective day. *J. Physiol. Lond.* 450, 629–642 (1992)
- MENDOZA, J., CLESSE, D., PEVET, P., and CHALLET, E.: Serotonergic potentiation of dark pulse-induced phase-shifting effects at midday in hamsters. *J. Neurochem.* 106, 1404–1414 (2008)
- MENET, J. S., VUILLEZ, P., and PEVET, P.: Calbindin expression in the hamster suprachiasmatic nucleus depends on day-length. *Neuroscience* 122, 591–598 (2003)
- MENG, Q. J., LOGUNOVA, L., MAYWOOD, E. S., GALLEGRO, M., LEBIECKI, J., BROWN, T. M., SLADEK, M., SEMIKHODSKII, A. S., GLOSSOP, N. R., PIGGINS, H. D., CHESHAM, J. E., BECHTOLD, D. A., YOO, S. H., TAKAHASHI, J. S., VIRSHUP, D. M., BOOT-HANDFORD, R. P., HASTINGS, M. H., and LOUDON, A. S.: Setting clock speed in mammals: the CK1 epsilon tau mutation in mice accelerates circadian pacemakers by selectively destabilizing PERIOD proteins. *Neuron* 58, 78–88 (2008)
- MENG, Q. J., MAYWOOD, E. S., BECHTOLD, D. A., LU, W. Q., LI, J., GIBBS, J. E., DUPRE, S. M., CHESHAM, J. E., RAJAMOHAN, F., KNAFELS, J., SNEED, B., ZAWADZKE, L. E., OHREN, J. F., WALTON, K. M., WAGER, T. T., HASTINGS, M. H., and LOUDON, A. S.: Entrainment of disrupted circadian behavior through inhibition of casein kinase 1 (CK1) enzymes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 107, 15240–15245 (2010)
- MEYER-BERNSTEIN, E. L., JETTON, A. E., MATSUMOTO, S. I., MARKUNS, J. F., LEHMAN, M. N., and BITTMAN, E. L.: Effects of suprachiasmatic transplants on circadian rhythms of neuroendocrine function in golden hamsters. *Endocrinology* 140, 207–218 (1999)
- MEYER-BERNSTEIN, E. L., and MORIN, L. P.: Differential serotonergic innervation of the suprachiasmatic nucleus and the intergeniculate leaflet and its role in circadian rhythm modulation. *J. Neuroscience* 16, 2097–2111 (1996)
- MICK, G., SHIGEMOTO, R., and KITAHAMA, K.: Localization of substance P receptors in central neural structures controlling daily rhythms in nocturnal rodents. *C. R. Acad. Sci. III* 318, 209–217 (1995)
- MIHAI, R., COCULESCU, M., WAKERLEY, J. B., and INGRAM, C. D.: The effects of [Arg8]vasopressin and [Arg8]vasotocin on the firing rate of suprachiasmatic neurons in vitro. *Neuroscience* 62, 783–792 (1994a)
- MIHAI, R., JUSS, T. S., and INGRAM, C. D.: Suppression of suprachiasmatic nucleus neurone activity with a vasopressin receptor antagonist: possible role for endogenous vasopressin in circadian activity cycles in vitro. *Neurosci. Lett.* 179, 95–99 (1994b)
- MIKKELSEN, J. D., and LARSEN, P. J.: Substance P in the suprachiasmatic nucleus of the rat: an immunohistochemical and in situ hybridization study. *Histochemistry* 100, 3–16 (1993)
- MIKKELSEN, J. D., LARSEN, P. J., MICK, G., VRANG, N., EBLING, F. J., MAYWOOD, E. S., HASTINGS, M. H., and MOLLER, M.: Gating of retinal inputs through the suprachiasmatic nucleus: role of excitatory neurotransmission. *Neurochem. Int.* 27, 263–272 (1995)
- MIKKELSEN, J. D., and O'HARE, M. M.: An immunohistochemical and chromatographic analysis of the distribution and processing of proneuropeptide Y in the rat suprachiasmatic nucleus. *Peptides* 12, 177–185 (1991)
- MITOME, M., SHIRAKAWA, T., OSHIMA, S., NAKAMURA, W., and OGUCHI, H.: Circadian rhythm of nitric oxide production in the dorsal region of the suprachiasmatic nucleus in rats. *Neuroscience Lett.* 303, 161–164 (2001)
- MIYAMOTO, Y., and SANCAR, A.: Vitamin B2-based blue-light photoreceptors in the retinohypothalamic tract as the photoactive pigments for setting the circadian clock in mammals. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 6097–6102 (1998)
- MIYAMOTO, Y., and SANCAR, A.: Circadian regulation of cryptochrome genes in the mouse. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 71, 238–243 (1999)

- MOGA, M. M., and MOORE, R. Y.: Organization of neural inputs to the suprachiasmatic nucleus in the rat. *J. Comp. Neurol.* **389**, 508–534 (1997)
- MOORE, R. Y., and CARD, J. P.: Intergeniculate leaflet: an anatomically and functionally distinct subdivision of the lateral geniculate complex. *J. Comp. Neurol.* **344**, 403–430 (1994)
- MOORE, R. Y., and EICHLER, V. B.: Loss of a circadian adrenal corticosterone rhythm following suprachiasmatic lesions in the rat. *Brain Res.* **42**, 201–206 (1972)
- MOORE, R. Y., and KLEIN, D. C.: Visual pathways and the central neural control of a circadian rhythm in pineal serotonin N-acetyltransferase activity. *Brain Res.* **71**, 17–33 (1974)
- MOORE, R. Y., and SPEH, J. C.: GABA is the principal neurotransmitter of the circadian system. *Neuroscience Lett.* **150**, 112–116 (1993)
- MOORE, R. Y., SPEH, J. C., and LEAK, R. K.: Suprachiasmatic nucleus organization. *Cell Tissue Res.* **309**, 89–98 (2002)
- MORI, T., NAGAI, K., NAKAGAWA, H., and YANAIHARA, N.: Intracranial infusion of CCK-8 derivatives suppresses food intake in rats. *Amer. J. Physiol.* **251**, R718–723 (1986)
- MORIN, L. P.: Serotonergic reinnervation of the hamster suprachiasmatic nucleus and intergeniculate leaflet without functional circadian rhythm recovery. *Brain Res.* **599**, 98–104 (1992)
- MORIN, L. P.: Serotonin and the regulation of mammalian circadian rhythmicity. *Ann. Med.* **31**, 12–33 (1999)
- MORIN, L. P.: SCN organization reconsidered. *J. Biol. Rhythms* **22**, 3–13 (2007)
- MORIN, L. P., and ALLEN, C. N.: The circadian visual system, 2005. *Brain Res. Rev.* **51**, 1–60 (2006)
- MORIN, L. P., and BLANCHARD, J.: Organization of the hamster intergeniculate leaflet: NPY and ENK projections to the suprachiasmatic nucleus, intergeniculate leaflet and posterior limitans nucleus. *Vis. Neuroscience* **12**, 57–67 (1995)
- MORIN, L. P., BLANCHARD, J., and MOORE, R. Y.: Intergeniculate leaflet and suprachiasmatic nucleus organization and connections in the golden hamster. *Vis. Neuroscience* **8**, 219–230 (1992)
- MORIYA, T., YOSHINOBU, Y., KOUZU, Y., KATOH, A., GOMI, H., IKEDA, M., YOSHIOKA, T., ITOHARA, S., and SHIBATA, S.: Involvement of glial fibrillary acidic protein (GFAP) expressed in astroglial cells in circadian rhythm under constant lighting conditions in mice. *J. Neuroscience Res.* **60**, 212–218 (2000)
- MOTA, S. R., CANTERAS, N. S., BARTOL, I., SKORUPA, A. L., SCIALFA, J. H., TERRA, I. M., AFECHÉ, S. C., and CIPOLLANETO, J.: Lesions of the dorsomedial hypothalamic nucleus do not influence the daily profile of pineal metabolism in rats. *Neuroendocrinology* **73**, 123–128 (2001)
- MULLER, E. E., LOCATELLI, V., and COCCHI, D.: Neuroendocrine control of growth hormone secretion. *Physiol. Rev.* **79**, 511–607 (1999)
- MUNCH, I. C., MOLLER, M., LARSEN, P. J., and VRANG, N.: Light-induced c-Fos expression in suprachiasmatic nuclei neurons targeting the paraventricular nucleus of the hamster hypothalamus: phase dependence and immunochemical identification. *J. Comp. Neurol.* **442**, 48–62 (2002)
- NAUM, O. G., FERNANDA RUBIO, M., and GOLOMBEK, D. A.: Rhythmic variation in gamma-aminobutyric acid(A)-receptor subunit composition in the circadian system and median eminence of Syrian hamsters. *Neuroscience Lett.* **310**, 178–182 (2001)
- NIELSEN, H. S., HANNIBAL, J., and FAHRENKRUG, J.: Vasoactive intestinal polypeptide induces per1 and per2 gene expression in the rat suprachiasmatic nucleus late at night. *Eur. J. Neuroscience* **15**, 570–574 (2002)
- NING, K., LI, L., LIAO, M., LIU, B., MIELKE, J. G., CHEN, Y., DUAN, Y., EL-HAYEK, Y. H., and WAN, Q.: Circadian regulation of GABAA receptor function by CKI epsilon-CKI delta in the rat suprachiasmatic nuclei. *Nature Neuroscience* **7**, 489–490 (2004)
- NISHIWAKI, T., OKAMURA, H., KANEMASA, K., INATOMI, T., IBATA, Y., FUKUHARA, C., and INOUE, S. T.: Differences of somatostatin mRNA in the rat suprachiasmatic nucleus under light-dark and constant dark conditions: an analysis by *in situ* hybridization. *Neuroscience Lett.* **197**, 231–234 (1995)
- NOGUCHI, T., and WATANABE, K.: Regional differences in circadian period within the suprachiasmatic nucleus. *Brain Res.* **1239**, 119–126 (2008)
- NOGUCHI, T., WATANABE, K., OGURA, A., and YAMAOKA, S.: The clock in the dorsal suprachiasmatic nucleus runs faster than that in the ventral. *Eur. J. Neuroscience* **20**, 3199–3202 (2004)
- NYGARD, M., LUNDKVIST, G. B., HILL, R. H., and KRISTENSSON, K.: Rapid nitric oxide-dependent effects of tumor necrosis factor-alpha on suprachiasmatic nuclei neuronal activity. *Neuroreport* **20**, 213–217 (2009)
- OHTSUKA-ISOYA, M., HAYASHI, H., and SHINODA, H.: Effect of suprachiasmatic nucleus lesion on circadian dentin increment in rats. *Amer. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **280**, R1364–1370 (2001)
- OKAMOTO, S., OKAMURA, H., MIYAKE, M., TAKAHASHI, Y., TAKAGI, S., AKAGI, Y., FUKUI, K., OKAMOTO, H., and IBATA, Y.: A diurnal variation of vasoactive intestinal peptide (VIP) mRNA under a daily light-dark cycle in the rat suprachiasmatic nucleus. *Histochemistry* **95**, 525–528 (1991)

- OKAMURA, H., BEROD, A., JULIEN, J. F., GEFFARD, M., KITAHAMA, K., MALLET, J., and BOBILLIER, P.: Demonstration of GABAergic cell bodies in the suprachiasmatic nucleus: in situ hybridization of glutamic acid decarboxylase (GAD) mRNA and immunocytochemistry of GAD and GABA. *Neuroscience Lett.* 102, 131–136 (1989)
- OKAMURA, H., and IBATA, Y.: GRP immunoreactivity shows a day-night difference in the suprachiasmatic nuclear soma and efferent fibers: comparison to VIP immunoreactivity. *Neuroscience Lett.* 181, 165–168 (1994)
- OTORI, Y., TOMINAGA, K., FUKUHARA, C., YANG, J., YAMAZAKI, S., CAGAMPANG, F. R., OKAMURA, H., and INOUE, S. T.: Substance P-like immunoreactivity in the suprachiasmatic nucleus of the rat. *Brain Res.* 619, 271–277 (1993)
- PAKHOTIN, P., HARMAR, A. J., VERKHRATSKY, A., and PIGGINS, H.: VIP receptors control excitability of suprachiasmatic nuclei neurones. *Pflügers Arch.* 452, 7–15 (2006)
- PAUL, K. N., FUKUHARA, C., TOSINI, G., and ALBERS, H. E.: Transduction of light in the suprachiasmatic nucleus: evidence for two different neurochemical cascades regulating the levels of Per1 mRNA and pineal melatonin. *Neuroscience* 119, 137–144 (2003)
- PERREAU-LENZ, S., KALSBECK, A., GARIDOU, M.L., WORTEL, J., VAN DER VLIET, J., VAN HEIJNINGEN, C., SIMONNEAUX, V., PEVET, P., and BUIJS, R. M.: Suprachiasmatic control of melatonin synthesis in rats: inhibitory and stimulatory mechanisms. *Eur. J. Neuroscience* 17, 221–228 (2003)
- PERREAU-LENZ, S., KALSBECK, A., PEVET, P., and BUIJS, R. M.: Glutamatergic clock output stimulates melatonin synthesis at night. *Eur. J. Neuroscience* 19, 318–324 (2004)
- PESCHKE, E., PESCHKE, D., RUZSAS, C., and REKASI, Z.: Lesion of the suprachiasmatic nuclei prevents the cold-induced increase of thyrotropin secretion. *Neuroendocrinol. Lett.* 11, 25–32 (1989)
- PICKARD, G. E., KAHN, R., and SILVER, R.: Splitting of the circadian rhythm of body temperature in the golden hamster. *Physiol. Behav.* 32, 763–766 (1984)
- PICKARD, G. E., and TUREK, F. W.: Splitting of the circadian rhythm of activity is abolished by unilateral lesions of the suprachiasmatic nuclei. *Science* 215, 1119–1121 (1982)
- PICKARD, G. E., and TUREK, F. W.: The suprachiasmatic nuclei: two circadian clocks? *Brain Res.* 268, 201–210 (1983)
- PIGGINS, H. D., ANTLE, M. C., and RUSAK, B.: Neuropeptides phase shift the mammalian circadian pacemaker. *J Neuroscience* 15, 5612–5622 (1995)
- PLANO, S. A., AGOSTINO, P. V., and GOLOMBEK, D. A.: Extracellular nitric oxide signaling in the hamster biological clock. *FEBS Lett.* 581, 5500–5504 (2007)
- PLANO, S. A., GOLOMBEK, D. A., and CHIESA, J. J.: Circadian entrainment to light-dark cycles involves extracellular nitric oxide communication within the suprachiasmatic nuclei. *Eur. J. Neuroscience* 31, 876–882 (2010)
- POIREL, V. J., MASSON-PEVET, M., PEVET, P., and GAUER, F.: MT1 melatonin receptor mRNA expression exhibits a circadian variation in the rat suprachiasmatic nuclei. *Brain Res.* 946, 64–71 (2002)
- POPA, S. M., CLIFTON, D. K., and STEINER, R. A.: A KiSS to remember. *Trends Endocrinol. Metab.* 16, 249–250 (2005)
- POPA, S. M., CLIFTON, D. K., and STEINER, R. A.: The role of kisspeptins and GPR54 in the neuroendocrine regulation of reproduction. *Annu. Rev. Physiol.* 70, 213–238 (2008)
- PREITNER, N., DAMIOLA, F., LOPEZ-MOLINA, L., ZAKANY, J., DUBOULE, D., ALBRECHT, U., and SCHIBLER, U.: The orphan nuclear receptor REV-ERB $\alpha$  controls circadian transcription within the positive limb of the mammalian circadian oscillator. *Cell* 110, 251–260 (2002)
- PROSSER, R. A.: Neuropeptide Y blocks serotonergic phase shifts of the suprachiasmatic circadian clock in vitro. *Brain Res.* 808, 31–41 (1998)
- PROVENCIO, I., RODRIGUEZ, I. R., JIANG, G., HAYES, W. P., MOREIRA, E. F., and ROLLAG, M. D.: A novel human opsin in the inner retina. *J. Neuroscience* 20, 600–605 (2000)
- RALPH, M. R., FOSTER, R. G., DAVIS, F. C., and MENAKER, M.: Transplanted suprachiasmatic nucleus determines circadian period. *Science* 247, 975–978 (1990)
- RALPH, M. R., and MENAKER, M.: A mutation of the circadian system in golden hamsters. *Science* 241, 1225–1227 (1988)
- RALPH, M. R., and MENAKER, M.: GABA regulation of circadian responses to light. I. Involvement of GABAA-benzodiazepine and GABAB receptors. *J. Neuroscience* 9, 2858–2865 (1989)
- RASH, J. E., OLSON, C. O., POULIOT, W. A., DAVIDSON, K. G., YASUMURA, T., FURMAN, C. S., ROYER, S., KAMASAWA, N., NAGY, J. I., and DUDEK, F. E.: Connexin36 vs. connexin32, „miniature“ neuronal gap junctions, and limited electrotonic coupling in rodent suprachiasmatic nucleus. *Neuroscience* 149, 350–371 (2007)
- RAWASHDEH, O., HUDSON, R. L., STEPIEN, I., and DUBOCOVICH, M. L.: Circadian periods of sensitivity for ramelteon on the onset of running-wheel activity and the peak of suprachiasmatic nucleus neuronal firing rhythms in C3H/HeN mice. *Chronobiol. Int.* 28, 31–38 (2010)
- REDLIN, U., and LYNCH, G. R.: Effects of pinealectomy on SCN electrical firing rhythm in Djungarian hamsters. *Neuroscience Lett.* 236, 67–70 (1997)



- REED, H. E., CUTLER, D. J., BROWN, T. M., BROWN, J., COEN, C. W., and PIGGINS, H. D.: Effects of vasoactive intestinal polypeptide on neurones of the rat suprachiasmatic nuclei in vitro. *J. Neuroendocrinol.* *14*, 639–646 (2002)
- REED, H. E., MEYER-SPASCHE, A., CUTLER, D. J., COEN, C. W., and PIGGINS, H. D.: Vasoactive intestinal polypeptide (VIP) phase-shifts the rat suprachiasmatic nucleus clock in vitro. *Eur. J. Neuroscience* *13*, 839–843 (2001)
- REPERT, S. M., ARTMAN, H. G., SWAMINATHAN, S., and FISHER, D. A.: Vasopressin exhibits a rhythmic daily pattern in cerebrospinal fluid but not in blood. *Science* *213*, 1256–1257 (1981)
- REPERT, S. M., WEAVER, D. R., RIVKES, S. A., and STOPA, E. G.: Putative melatonin receptors in a human biological clock. *Science* *242*, 78–81 (1988)
- REUSS, S.: Photoperiod effects on bombesin- and cholecystokinin-like immunoreactivity in the suprachiasmatic nuclei of the Djungarian hamster (*Phodopus sungorus*). *Neuroscience Lett.* *128*, 13–16 (1991)
- REUSS, S.: Components and connections of the circadian timing system in mammals. *Cell Tissue Res.* *285*, 353–378 (1996)
- REUSS, S.: The clock in the brain: Anatomy of the mammalian circadian timing system. *Abh. Sächs. Akad. Wiss. Leipzig Math.-nat.wiss. Kl.* *60/1*, 9–48 (2003)
- REUSS, S., and BURGER, K.: Substance P-like immunoreactivity in the hypothalamic suprachiasmatic nucleus of *Phodopus sungorus*-relation to daytime, photoperiod, sex and age. *Brain Res.* *638*, 189–195 (1994)
- REUSS, S., DECKER, K., ROSSELER, L., LAYES, E., SCHOLLMAYER, A., and SPESSERT, R.: Nitric oxide synthase in the hypothalamic suprachiasmatic nucleus of rat: evidence from histochemistry, immunohistochemistry and western blot; and colocalization with VIP. *Brain Res.* *695*, 257–262 (1995)
- REUSS, S., HURLBUT, E. C., SPEH, J. C., and MOORE, R. Y.: Immunohistochemical evidence for the presence of neuropeptides in the hypothalamic suprachiasmatic nucleus of ground squirrels. *Anat. Rec.* *225*, 341–346 (1989)
- ROMJIN, H. J., SLUITER, A. A., POOL, C. W., WORTEL, J., and BUIJS, R. M.: Differences in colocalization between Fos and PHI, GRP, VIP and VP in neurons of the rat suprachiasmatic nucleus after a light stimulus during the phase delay versus the phase advance period of the night. *J. Comp. Neurol.* *372*, 1–8 (1996)
- ROMJIN, H. J., SLUITER, A. A., POOL, C. W., WORTEL, J., and BUIJS, R. M.: Evidence from confocal fluorescence microscopy for a dense, reciprocal innervation between AVP-, somatostatin-, VIP/PHI-, GRP-, and VIP/PHI/GRP-immunoreactive neurons in the rat suprachiasmatic nucleus. *Eur. J. Neuroscience* *9*, 2613–2623 (1997)
- ROMJIN, H. J., SLUITER, A. A., WORTEL, J., VAN UUM, J. F., and BUIJS, R. M.: Immunocytochemical evidence for a diurnal rhythm of neurons showing colocalization of VIP with GRP in the rat suprachiasmatic nucleus. *J. Comp. Neurol.* *391*, 397–405 (1998)
- RUSAK, B., ROBERTSON, H. A., WISDEN, W., and HUNT, S. P.: Light pulses that shift rhythms induce gene expression in the suprachiasmatic nucleus. *Science* *248*, 1237–1240 (1990)
- SAEB-PARSY, K., and DYBALL, R. E.: Defined cell groups in the rat suprachiasmatic nucleus have different day/night rhythms of single-unit activity in vivo. *J. Biol. Rhythms* *18*, 26–42 (2003)
- SAEB-PARSY, K., LOMBARDELLI, S., KHAN, F. Z., MCDOWALL, K., AU-YONG, I. T., and DYBALL, R. E.: Neural connections of hypothalamic neuroendocrine nuclei in the rat. *J. Neuroendocrinol.* *12*, 635–648 (2000)
- SAPER, C. B., LU, J., CHOU, T. C., and GOOLEY, J.: The hypothalamic integrator for circadian rhythms. *Trends Neuroscience* *28*, 152–157 (2005)
- SATO, T. K., PANDA, S., MIRAGLIA, L. J., REYES, T. M., RUDIC, R. D., MCNAMARA, P., NAIK, K. A., FITZGERALD, G. A., KAY, S. A., and HOGENESCH, J. B.: A functional genomics strategy reveals Rora as a component of the mammalian circadian clock. *Neuron* *43*, 527–537 (2004)
- SAWAKI, Y., NIHONMATSU, I., and KAWAMURA, H.: Transplantation of the neonatal suprachiasmatic nuclei into rats with complete bilateral suprachiasmatic lesions. *Neuroscience Res.* *1*, 67–72 (1984)
- SCHAAP, J., ALBUS, H., VANDERLEEST, H. T., EILERS, P. H., DETARI, L., and MEIJER, J. H.: Heterogeneity of rhythmic suprachiasmatic nucleus neurons: Implications for circadian waveform and photoperiodic encoding. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *100*, 15994–15999 (2003)
- SCHWARTZ, W. J., CARPINO, A. Jr., DE LA IGLESIA, H. O., BALER, R., KLEIN, D. C., NAKABEPPU, Y., and ARONIN, N.: Differential regulation of fos family genes in the ventrolateral and dorsomedial subdivisions of the rat suprachiasmatic nucleus. *Neuroscience* *98*, 535–547 (2000)
- SCHWARTZ, W. J., and GAINER, H.: Suprachiasmatic nucleus: use of <sup>14</sup>C-labeled deoxyglucose uptake as a functional marker. *Science* *197*, 1089–1091 (1977)
- SHEARMAN, L. P., ZYLKA, M. J., WEAVER, D. R., KOLAKOWSKI, L. F. Jr., and REPERT, S. M.: Two period homologs: circadian expression and photic regulation in the suprachiasmatic nuclei. *Neuron* *19*, 1261–1269 (1997)

- SHWARD, W. J., MAYWOOD, E. S., FRENCH, K. L., HORN, J. M., HASTINGS, M. H., SECKL, J. R., HOLMES, M. C., and HARMAR, A. J.: Entrainment to feeding but not to light: circadian phenotype of VPAC2 receptor-null mice. *J. Neuroscience* 27, 4351–4358 (2007)
- SHIBATA, S.: Neural regulation of the hepatic circadian rhythm. *Anat. Rec. A. Discov. Mol. Cell. Evol. Biol.* 280, 901–909 (2004)
- SHIBATA, S., and MOORE, R. Y.: Electrical and metabolic activity of suprachiasmatic nucleus neurons in hamster hypothalamic slices. *Brain Res.* 438, 374–378 (1988)
- SHIBUYA, C. A., MELNYK, R. B., and MROSOVSKY, N.: Simultaneous splitting of drinking and locomotor activity rhythms in a golden hamster. *Naturwissenschaften* 67, 45–47 (1980)
- SHIGEYOSHI, Y., MAEBAYASHI, Y., and OKAMURA, H.: Co-localization of preprosomatostatin mRNA and prepro-tachykinin A mRNA in neurons of the rat suprachiasmatic nucleus. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 48, 159–163 (1997a)
- SHIGEYOSHI, Y., TAGUCHI, K., YAMAMOTO, S., TAKEKIDA, S., YAN, L., TEL, H., MORIYA, T., SHIBATA, S., LOROS, J. J., DUNLAP, J. C., and OKAMURA, H.: Light-induced resetting of a mammalian circadian clock is associated with rapid induction of the mPer1 transcript. *Cell* 91, 1043–1053 (1997b)
- SHIMAZOE, T., MORITA, M., OGIWARA, S., KOJIYA, T., GOTO, J., KAMAKURA, M., MORIYA, T., SHINOHARA, K., TAKIGUCHI, S., KONO, A., MIYASAKA, K., FUNAKOSHI, A., and IKEDA, M.: Cholecystokinin-A receptors regulate photic input pathways to the circadian clock. *FASEB J.* 22, 1479–1490 (2008)
- SHINOHARA, K., FUNABASHI, T., MITUSHIMA, D., and KIMURA, F.: Effects of gap junction blocker on vasopressin and vasoactive intestinal polypeptide rhythms in the rat suprachiasmatic nucleus in vitro. *Neuroscience Res.* 38, 43–47 (2000)
- SHINOHARA, K., HONMA, S., KATSUNO, Y., ABE, H., and HONMA, K.: Circadian rhythms in the release of vasoactive intestinal polypeptide and arginine-vasopressin in organotypic slice culture of rat suprachiasmatic nucleus. *Neuroscience Lett.* 170, 183–186 (1994)
- SHINOHARA, K., HONMA, S., KATSUNO, Y., ABE, H., and HONMA, K.: Circadian release of amino acids in the suprachiasmatic nucleus in vitro. *Neuroreport* 9, 137–140 (1998)
- SHINOHARA, K., and INOUE, S. T.: Circadian variations of neuropeptide Y-like immunoreactivity in the rat pineal gland. *Neuroreport* 5, 1262–1264 (1994)
- SHINOHARA, K., and INOUE, S. T.: Photic information coded by vasoactive intestinal polypeptide and neuropeptide Y. *Neuroscience Biobehav. Rev.* 19, 349–352 (1995)
- SHINOHARA, K., ISOBE, Y., TAKEUCHI, J., and INOUE, S. T.: Circadian rhythms of somatostatin-immunoreactivity in the suprachiasmatic nucleus of the rat. *Neuroscience Lett.* 129, 59–62 (1991)
- SHIRAKAWA, T., HONMA, S., KATSUNO, Y., OGUCHI, H., and HONMA, K. I.: Synchronization of circadian firing rhythms in cultured rat suprachiasmatic neurons. *Eur. J. Neuroscience* 12, 2833–2838 (2000)
- SHIRAKAWA, T., and MOORE, R. Y.: Responses of rat suprachiasmatic nucleus neurons to substance P and glutamate in vitro. *Brain Res.* 642, 213–220 (1994)
- SILVER, R., LESAUTER, J., TRESCO, P. A., and LEHMAN, M. N.: A diffusible coupling signal from the transplanted suprachiasmatic nucleus controlling circadian locomotor rhythms. *Nature* 382, 810–813 (1996a)
- SILVER, R., ROMERO, M. T., BESMER, H. R., LEAK, R., NUNEZ, J. M., and LESAUTER, J.: Calbindin-D28K cells in the hamster SCN express light-induced Fos. *Neuroreport* 7, 1224–1228 (1996b)
- SILVER, R., SOOKHOO, A. I., LESAUTER, J., STEVENS, P., JANSEN, H. T., and LEHMAN, M. N.: Multiple regulatory elements result in regional specificity in circadian rhythms of neuropeptide expression in mouse SCN. *Neuroreport* 10, 3165–3174 (1999)
- SIMONNEAUX, V., and RIBELAYGA, C.: Generation of the melatonin endocrine message in mammals: a review of the complex regulation of melatonin synthesis by norepinephrine, peptides, and other pineal transmitters. *Pharmacol. Rev.* 55, 325–395 (2003)
- SLOTTEN, H. A., KREKLING, S., SICARD, B., and PEVET, P.: Daily infusion of melatonin entrains circadian activity rhythms in the diurnal rodent *Arvicanthis ansorgei*. *Behav. Brain Res.* 133, 11–19 (2002)
- SLOTTEN, H. A., PITROSKY, B., and PEVET, P.: Influence of the mode of daily melatonin administration on entrainment of rat circadian rhythms. *J. Biol. Rhythms* 14, 347–353 (1999)
- SLOTTEN, H. A., PITROSKY, B., and PEVET, P.: Entrainment of rat circadian rhythms by melatonin does not depend on the serotonergic afferents to the suprachiasmatic nuclei. *Brain Res.* 876, 10–16 (2000)
- SMALE, L., BLANCHARD, J., MOORE, R. Y., and MORIN, L. P.: Immunocytochemical characterization of the suprachiasmatic nucleus and the intergeniculate leaflet in the diurnal ground squirrel, *Spermophilus lateralis*. *Brain Res.* 563, 77–86 (1991)
- SMALE, L., and BOVERHOF, J.: The suprachiasmatic nucleus and intergeniculate leaflet of *Arvicanthis niloticus*, a diurnal murid rodent from East Africa. *J. Comp. Neurol.* 403, 190–208 (1999)

- SMITH, M. J., and JENNES, L.: Neural signals that regulate GnRH neurones directly during the oestrous cycle. *Reproduction* 122, 1–10 (2001)
- SMITH, M. J., JENNES, L., and WISE, P. M.: Localization of the VIP2 receptor protein on GnRH neurons in the female rat. *Endocrinology* 141, 4317–4320 (2000)
- SMITH, T. M.: Experimental determination of the periodicity of incremental features in enamel. *J. Anat.* 208, 99–113 (2006)
- Sobotta Atlas: Sobotta Atlas der Anatomie des Menschen.* Hrsg. von R. PUTZ und R. PABST. 20. Aufl. München: Urban & Schwarzenberg 1993
- SOFRONIEW, M. V., and WEINDL, A.: Projections from the parvocellular vasopressin- and neurophysin-containing neurons of the suprachiasmatic nucleus. *Amer. J. Anat.* 153, 391–429 (1978)
- SOLLARS, P. J., OGILVIE, M. D., SIMPSON, A. M., and PICKARD, G. E.: Photic entrainment is altered in the 5-HT1B receptor knockout mouse. *J. Biol. Rhythms.* 21, 21–32 (2006a)
- SOLLARS, P. J., SIMPSON, A. M., OGILVIE, M. D., and PICKARD, G. E.: Light-induced Fos expression is attenuated in the suprachiasmatic nucleus of serotonin 1B receptor knockout mice. *Neuroscience Lett.* 401, 209–213 (2006b)
- SPOUSE, I., REYNOLDS, L., BRASELTON, J., and SCHMIDT, A.: Serotonin-induced phase advances of SCN neuronal firing in vitro: a possible role for 5-HT5A receptors? *Synapse* 54, 111–118 (2004)
- SPOUSE, J., BRASELTON, J., and REYNOLDS, L.: Fluoxetine modulates the circadian biological clock via phase advances of suprachiasmatic nucleus neuronal firing. *Biol. Psychiatry* 60, 896–899 (2006)
- SPOUSE, J., LI, X., STOCK, J., MCNEISH, J., and REYNOLDS, L.: Circadian rhythm phenotype of 5-HT7 receptor knockout mice: 5-HT and 8-OH-DPAT-induced phase advances of SCN neuronal firing. *J. Biol. Rhythms.* 20, 122–131 (2005)
- STADLER, F., SCHMUTZ, I., SCHWALLER, B., and ALBRECHT, U.: Lack of calbindin-D28k alters response of the murine circadian clock to light. *Chronobiol. Int.* 27, 68–82 (2010)
- STAMP, J. A., PIGGINS, H. D., RUSAK, B., and SEMBA, K.: Distribution of ionotropic glutamate receptor subunit immunoreactivity in the suprachiasmatic nucleus and intergeniculate leaflet of the hamster. *Brain Res.* 756, 215–224 (1997)
- STARKEY, S. J.: Melatonin and 5-hydroxytryptamine phase-advance the rat circadian clock by activation of nitric oxide synthesis. *Neuroscience Lett.* 211, 199–202 (1996)
- STARKEY, S. J., GRANT, A. L., and HAGAN, R. M.: A rapid and transient synthesis of nitric oxide (NO) by a constitutively expressed type II NO synthase in the guinea-pig suprachiasmatic nucleus. *Br. J. Pharmacol.* 134, 1084–1092 (2001)
- STEHLE, J., VANECEK, J., and VOLLRATH, L.: Effects of melatonin on spontaneous electrical activity of neurons in rat suprachiasmatic nuclei: an in vitro iontophoretic study. *J. Neural Transm.* 78, 173–177 (1989)
- STEHLE, J. H., GALL, C. VON, and KORF, H. W.: Melatonin: a clock-output, a clock-input. *J. Neuroendocrinol.* 15, 383–389 (2003)
- STEPHAN, F. K., and ZUCKER, I.: Circadian rhythms in drinking behavior and locomotor activity of rats are eliminated by hypothalamic lesions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 69, 1583–1586 (1972)
- STERNICZUK, R., COLLIN, M. A., NUNEZ, M., and ANTLE, M. C.: Investigating the role of substance P in photic responses of the circadian system: individual and combined actions with gastrin-releasing peptide. *Neuropharmacology* 58, 277–285 (2010)
- STERNICZUK, R., STEPKOWSKI, A., JONES, M., and ANTLE, M. C.: Enhancement of photic shifts with the 5-HT1A mixed agonist/antagonist NAN-190: intra-suprachiasmatic nucleus pathway. *Neuroscience* 153, 571–580 (2008)
- SU, J. D., and LIU, S. Y.: Direct projections from serotonergic neurons in the dorsal and median raphe nuclei of mid-brain to the suprachiasmatic nucleus in *Tupaia belangeri chinensis*. *Neuroreport* 12, 2341–2345 (2001)
- SUINO, M., MASUMOTO, K. H., YAMAGUCHI, S., VAN DER HORST, G. T., OKAMURA, H., and INOUE, S. T.: Suprachiasmatic nucleus grafts restore circadian behavioral rhythms of genetically arrhythmic mice. *Curr. Biol.* 13, 664–668 (2003)
- SUMOVA, A., EBLING, F. J., MAYWOOD, E. S., HERBERT, J., and HASTINGS, M. H.: Non-photic circadian entrainment in the Syrian hamster is not associated with phosphorylation of the transcriptional regulator CREB within the suprachiasmatic nucleus, but is associated with adrenocortical activation. *Neuroendocrinology* 59, 579–589 (1994)
- SWANN, J. M., and TUREK, F. W.: Multiple circadian oscillators regulate the timing of behavioral and endocrine rhythms in female golden hamsters. *Science* 228, 898–900 (1985)
- SWANSON, L. W., SAWCHENKO, P. E., RIVIER, J., and VALE, W. W.: Organization of ovine corticotropin-releasing factor immunoreactive cells and fibers in the rat brain: an immunohistochemical study. *Neuroendocrinology* 36, 165–186 (1983)

- SZAFARCZYK, A., IXART, G., ALONSO, G., MALAVAL, F., NOUGUIER-SOULE, J., and ASSENMACHER, I.: Neural control of circadian rhythms in plasma ACTH, plasma corticosterone and motor activity. *J. Physiol. (Paris)* 77, 969–976 (1981)
- TAKANO, A., SHIMIZU, K., KANI, S., BUIJS, R. M., OKADA, M., and NAGAI, K.: Cloning and characterization of rat casein kinase Iepsilon. *FEBS Lett.* 477, 106–112 (2000)
- TAKATSUJI, K., MIGUEL-HIDALGO, J. J., and TOHYAMA, M.: Substance P-immunoreactive innervation from the retina to the suprachiasmatic nucleus in the rat. *Brain Res.* 568, 223–229 (1991)
- TAKEUCHI, J., NAGASAKI, H., SHINOHARA, K., and INOUE, S. T.: A circadian rhythm of somatostatin messenger RNA levels, but not of vasoactive intestinal polypeptide/peptide histidine isoleucine messenger RNA levels in rat suprachiasmatic nucleus. *Mol. Cell. Neuroscience* 3, 29–35 (1992)
- TAMANINI, F., YAGITA, K., OKAMURA, H., and VAN DER HORST, G. T.: Nucleocytoplasmic shuttling of clock proteins. *Methods Enzymol.* 393, 418–435 (2005)
- TANAKA, M., HAYASHI, S., TAMADA, Y., IKEDA, T., HISA, Y., TAKAMATSU, T., and IBATA, Y.: Direct retinal projections to GRP neurons in the suprachiasmatic nucleus of the rat. *Neuroreport* 8, 2187–2191 (1997)
- TANAKA, M., ICHITANI, Y., OKAMURA, H., TANAKA, Y., and IBATA, Y.: The direct retinal projection to VIP neuronal elements in the rat SCN. *Brain Res. Bull.* 31, 637–640 (1993)
- TANAKA, M., OKAMURA, H., MATSUDA, T., SHIGEYOSHI, Y., HISA, Y., CHIHARA, K., and IBATA, Y.: Somatostatin neurons form a distinct peptidergic neuronal group in the rat suprachiasmatic nucleus: a double labeling in situ hybridization study. *Neuroscience Lett.* 215, 119–122 (1996)
- TECLEMARIAM-MESBAH, R., KALSBECK, A., PEVET, P., and BUIJS, R. M.: Direct vasoactive intestinal polypeptide-containing projection from the suprachiasmatic nucleus to spinal projecting hypothalamic paraventricular neurons. *Brain Res.* 748, 71–76 (1997)
- TOH, K. L., JONES, C. R., HE, Y., EIDE, E. J., HINZ, W. A., VIRSHUP, D. M., PTACEK, L. J., and FU, Y. H.: An hPer2 phosphorylation site mutation in familial advanced sleep phase syndrome. *Science* 291, 1040–1043 (2001)
- TOMINAGA, K., SHINOHARA, K., OTORI, Y., FUKUHARA, C., and INOUE, S. T.: Circadian rhythms of vasopressin content in the suprachiasmatic nucleus of the rat. *Neuroreport* 3, 809–812 (1992)
- TOUITOU, Y., and HAUS, E.: *Biologic Rhythms in Clinical and Laboratory Medicine*. Berlin: Springer 1992
- TOUSSON, E., and MEISSL, H.: Suprachiasmatic nuclei grafts restore the circadian rhythm in the paraventricular nucleus of the hypothalamus. *J. Neuroscience* 24, 2983–2988 (2004)
- UEDA, S., and IBATA, Y.: The fine structures of the suprachiasmatic nucleus of the golden hamster. *J. Hirnforsch.* 30, 719–729 (1989)
- UEDA, S., KAWATA, M., and SANO, Y.: Identification of neuropeptide Y immunoreactivity in the suprachiasmatic nucleus and the lateral geniculate nucleus of some mammals. *Neuroscience Lett.* 68, 7–10 (1986)
- UHL, G. R., and REPPERT, S. M.: Suprachiasmatic nucleus vasopressin messenger RNA: circadian variation in normal and Brattleboro rats. *Science* 232, 390–393 (1986)
- ULRICH-LAI, Y. M., ARNHOLD, M. M., and ENGELAND, W. C.: Adrenal splanchnic innervation contributes to the diurnal rhythm of plasma corticosterone in rats by modulating adrenal sensitivity to ACTH. *Amer. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 290, R1128–1135 (2006)
- VAN DEN POL, A. N.: The hypothalamic suprachiasmatic nucleus of rat: intrinsic anatomy. *J. Comp. Neurol.* 191, 661–702 (1980)
- VAN DEN POL, A. N.: Gamma-aminobutyrate, gastrin releasing peptide, serotonin, somatostatin, and vasopressin: ultrastructural immunocytochemical localization in presynaptic axons in the suprachiasmatic nucleus. *Neuroscience* 17, 643–659 (1986)
- VAN DEN POL, A. N., and GORCS, T.: Synaptic relationships between neurons containing vasopressin, gastrin-releasing peptide, vasoactive intestinal polypeptide, and glutamate decarboxylase immunoreactivity in the suprachiasmatic nucleus: dual ultrastructural immunocytochemistry with gold-substituted silver peroxidase. *J. Comp. Neurol.* 252, 507–521 (1986)
- VAN DEN POL, A. N., and TSUJIMOTO, K. L.: Neurotransmitters of the hypothalamic suprachiasmatic nucleus: immunocytochemical analysis of 25 neuronal antigens. *Neuroscience* 15, 1049–1086 (1985)
- VAN DER BEEK, E. M., HORVATH, T. L., WIEGANT, V. M., VAN DEN HURK, R., and BUIJS, R. M.: Evidence for a direct neuronal pathway from the suprachiasmatic nucleus to the gonadotropin-releasing hormone system: combined tracing and light and electron microscopic immunocytochemical studies. *J. Comp. Neurol.* 384, 569–579 (1997)
- VAN DER BEEK, E. M., WIEGANT, V. M., VAN DER DONK, H. A., VAN DEN HURK, R., and BUIJS, R. M.: Lesions of the suprachiasmatic nucleus indicate the presence of a direct vasoactive intestinal polypeptide-containing projection to gonadotrophin-releasing hormone neurons in the female rat. *J. Neuroendocrinol.* 5, 137–144 (1993)
- VAN DER ZEE, E. A., and BULT, A.: Distribution of AVP and Ca(2+)-dependent PKC-isozymes in the suprachiasmatic nucleus of the mouse and rabbit. *Brain Res.* 701, 99–107 (1995)

- VAN DER ZEE, E. A., OKLEJEWICZ, M., JANSEN, K., DAAN, S., and GERKEMA, M. P.: Vasopressin immunoreactivity and release in the suprachiasmatic nucleus of wild-type and tau mutant Syrian hamsters. *Brain Res.* 936, 38–46 (2002)
- VAN LEEUWEN, F. W., SWAAB, D. F., and RAAY, C. DE: Immunoelectronmicroscopic localization of vasopressin in the rat suprachiasmatic nucleus. *Cell Tissue Res.* 193, 1–10 (1978)
- VANSTEENSEL, M. J., MAGNONE, M. C., VAN OOSTERHOUT, F., BAERISWYL, S., ALBRECHT, U., ALBUS, H., DAHAN, A., and MEIJER, J. H.: The opioid fentanyl affects light input, electrical activity and Per gene expression in the hamster suprachiasmatic nuclei. *Eur. J. Neuroscience* 21, 2958–2966 (2005)
- VARCOE, T. J., and KENWAY, D. J.: Activation of 5-HT<sub>2C</sub> receptors acutely induces Per1 gene expression in the rat SCN in vitro. *Brain Res.* 1209, 19–28 (2008)
- VIDA, B., DELI, L., HRABOVSKY, E., KALAMATIANOS, T., CARATY, A., COEN, C. W., LIPOSITS, Z., and KALLO, I.: Evidence for suprachiasmatic vasopressin neurones innervating kisspeptin neurones in the rostral periventricular area of the mouse brain: regulation by oestrogen. *J. Neuroendocrinol.* 22, 1032–1039 (2010)
- VIDA, B., HRABOVSKY, E., KALAMATIANOS, T., COEN, C. W., LIPOSITS, Z., and KALLO, I.: Oestrogen receptor alpha and beta immunoreactive cells in the suprachiasmatic nucleus of mice: distribution, sex differences and regulation by gonadal hormones. *J. Neuroendocrinol.* 20, 1270–1277 (2008)
- VIELHABER, E., EIDE, E., RIVERS, A., GAO, Z. H., and VIRSHUP, D. M.: Nuclear entry of the circadian regulator mPER1 is controlled by mammalian casein kinase I epsilon. *Mol. Cell. Biol.* 20, 4888–4899 (2000)
- VIELHABER, E. L., DURICKA, D., ULLMAN, K. S., and VIRSHUP, D. M.: Nuclear export of mammalian PERIOD proteins. *J. Biol. Chem.* 276, 45921–45927 (2001)
- VRANG, N., LARSEN, P. J., and MIKKELSEN, J. D.: Direct projection from the suprachiasmatic nucleus to hypophysiotrophic corticotropin-releasing factor immunoreactive cells in the paraventricular nucleus of the hypothalamus demonstrated by means of Phaseolus vulgaris-leucoagglutinin tract tracing. *Brain Res.* 684, 61–69 (1995a)
- VRANG, N., LARSEN, P. J., MOLLER, M., and MIKKELSEN, J. D.: Topographical organization of the rat suprachiasmatic-paraventricular projection. *J. Comp. Neurol.* 353, 585–603 (1995b)
- VRANG, N., MROSOVSKY, N., and MIKKELSEN, J. D.: Afferent projections to the hamster intergeniculate leaflet demonstrated by retrograde and anterograde tracing. *Brain Res. Bull.* 59, 267–288 (2003)
- WAGNER, S., CASTEL, M., GAINER, H., and YAROM, Y.: GABA in the mammalian suprachiasmatic nucleus and its role in diurnal rhythmicity. *Nature* 387, 598–603 (1997)
- WATANABE, A., HAMADA, T., SHIBATA, S., and WATANABE, S.: Effects of nitric oxide synthase inhibitors on N-methyl-D-aspartate-induced phase delay of circadian rhythm of neuronal activity in the rat suprachiasmatic nucleus in vitro. *Brain Res.* 646, 161–164 (1994)
- WATANABE, K., and HIROSHIGE, T.: Phase relation between episodic fluctuations of spontaneous locomotor activity and plasma corticosterone in rats with suprachiasmatic nuclei lesions. *Neuroendocrinology* 33, 52–59 (1981)
- WATANABE, K., VANECEK, J., and YAMAOKA, S.: In vitro entrainment of the circadian rhythm of vasopressin-releasing cells in suprachiasmatic nucleus by vasoactive intestinal polypeptide. *Brain Res.* 877, 361–366 (2000)
- WATTS, A. G., and SWANSON, L. W.: Efferent projections of the suprachiasmatic nucleus: II. Studies using retrograde transport of fluorescent dyes and simultaneous peptide immunohistochemistry in the rat. *J. Comp. Neurol.* 258, 230–252 (1987)
- WATTS, A. G., SWANSON, L. W., and SANCHEZ-WATTS, G.: Efferent projections of the suprachiasmatic nucleus: I. Studies using anterograde transport of Phaseolus vulgaris leucoagglutinin in the rat. *J. Comp. Neurol.* 258, 204–229 (1987)
- WEAVER, D. R., and REPPERT, S. M.: The Mel1a melatonin receptor gene is expressed in human suprachiasmatic nuclei. *Neuroreport* 8, 109–112 (1996)
- WEBB, A. B., ANGELO, N., HUETTNER, J. E., and HERZOG, E. D.: Intrinsic, nondeterministic circadian rhythm generation in identified mammalian neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 106, 16493–16498 (2009)
- WEBER, E. T., GANNON, R. L., MICHEL, A. M., GILLETTE, M. U., and REA, M. A.: Nitric oxide synthase inhibitor blocks light-induced phase shifts of the circadian activity rhythm, but not c-fos expression in the suprachiasmatic nucleus of the Syrian hamster. *Brain Res.* 692, 137–142 (1995)
- WEBER, E. T., GANNON, R. L., and REA, M. A.: Local administration of serotonin agonists blocks light-induced phase advances of the circadian activity rhythm in the hamster. *J. Biol. Rhythms.* 13, 209–218 (1998)
- WEBER, E. T., and REA, M. A.: Neuropeptide Y blocks light-induced phase advances but not delays of the circadian activity rhythm in hamsters. *Neuroscience Lett.* 231, 159–162 (1997)
- WEBER, F.: Remodeling the clock: coactivators and signal transduction in the circadian clockworks. *Naturwissenschaften* 96, 321–337 (2009)
- WELSH, D. K., LOGOTHETIS, D. E., MEISTER, M., and REPPERT, S. M.: Individual neurons dissociated from rat suprachiasmatic nucleus express independently phased circadian firing rhythms. *Neuron* 14, 697–706 (1995)

- WELSH, D. K., and REPERT, S. M.: Gap junctions couple astrocytes but not neurons in dissociated cultures of rat suprachiasmatic nucleus. *Brain Res.* 706, 30–36 (1996)
- WELSH, D. K., TAKAHASHI, J. S., and KAY, S. A.: Suprachiasmatic nucleus: cell autonomy and network properties. *Annu. Rev. Physiol.* 72, 551–577 (2010)
- WENISCH, H. J.: Retinohypothalamic projection in the mouse: electron microscopic and iontophoretic investigations of hypothalamic and optic centers. *Cell Tissue Res.* 167, 547–561 (1976)
- WIEGAND, S. J., and TERASAWA, E.: Discrete lesions reveal functional heterogeneity of suprachiasmatic structures in regulation of gonadotropin secretion in the female rat. *Neuroendocrinology* 34, 395–404 (1982)
- WOLLNIK, F., and BIHLER, S.: Strain differences in the distribution of arginine-vasopressin- and neuropeptide Y-immunoreactive neurons in the suprachiasmatic nucleus of laboratory rats. *Brain Res.* 724, 191–199 (1996)
- WOLLNIK, F., BRYSCHE, W., UHLMANN, E., GILLARDON, F., BRAVO, R., ZIMMERMANN, M., SCHLINGENSIEPEN, K. H., and HERDEGEN, T.: Block of c-Fos and JunB expression by antisense oligonucleotides inhibits light-induced phase shifts of the mammalian circadian clock. *Eur. J. Neuroscience* 7, 388–393 (1995)
- YAMAGUCHI, S., ISEJIMA, H., MATSUO, T., OKURA, R., YAGITA, K., KOBAYASHI, M., and OKAMURA, H.: Synchronization of cellular clocks in the suprachiasmatic nucleus. *Science* 302, 1408–1412 (2003)
- YAMAKAWA, G. R., and ANTLE, M. C.: Phenotype and function of raphe projections to the suprachiasmatic nucleus. *Eur. J. Neuroscience* 31, 1974–1983 (2010)
- YAMANAKA, Y., SUZUKI, Y., TODO, T., HONMA, K., and HONMA, S.: Loss of circadian rhythm and light-induced suppression of pineal melatonin levels in Cry1 and Cry2 double-deficient mice. *Genes Cells* 15, 1063–1071 (2010)
- YAMASE, K., TAKAHASHI, S., NOMURA, K., HARUTA, K., and KAWASHIMA, S.: Circadian changes in arginine vasopressin level in the suprachiasmatic nuclei in the rat. *Neuroscience Lett.* 130, 255–258 (1991)
- YAMBE, Y., ARIMA, H., KAKIYA, S., MURASE, T., and OISO, Y.: Diurnal changes in arginine vasopressin gene transcription in the rat suprachiasmatic nucleus. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 104, 132–136 (2002)
- YAN, L.: Expression of clock genes in the suprachiasmatic nucleus: effect of environmental lighting conditions. *Rev. Endocr. Metab. Disord.* 10, 301–310 (2009)
- YAN, L., KARATSOREOS, I., LESAUTER, J., WELSH, D. K., KAY, S., FOLEY, D., and SILVER, R.: Exploring spatiotemporal organization of SCN circuits. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 72, 527–541 (2007)
- YAN, L., and OKAMURA, H.: Gradients in the circadian expression of Per1 and Per2 genes in the rat suprachiasmatic nucleus. *Eur. J. Neuroscience* 15, 1153–1162 (2002)
- YAN, L., and SILVER, R.: Differential induction and localization of mPer1 and mPer2 during advancing and delaying phase shifts. *Eur. J. Neuroscience* 16, 1531–1540 (2002)
- YAN, L., TAKEKIDA, S., SHIGEYOSHI, Y., and OKAMURA, H.: Per1 and Per2 gene expression in the rat suprachiasmatic nucleus: circadian profile and the compartment-specific response to light. *Neuroscience* 94, 141–150 (1999)
- YANG, J., TOMINAGA, K., OTORI, Y., FUKUHARA, C., TOKUMASU, A., and INOUE, S.: Day-night variation of prepro-somatostatin messenger RNA level in the suprachiasmatic nucleus. *Mol. Cell. Neuroscience* 5, 97–102 (1994)
- YANNIELLI, P. C., BREWER, J. M., and HARRINGTON, M. E.: Blockade of the NPY Y5 receptor potentiates circadian responses to light: complementary in vivo and in vitro studies. *Eur. J. Neuroscience* 19, 891–897 (2004)
- YANNIELLI, P. C., and HARRINGTON, M. E.: Neuropeptide Y applied in vitro can block the phase shifts induced by light in vivo. *Neuroreport* 11, 1587–1591 (2000)
- YANNIELLI, P. C., and HARRINGTON, M. E.: Neuropeptide Y in the mammalian circadian system: effects on light-induced circadian responses. *Peptides* 22, 547–556 (2001)
- YOUNG, W. S. 3rd, KOVACS, K., and LOLAIT, S. J.: The diurnal rhythm in vasopressin V1a receptor expression in the suprachiasmatic nucleus is not dependent on vasopressin. *Endocrinology* 133, 585–590 (1993)
- ZLOMANCZUK, P., MARGRAF, R. R., and LYNCH, G. R.: In vitro electrical activity in the suprachiasmatic nucleus following splitting and masking of wheel-running behavior. *Brain Res.* 559, 94–99 (1991)

Prof. em. Dr. Dr. h. c. Lutz VOLLRATH  
Institut für Mikroskopische Anatomie und Neurobiologie  
Langenbeckstraße 1  
55131 Mainz  
Bundesrepublik Deutschland  
Tel.: +49 6131 3922248  
Fax: +49 6131 3922258  
E-Mail: vollrath@uni-mainz.de

## Vorträge und Abhandlungen zur Wissenschaftsgeschichte 2010

Acta Historica Leopoldina Nr. 55

Herausgegeben von Sybille GERSTENGARBE, Joachim KAASCH, Michael KAASCH,  
Andreas KLEINERT und Benno PARTHIER (Halle/Saale)

(2010, 400 Seiten, 47 Abbildungen, 2 Tabellen, 23,95 Euro,  
ISBN: 978-3-8047-2799-1)

Der Band enthält 11 Vorträge aus den wissenschaftshistorischen Seminaren der Leopoldina und zeigt damit die große Themenvielfalt dieser Veranstaltungen. Behandelt werden u. a. die Problemkreise „Die Natur als Magierin: Zum paracelsischen Erbe neuzeitlicher Medizin“ (H. SCHOTT), „Georg Ernst Stahls medizinische Theorie und der Pietismus des 18. Jahrhunderts“ (J. HELM), „Die tamilische Heilkunde in der Wahrnehmung der pietistischen Missionare der dänisch-halleschen Tranquebar-Mission in der ersten Hälfte des 18. Jahrhunderts“ (J. N. NEUMANN), „Matthias Jacob Schleiden und die Versammlungen Deutscher Naturforscher und Ärzte“ (I. JAHN), „Von der Adria an die Nordsee. Meeresbiologische Forschung in der Kaiser-Wilhelm-/Max-Planck-Gesellschaft“ (M. KAZEMI) und „Wandel und Wende in der ostdeutschen Wissenschaft – Pflanzenbiochemie als institutionelles Beispiel“ (B. PARTHIER). Biographische Fragestellungen verfolgen die Beiträge „Johann von Lamont (1805–1879) – ein Pionier des Erdmagnetismus“ (H. SOFFEL), „Der (un)bekannte Reformier – Wilhelm Friedrich Georg Behn (1808–1878) und die Reorganisation der Leopoldina“ (M. KAASCH) und „Bambusstrategie“. Max Planck in der NS-Zeit“ (E. HENNING). Der Abschluss eines Bandes der Leopoldina-Ausgabe von Goethes naturwissenschaftlichen Schriften (*Zur Farbenlehre und Optik nach 1810 und zur Tonlehre*) bildet den Hintergrund eines weiteren Referates (T. NICKOL), während ethische Fragen im Fokus der Ausführungen über „Euthanasie in Geschichte und Gegenwart – im Spektrum zwischen Lebensbeendigung und Sterbebeistand“ (D. VON ENGELHARDT) stehen. Drei Abhandlungen ergänzen den Band. Sie behandeln Leben und Wirken von Otto MEYERHOF und Karl LOHMANN (E. HOFMANN) und widmen sich Fragen der Leopoldina-Geschichte, u. a. dem „Ende des Wanderlebens“ der einst mit den jeweiligen Präsidenten ihren Sitzort wechselnden Akademie (M. KAASCH) bzw. den Gründen für die schließlich dauerhafte Ansiedelung der Leopoldina in Halle an der Saale (W. BERG und M. KAASCH).

## Zur Generierung und Bedeutung circadianer Rhythmen unter besonderer Berücksichtigung von Uhrengenen im endokrinen Pankreas

Eckhard MÜHLBAUER (Leipzig) und Elmar PESCHKE ML (Halle/Saale)

Mit 5 Abbildungen

### Zusammenfassung

Im Zuge der Evolution haben alle höheren Lebewesen, so auch die Säugetiere einschließlich *Homo sapiens*, Mechanismen entwickelt, um äußere tageszeitliche Abläufe zu erfassen und endogen zu verarbeiten. Diese komplexen Verarbeitungsvorgänge bedingen eine innere, also biologische Uhr, die etwa 24-stündige, also *circa-diane*, Rhythmen vorgibt. Damit verknüpft ist die Notwendigkeit, die circadiane Uhr an den physikalischen Tag/Nachtwechsel anzupassen, also zu synchronisieren, um ein Freilaufen der circadianen Rhythmen zu vermeiden.

Beim Säuger befindet sich das circadiane Zentralorgan im hypothalamischen *Nucleus suprachiasmaticus*, dem SCN. Neben dem zentralen Oszillator wurden circadiane Rhythmusgeneratoren in verschiedenen Organen wie Leber, Herz und Pankreas beschrieben. Solche Uhren 2. Ordnung sind der Zentraluhr untergeordnet und werden daher im Gegensatz zum „master-oscillator“ des SCN, als „slave oscillators“ bezeichnet. Eigene Untersuchungen konnten zum einen belegen, dass die Insulinsekretion isolierter pankreatischer Langerhansscher Inseln in einer Perfusionseinrichtung tagesrhythmisch schwankt. Zudem ließ sich in diesem System der synchronisierende Einfluss des Pinealhormons Melatonin nachweisen. Mittels *Real-time*-RT-PCR konnte darüber hinaus am Pankreas der Ratte gezeigt werden, dass Transkripte zentraler Uhrengene (*Per1*, *Bmall*, *Cry1*, *Per2*), als Indikatoren einer funktionellen circadianen Uhr, tageszeitlichen Expressionsschwankungen unterliegen. Dabei wurde *Per1* stets antiphasisch zu *Bmall* exprimiert, was bedeutet, dass spezifische Expressionsmuster charakteristisch sind für jeden bislang untersuchten Oszillator. Schließlich ließ sich durch Serumschock-Experimente an Zellen einer Ratteninsulinoma- $\beta$ -Zelllinie (INS1) belegen, dass die circadiane Uhr auch auf der Ebene der Insulin-produzierenden Einzelzelle funktioniert.

### Abstract

In the course of evolution all higher organisms, including mammals and man, have evolved mechanisms to sense the time of day and to integrate this information endogenously. The complexity of such a process necessitates an internal biological clock to generate rhythms of close to 24 hours, i.e. a “circa-dian” period. However, this function intrinsically requires the introduction of a synchronizer in order to adapt to physical day/night phases, which would otherwise cause divergence from a circadian periodicity and a “free-running” of the circadian cycle.

In mammals, the central circadian oscillator resides in the hypothalamic *nucleus suprachiasmaticus* (SCN). In addition to this principal pacemaker, other oscillators have been detected in the liver, heart and pancreas. These secondary oscillators, also designated “slave” oscillators, are subordinate to the “master” oscillator of the SCN. In our research group, several investigations using a perfusion apparatus have shown that insulin is secreted from isolated pancreatic islets in a strictly circadian manner and that the pineal hormone melatonin can phase-shift these rhythms. Furthermore, using real-time RT-PCR, we have proven that the expression of the circadian clock genes *Per1*, *Cry1*, *Per2* and *Bmall* follows a circadian pattern. *Per1* was always expressed anti-phase to *Bmall*, which indicates the functioning of a circadian clock in the pancreas. Finally, our serum shock experiments on a rat insulinoma  $\beta$ -cell line (INS1) established that the circadian clock also functions on a single-cell level.



## 1. Einleitung

Der Tag/Nachtwechsel beeinflusst das Leben auf unserem Planeten in vielfältiger Weise. Dies betrifft nicht nur die auf das Licht zur Photosynthese angewiesenen Pflanzen, sondern auch alle anderen Organismen. Die Tierwelt hat im Zuge der Evolution eine innere „biologische Uhr“ entwickelt, die in antizipierender Weise dem Organismus einen ungefähr 24-stündigen (circa-dianen) Rhythmus vorgibt. Der Grund für diese Notwendigkeit wird wie folgt nach W. SCHWARZ (*University of Massachusetts Medical School*, MA, USA) zitiert: „All biological clocks are adaptations to life on a rotating world.“ Dabei werden der circadianen Uhr zwei wesentliche Funktionen zugeordnet: (1.) Temporale Organisation (Zuordnungen von Tag/Nachtzeiten zu physiologischen Abläufen), (2.) Antizipation (z. B. von stets wiederkehrenden, perpetuierenden Umweltänderungen).

Eine Abweichung der biologischen Uhr vom exakt 24-stündigen Rhythmus muss daher, wie auch bei einer mechanischen Uhr, „nachgestellt“ werden, ein Vorgang der in der Chronobiologie als „Synchronisation“ bezeichnet wird. Ohne Synchronisation kommt es zur Ausbildung eines freilaufenden Rhythmus, der vom physikalischen Tag/Nachtwechsel abweicht. Dieser endogene Rhythmus (mit der Periodenlänge  $\tau$ ), der sich unter freilaufenden Bedingungen einstellt, ist für jede Spezies typisch und beträgt beim Menschen etwas mehr als 24 Stunden, bei der Maus hingegen beträgt eine Periodenlänge etwas weniger als 24 Stunden (MAURY et al. 2010). Neben den tageszeitlichen, also circadianen oder diurnalen Rhythmen, spielen circannuale und lunare Rhythmen eine größere Rolle bei chronobiologischen Betrachtungen. In diesem Beitrag sollen allerdings nur circadiane Rhythmen behandelt werden.

Durch Läsionsexperimente konnte für den Säuger nachgewiesen werden, dass der Sitz der circadianen Uhr ein hypothalamischer Kern, nämlich der *Nucleus suprachiasmaticus*, ist (RALPH et al. 1990). Etwa 20000 spezialisierte Neurone des paarig angelegten Kernes generieren einen circadianen Rhythmus und bilden den zentralen circadianen Schrittmacher. Die Bedeutung dieses Oszillators äußert sich beim Menschen in der circadianen Beeinflussung vielfältiger Körperfunktionen wie z. B. Körpertemperatur, Schlaf-Wach-Verhalten und Stoffwechselabläufe. Eine Übersicht hierzu wird in Abbildung 1 gegeben.

Im Körper des Säugers finden sich neben der Zentraluhr im SCN auch circadiane Uhren in Organen wie Herz (YOUNG et al. 2002), Leber (DAMIOLA et al. 2000) und Pankreas (MÜHLBAUER et al. 2004). Nach häufiger Auffassung haben diese Uhren keine oder nur begrenzte Autonomie, da der von ihnen generierte Rhythmus *in vitro*, also nach Gewebentnahme und Einflussentzug vom zentralen circadianen Oszillator, einer raschen Dämpfung unterliegen kann (REPPERT und WEAVER 2002). PESCHKE und PESCHKE (1998) konnten demgegenüber allerdings zeigen, dass isolierte pankreatische Inseln der Ratte über mehrere Tage ihren Rhythmus beibehielten und auf Melatoninapplikation mit Phasenshift reagierten. Periphere Uhren werden, im Gegensatz zur Zentraluhr, als Uhren 2. Ordnung bezeichnet. Diese sind der Zentraluhr untergeordnet und werden daher auch, im Gegensatz zur „master clock“ des SCN, als „slave oscillators“ bezeichnet (REPPERT und WEAVER 2002, schematische Darstellung in Abb. 2). Es ist dabei essentiell, dass Organe wie Leber und Pankreas, die gemeinsame Funktionen erfüllen, wie z. B. die Regulation der Blutglukose, auch im circadianen Ablauf untereinander synchronisiert sein müssen.

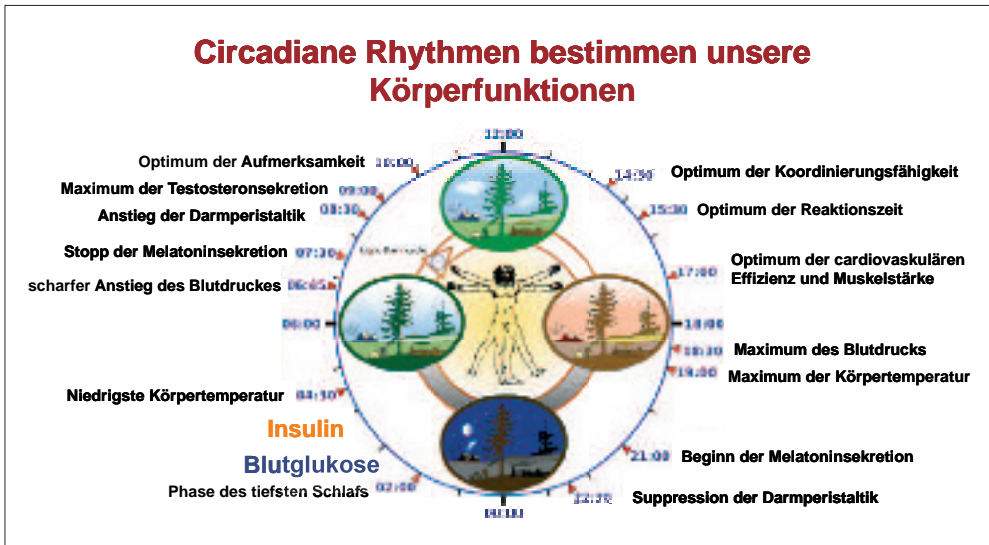


Abb. 1 Die circadiane Uhr des Menschen steuert im Tagesverlauf viele Körperfunktionen mit Reaktions- bzw. Effektmaxima zu genau definierten Tageszeiten. Diese Funktionen sind anhand eines Tageskreises dargestellt. Hervorzuheben ist, dass das Inselhormon Insulin (orange) sowie der Blutzuckerspiegel (blau) ebenfalls im Tagesgang schwanken.

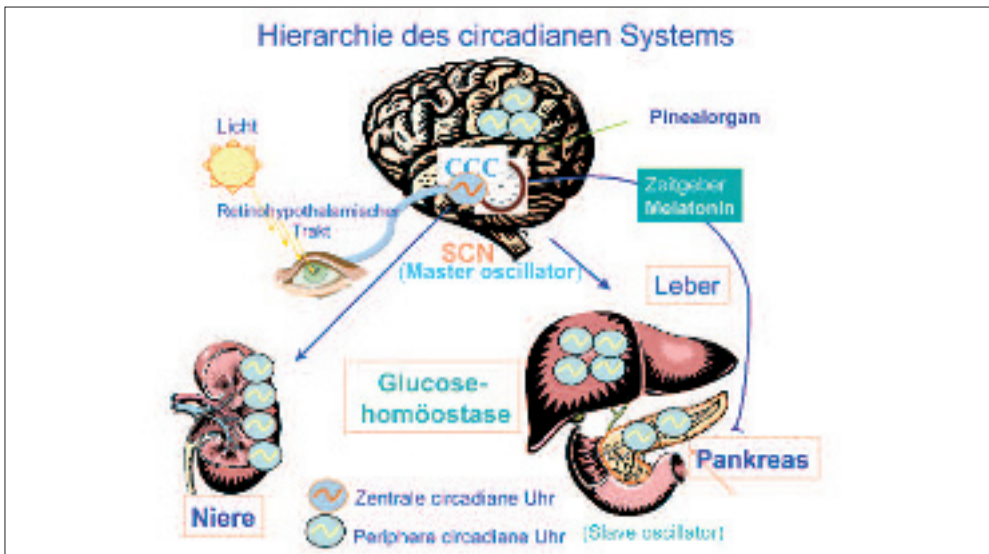


Abb. 2 Der Organismus des Säugers steht unter der Kontrolle eines zentralen circadianen Oszillators (*central circadian clock*, ccc) im hypothalamischen *Nucleus suprachiasmaticus* (SCN). Dieses Zentrum ist neuronal mit der Pinealdrüse, die das Hormon Melatonin produziert, verschaltet. Über das autonome Nervensystem können Organe der Peripherie, wie Pankreas und Leber, neuronal beeinflusst werden. Das „Circadianhormon“ Melatonin erreicht diese Organe über den Blutstrom. Auf beiden Wegen können circadiane Uhren dieser Organe, die auch als Uhren 2. Ordnung („slave oscillators“) betrachtet werden, synchronisiert werden. Der wesentliche synchronisierende Faktor für den „master oscillator“ im SCN ist hingegen das Tageslicht, welches über das Auge perzipiert wird (siehe Einleitung) und neuronal über den retinohypothalamischen Trakt den SCN erreicht. Für die Aufrechterhaltung der Blutglukose ist eine übergreifende Synchronisation der peripheren Uhren essentiell. Nach REPERT und WEAVER (2002), verändert.

Während der zentrale Oszillator im SCN wesentlich durch das Licht synchronisiert wird, gilt das nicht für Uhren in Organen der Peripherie. Diese Oszillatoren werden im Wesentlichen durch humorale Faktoren beeinflusst. Auch durch neuronale Kopplung können, vom SCN ausgehend, synchronisierende Einflüsse vermittelt werden (KALSBECK und BUJIS 2002). Auf Grund der Expression von Melatoninrezeptoren kann das pineale Hormon Melatonin neben seiner bekannten Wirkung auf den SCN beispielsweise Leber und pankreatische Insel (MÜHLBAUER und PESCHKE 2007, PESCHKE et al. 2007, MÜHLBAUER et al. 2009) sowie weitere Organe ansprechen. Auch Glukokortikoiden, die ebenfalls einen Tagesrhythmus aufweisen, wird synchronisierende Funktion zuerkannt. DAMIOLA et al. (2000) sowie STOKKAN et al. (2001) hatten gezeigt, dass bei der Ratte eine Futterrestriktion auf eine begrenzte Zeitspanne am Tag, die Phasenlage der inneren Uhren von Leber und Pankreas verschiebt. Das kann bis zur vollständigen Entkopplung der peripheren Uhr von der Rhythmusvorgabe des SCN führen. Nach neueren Arbeiten gilt beim Säuger auch die Körpertemperatur als wichtiger Synchronisator von Uhren, die eine Vielzahl von Körperprozessen steuern (CHALET et al. 1997, CAMBRAS et al. 2007).

## 2. Circadiane Prozesse und ihre Bedeutung

### 2.1 Der Uhrenmechanismus

Seit den frühen Arbeiten von KONOPKA und BENZER (1971) an Mutationen von Fruchtfliegen (*Drosophila*) mit veränderten Tagesrhythmen ist bekannt, dass die Aktivitäten spezieller Gene für die circadiane Uhr bedeutungsvoll sind. Wenig später konnte man auch beim Säuger homologe Gene wie *Period 1* oder *timeless (Tim)* nachweisen. Es zeigte sich, dass die Genprodukte von Uhrengenen für Transkriptionsfaktoren codieren. Inzwischen ist gesichert, dass eine Gruppe von Uhrengenen mit transkriptionell aktivierender einer zweiten mit transkriptionell inhibierender Funktion gegenübersteht. Dabei aktiviert das Uhrengenheterodimer BMAL/CLOCK die Expression des inhibitorischen Heterodimers PER/CRY. Letztere wirken zurück auf die Transkription von *Bmal* und unterbrechen so, zeitversetzt, die Genaktivität. Es wird damit eine negative transkriptionelle/translationelle Rückkopplungsschleife gebildet, deren kompletter Zyklus *circa* 24 h ausmacht. Die obengenannten Gene bilden die sogenannte „Core clock“, den zentralen Uhrenmechanismus (REPPERT und WEAVER 2002). Nicht transkriptionell aktiv ist eine zu den Uhrengenen gerechnete Caseinkinase  $1\epsilon$ , deren mutagene Veränderung bei Sibirischen Hamstern die sogenannte  $\tau$ -Mutation hervorruft, eine Verkürzung der Circadianperiode von 24 auf 20 h. Diese Kinase phosphoryliert Uhrengene (PER1) und beeinflusst so deren Halbwertszeit (RALPH und MENAKER 1988, LOWREY et al. 2000).

Zur transkriptionellen Aktivierung bedarf es für das BMAL1/CLOCK-Heterodimer einer cis-aktiven Sequenz, die als E-Box bezeichnet wird. Über diese kurze Hexanukleotidsequenz (CACGTG) oder eine analoge E'-Box (CACGTT) wird die transkriptionelle Aktivierung vermittelt (YOO et al. 2005). Da die E-Box sowohl im Promotorbereich als auch in Intronsequenzen nachgewiesen wurde, spricht man korrekterweise von einem E-Box-Enhancer, da dessen Wirkung positionell unabhängig ist. Durch Bindung der PAS-Domänen-Helix-LOOP-Helix (BHLH)-Proteine BMAL1 und CLOCK im Bereich der E-Box wird transkriptionelle Aktivierung von Genen gewährleistet, die diese Voraussetzung aufweisen. Bekannte Beispiele außerhalb der eigentlichen Uhrengene sind das Vasopressin sowie die Arylalkylamin-N-

Acetyltransferase AA-NAT, das Schlüsselenzym der Melatoninbiosynthese. Für die AA-NAT ist bekannt, dass eine E-Box im Intron des Gens zu finden ist, ebenso beim Gen der Glykogensynthese 2 der Leber, welches für die circadian modulierte Glykogensynthese wichtig ist (DOI et al. 2010). Durch E-Box-vermittelte Transaktivierung kann damit circadiane Information der zentralen Uhr weitergetragen werden. Seit Neuerem werden weitere Rückkopplungsschleifen, in die andere Gene involviert sind, zum Uhrenmechanismus gezählt. Auch hier sind positive und inhibierende Transkriptionsfaktoren involviert. Nach UEDA et al. (2005) greifen die sogenannten Orphan-Rezeptoren inhibierend (RevERB $\alpha$ ) und gegenläufig aktivierend (ROR $\alpha$ ) über die ROR-Box in die circadianen Prozesse der Uhr ein. Daneben wurde über die Faktoren DBP (positiv) und E4BP4 (negativ) noch eine weitere Rückkopplungsschleife beschrieben, die über die cis-aktive sogenannte D-Box circadian agiert. Sowohl ROR $\alpha$  als auch DBP werden über E-Box-Elemente in ihren Genen mit dem zentralen Uhrenelement verknüpft (UEDA et al. 2005). Andererseits verfügt das zentrale Uhrenglied *Per1* über eine D-Box. Somit sind auf Gen-Ebene mehrere circadiane Rückkopplungsschleifen miteinander verbunden, agieren also keinesfalls völlig unabhängig voneinander. Diese Tatsache soll für eine höhere Stabilität des generierten Rhythmus sorgen.

Der circadiane Oszillator wird in der Regel als Teil eines circadianen Systems aufgefasst (CERMAKIAN und SASSONE-CORSI 2000). Zu diesem gehört neben dem Rhythmusgenerator der von ihm erzeugte „output“, also die circadiane Information. Sie wird, von Transkriptionsfaktoren getragen, auf andere Gene übertragen. Diese steuern dann im Zuge einer Aktivierungskaskade eine Vielzahl weiterer Zellfunktionen, zu denen beispielsweise in der Leber die Glykogensynthese (DOI et al. 2010), im Pankreas die Insulinsekretion der Insel (BODEN et al. 1996) und die Glukagonsekretion (RUITER et al. 2003) gehören. Auf den Schrittmacher der Insel selbst wirken von außen synchronisierende Faktoren (Zeitgeber), zu denen das „Circadianhormon“ Melatonin gehört, das mit Melatoninrezeptoren der Insel eine Ligandenbindung eingeht (PESCHKE et al. 2000, KEMP et al. 2002). Weitere Zeitgeber können Nahrungsfaktoren wie die Glukose, aber auch Glukokortikoide sein, deren Spiegel im Tagesverlauf schwanken.

## 2.2 Circadiane Uhr und circadiane Insulinsekretion

1998 konnten Daten publiziert werden, die belegten, dass die Insulinsekretion im *In-vitro*-Versuch ebenfalls circadian oszilliert (PESCHKE und PESCHKE 1998). In einer Reihe von Experimenten an Ratteninseln, die mit Hilfe von Kollagenase aus dem Pankreas isoliert wurden und in einer Perifusionsapparatur stimuliert wurden, konnte gezeigt werden, dass die Insulinkonzentration im Perifusat tageszeitlichen Schwankungen unterliegt (Abb. 3). Die Auswertung mehrerer solcher Experimente machte es möglich, die Periodenlänge ( $\tau$ ) zu bestimmen. Sie lag zwischen 21,8 und 26,2 h, also innerhalb eines als circadiane Periode definierten Zeitabschnittes. Bemerkenswert war zudem, dass dieser *In-vitro*-Rhythmus nicht nur über 7 Tage nachweisbar war, sondern nach Melatonin-Applikation um 9 h shiftete. Diese Beobachtungen sprechen für eine Autonomie des Insel-internen Oszillators. Ähnliche Experimente wurden später von PICINATO et al. (2002) durchgeführt, die den Befund bestätigten. Einige Jahre zuvor hatten BODEN et al. (1996) bei freiwilligen stoffwechselgesunden Probanden unter Glukoseclamp-Verfahren eine tageszeitliche Insulinsekretionsschwankung gemessen, später bei Typ-2-Diabetikern (BODEN et al. 1999). Die *In-vitro*-Daten am Rattenmodell bestätigten damit letztlich das Gesamtbild einer circadian gesteuerten Insulinsekretion, die der üblichen Sekre-

tionsantwort nach postprandialen Blutglukoseerhöhungen überlagert ist. In diesem Zusammenhang sollte erwähnt werden, dass auch die Blutglukosekonzentration einer circadianen Regulation unterworfen ist (GAGLIARDINO und HERNANDEZ 1971, GAGLIARDINO et al. 1984).

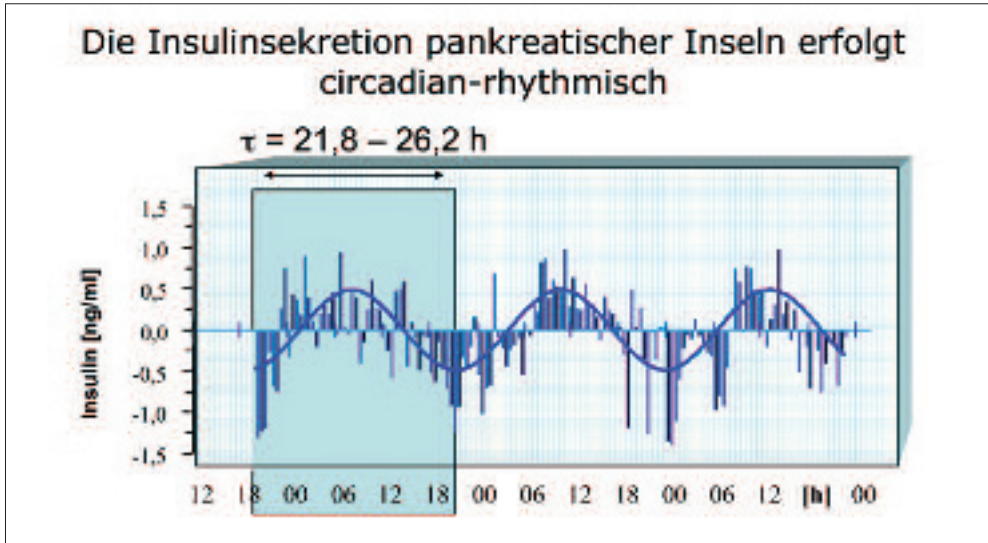


Abb. 3 Darstellung von Insulinsekretionsmustern in einem Superfusionsexperiment. Das Experiment zeigt, dass die Insulinsekretion aus isolierten Langerhansschen Inseln der Ratte in einem circadianen Muster erfolgt. Diese Beobachtung lässt sich über mehrere Tagesperioden verfolgen. Die Ordinate gibt die Insulinkonzentration in ng/ml an, die Abszisse die Tageszeit in h. Eine Circadianperiode ( $\tau$ ) ist dunkelblau unterlegt und differierte in mehreren Experimenten zwischen 21,8 und 26,2 h. Nach PESCHKE und PESCHKE 1998.

### 2.3 Uhrengene und Metabolismus

Mit dem Nachweis, dass die circadiane Uhr die basale Insulinsekretion beeinflusst, ließ sich nachfolgend durch MÜHLBAUER et al. (2004) belegen, dass wesentliche Uhrengene (*Bmal1*, *Per1*, *Per2*, *Clock*, *Cry1* und *Tim*) im Rattenpankreas circadian exprimiert werden. Damit konnte die Annahme, dass ein pankreatischer und Insel-interner Oszillator auf die Insulinsekretion wirkt, erhärtet werden. In Pankreas und Leber der Maus konnte ferner gezeigt werden, dass drei Uhrenschleifen in diesen Organen von Bedeutung sind. Charakterisiert sind diese transkriptionellen/translationellen „feedback loops“ durch die typische antiphasische Expression von Uhrengenen mit positiver oder negativer Funktion bezüglich ihrer transkriptionellen Aktivierungspotenz (MÜHLBAUER et al. 2009, Abb. 4).

Welche Bedeutung haben nun Uhrengene für die Aufrechterhaltung der Glukose- und Stoffwechselregulation? Durch Verwendung von Uhrengen-*knockout*-Mausmodellen, in denen selektiv Uhrengene funktionsunfähig gemacht oder eliminiert waren („knockout“), konnte ein direkter Zusammenhang zwischen Verlust der Uhrenfunktion und der Glukoseregulation nachgewiesen werden. RUDIC et al. (2004) konnten das beispielsweise in ihren Mausmodellen für eine *Clock*-Mutation und für *Bmal1-knockout*-Modelle zeigen. Speziell die Regulation der Glukoneogenese in der Leber war bei diesen Tiermodellen betroffen und damit die Regulation des Blutglukoseniveaus. In einem weiteren *Clock*-Mutations-Modell von TUREK et al. (2005)

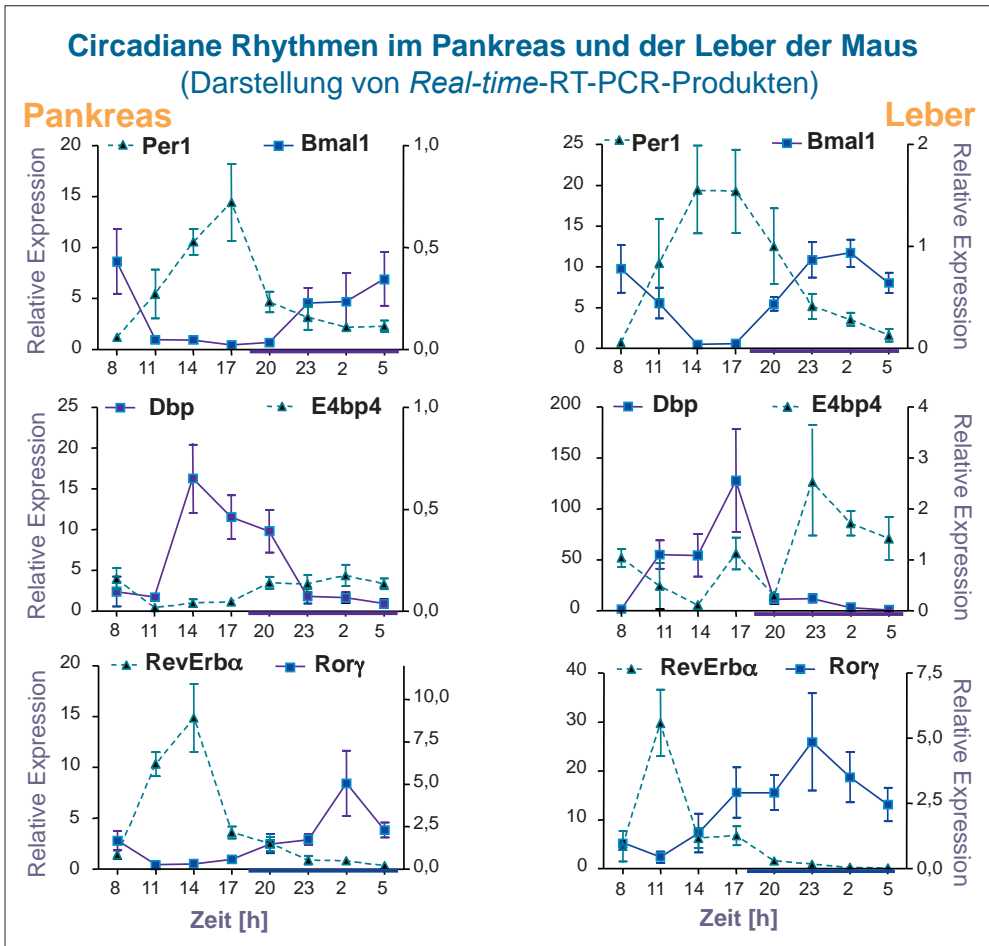


Abb. 4 Nachweis einer funktionalen Uhr in Pankreas und Leber der Maus durch Darstellung antiphasischer Expression von Uhrgenen. *Real-time-RT-PCR*-Messungen von Uhrgentranskripten im Verlauf einer Tagesperiode. 6 Wochen alte Mäuse wurden dazu im 3-h-Rhythmus getötet, die Organe entnommen und extrahiert. RNA wurde nach reverser Transkription in einem Rotor-Cycler mittels *PCR*-Technik amplifiziert und die Transkriptmengen von Uhrgenen indirekt vermessen. Je zwei Transkripte mit antiphasischer Expression, die entweder die circadianen cis-Elemente E-Box (*oben*), DBP-Box (*Mitte*) oder ROR-Box (*unten*) aktivieren, wurden dabei erfasst. Nach MÜHLBAUER et al. 2009.

konnte ein Zusammenhang zwischen Funktionsverlust des Uhrgens, Veränderungen der circadianen Rhythmik und der Regulation des Energiehaushaltes festgestellt werden. Diese Tiere zeigten, im Gegensatz zu nicht Uhrgen-mutierten Kontrollen, Hypercholesterinämie, Hypertriglyceridämie, Hyperglykämie und Hypoinsulinämie sowie Obesitas nach Applikation einer hochkalorischen Nahrung. Es zeigte sich außerdem, dass die Regulation des Energiehaushaltes insgesamt betroffen war. Die Mutation eines einzigen Uhrgens hatte also im „Ganztier“ weitreichende Auswirkungen. Eine neuere Publikation von LAMIA et al. (2008) beschreibt Mäuse mit einer, im Gegensatz zu den vorherigen Mausmodellen, ausschließlich Leber-spezifischen *Bmal1*-Deletion. Die Resultate dieser Studie deuten ebenfalls darauf hin,

dass der Verlust der *Bmal1*-Funktion nur in einem einzigen Organ, der Leber, zu Störungen der Regulation des Körperfettes, der Glukose-, „Clearance“ und der Insulinproduktion führt. Zusammengefasst lassen die Arbeiten erkennen, dass durch das korrekte, präzise Funktionieren einer circadianen Uhr die Entwicklung eines metabolischen Syndroms und eines Typ-2-Diabetes verhindert werden kann. Unterstützt wird diese Aussage durch eine Assoziationsstudie, die nach Genotypisierung von 19 Uhren- oder Uhrengen-getriebenen Genen einer finnischen Kohorte mit ca. 8000 Personen feststellt, dass bestimmte *Single-nucleotide*-Genvarianten (SNPs) des Uhrengens *Period 2* (*Per2*) mit Veränderungen des Glukosemetabolismus und metabolischem Syndrom assoziiert sind (ENGLUND et al. 2009). Außerdem wurde ein bestimmtes SNP von *Npas2*, einem funktionellen *Clock*-Analogon des Vorderhirns, mit Blutdruckänderungen assoziiert.

#### 2.4 Die circadiane Uhr funktioniert auf Ebene der einzelnen Zelle

Bereits 1998 konnten BALSALOBRE et al. zeigen, dass Rattenfibroblasten in Zellkultur (Rat-1-Linie), die über viele Zellteilungszyklen *in vitro* gehalten worden waren, über eine innere, circadiane Uhr verfügen. Möglich wurde diese Erkenntnis durch eine Behandlung der Zellen, bei der nach Serumentzug und Wachstumsstopp eine hohe Serumkonzentration (50 %) für kurze Zeit gegeben wurde, bevor nach Applikation von Standardmedium wieder normales Wachstum erfolgte. Erstaunlicherweise zeigte sich in diesen Zellen ein circadianer Rhythmus der Uhrengensexpression, der in den unbehandelten Zellen nicht zu erkennen war. Die Autoren vermuteten, dass entweder der Rhythmus neu induziert wird oder es zur Gleichschaltung von desynchronisierten Rhythmen kommt. Erst sehr viel später konnten WELSH et al. (2004) an gentechnisch mit einem Fluoreszenzfarbstoff modifizierten (*Luziferase-knockin*-) Rat-1-Fibroblasten zeigen, dass eine über die Zeit zunehmende Desynchronisation von Zellen der Peripherie die Ursache für das scheinbare Erlöschen beobachteter circadianer Rhythmen in der Zellkultur ist. Das Verfahren zur Einzelzellsynchronisation ist inzwischen auch auf andere Zelltypen übertragen worden. An der  $\beta$ -Zelllinie der Maus ( $\beta$ -TC1) konnten ALLAMAN-PILLET et al. (2004) Evidenz für einen endogenen circadianen Oszillator finden, der in einzelnen Zellen funktioniert. Durch eigene Untersuchungen an Glukose-responsiven Ratteninsulinoma- $\beta$ -Zellen (INS1) konnte der Befund inzwischen erhärtet werden (MÜHLBAUER et al. 2007, Abb. 5).

#### 2.5 Bedeutung von Uhrengenen für die zelluläre Expression

Welche Bedeutung haben circadian gesteuerte Gene im Kontext aller aktiven Gene einer Zelle, dem Transkriptom? Nach Untersuchungen von STORCH et al. (2002) an zwei Organsystemen der Maus, Leber und Herz, mittels Array-Technik, mit der Hunderte von aktiven Genen gleichzeitig über ihr Transkript erfasst werden, liegt der Prozentsatz von circadian fluktuierenden Transkripten zwischen 8–10 %. Beim Herz waren es nachweislich 462 Gene (8 %), bei der Leber 575 Gene (10 %). Ein weiterer Befund war, dass die circadianen Phasenlagen zwischen beiden Organen differierten. Darüber hinaus war nur ein kleiner Prozentsatz circadian gesteuerter Gene in beiden Organen gleich (37 Gene), und zwar im Wesentlichen die eigentlichen Uhrengene. PANDA et al. (2002) hatten zur gleichen Zeit mit ähnlichem technischen Ansatz den SCN und die Leber untersucht. Für Ersteren wurden 337 circadian regulierte Gene und für die Leber 335 ausgemacht. Damit bewegt sich die Aussage dieser Studie im Rahmen der

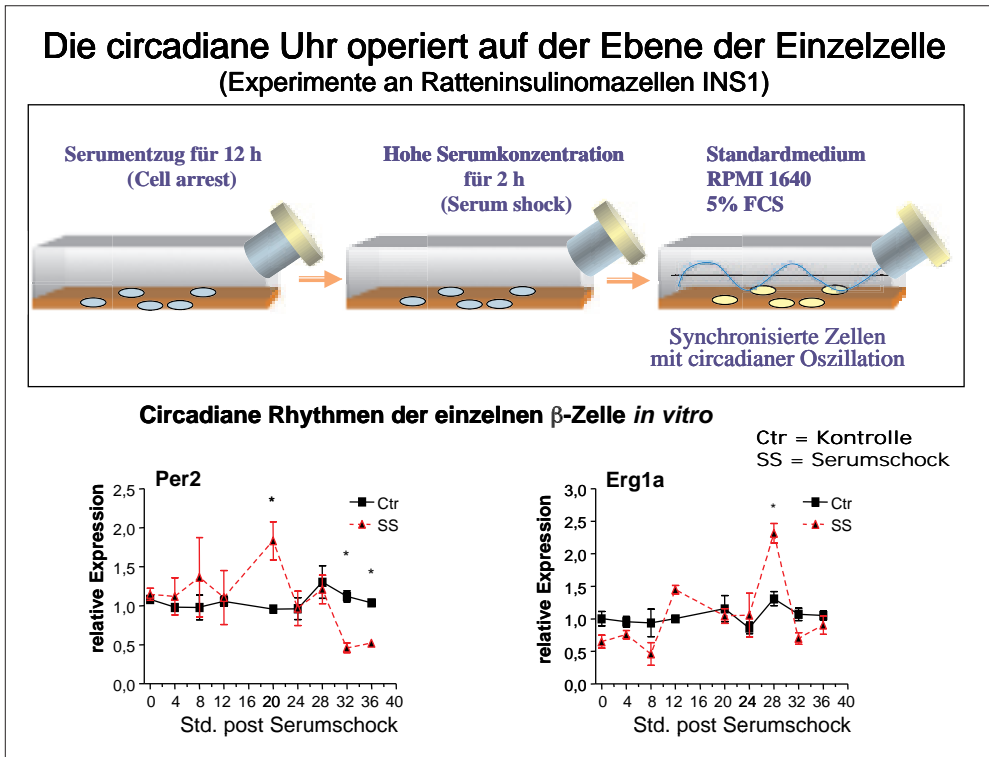


Abb. 5 Die circadiane Uhr funktioniert auf der Ebene der Einzelzelle, dargestellt am Beispiel der Ratteninsulinoma- $\beta$ -Zelllinie INS1. Analog zu frühen Untersuchungen von BALSALOBRE et al. (1998) an Rattenfibroblastenzellen der Linie Rat-1 lässt sich nach Serumschock an INS1-Zellen ein Tagesrhythmus nachweisen. Die Abbildung *oben* gibt kurz das Verfahren wieder, bei dem es zunächst durch Serumentzug und Erzeugung eines Wachstumsfaktormangels zum Stopp des Wachstums kommt. Durch nachfolgende Wachstumsstimulation mit sehr hohen (50%) Pferdeserumkonzentrationen kommt es zur Zellsynchronisation. An solchen synchronisierten Zellen ließen sich sowohl ein circadianer Rhythmus des Uhrengentranskripts *Per2* als auch Oszillationen der Expression eines Kaliumkanals (*Erg1a*) mittels *Real-time*-RT-PCR nachweisen (*unten*, nach MÜHLBAUER et al. 2007).

zuerst genannten. Auch diese Autoren kommen zu der Erkenntnis, dass die Mehrzahl der so identifizierten Uhren-gesteuerten Gene gewebspezifisch ist, mit divergierender Phasenlage zwischen den untersuchten Organen.

Um zu untersuchen, wie viele und welche Gene in der Leber einer circadianen Steuerung unterworfen sind, wählten KORNMANN et al. in einer neueren Arbeit von 2007 einen völlig anderen technischen Ansatz. Diese Arbeitsgruppe stellte sich der Frage, was passiert, wenn man gezielt und organspezifisch die circadiane Uhr anhält. Sie verwendeten für die Erzeugung von gentechnisch modifizierten Mäusen ein DNA-Konstrukt, welches den bekannten *Bmal1*-Repressor *RevErba* spezifisch und unter Kontrolle eines Tetracyclin-Repressors hepatozyten-spezifisch aktivierte. Nach *RevErba*-Expression wurde die BMAL1-Aktivität reprimiert. Da dieses Gen essentiell für die Uhrenfunktion ist (BUNGER et al. 2000), bricht nach dessen transkriptioneller Ausschaltung die circadiane Oszillation rasch zusammen. Mit diesem geschickten technischen Ansatz konnten die Autoren durch Tetracyclin-Applikation bzw. -Entzug in den transgenen Mäusen „die Uhr“ in der Leber ab- und anschalten. Als Ergebnis zeigte sich,



dass 90 % aller Transkripte der Leber von einer funktionsfähigen circadianen Uhr abhängen. Allerdings zeigte sich auch, dass Uhrengene, wie *Per2* und einige andere, eigenständig ihren Rhythmus beibehalten, also unabhängig von einer Rhythmusvorgabe durch den endogenen, BMAL-abhängigen Oszillator sind.

## 2.6 Weitere Folgen der Störung des circadianen Systems

Ein übergeordnetes System der Uhrengen-Regulation erfolgt durch posttranskriptionelle Modifikationen von Uhrengenen. Untersuchte Beispiele betreffen Acetylierung und Phosphorylierung von Uhrenproteinen wie PER2 (Phosphorylierung, VANSELOW et al. 2006), wobei sich gezeigt hat, dass CLOCK selbst intrinsische Acetylierungskapazität, z. B. als Histon-Acetylase, besitzt (HIRAYAMA et al. 2007). Eine Störung der Phosphorylierung von PER2 führt nach neuesten Erkenntnissen beispielsweise zur Ausprägung des „human familial advanced sleep phase syndrome“ (FASPS), einer vererbten Schlafstörung (VANSELOW et al. 2006). Bekannt ist, dass auch das Phänomen der Caseinkinase  $\epsilon 1a$ , deren Mutation und verminderte Fähigkeit, PER-Proteine zu phosphorylieren, zu verkürzten circadianen Rhythmen führt (MENG et al. 2008). Post-translationelle Phosphorylierung dieses Uhrengenes bestimmt damit seine Halbwertszeit und konsekutiv indirekt die Periodenlänge des circadianen Rhythmus. Diese Tatsache ist seit längerem am Modell einer natürlich vorkommenden  $\tau$ -Mutation des Hamsters bekannt (RALPH et al. 1988).

Die circadian exprimierte Histondeacetylase Sirtuin 1 (SIRT 1) ist eng mit dem zellulären Energiestatus der Zelle über das NADH/NAD<sup>+</sup>-Verhältnis verknüpft. Nachweislich deacetyliert das Enzym auch das Uhrengenprodukt PER2 und überführt es in einen degradativen Abbau. Auch die Expression mehrerer anderer Uhrengene, wie *Bmal1* und *Cry1*, wird durch SIRT1 beeinflusst. Über das Redoxverhältnis einer Zelle ist also letztlich ein metabolischer Einfluss auf die circadiane Funktion der Uhr gegeben (ASHER et al. 2008). Metabolische Störungen würden sich entsprechend in Störungen der Uhrenfunktion niederschlagen, die im Zuge einer Rückkopplungsschleife wiederum auf die metabolischen Körperfunktionen rückwirken. Die Histondeacetylase SIRT6 wirkt in Ergänzung regulierend auf die Glukosehomeostase (ZHONG et al. 2010). Nach MAURY et al. (2010) werden die Nicotinamid-Phosphoribosyltransferase (NAMPT) und SIRT1, die beide circadian exprimiert werden, für die circadiane Insulinsekretion der  $\beta$ -Zelle verantwortlich gemacht. Pharmaka, die sowohl SIRT-Deacetylasen als auch Caseinkinasen  $1\epsilon$  und  $\delta$  beeinflussen und damit inhärente Eigenschaften der circadianen Uhr berühren (Phase und Periode), werden offenbar derzeit entwickelt (BECHTOLD et al. 2010). Ziel dieser Bemühungen soll eine positive Beeinflussung metabolischer Entgleisungen (Hyperglykämie oder Hyperinsulinämie) sein, die z. B. auch durch desynchronisierten Schlaf entstehen können (SCHEER et al. 2009).

## 3. Zusammenfassung und Ausblick

- Die Insulinsekretion pankreatischer Inseln unterliegt einem circadianen Rhythmus.
- Die Befunde sprechen dafür, dass ein circadianer Rhythmus in der Insel selbst generiert wird, unabhängig von neuronaler Verbindung zum Hypothalamus.
- Uhrengene und Uhrengen-gesteuerte Gene oszillieren in ihrer Expression in der pankreatischen Insel von Ratte und Maus circadian-rhythmisch.

- Es ist davon auszugehen, dass die circadiane Uhrengenaktivität die Sekretion der Inselhormone beeinflusst.
- Circadiane Uhren funktionieren auf der Ebene einzelner  $\beta$ -Zellen. Auf die Phasenlage ihrer circadianen Schwingungen kann Melatonin Einfluss nehmen. Grundlage dafür sind MT1- und MT2-Rezeptoren, über die  $\beta$ -Zellen verfügen.
- Desynchronisation der circadianen Uhr kann zur Ausprägung von Erkrankungen führen, die möglicherweise über die Kenntnis synchronisierender Faktoren therapierbar sind.

## Literatur

- ALLAMAN-PILLET, N., RODUIT, R., OBERSON, A., ABDELLI, S., RUIZ, J., BECKMANN J. S., SCHORDERET D. F., and BONNY, C.: Circadian regulation of islet genes involved in insulin production and secretion. *Mol. Cell. Endocrinol.* 226, 59–66 (2004)
- ASHER, G., GATFIELD, D., STRATMANN, M., REINKE, H., DIBNER, C., KREPEL, F., MOSTOSLAVSKY, R., ALT, F. W., and SCHIBLER U.: SIRT1 regulates circadian clock gene expression through PER2 deacetylation. *Cell* 134, 317–328 (2008)
- BALSALOBRE, A., DAMIOLA, F., and SCHIBLER, U.: A serum shock induces circadian gene expression in mammalian tissue culture cells. *Cell* 93, 929–937 (1998)
- BECHTOLD, D. A., GIBBS, J. E., and LOUDON, A. S.: Circadian dysfunction in disease. *Trends Pharmacol. Sci.* 31, 191–198 (2010)
- BODEN, G., CHEN, X., and POLANSKY, M.: 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 (1999)
- BODEN, G., RUIZ, J., URBAIN, J. L., and CHEN, X.: Evidence for a circadian rhythm of insulin secretion. *Amer. J. Physiol.* 271, E246–252 (1996)
- BUNGER, M. K., WILSBACHER, L. D., MORAN, S. M., CLENDENIN, C., RADCLIFFE, L. A., HOGENESCH, J. B., SIMON, M. C., TAKAHASHI, J. S., and BRADFIELD, C. A.: Mop3 is an essential component of the master circadian pacemaker in mammals. *Cell* 103, 1009–1017 (2000)
- CAMBRAS, T., WELLER, J. R., ANGLÈS-PUJORÀS, M., LEE, M. L., CHRISTOPHER, A., DÍEZ-NOGUERA, A., KRUEGER, J. M., and DE LA IGLESIA, H. O.: Circadian desynchronization of core body temperature and sleep stages in the rat. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104, 7634–7639 (2007)
- CERMAKIAN, N., and SASSONE-CORSI, P.: Multilevel regulation of the circadian clock. *Nature Rev. Mol. Cell. Biol.* 1, 59–67 (2000)
- CHALLET, E., PÉVET, P., VIVIEN-ROELS, B., and MALAN, A.: Phase-advanced daily rhythms of melatonin, body temperature, and locomotor activity in food-restricted rats fed during daytime. *J. Biol. Rhythms* 12, 65–79 (1997)
- DAMIOLA, F., LE MINH, N., PREITNER, N., KORNMANN, B., FLEURY-OLELA, F., and SCHIBLER, U.: Restricted feeding uncouples circadian oscillators in peripheral tissues from the central pacemaker in the suprachiasmatic nucleus. *Genes Dev.* 14, 2950–2961 (2000)
- DOI, R., OISHI, K., and ISHIDA, N.: CLOCK regulates circadian rhythms of hepatic glycogen synthesis through transcriptional activation of Gys2. *J. Biol. Chem.* 285, 22114–22121 (2010)
- ENGLUND, A., KOVANEN, L., SAARIKOSKI, S. T., HAUKKA, J., REUNANEN, A., AROMAA, A., LÖNNQVIST, J., and PARTONEN, T.: NPAS2 and PER2 are linked to risk factors of the metabolic syndrome. *J. Circadian Rhythms* 7, 5 doi:10.1186/1740-3391-7-5 (2009)
- GAGLIARDINO, J. J., and HERNÁNDEZ R. E.: Circadian variation of the serum glucose and immunoreactive insulin levels. *Endocrinology* 88, 1532–1534 (1971)
- GAGLIARDINO, J. J., HERNANDEZ, R. E., and REBOLLEDO O. R.: Chronobiological aspects of blood glucose regulation: a new scope for the study of diabetes mellitus. *Chronobiologia* 11, 357–379 (1984)
- HIRAYAMA, J., SAHAR, S., GRIMALDI, B., TAMARU, T., TAKAMATSUM K., NAKAHATA, Y., and SASSONE-CORSI, P.: CLOCK-mediated acetylation of BMAL1 controls circadian function. *Nature* 450, 1086–1090 (2007)
- KALSBECK, A., and BUIJS, R. M.: Output pathways of the mammalian suprachiasmatic nucleus: coding circadian time by transmitter selection and specific targeting. *Cell Tissue Res.* 309, 109–118 (2002)
- KEMP, D. M., UBEDA, M., and HABENER, J. F.: 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 (2002)

- KONOPKA, R. J., and BENZER, S.: Clock mutants of *Drosophila melanogaster*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *68*, 2112–2116 (1971)
- KORNMAN, B., SCHAAD, O., BUJARD, H., TAKAHASHI, J. S., and SCHIBLER, U.: System-driven and oscillator-dependent circadian transcription in mice with a conditionally active liver clock. *PLoS Biol.* *5*, e34 (2007)
- LAMIA, K. A., STORCH, K. F., and WEITZ, C. J.: Physiological significance of a peripheral tissue circadian clock. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *105*, 15172–15177 (2008)
- LOWREY, P. L., SHIMOMURA, K., ANTOCH, M. P., YAMAZAKI, S., ZEMENIDES, P. D., RALPH, M. R., MENAKER, M., and TAKAHASHI, J. S.: Positional syntenic cloning and functional characterization of the mammalian circadian mutation tau. *Science* *288*, 483–492 (2000)
- MAURY, E., RAMSEY, K. M., and BASS, J.: Circadian rhythms and metabolic syndrome: from experimental genetics to human disease. *Circ. Res.* *106*, 447–462 (2010)
- MENG, Q. J., LOGUNOVA, L., MAYWOOD, E. S., GALLEGRO, M., LEBIECKI, J., BROWN, T. M., SLÁDEK, M., SEMIKHODSKII, A. S., GLOSSOP, N. R., PIGGINS, H. D., CHESHAM, J. E., BECHTOLD, D. A., YOO, S. H., TAKAHASHI, J. S., VIRSHUP, D. M., BOOT-HANDFORD, R. P., HASTINGS, M. H., and LOUDON, A. S.: Setting clock speed in mammals: the CK1 epsilon tau mutation in mice accelerates circadian pacemakers by selectively destabilizing PERIOD proteins. *Neuron* *58*, 78–88 (2008)
- MÜHLBAUER, E., and PESCHKE, E.: Evidence for the expression of both the MT1- and in addition, MT2-melatonin receptor, in the rat pancreas, islet and  $\beta$ -cell. *J. Pineal Res.* *42*, 105–106 (2007)
- MÜHLBAUER, E., BAZWINSKY, I., WOLGAST, S., KLEMENZ, A., and PESCHKE, E.: Circadian changes of ether-a-go-go-related-gene (*Erg*) potassium channel transcripts in the rat pancreas and beta-cell. *Cell. Mol. Life Sci.* *64*, 768–780 (2007)
- MÜHLBAUER, E., GROSS, E., LABUCAY, K., WOLGAST, S., and PESCHKE, E.: Loss of melatonin signalling and its impact on circadian rhythms in mouse organs regulating blood glucose. *Eur. J. Pharmacol.* *606*, 61–71 (2009)
- MÜHLBAUER, E., WOLGAST, S., FINCKH, U., PESCHKE, D., and PESCHKE, E.: Indication of circadian oscillations in the rat pancreas. *FEBS Lett.* *564*, 91–96 (2004)
- PANDA, S., ANTOCH, M. P., MILLER, B. H., SU, A. I., SCHOOK, A. B., STRAUME, M., SCHULTZ, P. G., KAY, S. A., TAKAHASHI, J. S., and HOGENESCH, J. B.: Coordinated transcription of key pathways in the mouse by the circadian clock. *Cell* *109*, 307–320 (2002)
- PESCHKE, E., and PESCHKE, D.: Evidence for a circadian rhythm of insulin release from perfused rat pancreatic islets. *Diabetologia* *41*, 1085–1092 (1998)
- PESCHKE, E., FAUTECK, J. D., MUSSHOF, U., SCHMIDT, F., BECKMANN, A., and PESCHKE, D.: Evidence for a melatonin receptor within pancreatic islets of neonate rats: functional, autoradiographic, and molecular investigations. *J. Pineal Res.* *28*, 156–164 (2000)
- PESCHKE, E., STUMPF, I., BAZWINSKY, I., LITVAK, L., DRALLE, H., and MÜHLBAUER, E.: Melatonin and type 2 diabetes – a possible link? *J. Pineal Res.* *42*, 350–358 (2007)
- PICINATO, M. C., HABER, E. P., CARPINELLI, A. R., and CIPOLLA-NETO, J.: Daily rhythm of glucose-induced insulin secretion by isolated islets from intact and pinealectomized rat. *J. Pineal Res.* *33*, 172–177 (2002)
- RALPH, M. R., and MENAKER, M.: A mutation of the circadian system in golden hamsters. *Science* *241*, 1225–1227 (1988)
- RALPH, M. R., FOSTER, R. G., DAVIS, F. C., and MENAKER, M.: Transplanted suprachiasmatic nucleus determines circadian period. *Science* *247*, 975–978 (1990)
- REPPERT, S. M., and WEAVER, D. R.: Coordination of circadian timing in mammals. *Nature* *418*, 935–941 (2002)
- RUDIC, R. D., McNAMARA, P., CURTIS, A. M., BOSTON, R. C., PANDA, S., HOGENESCH, J. B., and FITZGERALD, G. A.: BMAL1 and CLOCK, two essential components of the circadian clock, are involved in glucose homeostasis. *PLoS Biol.* *2*, 1393–1399 (2004)
- RUITER, M., LA FLEUR, S. E., VAN HEIJNINGEN, C., VAN DER VLIET, J., KALSBECK, A., and BUIJS, R. M.: The daily rhythm in plasma glucagon concentrations in the rat is modulated by the biological clock and by feeding behavior. *Diabetes* *52*, 1709–1715 (2003)
- SCHEER, F. A., HILTON, M. F., MANTZOROS, C. S., and SHEA, S. A.: Adverse metabolic and cardiovascular consequences of circadian misalignment. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *106*, 4453–4458 (2009)
- STOKKAN, K. A., YAMAZAKI, S., TEI, H., SAKAKI, Y., and MENAKER, M.: Entrainment of the circadian clock in the liver by feeding. *Science* *291*, 490–493 (2001)
- STORCH, K. F., LIPAN, O., LEYKIN, I., VISWANATHAN, N., DAVIS, F. C., WONG, W. H., and WEITZ, C. J.: Extensive and divergent circadian gene expression in liver and heart. *Nature* *417*, 78–83 (2002)
- TUREK, F. W., JOSHU, C., KOHSAKA, A., LIN, E., IVANOVA, G., MCDERMION, E., LAPOSKY, A., LOSEE-OLSON, S., EASTON, A., JENSEN, D. R., ECKEL, R. H., TAKAHASHI, J. S., and BASS, J.: Obesity and metabolic syndrome in circadian Clock mutant mice. *Science* *308*, 1043–1045 (2005)

- UEDA, H. R., HAYASHI, S., CHEN, W., SANO, M., MACHIDA, M., SHIGEYOSHI, Y., IINO, M., and HASHIMOTO, S.: System-level identification of transcriptional circuits underlying mammalian circadian clocks. *Nature Genet.* *37*, 187–192 (2005)
- VANSELOW, K., VANSELOW, J. T., WESTERMARK, P. O., REISCHL, S., MAIER, B., KORTE, T., HERRMANN, A., HERZEL, H., SCHLOSSER, A., and KRAMER, A.: Differential effects of PER2 phosphorylation: molecular basis for the human familial advanced sleep phase syndrome (FASPS). *Genes Dev.* *20*, 2660–2672 (2006)
- WELSH, D. K., YOO, S. H., LIU, A. C., TAKAHASHI, J. S., and KAY, S. A.: Bioluminescence imaging of individual fibroblasts reveals persistent, independently phased circadian rhythms of clock gene expression. *Curr. Biol.* *14*, 2289–2295 (2004)
- YOO, S. H., KO, C. H., LOWREY, P. L., BUHR, E. D., SONG, E. J., CHANG, S., YOO, O. J., YAMAZAKI, S., LEE, C., and TAKAHASHI, J. S.: A noncanonical E-box enhancer drives mouse *Period2* circadian oscillations in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *102*, 2608–2613 (2005)
- YOUNG, M. E., WILSON, C. R., RAZEGHI, P., GUTHRIE, P. H., and TAEGTMEYER, H.: Alterations of the circadian clock in the heart by streptozotocin-induced diabetes. *Mol. Cell. Cardiol.* *34*, 223–231 (2002)
- ZHONG, L., D'URSO, A., TOIBER, D., SEBASTIAN, C., HENRY, R. E., VADYSIRISACK, D. D., GUIMARAES, A., MARINELLI, B., WIKSTROM, J. D., NIR, T., CLISH, C. B., VAITHEESVARAN, B., ILIOPOULOS, O., KURLAND, I., DOR, Y., WEISSLEDER, R., SHIRIHAI, O. S., ELLISEN, L. W., ESPINOSA, J. M., and MOSTOSLAVSKY, R.: The histone deacetylase Sirt6 regulates glucose homeostasis via Hif1alpha. *Cell* *140*, 280–293 (2010)

Dr. Eckhard MÜHLBAUER  
Sächsische Akademie der Wissenschaften zu Leipzig  
Karl-Tauchnitz-Straße 1  
04107 Leipzig  
Bundesrepublik Deutschland  
Tel.: +49 345 5571711  
Fax: +49 345 5574053  
E-Mail: eckhard.muehlbauer@medizin.uni-halle.de

**Festliche Übergabe des Präsidentenamtes  
der Deutschen Akademie der Naturforscher Leopoldina –  
Nationale Akademie der Wissenschaften  
von Volker ter Meulen an Jörg Hacker**

am 26. Februar 2010 in der Aula des Löwengebäudes der  
Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

Nova Acta Leopoldina N. F. Bd. 113, Nr. 385

Herausgegeben vom Präsidium der Akademie

(2010, 84 Seiten, 23 Abbildungen, DVD mit der Dokumentation der Veranstaltung,  
21,95 Euro, ISBN: 978-3-8047-2848-6)

Am 26. Februar 2010 fand in der Aula des Löwengebäudes der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg die Feierliche Übergabe des Leopoldina-Präsidentenamtes von Volker TER MEULEN an Jörg HACKER statt. Der Band enthält die Begrüßung durch die Leopoldina-Vizepräsidentin Bärbel FRIEDRICH, die Grußworte der Bundesministerin für Bildung und Forschung Annette SCHAVAN und des Ministerpräsidenten des Landes Sachsen-Anhalt Wolfgang BÖHMER. Im Mittelpunkt stehen die Ansprache des scheidenden XXV. Präsidenten Volker TER MEULEN und die Antrittsrede des XXVI. Präsidenten Jörg HACKER. Ergänzt wird der Band durch die Festrede „Wissenschaftskultur – Zur Vernunft wissenschaftlicher Institutionen“ von Jürgen MITTELSTRASS. Alle Beiträge sind in deutscher und englischer Sprache abgedruckt.

## Biologische Bedeutung saisonaler und circannualer Rhythmen bei Tier und Mensch<sup>1</sup>

Stephan STEINLECHNER (Hannover)

Mit 6 Abbildungen

### Zusammenfassung

Es gibt zahlreiche Beispiele für Jahresrhythmen bei Tieren und auch dem Menschen. Dabei muss zwischen „einfachen“ Jahres- oder saisonalen Rhythmen und „echten“ circannualen Rhythmen unterschieden werden. Obwohl in beiden Fällen die biologische Bedeutung dieselbe ist, sind wahrscheinlich die zugrundeliegenden Mechanismen verschieden. Der biologische Sinn ist darin zu sehen, dass sowohl circannuale Rhythmen als auch saisonale Rhythmen den Organismen erlauben, physiologische Anpassungen zu initiieren, bevor sich die Umweltbedingungen entsprechend der Jahreszeiten geändert haben. Physiologische und/oder morphologische Anpassungen, die längere Zeit in Anspruch nehmen, müssen früh genug initiiert werden, um rechtzeitig vollendet zu sein. Dafür brauchen die Tiere ein Umweltsignal, das ihnen zuverlässig und weit im Voraus den Wechsel der Jahreszeit anzeigt. Der wichtigste proximate Faktor ist die Photoperiode und ihre jahreszeitliche Änderung. Die Prozesse, die durch die Photoperiode und konsekutiv durch das Pinealorgan und Melatonin kontrolliert werden, umfassen praktisch alle Bereiche, die einen jahreszeitlichen Rhythmus zeigen. Im Gegensatz dazu werden circannuale Rhythmen endogen generiert und können jahrelang fortauern, selbst unter konstanten Umweltbedingungen. Bei circannualen Rhythmen sind die proximatsten Faktoren nicht die Auslöser der Rhythmik, sondern sie dienen als sogenannte Zeitgeber der Synchronisation der endogenen Rhythmen mit der Außenwelt. Die zugrundeliegenden Mechanismen sowie die anatomische Lokalisation des circannualen Schrittmachers im Zentralnervensystem sind nach wie vor ungeklärt.

### Abstract

In numerous studies the existence of annual cycles in animals and man has been demonstrated. A clear distinction must be made between “simple” annual or seasonal rhythms and “true” circannual rhythms. Although the biological significance probably is similar in both cases, the possible underlying mechanisms are very likely quite different. The biological importance lies in the fact that both seasonal rhythms and circannual rhythms allow physiological changes to be complete well in advance of seasonal environmental changes. Physiological and/or morphological adaptations that require some time to develop must be initiated early enough to be completed on time. For example, to guarantee that the young are born at the optimal time of year, the preceding process of gonadal development and gestation must be initiated long in advance. For that, the animals need an environmental cue that reliably gives information about the season to come well in advance. Of such cues the photoperiod and its seasonal change is the most important one. The processes that are controlled by the photoperiod (and hence by the pineal gland and melatonin) comprise essentially all types of activities known to show seasonal variations. In contrast, circannual rhythms are generated endogenously and can persist for many years even under constant environmental conditions. In circannual rhythms the proximate factors such as photoperiod do not trigger and thereby initiate the seasonal rhythms, but they are used as *zeitgeber* to synchronize the endogenous rhythm with the outside world. The underlying mechanism(s) and the anatomical location of a circannual pacemaker within the central nervous system are still under debate.

---

1 Dem Gedenken an Professor Eberhard GWINNER, einem Pionier der Erforschung circannualer Rhythmen, gewidmet.

## 1. Einleitung

Die Habitate der meisten Organismen auf unserer Erde unterliegen saisonalen Fluktuationen. Dabei sind die jahreszeitlichen Änderungen von vielen abiotischen und biotischen Umweltfaktoren insbesondere in den höheren Breitengraden unserer Erde sehr ausgeprägt. Zu diesen Umweltfaktoren zählen vor allem die Tageslänge (Photoperiode), aber auch Temperatur, Niederschlagsmenge, Futterangebot sowie Druck von Raubfeinden und Parasiten. Die jahreszeitlichen Fluktuationen in diesen Parametern sind teilweise so groß, dass die Organismen gar nicht umhin konnten, adaptive Strategien zu entwickeln, die ein Überleben bei den sich ändernden Umweltbedingungen ermöglichen. Als unmittelbare Folge dieser Notwendigkeit wurden viele biologische Aktivitäten auf die Jahreszeit(en) beschränkt, in denen ein Erfolg wahrscheinlich ist. So werden Geburt und Aufzucht der Jungtiere immer in die für ihr Überleben optimale Jahreszeit gelegt (meist das Frühjahr). Andere, auf bestimmte Jahreszeiten beschränkte Funktionen, umfassen physiologische und morphologische Anpassungen (z. B. Fellwechsel, Fettreserven) sowie adäquates Verhalten (z. B. Vorräte sammeln). Ein Überleben bei extremen Winterbedingungen in den hohen Breitengraden erfordert auch ein Haushalten mit den begrenzten Energiereserven. Die Energie, die Tiere während der Sommermonate in die Reproduktion und Aufzucht der Jungtiere stecken können, wird in den Wintermonaten bei extremer Kälte für die Thermoregulation (und damit für das eigene Überleben) benötigt. Eine andere Strategie besteht darin, nur während der Jahreszeiten mit gutem Nahrungsangebot aktiv zu sein. Während der Monate mit hohem Energieaufwand, aber niedrigen Ressourcen, wird in einen Energiesparmodus geschaltet, also Winterschlaf gehalten. Andere Tiere wiederum entziehen sich belastenden Umweltbedingungen und ziehen in warme Regionen (z. B. Zugvögel). Entsprechend den stark wechselnden Umweltbedingungen in den höheren Breitengraden teilen sich die Organismen die Zeit und die Ressourcen ein, die sie für die verschiedenen Verhaltensweisen und physiologischen Vorgänge benötigen. Aber selbst in äquatornahen Regionen kann man zahlreiche Jahresrhythmen beobachten, denn auch dort gibt es ausgeprägte Zyklen der Umweltbedingungen, z. B. zwischen Trocken- und Regenzeit (Monsun), die eine Anpassung erfordern.

Diejenigen Umweltbedingungen, durch die die Aktivitäten der Organismen auf bestimmte Jahreszeiten beschränkt werden und dadurch eine höhere *Fitness* erzielt wird, die also im Verlauf der Evolution einen Selektionsdruck ausgeübt haben, nennt man „ultimate Faktoren“ (BAKER 1938, THOMSON 1950). Diesen ultimatsten Faktoren – den Herausforderungen der Umwelt – muss mit adäquaten Anpassungen begegnet werden. Viele dieser Anpassungen dauern aber lange, über mehrere Wochen oder gar Monate. So müssen, um sicherzustellen, dass die Jungtiere im Frühjahr geboren werden, die Prozesse der Gonadenreife und der Trächtigkeit weit im Voraus begonnen werden. Oder der Wechsel in ein weißes Winterfell darf nicht erst beim ersten Schneefall beginnen, sondern muss mehrere Wochen voraus initiiert werden. Solche Umweltsignale, die physiologische Prozesse auslösen und damit die saisonalen Rhythmen antreiben, nennt man „proximate Faktoren“ (BAKER 1938, THOMSON 1950). Dafür brauchen die Tiere ein Umweltsignal, das ihnen zuverlässig und weit im Voraus den Wechsel der Jahreszeit anzeigt. Der wichtigste proximate Faktor ist die Photoperiode und ihre jahreszeitliche Änderung. Die Photoperiode ist das Umweltsignal, das den Verlauf der Jahreszeiten mit – im wahren Sinne des Wortes – astronomischer Präzision und damit störungsfrei widerspiegelt. Die Tageslänge ändert sich ganz systematisch im Jahresverlauf und durch die Richtung der Änderung (zunehmend oder abnehmend) wird auch eindeutig die kommende Jahreszeit definiert.

## 2. Phänomenologie: Beispiele für saisonale und circannuale Rhythmen

Mit einer Vielzahl von Belegen und Beispielen ist die Monographie von GWINNER (1986) nach wie vor das Standardwerk für saisonale und circannuale Rhythmen. Daneben sind weitere Übersichtsartikel erschienen, die sich entweder auf einzelne Gruppen beziehen (*Vögel*: GWINNER 2003, WIKELSKI et al. 2008, *Säugeter*: ZUCKER 2001, *Mensch*: REINBERG 1974, WEHR 2001, FOSTER und ROENNEBERG 2008) oder auf einzelne mechanistische oder funktionelle Aspekte näher eingehen (*Synchronisation*: GWINNER 1981b, *photoperiodische Zeitmessung*: HOFFMANN 1981, GOLDMAN 2001, *Reproduktion*: REITER 1974, BRONSON und HEIDEMAN 1994, *Torpor und Winterschlaf*: MROSOVSKY 1978, KÖRTNER und GEISER 2000, *Nahrungsaufnahme*: LOUDON 1994; *endokrine Mechanismen*: SCHERBARTH und STEINLECHNER 2010, *zelluläre und molekulare Mechanismen*: LINCOLN et al. 2003a, b, HAZLERIGG und WAGNER 2006, LINCOLN und HAZLERIGG 2010).

Nach ZUCKER et al. (1991) kann man drei verschiedene Typen von Jahresrhythmen unterscheiden: Typ-I-Jahresrhythmen kommen vor allem bei eher kurzlebigen Säugetieren (Lebenserwartung < 2–3 Jahre) vor. Diese Jahresrhythmen besitzen zwar eine endogene Komponente, die Rhythmik persistiert aber ohne den Einfluss von Umweltsignalen nicht länger als einen Zyklus. Diese saisonalen Rhythmen sind im Tierreich sehr weit verbreitet und auch am besten untersucht; insbesondere was die zugrundeliegenden Mechanismen und die proximalen Faktoren betrifft, die für die Synchronisation mit den Jahreszeiten sorgen.

Typ-II-Jahresrhythmen sind die „echten“ endogenen, circannualen Rhythmen, die auch ohne periodische Signale, also bei völlig konstanter Umwelt, über mehrere (Jahres-)Zyklen weiter bestehen. Entsprechend können die Typ-II-Jahresrhythmen nur bei länger lebenden Tieren vorkommen. Obwohl schon in den 1920er Jahren die Existenz einer endogenen Jahresrhythmik postuliert wurde (ROWAN 1926), lieferten PENGELEY und Mitarbeiter erst in den späten 1950er Jahren die klaren Belege für endogene, circannuale Rhythmen beim Goldmantelziesel (*Citellus lateralis*, heute: *Spermophilus lateralis*). Sie hielten die Erdhörnchen über mehrere Jahre unter konstanten Licht- und Temperaturbedingungen und konnten dabei zeigen, dass sich die Winterschlafsaision und das Körpergewicht in ungefähr jährlichen Zyklen wiederholten (PENGELEY und FISHER 1957, Abb. 1).

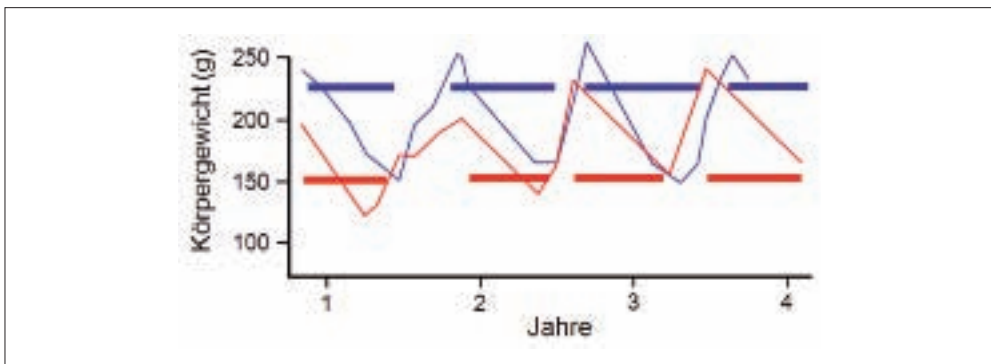


Abb. 1 Verlauf von Körpergewichten (dünne Linien) und Winterschlaf (Balken) von zwei repräsentativen Goldmantelzeiseln, die bei konstanter Temperatur (12 °C bzw. 3 °C) und konstanter Photoperiode von L:D = 12:12 über fast 4 Jahre gehalten wurden (aus PENGELEY 1974).



Die Typ-III-Jahresrhythmen sollen hier nicht weiter besprochen werden, denn dabei handelt es sich um „Pseudorhythmen“, die keinerlei endogene Komponente besitzen, sondern nur (jahres-)periodisch auftretende Phänomene in der Umwelt widerspiegeln und ohne diese Umweltkomponenten nicht in Erscheinung treten. Ein Beispiel hierfür sind saisonal wiederkehrende Allergien beim Menschen; etwa gegen Birkenpollen. Diese Allergie tritt eben nur im Frühjahr während weniger Wochen auf, in denen Birken ihre Pollen produzieren. Bei Aufenthalt in Landschaften ohne Birken tritt die Allergie nicht auf. Ein Beispiel für einen Pseudorhythmus aus der Tierwelt liefert die Mexikanische Hirschmaus (*Peromyscus nudipes*), die eigentlich das ganze Jahr über fruchtbar ist, aber in Costa Rica während der Trockenzeit keinen Nachwuchs bekommt. Obwohl die Männchen das ganze Jahr über fruchtbare Spermien bilden, die Weibchen regelmäßige Östruszyklen zeigen und die Paare auch kopulieren, sind begrenztes Futterangebot und eventuell Wassermangel die Stimuli, die eine Implantation verhindern oder eine Reabsorption des Embryos auslösen (HEIDEMANN und BRONSON 1992).

### 3. Die Jahresrhythmen beim Dsungarischen Zwerghamster

Als eines der am besten untersuchten Beispiele für den Typ-I-Jahresrhythmus kann der Dsungarische Zwerghamster (auch Sibirischer Hamster genannt), *Phodopus sungorus*, dienen (GOLDMAN 1999). Die ersten systematischen Beobachtungen zur Jahresrhythmik dieser aus Süd-West-Sibirien und Nord-Ost-Kasachstan stammenden Hamster führten FIGALA und Mitarbeiter Anfang der 1970er Jahre durch. Die Autoren konnten auch erstmalig zeigen, dass bei *Phodopus* die saisonalen Änderungen durch die Photoperiode gesteuert werden (FIGALA et al. 1973, HOFFMANN 1973, 1977, 1979). Besonders auffällig in der Jahresperiodik ist der Wechsel vom graubraunen Sommerfell in das weiße Winterfell, das dichter ist und wesentlich besser isoliert (Abb. 2, 3A). Auffällig sind auch die saisonalen Änderungen im Körpergewicht. Im Sommer erreichen die Hamster ein mittleres Körpergewicht von ca. 45 g, während sie im Winter nur ca. 25 g wiegen (Abb. 3B) (HOFFMANN 1973, HELDMAIER und STEINLECHNER 1981a). Die Reproduktion wird beim Dsungarischen Hamster in den Herbst- und Wintermonaten vollständig eingestellt. Im Sommer wiegen die Hoden ca. 800–900 mg; ab September kommt es zu einer Regression der Hoden mit vollständiger Einstellung der Spermatogenese. Die Hoden wiegen dann im Winter weniger als 100 mg (HOFFMANN 1973, 1979). Im Spätwinter beginnen die Hoden spontan („Photorefraktärzeit“, siehe unten) wieder zu wachsen, um dann bereits Ende März erneut ihr Maximalgewicht erreicht zu haben (Abb. 3C). Parallel zur Regression der Hoden bei den Männchen werden die Weibchen azyklisch und zeigen auch sonst alle saisonalen Merkmale wie die Männchen (LERCHL und SCHLATT 1993).

Etwa ab Ende September wird auch die Thermogenesekapazität (d. h. die Fähigkeit, endogene Wärme zu produzieren) verbessert, und zwar selbst bei noch warmen Außentemperaturen. Insbesondere die Fähigkeit zur zitterfreien Wärmebildung im braunen Fettgewebe wird deutlich erhöht, so dass die Hamster im Winter allein durch Aktivierung der zitterfreien Thermogenese Temperaturen von  $-40\text{ °C}$  tolerieren können, ohne dabei hypotherm zu werden (HELDMAIER und STEINLECHNER 1981a). Die zitterfreie Thermogenese im braunen Fettgewebe spielt auch eine besondere Rolle beim Aufwachen aus der Tagesschlaf-Lethargie (*daily torpor*, tageszeitlicher Torpor), die charakterisiert ist durch Hypometabolismus und Hypothermie während der circadianen Ruheperiode. Bei *Phodopus* ist Torpor ein ausschließlich saisonales Phänomen, das nur während der Wintermonate November bis Februar auftritt (Abb. 3C) und streng circa-



Abb. 2 Dsungarische Zwerghamster im Sommer und im Winter

dian kontrolliert ist (HELDMAIER und STEINLECHNER 1981b, STEINLECHNER et al. 1986, RUF et al. 1987). Nach einer nächtlichen Normothermie- und Aktivitätsperiode senken die Hamster in den frühen Morgenstunden ihren Stoffwechsel auf ca. 20% ihres normothermen Ruhestoffwechsels, und als Folge davon sinkt die Körpertemperatur auf Werte zwischen 15 und 25 °C (abhängig von der Außentemperatur). Der Torpor wird nach 6–8 h durch spontanes Aufwachen beendet, d. h. ohne dass dazu äußere Stimuli notwendig wären. Der Aufwachvorgang dauert ca. 30–40 min, und danach beginnt der Hamster seine normale nächtliche Aktivität bei sibir-

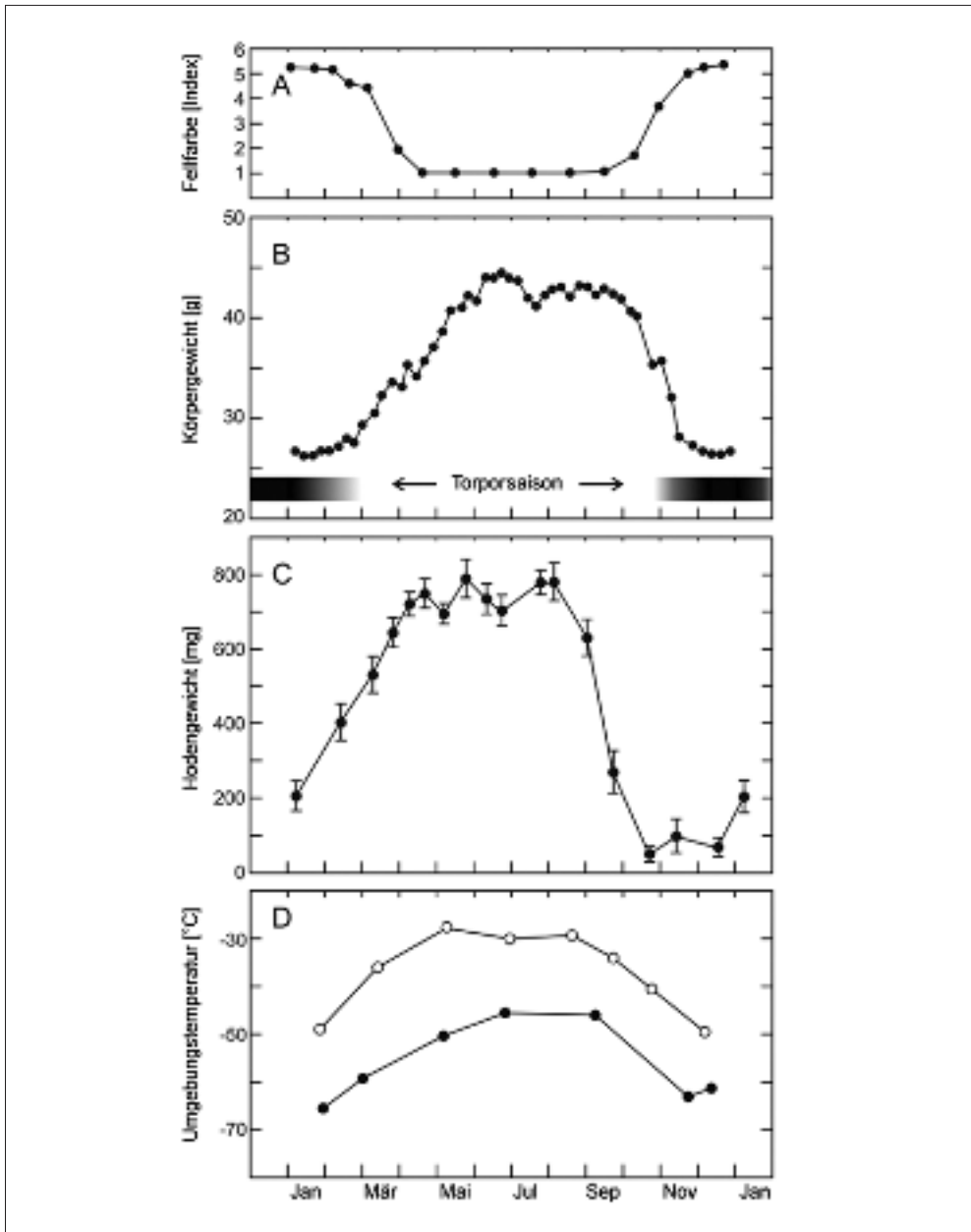


Abb. 3 Jahreszyklen beim Dsungarischen Zwerghamster unter natürlicher Photoperiode. (A) Fellfarbe (1 = dunkles Sommerfell, 6 = weißes Winterfell); (B) Körpergewicht und Torporsaison (HELDMAIER und STEINLECHNER 1981a, b); (C) Hodengröße (HOFFMANN 1979); (D) Kältelimit eines Tieres, das bei konstanter Zimmertemperatur (offene Kreise), und eines Tieres, das im Außengehege (schwarze Punkte) gehalten wurde. (Verändert nach SCHERBARTH und STEINLECHNER 2010.)

schen Temperaturen von  $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$  (FLINT 1966). Mit dieser Strategie kann sich der Zwerghamster einen relativ hohen nächtlichen Stoffwechsel leisten und dennoch seinen Energieverbrauch (und damit die Nahrungsmenge) über 24 h um ca. 65 % reduzieren (RUF et al. 1991).

Bei den meisten bisher untersuchten Kleinsäugetern der gemäßigten Breiten sind ähnliche Jahreszyklen zu beobachten (z. B. Goldhamster, *Mesocricetus auratus*: HOFFMAN und REITER 1965, GASTON und MENAKER 1967, JEFIMOW et al. 2004; Weißfußmaus, *Peromyscus leucopus*: LYNCH 1973, CHRISTIAN 1980; Wühlmäuse, *Microtus agrestis*: BAKER und RANSON 1932, AL-KHATEEB und JOHNSON 1971, GROCOCK und CLARKE 1974, *Microtus ochrogaster*: NELSON 1985). Allerdings sind diese Jahreszyklen meist viel weniger ausgeprägt, was aufgrund der im Vergleich zu Sibirien moderaten Klimabedingungen verständlich ist. Aber wegen dieser Jahreszyklen mit hohen Amplituden eignet sich der Dsungarische Zwerghamster besonders gut, um die bei der jahreszeitlichen Klimaanpassung beteiligten Mechanismen zu studieren (STEINLECHNER 2009).

Hält man die Hamster mit Beginn des Herbstes weiterhin in langer Photoperiode, so behalten sie ihre großen Hoden sowie das hohe Körpergewicht, und die Umfärbung in das Winterfell unterbleibt (Abb. 4A). Sobald im Herbst aber die Photoperiode einen kritischen Wert unterschreitet, wird die Anpassung an den Winter eingeleitet, d. h., die Gonadenaktivität und das Körpergewicht werden reduziert, während die Fellisolation und die Fähigkeit zur Wärmebildung ansteigen. Diese „kritische Photoperiode“ ist artspezifisch und beträgt beim Goldhamster beispielsweise 12,5 h Licht pro Tag (ELLIOTT 1976) und beim Dsungarischen Zwerghamster etwa 13,5 h Licht pro Tag (HOFFMANN 1982). Die etwas längere kritische Photoperiode bei *Phodopus* wird durch das nördlichere Verbreitungsgebiet des Dsungarischen Hamsters verständlich, denn in den höheren Breitengraden beginnen die Winter bereits früher im Jahr (d. h. bei noch längeren Photoperioden). Alle Tageslängen, die kürzer als diese kritische Photoperiode sind, werden als Kurztag interpretiert und leiten die Winteranpassung ein. Photoperioden, die länger sind, lösen Langtag (Sommer)-Reaktionen aus (Abb. 5). Die Existenz eines so scharfen Umschlagpunktes für Langtag- und Kurztagreaktionen lässt darauf schließen, dass die Tiere die Dauer der Photoperiode sehr präzise messen können. Diese Alles-oder-Nichts-Antwort, und die Tatsache, dass alles, was unterhalb dieser kritischen Photoperiode liegt, als Kurztag interpretiert wird und zur Gonadenregression führt, bedeutet aber nicht, dass die Tiere zwischen verschiedenen kurzen Photoperioden (etwa L:D = 12:12, L:D = 10:14 oder L:D = 8:16) nicht unterscheiden könnten. Wir haben vielmehr zeigen können, dass die Hamster die kontinuierlich abnehmende Photoperiode im Herbst jederzeit sehr präzise messen können und z. B. ihr Körpergewicht sehr genau auf den „Sollwert“ der jeweiligen Jahreszeit regulieren (STEINLECHNER et al. 1983, MORGAN und MERCER 2001). Wir haben auch zeigen können, dass die Umgebungstemperatur einen deutlichen Einfluss auf die kritische Photoperiode hat (Abb. 5, unten). Hält man die Tiere bei einer Umgebungstemperatur von  $5\text{ }^{\circ}\text{C}$ , so wird die kritische Photoperiode um ca. zwei Stunden in Richtung auf längere Tage hin verschoben. Auch wird die Hodenregression sowohl beim Goldhamster (LARKIN et al. 2002) als auch beim Dsungarischen Hamster (RUF et al. 1993, LARKIN et al. 2001) durch niedrige Umgebungstemperatur beschleunigt. Aus ökophysiologischer Sicht ist diese Temperaturabhängigkeit durchaus sinnvoll, denn sie erlaubt eine flexible Reaktion auf die Umwelt: Bei frühem Kälteeinbruch im Herbst wird die günstige Zeit für eine Jungenaufzucht deutlich reduziert, und die Reproduktion muss früher im Jahr beendet werden (STEINLECHNER und NIKLOWITZ 1992).

Setzt man Dsungarische Hamster im Herbst oder Winter, bei abnehmender oder bereits minimaler Hodengröße, langen Photoperioden aus, so nehmen sowohl die Hoden als auch das Körpergewicht rasch wieder in Richtung hohes Sommergewicht zu (Abb. 4A). Dies passiert

allerdings auch spontan bei Hamstern, die man über die Wintersonnenwende hinaus in kurzer Photoperiode belässt. Die Hamster scheinen dann „blind“ gegenüber der Photoperiode zu sein; sie werden „photorefraktär“. Diese spontan induzierte Refraktärphase beginnt etwa 18 Wochen nach Beginn der kurzen Photoperiode und kann nur durch ca. 6 Wochen Exposition an lange Photoperioden beendet werden (STETSON et al. 1977, Abb. 4B). Erst nach Beendigung der Photorefraktärphase sind die Hamster wieder in der Lage, auf kurze Photoperioden zu reagieren. Eine Anpassung an lange Photoperioden hat also beim Dsungarischen Zwerghamster und allen anderen Säugetieren mit einem Typ-I-Jahresrhythmus zu jeder Jahreszeit denselben Effekt: Die Tiere zeigen den Sommer-Phänotyp (Abb. 4A), und bei dauernder Haltung unter langer Photoperiode bleibt der Sommerphänotyp immer erhalten. Eine Anpassung an Kurztag hat allerdings je nach Jahreszeit unterschiedliche Effekte: Im Spätsommer bewirkten kurze Photoperioden eine Winteranpassung, im Spätherbst werden die Tiere im Winterzustand gehalten, bis sie refraktär werden und dann spontan, trotz kurzer Photoperiode, wieder in den Sommerzustand übergehen (Abb. 4B). Erst wenn die Refraktärzeit durch lange Photoperioden

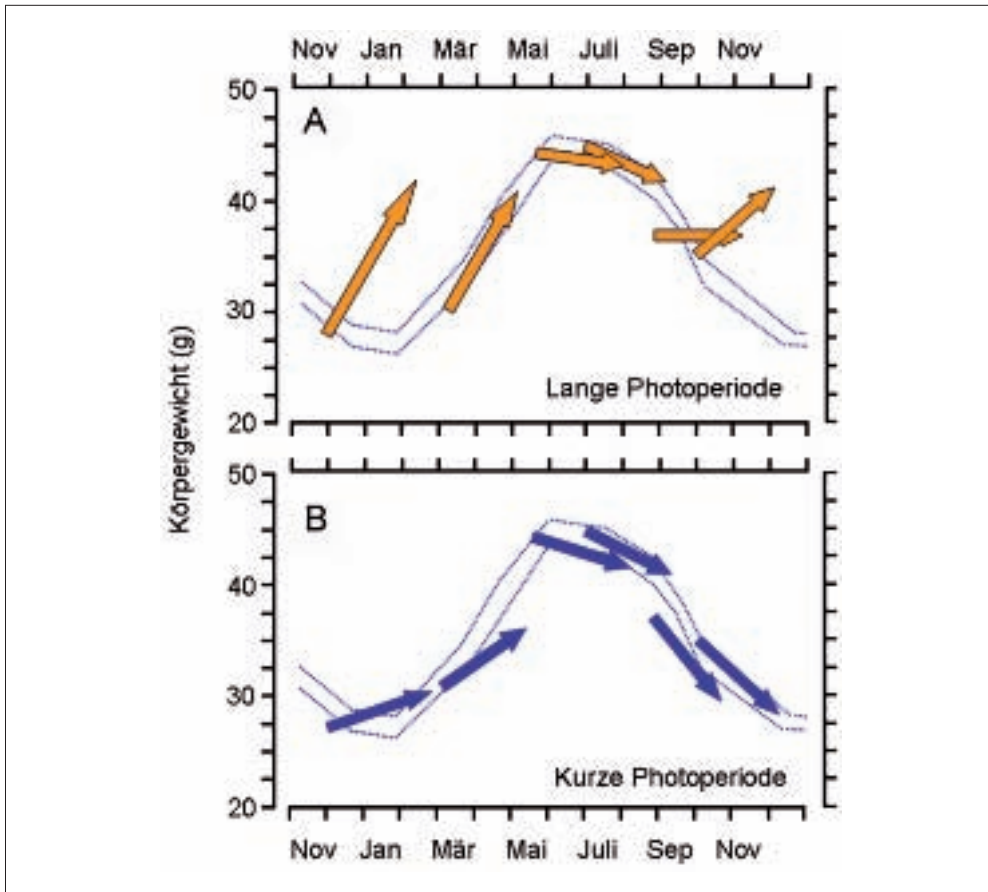


Abb. 4 Die Auswirkung langer (A) und kurzer (B) Photoperioden auf das Körpergewicht Dsungarischer Zwerghamster zu verschiedenen Zeiten des Jahres. Der von punktierten Linien eingefasste Bereich gibt das mittlere Körpergewicht der Tiere unter natürlicher Photoperiode im Jahresverlauf an. Näheres siehe Text (Daten aus STEINLECHNER et al. 1983).

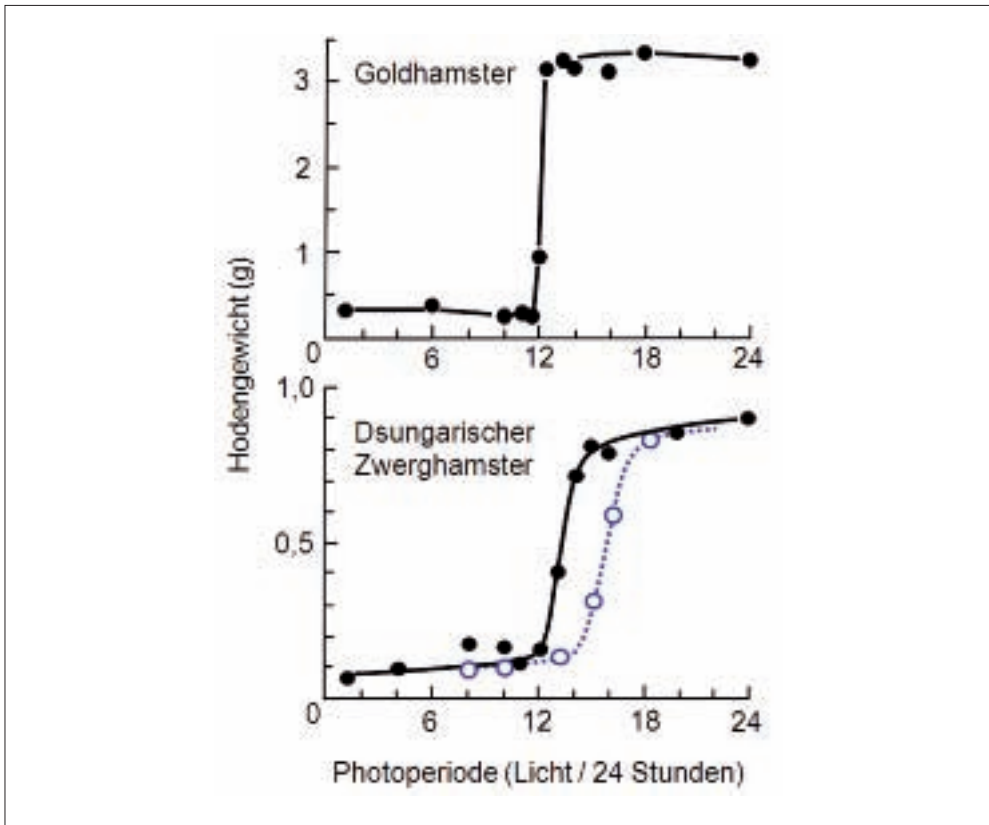


Abb. 5 Die kritische Photoperiode, d. h. der Umschlagpunkt von langer zu kurzer Photoperiode, liegt beim Goldhamster (*oben*) bei ca. 12,5 h Licht pro Tag. Beim Dsungarischen Zwerghamster (*unten*) ist sie mit ca. 13,5 h etwas länger. Werden die Zwerghamster in kalter Umgebung (10 °C) gehalten, verschiebt sich die kritische Photoperiode um ca. 2 h nach rechts (*offene, blaue Symbole*). Daten zum Goldhamster aus ELLIOTT (1976); zum Zwerghamster zusammengestellt aus HOFFMAN (1982) und STEINLECHNER und NIKLOWITZ (1992).

wieder aufgehoben wird, reagieren die Tiere wieder auf kurze Photoperioden. Da hier zur Auslösung des Jahreszyklus jeweils ein Anstoß durch kurze Photoperioden notwendig ist, der Zyklus aber dann spontan weiter läuft, spricht man hier von einem „Sanduhr“-Mechanismus (im Englischen auch vom „interval timer“). Das Poster von PETRI et al. im vorliegenden Band S. 257–260 zeigt, dass photoperiodische Reaktionen des Dsungarischen Zwerghamsters durch intensive Laufaktivität modifiziert werden können. Die zugrundeliegenden Mechanismen sind aber noch nicht geklärt.

#### 4. Das Photoneuroendokrine System und photoperiodische Zeitmessung

Alle jahreszeitlichen Änderungen, die von der Photoperiode gesteuert und beeinflusst werden, also das gesamte „adaptive Syndrom“ (HELDMAIER und LYNCH 1986), unterliegen der Steuerung durch das photoneuroendokrine System und Melatonin (siehe Übersichten bei GOLDMAN

und DARROW 1983, KORF et al. 1998, KORF und STEHLE 2005). Eine der wesentlichen Komponenten des photoneuroendokrinen Systems ist der paarige suprachiasmatische Nucleus (SCN), der Sitz des zentralen, endogenen Oszillators. Diese „Innere Uhr“ ist maßgeblich für die Fähigkeit der Tiere, die Tageslänge zu messen und so jederzeit zu „wissen“, in welcher Jahreszeit sie sich gerade befinden (Kalenderfunktion). Der Mechanismus dieser „photoperiodischen Zeitmessung“ ist inzwischen sehr gut charakterisiert und in vielen Übersichtsartikeln ausführlich dargestellt (u. a. BARTNESS und GOLDMAN 1989, GOLDMAN 1999, 2001, GORMAN et al. 2001, PAUL et al. 2008) und soll deshalb hier nur in seinen wesentlichen Punkten rekapituliert werden.

Die Information über die Tageslänge wird von der Netzhaut des Auges über den retino-hypothalamischen Trakt zu den SCN geleitet. Dabei sind allerdings nicht die eigentlichen Photosensoren der Retina (Zapfen und Stäbchen) für die Lichtwahrnehmung zuständig, sondern eine Untergruppe der retinalen Ganglienzellen mit einem speziellen Photopigment, dem Melanopsin (PROVENCIO et al. 2000). Jedes einzelne Neuron des SCN (in der Summe ca. 20000) besitzt ein molekulares Uhrwerk und produziert so einen eigenen endogenen, circadianen Rhythmus, der durch den täglichen Hell-Dunkel-Wechsel mit dem 24-h-Tag synchronisiert wird (WELSH et al. 1995, GILLETTE und MITCHELL 2002, SCHAAP et al. 2003, ROHLING et al. 2006). Das molekulare „Räderwerk“ der circadianen Uhr in den Neuronen des SCN ist in seinen Grundzügen verstanden und besteht aus ineinander verschachtelten, negativen und positiven Rückkopplungsschleifen, die die Transkription und Translation von mehreren „Uhrengenen“ regulieren (Übersichten siehe OKAMURA et al. 2002, REPERT und WEAVER 2002, KORF und STEHLE 2005, KO und TAKAHASHI 2006, siehe aber auch O'NEILL et al. 2008 für neuere, zusätzliche Mechanismen). Wie aus diesen vielen separaten „Uhren“ der Einzelneurone ein gemeinsames, einheitliches Ausgangssignal wird, ist bisher aber nur im Ansatz geklärt, und vermutlich sind an dieser internen Synchronisation auch die Astrozyten im SCN beteiligt (ANTLE und SILVER 2005, ROHLING et al. 2006; siehe auch das Poster von LIPOKATIC-TAKACS und STEINLECHNER im vorliegenden Band S. 227–230). Es scheint allerdings gesichert zu sein, dass im SCN nicht nur die Information über die Tageszeit codiert wird, sondern dass auch die tägliche Lichtdauer in eine Information über die Jahreszeit übersetzt wird (SUMOVÁ et al. 1995, SCHWARTZ et al. 2001, SCHAAP et al. 2003). Bereits 1976 haben PITTENDRIGH und DAAN aus Analysen von Aktogrammen geschlossen, dass die circadiane Uhr aus zwei gekoppelten Oszillatoren besteht. Sie postulierten die Existenz eines „Abendoszillators“ (*evening oscillator*, E), der an die Abenddämmerung synchronisiert und durch Licht verzögert wird, und eines „Morgensoszillators“ (*morning oscillator*, M), der an die Morgendämmerung gekoppelt ist und durch Licht beschleunigt wird. Durch die länger werdenden Tage im Frühjahr werden E und M aufeinander zu bewegt, bzw. durch die kürzer werdenden Tage im Herbst werden E und M auseinander gezogen und so die Phasenbeziehung zwischen E und M in Abhängigkeit von der Jahreszeit (Photoperiode) verändert („a clock for all seasons“, PITTENDRIGH und DAAN 1976). Neuere Ergebnisse unter Hinzunahme von Expressionsmustern der Uhrengene im SCN sowie der Registrierung der elektrischen Aktivität im SCN scheinen die Theorie zu bestätigen, auch wenn noch einige Details umstritten sind (JAGOTA et al. 2000, MRUGALA et al. 2000, NÜSSELEIN-HILDESHEIM et al. 2000, DAAN et al. 2001, HASTINGS 2001, STEINLECHNER et al. 2002, JOHNSTON 2005, HONMA et al. 2008). Der SCN generiert also abhängig von der Photoperiode ein Ausgangssignal, das u. a. die Produktion von Melatonin im Pinealorgan steuert. Da Melatonin nur während der Nacht synthetisiert wird, spiegelt die Dauer der Melatoninsynthese die Länge der Nacht und damit auch die Photoperiode wider (CARTER und GOLDMAN 1983,

DOWELL und LYNCH 1987, STEINLECHNER et al. 1987, REITER 1991, 1993, STEHLE et al. 2001, SIMONNEAUX und RIBLEAYGA 2003). In den Zielzellen für Melatonin, d. h. in Zellen, die spezifische Melatoninrezeptoren (MT<sub>1</sub>, REPERT et al. 1994) besitzen, wird das Melatoninsignal in die adäquaten saisonalen, physiologischen Reaktionen übersetzt (BITTMAN 1993, MORGAN et al. 1994, VON GALL et al. 2002). Durch geeignete Behandlung mit Melatonin kann ein physiologischer Sommerhamster (hohes Körpergewicht, aktive Gonaden, Sommerfell) in einen physiologischen Winterhamster (niedriges Körpergewicht, inaktive Gonaden, Winterfell) verwandelt werden. Durch Ausschaltung des Pinealorgans (Denervierung oder Exstirpation), also durch Ausschaltung der Quelle von Melatonin, reagieren die Tiere, als wären sie unempfindlich oder „blind“ gegenüber der (kurzen) Photoperiode, und in den meisten Fällen zeigen die Tiere kontinuierlich einen Sommerphänotyp (GOLDMAN 2001). Da durch Licht die nächtliche Melatonsynthese beendet wird, genügt ein 1-minütiger Lichtpuls in der Mitte der Nacht, um im Kurztag (also bei langer Nacht) aus einem langen Melatoninsignal ein kurzes „Sommer“-Melatoninsignal zu machen. Entsprechend reagieren die Tiere mit Hodenwachstum trotz Winterbeleuchtung (Kurztag, L:D = 8:16 + 1 min Licht, HOFFMANN et al. 1981). Melatonin ist also das entscheidende Hormon, das die photoperiodische Information an den Organismus übermittelt. Es ist aber nicht das Melatonin selbst, das die jeweiligen Veränderungen bewirkt, sondern Melatonin ist der permissive Faktor, schafft also die Voraussetzungen dafür, dass andere Hormonsysteme aktiv werden können (Übersichten siehe MORGAN und MERCER 1994, GOLDMAN 2001, SPESSERT 2005, HAZLERIGG und WAGNER 2006, PAUL et al. 2008).

## **5. Wo wirkt das Melatonin?**

Die Kerngebiete mit funktionalen MT<sub>1</sub>-Rezeptoren, also die Wirkorte von Melatonin im Gehirn, sind artspezifisch sehr variabel (BITTMAN und WEAVER 1990, BITTMAN 1993, MASSON-PÉVET et al. 1994, MORGAN et al. 1994). Selbst bei streng photoperiodisch gesteuerten, nahe verwandten Arten, wie z. B. dem Goldhamster und dem Dsungarischen Hamster, findet man überraschend große Unterschiede (MAYWOOD et al. 1995). So werden beim adulten Dsungarischen Hamster im SCN MT<sub>1</sub>-Rezeptoren exprimiert, während man beim adulten Goldhamster keine MT<sub>1</sub>-Rezeptoren im SCN findet (WEAVER et al. 1989, 1996, GAUER et al. 1998).

Bei allen Speziesunterschieden in der Verteilung der MT<sub>1</sub>-Rezeptoren bildet die Pars tuberalis der Adenohypophyse eine Ausnahme, denn dort sind bisher bei allen untersuchten Arten MT<sub>1</sub>-Rezeptoren gefunden worden. Die Pars tuberalis ist daher auch das am besten charakterisierte Zielgewebe für Melatonin (HAZLERIGG et al. 2001, LINCOLN et al. 2002, ROSS und MORGAN 2002, LINCOLN und HAZLERIGG 2010). Sie liegt strategisch günstig am Übergang vom Gehirn zur Hypophyse und kann dort als „Torwächter“ angesehen werden, durch den die neuroendokrinen Signale aus dem Hypothalamus, die an die Hypophyse gerichtet sind, gefiltert werden.

Neben den thyreotropen Zellen der Adenohypophyse, die TSH sezernieren, wodurch die Schilddrüsenhormone in der Peripherie gesteuert werden, gibt es auch in der Pars tuberalis eine Population separater, thyreotroper Zellen, die ebenfalls TSH sezernieren (BOCKMANN et al. 1997, WITKOWSKI et al. 1999). Dieses wirkt aber offensichtlich nur lokal im mediobasalen Hypothalamus und reguliert in den Tanyzyten über differentielle Aktivierung/Inaktivierung von Deiodonase-Typ-2 und Deiodinase-Typ-3 die Bildung bzw. den Abbau von biologisch aktivem Triiodthyronin (WATANABE et al. 2004, 2007, BARRETT et al. 2007, HERWIG et al. 2008). Ein lokaler Anstieg von Triiodthyronin aktiviert Mechanismen, die einen Langtagphä-



notyp bewirken (BECHTOLD und LOUDON 2007, FREEMAN et al. 2007, HANON et al. 2008, NAKAO et al. 2008). Zu saisonalen Änderungen in der Morphologie von Tanyzyten siehe auch das Poster von BOLBOREA et al. in diesem Band S. 215–219.

Daneben regulieren Zellen der Pars tuberalis als Antwort auf das nächtliche Melatonin-signal die Prolaktinsekretion in den lactotopen Zellen der Pars distalis (LINCOLN et al. 2003a, b). Der nächtliche Anstieg des Melatonins induziert in den „Kalender“-Zellen (LINCOLN et al. 2002) der Pars tuberalis die Expression der Uhrgene *cryptochrom 1* und *cryptochrom 2* (LINCOLN et al. 2002, DARDENTE et al. 2003). Das Ende des Melatoninsignals ist hingegen mit der Expression des Uhrgens *period 1* korreliert (LINCOLN et al. 2002). Nur im Langtag kommt es zu einer Überlappung der Expressionsmuster der Uhrgene (und ihrer Proteine, JILG et al. 2005) und dadurch zu einer Aktivierung (bislang hypothetischer) Mechanismen, die eine erhöhte Prolaktinausschüttung im Langtag bewirken (Modell der „molekularen Koinzidenz“, HAZLERIGG und WAGNER 2006). Da im Langtag im Vergleich zum Kurztag am Ende der Nacht auch eine signifikant höhere Expression von *period* und *ICER (inducible cAMP early repressor)* gefunden wurde, weist dies auch auf ein „Amplituden“-Modell zur Entschlüsselung des Melatoninsignals hin (MESSAGE et al. 1999, ROSS und MORGAN 2002). Beide Modelle schließen sich aber keineswegs aus, denn es kann sehr wohl sein, dass das saisonale Melatoninsignal sowohl die Phasenbeziehung der Expressionsmuster verschiedener Uhrgene als auch die Amplitude (also die Intensität) der Expression relevanter Uhrgene und Transkriptionsfaktoren verändert (ROSS und MORGAN, 2002, HAZLERIGG und WAGNER 2006). Weitergehende Studien an Schaf und Dsungarischem Hamster haben inzwischen gezeigt, dass wohl das gesamte molekulare Räderwerk der Inneren Uhr in den Pars-tuberalis-Zellen vorhanden ist (JOHNSTON et al. 2005). Die Uhr „tickt“ hier aber nicht autonom wie im SCN, sondern ist auf den täglichen Anstoß durch das Melatoninsignal angewiesen (JILG et al. 2005, WAGNER et al. 2007). Die photoperiodische Zeitmessung ist also völlig von endogenen circadianen Rhythmen abhängig, weil Uhrgene die Schrittmacherfunktion des SCN kontrollieren, die für den Melatoninrhythmus und das tägliche Melatoninprofil verantwortlich sind. Darüber hinaus kontrollieren die Uhrgene den Decodierungsmechanismus in der Pars tuberalis, durch den der Melatoninrhythmus entschlüsselt wird (LINCOLN und HAZLERIGG 2010).

## 6. Circannuale Rhythmen

Circannuale Rhythmen können über die gesamte Lebensdauer eines Tieres bestehen bleiben, wie GWINNER an Afrikanischen Schwarzkehlchen (*Saxicola torquata*) nachwies, die er über mehr als 12 Jahre unter konstanter Photoperiode von L:D = 12:12 gehalten hatte und die in dieser Zeit einen ungedämpften, freilaufenden Rhythmus mit einer Phasenlänge von 9–13 Monaten zeigten (Abb. 6, GWINNER 1996, 2003). Auch Sibirische Streifenhörnchen (*Tamias sibiricus*), die bis zu 11 Jahre lang unter konstantem Dämmerlicht und niedriger Umgebungstemperatur gehalten wurden, zeigten bis zu ihrem Lebensende freilaufende circannuale Rhythmen mit einer durchschnittlichen Periodenlänge von 10,5 Monaten (KONDO et al. 2006). Die den circannualen Rhythmen zugrundeliegenden Mechanismen sowie die anatomische Lokalisation des circannualen Schrittmachers im Zentralnervensystem sind nach wie vor ungeklärt. FARNER (1985) hat vermutet, dass im Verlauf der Evolution Jahresrhythmen mehrfach entstanden sind und deshalb ein breites Spektrum an saisonalen Phänomenen zu finden ist. Auf der einen Seite der Skala gibt es den Typ I der saisonalen Rhythmen, der in zweifacher

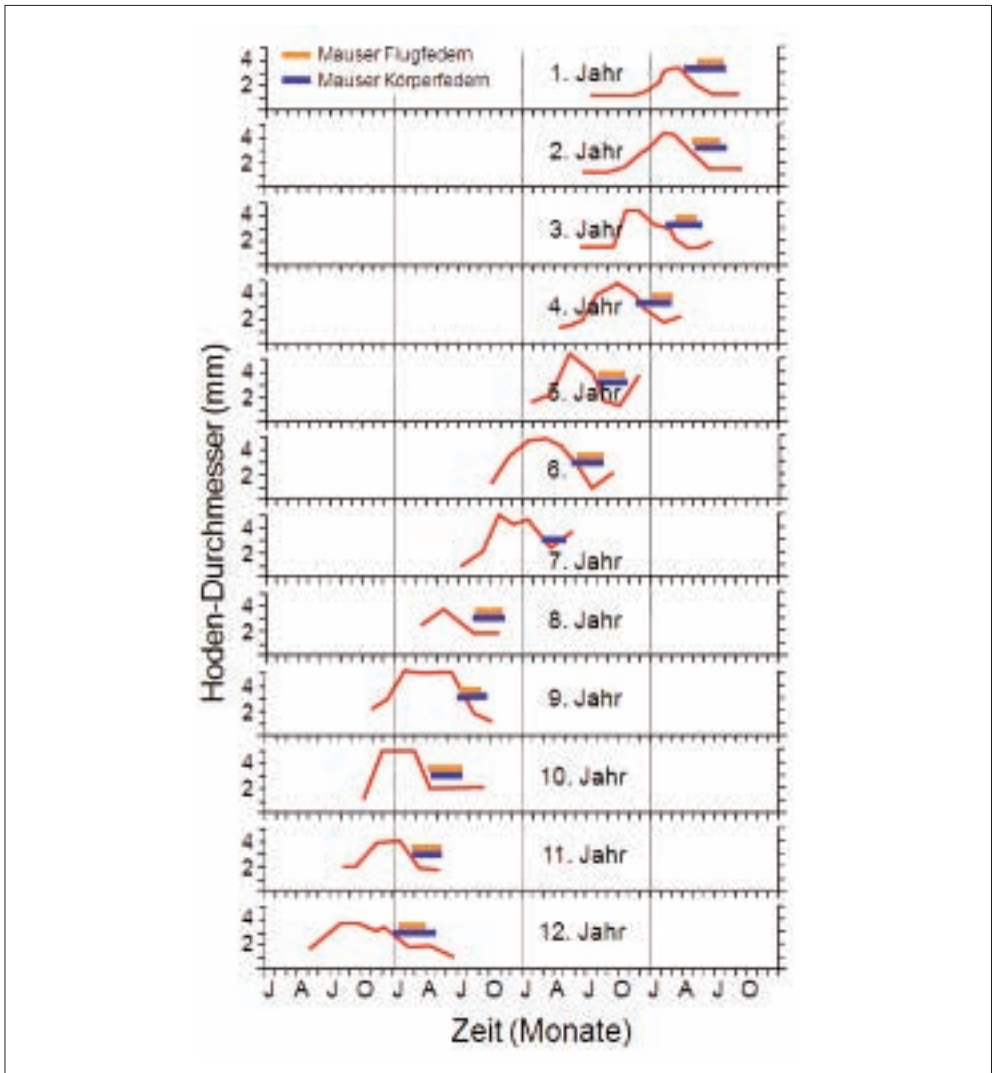


Abb. 6 Freilaufender Jahresrhythmus der Hodengröße (rote Kurven) und der Mauser eines afrikanischen Schwarzkehlchens bei konstanter Photoperiode (L:D = 12:12) und konstanter Temperatur (verändert nach GWINNER 2003).

Weise von der Photoperiode abhängig ist. Kurze Photoperiode wird benötigt, um den Zyklus in Gang zu setzen, lange Photoperiode wird benötigt, um die Refraktärphase zu beenden und die „Sanduhr“ wieder in die Ausgangsstellung zu bringen (siehe oben). Am anderen Ende der Skala gibt es die echten, endogenen circannualen Rhythmen, die die Photoperiode nur zur Synchronisation mit den Jahreszeiten benötigen. Dazwischen gibt es Systeme, die entweder zusätzliche Informationen aus der Umwelt für eine adäquate saisonale Anpassung benötigen, oder bei denen ein circannualer Rhythmus nur unter bestimmten Photoperioden (z. B. L:D = 12:12, „permissive Photoperiode“) zu beobachten ist. GOLDMAN und Mitarbeiter

haben daher vorgeschlagen, dass die Typ II circannualen Rhythmen ebenfalls auf Sanduhr-Mechanismen beruhen, allerdings mit dem Unterschied, dass hier die Photorefraktärzeit spontan beendet wird, d. h. ohne dass lange Photoperioden dazu notwendig sind (GOLDMAN et al. 2004).

Die Existenz circannualer Rhythmen wurde und wird allerdings auch von manchen Autoren in Frage gestellt und stattdessen eine „Abfolge voneinander abhängender Schritte“ oder eine Abfolge von einzelnen Phasen („sequence of stages“) angenommen (MROSOVSKY 1970, 1978, DAWSON et al. 2001, WINGFIELD 2008). Eine (Lebens-)Phase wird von einer darauf folgenden anderen Phase abgelöst, die wiederum eine weitere Phase zur Folge hat, usw., bis wieder die Ausgangsphase erreicht ist. Die aufsummierte Dauer der Einzelphasen entspricht dabei etwa 12 Monaten. Analog zu einem „finiten Automaten“ („finite state machine“, JACOBS und WINGFIELD 2000) folgt beispielsweise der Überwinterungsphase bei Zugvögeln eine Phase, in der der Frühjahrszug stattfindet, gefolgt von der Brutsaison und der anschließenden Mauser sowie dem Herbstzug in das Winterquartier, der den Jahreszyklus vollendet und letztlich wieder die Überwinterungsphase einleitet (WINGFIELD 2008). Aber bereits 1974 hat MENAKER darauf hingewiesen, dass selbstverständlich sowohl circadiane als auch circannuale Rhythmen aus einer Abfolge von Einzelschritten bestehen; die Frage ist nur, was diese einzelnen Schritte sind und auf welcher Ebene der Organisation sie auftreten (MENAKER 1974). Zudem gibt es inzwischen mehrere Belege, dass circannuale Rhythmen weiter bestehen, selbst wenn man einzelne Phasen daraus verhindert. Es wurde beispielsweise postuliert, dass bei Erdhörnchen der Anstieg im Körpergewicht eine Voraussetzung für den darauf folgenden Winterschlaf sei, was aber durch PENGELLEY (1967) widerlegt werden konnte. Wird der Anstieg im Körpergewicht durch Futterrestriktion verhindert, dann beginnen die Tiere den Winterschlaf dennoch gleichzeitig mit *ad libitum* gefütterten Kontrolltieren. Ebenso bleibt der Rhythmus im Körpergewicht bestehen, auch wenn die Erdhörnchen gehindert werden, Winterschlaf zu halten (PENGELLEY und FISHER 1963). Dies zeigt, dass es sich um zwei unabhängige circannuale Rhythmen handelt, die allerdings unter natürlichen Bedingungen (und sinnvoller Weise) eng gekoppelt sind (PENGELLEY 1967). MARTINET et al. (1992) fanden auch, dass beim Mink (*Mustela vison*) unter konstanten Bedingungen circannuale Rhythmen von Körpergewicht und Fellwechsel persistieren, aber im Lauf der Zeit ihre normale, enge Phasenbeziehung verlieren (Übersicht in GWINNER 1981a).

Circannuale Rhythmen besitzen Eigenschaften und Mechanismen, die von circadianen Rhythmen her bekannt und gut charakterisiert sind. Circannuale Rhythmen scheinen (zumindest bei Vögeln, GWINNER 1986) ebenso wie circadiane Rhythmen angeboren zu sein. Es handelt sich ebenfalls um „circa“-Rhythmen mit freilaufenden Zyklen, die durch äußere Zeitgeber synchronisierbar sind (DAVIS und FINNIE 1975, WOODFILL et al. 1991, 1994, CONCANNON et al. 1993, BARRELL et al. 2000), die einen Mitnahmebereich besitzen und – soweit bekannt – temperaturkompensiert sind (BLAKE 1959, GWINNER 1986). Für drei verschiedene Arten wurde sogar die (sehr langwierige) Erstellung von Phasen-Response-Kurven unternommen (Forelle, *Salmo gairdneri*, heute: *Oncorhynchus mykiss*: DUNSTAN und BROMAGE 1988, Europäischer Hamster, *Cricetus cricetus*: MONECKE et al. 2009 und Teppichkäfer, *Anthrenus verbasci*: MIYAZAKI et al. 2005). Circadiane und circannuale Rhythmen haben also sehr ähnliche, formale Eigenschaften, woraus sich aber nicht schließen lässt, dass die circannuale Uhr ein Teil der zentralen, circadianen Uhr (SCN) oder gar mit ihr identisch ist. Vielmehr ist heute klar, dass der SCN zwar wichtig für die Anpassung des circadianen Rhythmus an das Kalenderjahr (weil

notwendig für die photoperiodische Zeitmessung), aber sicher nicht Sitz des circannualen Oszillators ist. In mehreren Arbeiten konnte gezeigt werden, dass nach Läsion des SCN der circannuelle Rhythmus weiter besteht (ZUCKER et al. 1983, RUBY et al. 1996, 1998). Dies spricht auch ganz klar gegen die „Frequenz-Demultiplikations-Hypothese“, nach der sich ein circannualer Zyklus aus ungefähr 360 circadianen Tagen zusammensetzen sollte. In Experimenten von GWINNER (1981a) an Staren (*Sturnus vulgaris*) wurden zwei Gruppen von Staren für 3½ Jahre in konstanten L:D-Zyklen gehalten, die eine Gruppe bei L:D = 11:11, das entspricht einer Periode  $\tau = 22$  h, die andere Gruppe bei L:D = 12:12, also einer Periode von  $\tau = 24$  h. Die Frequenz-Demultiplikations-Hypothese würde eine deutlich kürzere circannuale Periode (ca. – 10 %) für die Stare unter  $\tau = 22$  h erwarten lassen. GWINNER (1981a) fand aber gleich lange oder sogar etwas längere circannuale Rhythmen bei Hodengröße und Mauser der Vögel unter  $\tau = 22$  h als bei Vögeln unter  $\tau = 24$  h. Eine Bestätigung für die Hypothese, dass die circadianen Tage gezählt werden, konnte auch ein ähnlicher Versuch an Haussperlingen (*Passer domesticus*) nicht erbringen (WIKELSKI et al. 2008), und auch beim Goldmantelziesel hat sich diese Hypothese nicht bestätigen lassen (CARMICHAEL und ZUCKER 1986). Obwohl die Erdhörnchen unter  $\tau$ -Zyklen von  $\tau = 23$ ,  $\tau = 24$  oder  $\tau = 25$  h gehalten wurden, waren die Periodenlängen ihrer circannualen Rhythmen nicht unterschiedlich. Dies zeigt, dass circannuale Rhythmen nicht einfach aus 360 circadianen Zyklen zusammengesetzt sind, sondern dass circadiane und circannuale Rhythmen durch unterschiedliche Mechanismen generiert werden (CARMICHAEL und ZUCKER 1986).

## 7. Bedeutung des Pinealorgans für circannuale Rhythmen

Die zentrale Rolle des Pinealorgans als neurochemischer Transducer (AXELROD 1974) der Photoperiode ist heute unumstritten und für eine Vielzahl von Säugetieren sehr gut belegt (Übersichten siehe REITER 1974, 1980, 1993, GOLDMAN und DARROW 1983, BARTNESS und GOLDMAN 1989, GOLDMAN 2001). Allerdings bleiben auch nach Pinealektomie die circannualen Rhythmen von Körpergewicht und Hodengröße sowohl bei Frettchen (HERBERT 1971, 1972) als auch beim Goldmantelziesel (ZUCKER 1985, HIEBERT et al. 2000) unter konstanten Bedingungen bestehen. Werden die pinealektomierten Tiere jedoch in natürlicher Photoperiode gehalten, verschiebt sich ihr Rhythmus im zweiten Jahr gegenüber den Kontrolltieren um mehrere Monate (HERBERT 1971, 1972, HERBERT et al. 1978). Ähnliche Effekte von Pinealektomie wurden später auch mehrfach beim Schaf nachgewiesen (LINCOLN 1979, BITTMAN et al. 1983a, b). Pinealektomie hat also keinen Einfluss auf den circannualen Mechanismus an sich, sondern verhindert die Synchronisation des endogenen Rhythmus mit dem jährlichen Zyklus der Photoperiode, so dass die Zyklen außer Phase mit der Umwelt geraten. Die pinealektomierten Tiere erscheinen „blind“ gegenüber der Photoperiode und verhalten sich in dieser Hinsicht auch wie blinde Tiere (LEGAN und KARSCH 1983), weil eine ganz entscheidende Komponente der photoperiodischen Zeitmessung, der Melatoninrhythmus, fehlt.

## 8. Eine neue Hypothese

GWINNER (1986) hat in seiner Monographie schon darauf hingewiesen, dass die Zeitkonstanten circannualer Rhythmen weit über das Maß der bekannten neuroendokrinen Rückkopplungs-

schleifen hinaus gehen und in vieler Hinsicht eher Entwicklungsprozessen entsprechen, die während der Ontogenese auftreten, wie z. B. die der sexuellen Reifung. Ausgehend von dieser Überlegung haben LINCOLN und HAZLERIGG (2010) eine neue Hypothese zur Entstehung circannualer Rhythmen entworfen. Bei vielen langlebigen Arten kann man zyklische Vorgänge beobachten, wie z. B. Wachstumsschübe und regenerative Prozesse, die auch im erwachsenen Organismus ablaufen. Synchronisierte Zellproliferation von adulten Stammzellen in verschiedenen Geweben (Gehirn, Hypophyse, periphere Organe) bildet die Grundlage einer zyklischen Regeneration. Solche zyklischen Regenerationen sind aus praktisch allen Geweben und Organen bekannt und spielen in der aktuellen Forschung zur regenerativen Medizin eine herausragende Rolle (z. B. Leber: FORBES et al. 2002, Herz: ANVERSA et al. 2004, Hypophyse: FAUQUIER et al. 2008, Haarfollikel: SCHNEIDER et al. 2009, Hoden: DAVIDOFF et al. 2004). Neu an der Hypothese ist die Idee, dass diese regenerativen Zyklen der Histogenese zeitlich und hierarchisch koordiniert ablaufen. Als Beispiel kann das Haarwachstum gelten. Jeder Haarfollikel durchläuft normalerweise seine eigenen, zeitlich mit den Nachbarfollikeln unkoordinierten Zyklen von Wachstum (Anagen), Regression (Katagen) und Ruhephasen (Telogen, Übersicht siehe SCHNEIDER et al. 2009). Nach einer Intervention (z. B. Bestrahlung, Chemotherapie) kommt es aber zu einer Synchronisation der Zyklen der einzelnen Follikel bei gleichzeitiger massiver Proliferation der Follikelstammzellen. Dies ähnelt dem Zustand der Mauser oder des saisonalen Fellwechsels, für die u. a. der saisonale Prolaktinspiegel verantwortlich ist (MARTINET et al. 1981, DUNCAN und GOLDMAN 1984, LINCOLN et al. 2003a). Es wird vermutet, dass jedes saisonal regulierte, physiologische System über ähnliche regenerative Zyklen verfügt. Als übergeordneter, saisonaler Koordinator kann die Hypophyse angenommen werden, deren Pars tuberalis derzeit als wahrscheinlichster Sitz des circannualen Oszillators (oder einer von mehreren!) gilt (HAZLERIGG et al. 2001, LINCOLN et al. 2003b, 2006, HAZLERIGG und WAGNER 2006, LINCOLN und HAZLERIGG 2010).

## 9. Gibt es circannuale Rhythmen auch beim Menschen?

Für eine Vielzahl physiologischer, psychologischer und auch Verhaltensparameter des Menschen wurden saisonale Rhythmen beschrieben (Übersichten siehe REINBERG 1974, ASCHOFF 1981, HARMATZ et al. 2000, WEHR 2001, FOSTER und ROENNEBERG 2008). Viele der beim Menschen beschriebenen Rhythmen sind allerdings Pseudorhythmen (Typ III), die oft nur aufgrund von direkten Umwelteinflüssen oder gesellschaftlichen Zwängen und Traditionen entstehen. Ein oft zitiertes Beispiel ist das Verbot der sexuellen Aktivität während der Wachstumszeit der Yamswurzeln von Juli bis zur Ernte im Januar bei den Samukundi auf Papua-Neuguinea, das ein auffälliges Geburtenmaximum im Oktober zur Folge hat (SCAGLION 1978). Daneben gibt es aber gute Belege, dass beim Menschen photoperiodische Anpassungen existieren (WEHR 2001, BRONSON 2004). So haben WEHR und Mitarbeiter nachgewiesen, dass sowohl die Dauer der nächtlichen Melatoninsynthese als auch die Schlafdauer abhängig von der Photoperiode sind (WEHR 1991, WEHR et al. 1993). Obwohl der Mensch sicherlich das ganze Jahr über sexuell aktiv ist und zu jeder Jahreszeit Kinder geboren werden, haben mehrere Studien unzweifelhaft nachgewiesen, dass die Geburtenrate saisonalen Schwankungen unterliegt, auch wenn sich die Amplitude dieser Schwankungen – zumindest in den Industriestaaten – in den letzten 100 Jahren deutlich abgeschwächt hat, oder sich die Maxima jahreszeitlich verschoben haben (ROENNEBERG und ASCHOFF 1990a, b, BRONSON 1995, FOSTER und ROENNEBERG 2008).

Ob es sich bei den saisonalen Rhythmen des Menschen mit biologischem Hintergrund (auch um echte circannuale Rhythmen handelt, ist zwar wahrscheinlich; jedoch ist es aus nahe liegenden Gründen nicht möglich, Menschen über mehrere Jahre hinweg in Isolation konstanten Bedingungen auszusetzen. Bei nicht-menschlichen Primaten sind aber circannuale Rhythmen nachgewiesen (MICHAEL und BONSALE 1977), und es gibt daher keinen Grund anzunehmen, dass *Homo sapiens* eine Ausnahme darstellen könnte (WEHR 2001).

## 10. Cui bono?

Dies bringt uns letztlich zu der entscheidenden Frage: wem (oder was) nützt es? Zunächst einmal ist offenkundig, dass, ebenso wie bei der circadianen Uhr, der entscheidende Vorteil einer Jahresuhr darin besteht, dass sich der Organismus im Voraus auf Ereignisse einstellen und vorbereiten kann. Insbesondere für alle physiologischen und morphologischen Prozesse, die eine mehrere Wochen oder gar Monate dauernde Entwicklungszeit benötigen, käme eine Anpassung zu spät, die erst als Reaktion auf den ultimativen Faktor begonnen würde.

Tiere, die selten länger als ein Jahr in der Natur überleben, benötigen keinen Mechanismus, der über mehrere Jahreszyklen fort dauert. Für sie bestand also im Verlauf der Evolution gar kein selektiver Druck, eine circannuale Uhr zu entwickeln. Für sie genügt ein Sanduhr-Mechanismus, kombiniert mit der Fähigkeit zur photoperiodischen Zeitmessung, um die Tageslänge messen zu können. Dadurch können die Tiere diesen sehr zuverlässigen, proximalen Umweltfaktor dazu benutzen, um eine rechtzeitige Anpassung an die bevorstehende Jahreszeit einleiten zu können. Wenn aber, wie bei vielen Organismen gezeigt, ein saisonaler Rhythmus (Typ I), der durch die Photoperiode gesteuert wird, für eine adäquate Anpassung an die Umwelt ausreicht, warum hat sich dann ein endogener, circannualer Rhythmus (Typ II) entwickelt? Wo liegt da der Mehrwert, die zusätzliche Fitness?

Für alle Tiere, die zumindest zeitweise ohne die Möglichkeit zur photoperiodischen Zeitmessung leben, sollte eine circannuale Uhr vorteilhaft sein. Alle Zugvögel, die jedes Jahr im Herbst über viele Breitengrade fliegen oder gar weit über den Äquator hinaus bis ins südliche Afrika und im Frühjahr zurückkehren, durchleben während des Zuges sehr komplexe Änderungen der Photoperiode. Für sie ist es sogar sinnvoll, sich (zumindest während des Zuges) größtenteils von der Photoperiode unabhängig zu machen und auf einen inneren Rhythmus zu „hören“. Ein anderes Beispiel sind die Winterschläfer, die z. T. bis zu sieben Monate im Jahr unterirdisch in ihren Bauen verbringen, wo keinerlei Information über die Photoperiode möglich ist. Auch sie müssen sich auf eine innere Jahresuhr verlassen können.

Für Tiere der äquatorialen Zone ist die jährliche Änderung der Photoperiode zu gering, um ein zuverlässiges, starkes Signal zu sein, auch wenn HAU und Mitarbeiter nachweisen konnten, dass für den tropischen Ameisenvogel, *Hylophylax naevioides*, in Panama ein Anstieg der Photoperiode um 17 min für eine Stimulation des Gonadenwachstums ausreicht (HAU et al. 1998). Am Äquator sind aber die Änderungen in der Photoperiode noch geringer als in Panama und durch variable Wetterbedingungen (z. B. dichte Wolkendecke) weiter stark abgeschwächt, so dass die Photoperiode hier kein zuverlässiges Umweltsignal mehr ist (GWINNER 2003). Dazu passt auch der Befund, dass das Schwarzkehlchen aus Äquatorial-Afrika unter konstanten Umweltbedingungen stabilere circannuale Rhythmen zeigt (siehe Abb. 6) als das nahe verwandte Europäische Schwarzkehlchen unter vergleichbaren Bedingungen (GWINNER 2003).

Der letztendliche Test aber, ob circannuale Rhythmen die Fitness eines Organismus in der freien Natur erhöhen, lässt sich nur sehr schwer erbringen. Da circannuale Rhythmen ja durch Umweltsignale (die Photoperiode) synchronisiert werden, können in einer natürlichen Umgebung die Effekte eines endogenen Rhythmus von direkten Umwelteffekten nicht sicher unterschieden werden. Auch lässt sich die endogene, circannuale Uhr nicht ausschalten, solange man sie anatomisch noch nicht lokalisiert hat. So ist (noch) kein direkter Vergleich zwischen Tieren mit intakter und defekter circannuabler Uhr möglich, wie das inzwischen auf der Ebene der circadianen Uhr sehr überzeugend gelungen ist (DECOURSEY et al. 2000, DECOURSEY 2004).

## 11. Ausblick

Die Mechanismen der photoperiodischen Zeitmessung bei Säugetieren können als weitgehend verstanden angesehen werden. Ebenso sind die molekularen Mechanismen und die beteiligten Gene für die innere Uhr im SCN in ihren Grundzügen aufgeklärt. Die den circannualen Rhythmen zugrundeliegenden Mechanismen sind allerdings noch gänzlich unverstanden, auch wenn es manche Hypothesen und viel versprechende Ansätze gibt. Michael MENAKER hat bereits 1974 ein entscheidendes Problem für die Erforschung circannualer Rhythmen formuliert: „Indeed perhaps the major difficulty in the study of circannual rhythms is a consequence of the ratio of the period length of a single circadian cycle to the length of the productive life of a biologist“ (MENAKER 1974). Und ich möchte hinzufügen: und heutzutage noch wichtiger sind die Vergabezyklen für Drittmittel und die damit verbundenen Erwartungen, dass jedes Jahr mehrere Publikationen zum bearbeiteten Thema erscheinen. Wer circannuale Rhythmen erforschen will, braucht einen langen Atem und langfristig gesicherte Finanzierung. Es wäre heutzutage schon unverantwortbar, wollte man jungen Nachwuchswissenschaftler(inne)n ein Thema zu circannualen Rhythmen als Dissertationsthema geben. In dem von den meisten Graduiertenkollegs geförderten Zeitraum von maximal 3 Jahren ist so ein Thema nicht sinnvoll zu bearbeiten! Ich fürchte, wir können daher in absehbarer Zeit keine wesentlichen Fortschritte in der Erforschung der circannualen Rhythmen erwarten, es sei denn, einem oder einer der etablierten Forscher und Forscherinnen, die (noch) ausreichend Zeit haben, gelingt ein entscheidender Durchbruch.

## Literatur

- AL-KHATEEB, A., and JOHNSON, E.: Seasonal changes of pelage in the vole (*Microtus agrestis*). II. The effect of day-length. *Gen. Comp. Endocrinol.* 16, 229–235 (1971)
- ANTLE, M. C., and SILVER, R.: Orchestrating time: arrangements of the brain circadian clock. *Trends in Neuroscience* 28, 145–151 (2005)
- ANVERSA, P., KAJSTURA, J., and LERI, A.: Circulating progenitor cells: search for an identity. *Circulation* 110, 3158–3160 (2004)
- ASCHOFF, J.: Annual rhythms in man. In: ASCHOFF, J. (Ed.): *Handbook of Behavioral Neurobiology*. Vol. 4: Biological Rhythms; pp. 457–487. New-York: Plenum 1981
- AXELROD, J.: The pineal gland: a neurochemical transducer. *Science* 184, 1341–1348 (1974)
- BAKER, J. R.: The evolution of breeding seasons. In: BEER, G. R. DE (Ed.): *Evolution: Essays on Aspects of Evolutionary Biology*; pp. 161–177. Oxford: Oxford University Press 1938

- BAKER, J. R., and RANSON, R. M.: Factors affecting the breeding of the field mouse (*Microtus agrestis*). I. Light. Proc. Roy Soc. Lond. B Biol. Science *110*, 313–322 (1932)
- BARRELL, G. K., THRUN, L. A., BROWN, M. E., VIGUIÉ, C., and KARSCH, F. J.: Importance of photoperiodic signal quality to entrainment of the circannual reproductive rhythm of the ewe. Biol. Reprod. *63*, 769–774 (2000)
- BARRETT, P., EBLING, F. J. P., SCHULER, S., WILSON, D., ROSS, A.W., WARNER, A., JETHWA, P., BOELEN, A., VISSER, T. J., OZANNE, D. M., ARCHER, Z. A., MERCER, J. G., and MORGAN, P. J.: Hypothalamic thyroid hormone catabolism acts as a gatekeeper for seasonal control of body weight and reproduction. Endocrinology *148*, 3608–3617 (2007)
- BARTNESS, T. J., and GOLDMAN, B. D.: Mammalian pineal melatonin: A clock for all seasons. Experientia *45*, 939–945 (1989)
- BECHTOLD, D. A., and LOUDON, A. S. I.: Hypothalamic thyroid hormones: Mediators of seasonal physiology. Endocrinology *148*, 3605–3607 (2007)
- BITTMAN, E. L.: The sites and consequences of melatonin binding in mammals. Amer. Zool. *33*, 200–211 (1993)
- BITTMAN, E. L., DEMPSEY, R. J., and KARSCH, F. J.: Pineal melatonin secretion drives the reproductive response to daylength in the ewe. Endocrinology *113*, 2276–2283 (1983a)
- BITTMAN, E. L., KARSCH, F. J., and HOPKINS, J. W.: Role of the pineal gland in ovine photoperiodism: regulation of seasonal breeding and negative feedback effects of estradiol upon luteinizing hormone secretion. Endocrinology *113*, 329–336 (1983b)
- BITTMAN, E. L., and WEAVER, D. R.: The distribution of melatonin binding sites in neuroendocrine tissues of the ewe. Biol. Reprod. *43*, 986–993 (1990)
- BLAKE, G. M.: Control of diapause by an “internal clock” in *Anthrenus verbasci* (L.) (*Col. Dermestidae*). Nature *183*, 126–127 (1959)
- BOCKMANN, J., BÖCKERS, T. M., WINTER, C., WITTKOWSKI, W., WINTERHOFF, H., DEUFEL, T., and KREUTZ, M. R.: Thyrotropin expression in hypophysal pars tuberalis-specific cells is 3, 5, 3'- triiodothyronine, thyrotropin-releasing-hormone, and pit-1 independent. Endocrinology *138*, 1019–1028 (1997)
- BRONSON, F. H.: Seasonal variation in human reproduction: Environmental factors. Q. Rev. Biol. *70*, 141–164 (1995)
- BRONSON, F. H.: Are humans seasonally photoperiodic? J. Biol. Rhythms *19*, 180–192 (2004)
- BRONSON, F. H., and HEIDEMAN, P. D.: Seasonal regulation of reproduction in mammals. In: KNOBIL, E., and NEILL, J. D. (Eds.): The Physiology of Reproduction, 2<sup>nd</sup> Ed., S. 541–583. New York: Raven Press 1994
- CARMICHAEL, M. S., and ZUCKER, I.: Circannual rhythms of ground squirrels: A test of the frequency demultiplication hypothesis. J. Biol. Rhythms *1*, 277–284 (1986)
- CARTER, D. S., and GOLDMAN, B. D.: Antigonadal effects of timed melatonin infusion in pinealectomized male Djungaria hamsters (*Phodopus sungorus sungorus*): duration is the critical parameter. Endocrinology *113*, 1261–1267 (1983)
- CHRISTIAN, J. J.: Regulation of annual rhythms in temperate small rodents. In: STEINBERGER, A., and STEINBERGER, E. (Eds.): Testicular Development, Structure and Function; pp. 367–380. New York: Raven Press 1980
- CONCANNON, P., ROBERTS, P., BALDWIN, B., ERB, H., and TENNANT, B.: Alteration of growth, advancement of puberty, and season-appropriate circannual breeding during 28 months of photoperiod reversal in woodchucks (*Marmota monax*). Biol. Reprod. *48*, 1057–1070 (1993)
- DAAN, S., ALBRECHT, U., VAN DER HORST, G. T. J., ILLNEROVA, H., ROENNEBERG, T., WEHR, T. A., and SCHWARTZ, W. J.: Assembling a clock for all seasons: Are the M and E oscillators in the genes? J. Biol. Rhythm. *16*, 105–116 (2001)
- DARDENTE, H., MENET, J. S., POIREL, V. J., STREICHER, D., GAUER, F., VIVIEN-ROELS, B., KLOSEN, P., PÉVET, P., and MASSON-PÉVET, M.: Melatonin induces Cry1 expression in the pars tuberalis of the rat. Mol. Brain Res. *114*, 101–106 (2003)
- DAVIDOFF, M. S., MIDDENDORFF, R., ENIKOLOPOV, G., RIETHMACHER, D., HOLSTEIN, A. F., and MÜLLER, D.: Progenitor cells of the testosterone-producing Leydig cells revealed. J. Cell. Biol. *167*, 935–944 (2004)
- DAVIS, D. E., and FINNIE, E. P.: Entrainment of circannual rhythm in weight of woodchucks. J. Mammal. *56*, 199–203 (1975)
- DAWSON, A., KING, V. M., BENTLEY, G. E., and BALL, G. F.: Photoperiodic control of seasonality in birds. J. Biol. Rhythms *16*, 365–380 (2001)
- DECOURSEY, P.: The behavioural ecology of biological timing systems In: DUNLAP, J. C., LOROS, J. J., and DECOURSEY, P. (Eds.): Chronobiology. Biological Timekeeping; pp. 27–65. Sunderland: Sinauer 2004
- DECOURSEY, P., WALKER, J. K., and SMITH, S. A.: A circadian pacemaker in free-living chipmunks: Essential for survival? J. Comp. Physiol. A *186*, 169–180 (2000)
- DOWELL, S. F., and LYNCH, G. R.: Duration of the melatonin pulse in the hypothalamus controls testicular function in pinealectomized mice (*Peromyscus leucopus*). Biol. Reprod. *36*, 1095–1101 (1987)



- DUNCAN, M. J., and GOLDMAN, B. D.: Hormonal regulation of the annual pelage color cycle in the Djungarian hamster, *Phodopus sungorus*. I. Role of prolactin. *J. Exp. Zool.* *230*, 97–103 (1984)
- DUNSTAN, J., and BROMAGE, N.: The entrainment and gating of the endogenous circannual rhythms of reproduction in the female rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *J. Comp. Physiol. A* *164*, 259–268 (1988)
- ELLIOTT, J. A.: Circadian rhythms and photoperiodic time measurement in mammals. *Fed. Proc.* *35*, 2339–2346 (1976)
- FARNER, D. S.: Annual rhythms. *Annu. Rev. Physiol.* *47*, 65–82 (1985)
- FAUQUIER, T., RIZZOTI, K., DATTANI, M., LOVELL-BADGE, R., and ROBINSON, I. C.: SOX2-expressing progenitor cells generate all of the major cell types in the adult mouse pituitary gland. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *105*, 2907–2912 (2008)
- FIGALA, J., HOFFMANN, K., und GOLDAU, G.: Zur Jahresperiodik beim Dsungarischen Zwerghamster, *Phodopus sungorus*, Pallas. *Oecologia (Berl.)* *12*, 89–118 (1973)
- FLINT, W. E.: Die Zwerghamster der paläarktischen Fauna. Die neue Brehm-Bücherei. Wittenberg: Ziemsen 1966
- FORBES, S., VIG, P., POULSON, R., THOMAS, H., and ALLISON, M.: Hepatic stem cells. *J. Pathol.* *197*, 510–518 (2002)
- FOSTER, R. G., and ROENNEBERG, T.: Human responses to the geophysical daily, annual, and lunar cycles. *Curr. Biol.* *18*, R784–794 (2008)
- FREEMAN, D. A., TEUBNER, B. J. W., SMITH, C. D., and PRENDERGAST, B. J.: Exogenous T<sub>3</sub> mimics long day lengths in Siberian hamsters. *Amer. J. Physiol.* *292*, R2368–R2372 (2007)
- GALL, C. VON, STEHLE, J. H., and WEAVER D. R.: Mammalian melatonin receptors: molecular biology and signal transduction. *Cell Tissue Res.* *309*, 151–162 (2002)
- GASTON, S., and MENAKER, M.: Photoperiodic control of hamster testis. *Science* *158*, 925–928 (1967)
- GAUER, F., SCHUSTER, C., POIREL, V.-J., PÉVET, P., and MASSON-PÉVET, M.: Cloning experiments and developmental expression of both melatonin receptor Mel1a mRNA and melatonin binding sites in the Syrian hamster suprachiasmatic nuclei. *Mol. Brain Res.* *60*, 193–202 (1998)
- GILLETTE, M., and MITCHELL, J. W.: Signaling in the suprachiasmatic nucleus: selectively responsive and integrative. *Cell Tissue Res.* *309*, 99–107 (2002)
- GOLDMAN, B. D.: The Siberian hamster as a model for study of the mammalian photoperiodic mechanism. In: OLCESE, J. (Ed.): *Melatonin after Four Decades. An Assessment of its Potential*; pp. 155–164. New York, Boston, Dordrecht, London, Moscow: Kluwer/Plenum 1999
- GOLDMAN, B. D.: Mammalian photoperiodic system: Formal properties and neuroendocrine mechanisms of photoperiodic time measurement. *J. Biol. Rhythms* *16*, 283–301 (2001)
- GOLDMAN, B. D. and DARROW, J. M.: The pineal gland in mammalian photoperiodism. *Neuroendocrinology* *37*, 386–396 (1983)
- GOLDMAN, B. D., GWINNER, E., KARSCH, F. J., SAUNDERS, D., ZUCKER, I., and BALL, G.: Circannual rhythmicity and photoperiodicity. In: DUNLAP, J. C., LOROS, J. J., and DECOURSEY, P. J.: *Chronobiology: biological timekeeping*; pp. 107–144. Sunderland: Sinauer 2004
- GORMAN, M. R., GOLDMAN, B. D., and ZUCKER, I.: Mammalian photoperiodism. In: TAKAHASHI, J. S., TUREK, F. W., and MOORE, R. Y. (Eds.): *Handbook of Behavioral Neurobiology. Vol. 12: Circadian Clocks*; pp. 481–508. New York: Kluwer Academic/Plenum 2001
- GROCOCK, C. A., and CLARKE, J. R.: Photoperiodic control of testis activity in the vole, *Microtus agrestis*. *J. Reprod. Fert.* *39*, 337–347 (1974)
- GWINNER, E.: Circannual systems. In: ASCHOFF, J. (Ed.): *Handbook of Behavioral Neurobiology. Vol. 4: Biological Rhythms*; pp. 391–410. New-York: Plenum 1981a
- GWINNER, E.: Circannuale Rhythmen bei Tieren und ihre photoperiodische Synchronisation. *Naturwissenschaften* *68*, 542–551 (1981b)
- GWINNER, E.: *Circannual Rhythms. Endogenous Annual Clocks in the Organization of Seasonal Processes*. Berlin, Heidelberg, New York, London, Paris, Tokyo: Springer 1986
- GWINNER, E.: Circannual clocks in avian reproduction and migration. *Ibis* *138*, 47–63 (1996)
- GWINNER, E.: Circannual rhythms in birds. *Curr. Opin. Neurobiol.* *13*, 770–778 (2003)
- HANON, E. A., LINCOLN, G. A., FUSTIN, J.-M., DARDENTE, H., MASSON-PÉVET, M., MORGAN, P. J., and HAZLERIGG, D. G.: Ancestral TSH mechanism signals summer in a photoperiodic mammal. *Curr. Biol.* *18*, 1147–1152 (2008)
- HARMATZ, M. G., WELL, A. D., OVERTREE, C. E., KAWAMURA, K. Y., ROSAL, M., and OCKENE, I. S.: Seasonal variation of depression and other moods: A longitudinal approach. *J. Biol. Rhythms* *15*, 344–350 (2000)
- HASTINGS, M. J.: Modeling the molecular calendar. *J. Biol. Rhythms* *16*, 117–123 (2001)
- HAU, M., WIKELSKI, M., and WINGFIELD, J. C.: A neotropical forest bird can measure the slight changes in tropical photoperiod. *Proc. Roy. Soc. Lond. B Biol. Science* *265*, 89–95 (1998)
- HAZLERIGG, D. G., MORGAN, P. J., MESSENGER, S.: Decoding photoperiodic time and melatonin in mammals: what can we learn from the pars tuberalis? *J. Biol. Rhythms* *16*, 326–335 (2001)

- HAZLERIGG, D. G., and WAGNER, G. C.: Seasonal photoperiodism in vertebrates: from coincidence to amplitude. *Trends Endocrinol. Metab.* 17, 83–91 (2006)
- HEIDEMAN, P. D., and BRONSON, F. H.: A pseudoseasonal reproductive strategy in a tropical rodent, *Peromyscus nudipes*. *J. Reprod. Fertil.* 95, 57–67 (1992)
- HELDMAIER, G., and LYNCH, G. R.: Pineal involvement in thermoregulation and acclimatization. In: REITER, R. J. (Ed.): *Pineal Research Reviews*; pp. 97–139. New York: Alan R. Liss. 1986
- HELDMAIER, G., and STEINLECHNER, S.: Seasonal control of energy requirements for thermoregulation in the Djungarian hamster (*Phodopus sungorus*), living in natural photoperiod. *J. Comp. Physiol. B* 142, 429–437 (1981a)
- HELDMAIER, G., and STEINLECHNER, S.: Seasonal pattern and energetics of short daily torpor in the Djungarian hamster, *Phodopus sungorus*. *Oecologia* 48, 265–270 (1981b)
- HERBERT, J.: The role of the pineal gland in the control by light of the reproductive cycle of the ferret. In: WOLSTENHOLME, G. E. W., and KNIGHT, J. (Eds.): *The Pineal Gland*. Ciba Symposium; pp. 303–327. London: Churchill 1971
- HERBERT, J.: Initial observations on pinealectomized ferrets kept for long periods in either daylight or artificial illumination. *J. Endocrinol.* 55, 591–597 (1972)
- HERBERT, J., STACEY, P. M., and THORPE, D. H.: Recurrent breeding seasons in pinealectomized or optic-nerve-sectioned ferrets. *J. Endocrinol.* 78, 389–397 (1978)
- HERWIG, A., ROSS, A. W., NILAWEERA, K. N., MORGAN, P. J., and BARRETT, P.: Hypothalamic thyroid hormone in energy balance regulation. *Obesity Facts* 1, 71–79 (2008)
- HIEBERT, S. M., THOMAS, E. M., LEE, T. M., PELZ, K. M., YELLON, S. M., and ZUCKER, I.: Photic entrainment of circannual rhythms in golden-mantled ground squirrels: Role of the pineal gland. *J. Biol. Rhythms* 15, 126–134 (2000)
- HOFFMAN, R. A., and REITER, R. J.: Pineal gland: Influence on gonads of male hamsters. *Science* 148, 1609–1611 (1965)
- HOFFMANN, K.: The influence of photoperiod and melatonin on testis size, body weight and pelage colour in the Dsungarian hamster (*Phodopus sungorus*). *J. Comp. Physiol.* 85, 397–415 (1973)
- HOFFMANN, K.: Die Funktion des Pineals bei der Jahresperiodik der Säuger. In: SCHARF, H.-J., und MAYERSBACH, H. VON (Eds.): *Die Zeit und das Leben*. Nova Acta Leopoldina NF Bd. 46, Nr. 225, 217–229 (1977)
- HOFFMANN, K.: Photoperiod, pineal melatonin, and reproduction in hamsters. *Prog. Brain Res.* 52, 397–415 (1979)
- HOFFMANN, K.: Photoperiodism in vertebrates. In: ASCHOFF, J. (Ed.): *Handbook of Behavioral. Neurobiology*, Vol. 5, *Biological Rhythms*; pp. 449–473. New York, London: Plenum Press 1981
- HOFFMANN, K.: The critical photoperiod in the Djungarian hamster, *Phodopus sungorus*. In: ASCHOFF, J., DAAN, S., and GROOS, G. (Eds.): *Circadian Systems. Structure and Function*; pp. 297–304. Berlin, Heidelberg, New York: Springer 1982
- HOFFMANN, K., ILLNEROVÁ, H., and VANECEK, J.: Effect of one minute light at night on the pineal rhythm of N-acetyltransferase activity in the Djungarian hamster *Phodopus sungorus*. *Biol. Reprod.* 24, 551–556 (1981)
- HONMA, S., INAGAKI, N., ONO, D., YOSHIKAWA, T., HASHIMOTO, S., and HONMA, K.-I.: Clock mechanisms for seasonal adaptation: Morning and evening oscillators in the suprachiasmatic nucleus. *Sleep and Biol. Rhythms* 6, 84–90 (2008)
- JACOBS, J. D., and WINGFIELD, J. C.: Endocrine control of life-cycle stages: a constraint on responses to the environment? *Condor* 102, 35–51 (2000)
- JAGOTA, A., DE LA IGLESIA, H. O., and SCHWARTZ, W. J.: Morning and evening oscillations in the suprachiasmatic nucleus in vitro. *Nature Neuroscience* 3, 327–376 (2000)
- JEFIMOW, M., WOJCIEKOWSKI, M., and TEGOWSKA, E.: Seasonal changes in the thermoregulation of laboratory golden hamsters during acclimation to seminatural outdoor conditions. *Comp. Biochem. Physiol. A* 139, 379–388 (2004)
- JILG, A., MOEK, J., WEAVER, D. A., KORF, H.-W., STEHLE, J., and GALL, C. VON: Rhythms in clock proteins in the mouse pars tuberalis depend on MT1 melatonin receptor signalling. *Eur. J. Neuroscience* 22, 2845–2854 (2005)
- JOHNSTON, J. D.: Measuring seasonal time within the circadian system: regulation of the suprachiasmatic nuclei by photoperiod. *J. Neuroendocrinol.* 17, 459–465 (2005)
- JOHNSTON, J. D., EBLING, F. J. P., and HAZLERIGG, D.: Photoperiod regulates multiple gene expression in the suprachiasmatic nuclei and pars tuberalis of the Siberian hamster (*Phodopus sungorus*). *Eur. J. Neuroscience* 21, 2967–2974 (2005)
- KO, C. H., and TAKAHASHI, J. S.: Molecular components of the mammalian circadian clock. *Hum. Mol. Genet.* 15 (Suppl. 2), R271–R277 (2006)
- KONDO, N., SEKIJIMA, T., KONDO, J., TAKAMATSU, N., TOHYA, K., and OHTSU, T.: Circannual control of hibernation by HB complex in the brain. *Cell* 125, 161–172 (2006)
- KORF, H. W., SCHOMERUS, C., and STEHLE, J. H.: The pineal organ, its hormone melatonin, and the photoneuroendocrine system. *Adv. Anat. Embryol. Cell Biol.* 146, 1–100 (1998)

- KORF, H. W., und STEHLE, J. H.: Das circadiane System der Säugetiere – integraler Bestandteil des neuroendocrinen Systems. In: PESCHKE, E. (Ed.): Endokrinologie II. Vorträge im Rahmen des Projekts „Zeitstrukturen endokriner Systeme“. Sächsische Akademie der Wissenschaften zu Leipzig. S. 9–31. Stuttgart, Leipzig: Hirzel Verlag 2005
- KÖRTNER, G., and GEISER, F.: The temporal organization of daily torpor and hibernation: circadian and circannual rhythms. *Chronobiol. Int.* *17*, 103–128 (2000)
- LARKIN, J. E., FREEMAN, D. A., and ZUCKER, I.: Low ambient temperature accelerates short-day responses in Siberian hamsters by altering responsiveness to melatonin. *J. Biol. Rhythms* *16*, 76–86 (2001)
- LARKIN, J. E., JONES, J., and ZUCKER, I.: Temperature dependence of gonadal regression in Syrian hamsters exposed to short day lengths. *Amer. J. Physiol.* *282*, R744–R752 (2002)
- LEGAN, S. J., and KARSCH, F. J.: Importance of retinal photoreceptors to the photic control of seasonal breeding in the ewe. *Biol. Reprod.* *29*, 316–325 (1983)
- LERCHL, A., and SCHLATT, S.: Influence of photoperiod on pineal melatonin synthesis, fur color, body weight, and reproductive function in the female Djungarian hamster, *Phodopus sungorus*. *Neuroendocrinology* *57*, 359–364 (1993)
- LINCOLN, G. A.: Photoperiodic control of seasonal breeding in the ram: participation of the cranial sympathetic nervous system. *J. Endocrinol.* *82*, 135–147 (1979)
- LINCOLN, G. A., ANDERSON, H., and HAZLERIGG, D.: Clock genes and long-term regulation of prolactin secretion: evidence for a photoperiod/circannual timer in the pars tuberalis. *J. Neuroendocrinol.* *15*, 390–397 (2003a)
- LINCOLN, G. A., ANDERSON, H., and LOUDON, A.: Clock genes in calendar cells as the basis of annual timekeeping in mammals – a unifying hypothesis. *J. Endocrinol.* *179*, 1–13 (2003b)
- LINCOLN, G. A., CLARKE, I. J., HUT, R. A., and HAZLERIGG, D. G.: Characterizing a mammalian circannual pacemaker. *Science* *314*, 1941–1944 (2006)
- LINCOLN, G. A., and HAZLERIGG, D. G.: Mammalian circannual pacemakers. In: LUCY, M. C., PATE, J. L., SMITH, M. F., and SPENCER, T. E. (Eds.): *Reproduction in Domestic Ruminants*. Chapter 12. Nottingham: Nottingham University Press 2010
- LINCOLN, G., MESSEGER, S., ANDERSSON, H., and HAZLERIGG, D.: Temporal expression of seven clock genes in the suprachiasmatic nucleus and the pars tuberalis of the sheep: Evidence for an internal coincidence timer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *99*, 13890–13895 (2002)
- LOUDON, A. S. I.: Photoperiod and the regulation of annual and circannual cycles of food intake. *Proc. Nutrition Soc.* *53*, 495–507 (1994)
- LYNCH, G. R.: Seasonal changes in thermogenesis, organ weights and body composition in the white-footed mouse, *Peromyscus leucopus*. *Oecologia (Berl.)* *13*, 363–376 (1973)
- MARTINET, L., MEUNIER, M., and ALLAIN, D.: Control of delayed implantation and onset of spring moult in the mink (*Mustela vison*) by daylight ratio, prolactin and melatonin. In: PELLETIER, J., and RAVAUlt, J. P. (Eds.): *Photoperiodism and Reproduction*; pp. 253–261. Paris: INRA Pub. 1981
- MARTINET, L., MONDAIN-MONVAL, M., and MONNERIE, R.: Endogenous circannual rhythms and photorefractoriness of testis activity, moult and prolactin concentrations in mink (*Mustela vison*). *J. Reprod. Fert.* *95*, 325–338 (1992)
- MASSON-PÉVET, M., GEORGE, D., KALSBECK, A., SABUREAU, M., LAKHDAR-GAZAL, N., and PÉVET, P.: An attempt to correlate brain areas containing melatonin-binding sites with rhythmic functions: A study in five hibernator species. *Cell Tissue Res.* *278*, 97–106 (1994)
- MAYWOOD, E. S., BITTMAN, E. L., EBLING, F. J. P., BARRETT, P., MORGAN, P., and HASTINGS, M. H.: Regional distribution of iodomelatonin binding sites within the suprachiasmatic nucleus of the Syrian hamster and the Siberian hamster *J. Neuroendocrinology* *7*, 215–223 (1995)
- MENAKER, M.: Circannual rhythms in circadian perspective. In: PENGELLE, E. T. (Ed.): *Circannual Clocks. Annual Biological Rhythms*; pp. 507–520. New York: Academic Press 1974
- MESSEGER, S., ROSS, A. W., BARRETT, P., and MORGAN, P. J.: Decoding photoperiodic time through *Per1* and *ICER* gene amplitude. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *96*, 9938–9943 (1999)
- MICHAEL, R. P., and BONSALE, R. W.: A 3-year study of an annual rhythm in plasma androgen levels in male rhesus monkeys (*Macaca mulatta*) in a constant laboratory environment. *J. Reprod. Fert.* *49*, 129–131 (1977)
- MIYAZAKI, Y., NISIMURA, T., and NUMATA, H.: A phase response curve for circannual rhythm in the varied carpet beetle *Anthrenus verbasci*. *J. Comp. Physiol. A* *191*, 883–887 (2005)
- MONECKE, S., SABUREAU, M., MALAN, A., BONN, D., MASSON-PÉVET, M., and PÉVET, P.: Circannual phase-response curve to short and long photoperiod in the European hamster. *J. Biol. Rhythm* *24*, 413–426 (2009)
- MORGAN, P. J., and MERCER, J. G.: Control of seasonality by melatonin. *Proc. Nutrition Soc.* *53*, 483–493 (1994)
- MORGAN, P. J., and MERCER, J. G.: The regulation of body weight: lessons from a seasonal animal. *Proc. Nutr. Soc.* *60*, 127–134 (2001)
- MORGAN, P. J., BARRETT, P., HOWELL, H. E., and HELLIWELL, R.: Melatonin receptors: Localization, molecular pharmacology and physiological significance. *Neurochem. Int.* *24*, 101–146 (1994)

- MROSOVSKY, N.: Mechanism of hibernation cycles in ground squirrels: circannian rhythm or sequence of stages? *Pennsylvania Acad. Sci.* **44**, 172–175 (1970)
- MROSOVSKY, N.: Circannual cycles in hibernators. In: WANG, L. C. H., and HUDSON, J. W. (Eds.): *Strategies in Cold: Natural Torpidity and Thermogenesis*; pp. 21–65. New York: Academic Press 1978
- MRUGALA, M., ZLOMANCZUK, P., JAGOTA, A., and SCHWARTZ, W. J.: Rhythmic multiunit neural activity in slices of hamster suprachiasmatic nucleus reflect prior photoperiod. *Amer. J. Physiol.* **278**, R987–R994 (2000)
- NAKAO, N., ONO, H., YAMAMURA, T., ANRAKU, T., TAKAGI, T., HIGASHI, K., YASUO, S., KATOU, Y., KAGEYAMA, S., UNO, Y., KASUKAWA, T., IIGO, M., SHARP, P. J., IWASAWA, A., SUZUKI, Y., SUGANO, S., NIIMI, T., MIZUTANI, M., NAMIKAWA, T., EBIHARA, S., UEDA, H. R., and YOSHIMURA, T.: Thyrotrophin in the pars tuberalis triggers photoperiodic response. *Nature* **452**, 317–322 (2008)
- NELSON, R. J.: Photoperiod influences reproduction in the prairie vole. *Biol. Reprod.* **33**, 596–602 (1985)
- NÜSSLEIN-HILDESHEIM, B., O'BRIAN, J. A., EBLING, F. J. P., MAYWOOD, E. S., and HASTINGS, M. H.: The circadian cycle of mPER clock gene products in the suprachiasmatic nucleus of the Siberian hamster encodes both daily and seasonal time. *Eur. J. Neuroscience* **12**, 2856–2864 (2000)
- OKAMURA, H., YAMAGUCHI, S., and YAGITA, K.: Molecular machinery of the circadian clock in mammals. *Cell Tissue Res.* **309**, 47–56 (2002)
- O'NEILL, J. S., MAYWOOD, E. S., CHESHAM, J. E., TAKAHASHI, J. S., and HASTINGS, M. H.: cAMP-dependent signaling as a core component of the mammalian circadian pacemaker. *Science* **320**, 949–953 (2008)
- PAUL, M. J., ZUCKER, I., and SCHWARTZ, W. J.: Tracking the seasons: the internal calendars of vertebrates. *Phil. Trans. R. Soc. B* **363**, 341–361 (2008)
- PENGELLEY, E. T.: Interrelationships of circannian rhythms in the ground squirrel, *Citellus lateralis*. *Comp. Biochem. Physiol.* **24**, 915–919 (1967)
- PENGELLEY, E. T. (Ed.): *Circannual Clocks. Annual Biological Rhythms*. New York: Academic Press 1974
- PENGELLEY, E. T., and FISHER, K. C.: Onset and cessation of hibernation under constant temperature and light in the golden-mantled ground squirrel, *Citellus lateralis*. *Nature* **180**, 1371–1372 (1957)
- PENGELLEY, E. T., and FISHER, K. C.: The effect of temperature and photoperiod on the yearly hibernating behaviour of captive golden-mantled ground squirrels, *Citellus lateralis tescorum*. *Can. J. Zool.* **42**, 1103–1120 (1963)
- PITTENDRIGH, C. S., and DAAN, S.: A functional analysis of circadian pacemakers in nocturnal rodents: V. Pacemaker structure: A clock for all seasons. *J. Comp. Physiol. A* **106**, 333–355 (1976)
- PROVENCIO, I., RODRIGUEZ, I. R., JIANG, G., HAYES, W. P., MOREIRA, E. F., and ROLLAG, M. D.: A Novel Human Opsin in the Inner Retina. *J. Neuroscience* **20**, 600–605 (2000)
- REINBERG, A.: Aspects of circannual rhythms in man. In: PENGELLEY, E. T. (Ed.): *Circannual Clocks: Annual Biological Rhythms*; pp. 424–505. New York: Academic Press 1974
- REITER, R. J.: Circannual reproductive rhythms in mammals related to photoperiod and pineal function: a review. *Chronobiologia* **1**, 365–395 (1974)
- REITER, R. J.: The pineal and its hormones in the control of reproduction in mammals. *Endocr. Rev.* **1**, 109–131 (1980)
- REITER, R. J.: Melatonin: the chemical expression of darkness. *Mol. Cell. Endocrinol.* **79**, C153–C159 (1991)
- REITER, R. J.: The melatonin rhythm: Both a clock and a calendar. *Experientia* **49**, 654–664 (1993)
- REPPERT, S. M., WEAVER, D. R., and EBISAWA, T.: Cloning and characterization of a mammalian melatonin receptor that mediates reproductive and circadian responses. *Neuron* **13**, 1177–1185 (1994)
- REPPERT, S. M., and WEAVER, D. R.: Coordination of circadian timing in mammals. *Nature* **418**, 935–941 (2002)
- ROENNEBERG, T., and ASCHOFF, J.: Annual rhythm in human reproduction: I. Biology, sociology, or both. *J. Biol. Rhythms* **5**, 195–216 (1990a)
- ROENNEBERG, T., and ASCHOFF, J.: Annual rhythm in human reproduction: II. Environmental correlations. *J. Biol. Rhythms* **5**, 217–239 (1990b)
- ROHLING, J., WOLTERS, L., and MEIJER, J. H.: Simulation of day-length encoding in the SCN: From single-cell to tissue-level organization. *J. Biol. Rhythms* **21**, 301–313 (2006)
- ROSS, A. W., and MORGAN, P. J.: The pars tuberalis as a target of the central clock. *Cell Tissue Res.* **309**, 100–200 (2002)
- ROWAN, W.: On photoperiodism, reproductive periodicity and the annual migration of birds and certain fishes. *Proc. Boston Soc. Nat. Hist.* **38**, 147–189 (1926)
- RUBY, N. F., DARK, J., HELLER, H. C., and ZUCKER, I.: Ablation of suprachiasmatic nucleus alters timing of hibernation in ground squirrels. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 9864–9868 (1996)
- RUBY, N. F., DARK, J., HELLER, H. C., and ZUCKER, I.: Suprachiasmatic nucleus: role in circannual body mass and hibernation rhythms of ground squirrels. *Brain Res.* **782**, 63–72 (1998)
- RUF, T., KLINGENSPOR, M., PREIS, H., and HELDMAIER, G.: Daily torpor in the Djungarian hamster (*Phodopus sungorus*): interactions with food intake, activity, and social behaviour. *J. Comp. Physiol. B* **160**, 609–615 (1991)

- RUF, T., STEINLECHNER, S., and HELDMAIER, G.: Influence of photoperiod on body temperature rhythms in the Djungarian hamster. In: HILDEBRANDT, G., MOOG, R., and RASCHKE, F. (Eds.): *Chronobiology & Chronomedicine. Basic Research and Applications*; pp. 79–84. Frankfurt (Main), Bern, New York, Paris: Peter Lang 1987
- RUF, T., STIEGLITZ, A., STEINLECHNER, S., BLANK, J. L., and HELDMAIER, G.: Cold exposure and food restriction facilitate physiological responses to short photoperiod in Djungarian hamsters (*Phodopus sungorus*). *J. Exp. Zool.* 267, 104–112 (1993)
- SCAGLION, R.: Seasonal births in a Western Abelan village, Papua New Guinea. *Hum. Biol.* 50, 313–323 (1978)
- SCHAAP, J., ALBUS, H., VAN DER LEEST, H. T., EILERS, P. H. C., DÉTARI, L., and MEIJER, J. H.: Heterogeneity of rhythmic suprachiasmatic nucleus neurons: Implications for circadian waveform and photoperiodic encoding. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100, 15994–15999 (2003)
- SCHERBARTH, F., and STEINLECHNER, S.: Endocrine mechanisms of seasonal adaptation in small mammals: from early results to present understanding. *J. Comp. Physiol. B* 180, 935–952 (2010)
- SCHNEIDER, M. R., SCHMIDT-ULLRICH, R., and PAUS, R.: The hair follicle as a dynamic miniorgan. *Curr. Biol.* 19, R132–R142 (2009)
- SCHWARTZ, W. J., DE LA IGLESIA, H. O., ZLOMANCZUK, P., and ILLNEROVÁ, H.: Encoding *le quattro stagioni* within the mammalian brain: Photoperiodic orchestration through the suprachiasmatic nucleus. *J. Biol. Rhythms* 16, 302–311 (2001)
- SIMONNEAUX, V., and RIBELAYGA, C.: Generation of the melatonin endocrine message in mammals: a review of the complex regulation of melatonin synthesis by norepinephrine, peptides, and other pineal transmitters. *Pharmacol. Rev.* 55, 325–395 (2003)
- SPESSERT, R.: Photoperiodismus beim Säuger: Die Rolle von Melatonin. In: PESCHKE, E. (Ed.): *Endokrinologie II. Vorträge im Rahmen des Projekts „Zeitstrukturen endokriner Systeme“*. Sächsische Akademie der Wissenschaften zu Leipzig. S. 57–74. Stuttgart, Leipzig: Hirzel Verlag 2005
- STEHLE, J. H., GALL, C. VON, SCHOMERUS, C., and KORF, H.-W.: Of rodents and ungulates and melatonin: Creating a uniform code for darkness by different signaling mechanisms. *J. Biol. Rhythms* 16, 312–325 (2001)
- STEINLECHNER, S.: Endokrine Mechanismen bei der jahreszeitlichen Klimaanpassung. In: PESCHKE, E. (Ed.): *Endokrinologie IV. Abhandlungen der Sächsischen Akademie der Wissenschaften zu Leipzig. Mathematisch-naturwissenschaftliche Klasse Bd. 65/3*, S. 99–112. Stuttgart, Leipzig: Hirzel Verlag 2009
- STEINLECHNER, S., BUCHBERGER, A., and HELDMAIER, G.: Circadian rhythms of pineal N-acetyltransferase activity in the Djungarian hamster, *Phodopus sungorus*, in response to seasonal changes in natural photoperiod. *J. Comp. Physiol. A* 160, 593–597 (1987)
- STEINLECHNER, S., HELDMAIER, G., and BECKER, H.: The seasonal cycle of body weight in the Djungarian hamster: photoperiodic control and influence of starvation and melatonin. *Oecologia (Berl.)* 60, 401–405 (1983)
- STEINLECHNER, S., HELDMAIER, G., WEBER, C., and RUF, T.: Role of photoperiod: pineal gland interaction in torpor control. In: HELLER, H. C., MUSACCHIA, X. J., and WANG L. C. H. (Eds.): *Living in the Cold. Physiological and Biochemical Adaptations*; pp. 301–307. New York: Elsevier 1986
- STEINLECHNER, S., JACOBMEIER, B., SCHERBARTH, F., DERNBACH, H., KRUSE, F., and ALBRECHT, U.: Robust circadian rhythmicity of Per1 and Per2 mutant mice in constant light, and dynamics of Per1 and Per2 gene expression under long and short photoperiods. *J. Biol. Rhythm* 17, 202–209 (2002)
- STEINLECHNER, S., and NIKLOWITZ, P.: Impact of photoperiod and melatonin on reproduction in small mammals. *Animal Reprod. Sci.* 30, 1–28 (1992)
- STETSON, M. H., WATSON-WHITMYRE, M., and MATT, K. S.: Termination of photorefractoriness in golden hamsters: Photoperiodic requirements. *J. Exp. Zool.* 202, 81–88 (1977)
- SUMOVÁ, A., TRÁVNÍKOVÁ, Z., PETERS, R., SCHWARTZ, W. J., and ILLNEROVÁ, H.: The rat suprachiasmatic nucleus is a clock for all seasons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 7754–7758 (1995)
- THOMSON, A. L.: Factors determining the breeding seasons of birds: an introductory review. *Ibis* 92, 173–184 (1950)
- WAGNER, G. C., JOHNSTON, J. D., TOURNIER, B. B., EBLING, F. J., and HAZLERIGG, D. G.: Melatonin induces gene-specific effects on rhythmic mRNA expression in the pars tuberalis of the Siberian hamster (*Phodopus sungorus*). *Eur. J. Neuroscience* 25, 485–490 (2007)
- WATANABE, M., YASUO, S., WATANABE, T., YAMAMURA, T., NAKAO, N., EBIHARA, S., and YOSHIMURA, T.: Photoperiodic regulation of Type 2 deiodinase gene in Djungarian hamster: Possible homologies between avian and mammalian photoperiodic regulation of reproduction. *Endocrinology* 145, 1546–1549 (2004)
- WATANABE, T., YAMAMURA, T., WATANABE, M., YASUO, S., NAKAO, N., DAWSON, A., EBIHARA, S., and YOSHIMURA, T.: Hypothalamic expression of thyroid hormone-activating and -inactivating enzyme genes in relation to photorefractoriness in birds and mammals. *Amer. J. Physiol.* 292, R568–R572 (2007)
- WEAVER, D. R., LIU, C., and REPERT, S. M.: Nature's knockout: the Mel<sub>1b</sub> receptor is not necessary for reproductive and circadian responses to melatonin in Siberian hamsters. *Mol. Endocrinol.* 10, 1478–1487 (1996)

- WEAVER, D. R., RIVKEES, S. A., and REPPERT, S. M.: Localisation and characterisation of melatonin receptors in rodent brain by in vitro autoradiography. *J. Neuroscience* 9, 2581–2590 (1989)
- WEHR, T. A.: The durations of human melatonin and sleep respond to changes in daylength (photoperiod). *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 73, 1276–1280 (1991)
- WEHR, T. A.: Photoperiodism in humans and other primates: Evidence and implications. *J. Biol. Rhythms* 16, 348–364 (2001)
- WEHR, T. A., MOUL, D. E., GIESEN, H. A., SEIDEL, J. A., BARKER, C., and BENDER, C.: Conservation of photoperiod-responsive mechanisms in humans. *Amer. J. Physiol.* 265, R846–R857 (1993)
- WELSH, D. K., LOGOTHETIS, D. E., MEISTER, M., and REPPERT, S. M.: Individual neurons dissociated from rat suprachiasmatic nucleus express independently phased circadian firing rhythms. *Neuron* 14, 697–706 (1995)
- WIKELSKI, M., MARTIN, L. B., SCHEUERLEIN, A., ROBINSON, M. T., ROBINSON, N. D., HELM, B., HAU, M., and GWINNER, E.: Avian circannual clocks: adaptive significance and possible involvement of energy turnover in their proximate control. *Phil. Trans. R. Soc. B* 363, 411–423 (2008)
- WINGFIELD, J. C.: Organization of vertebrate annual cycles: implications for control mechanisms. *Phil. Trans. R. Soc. B* 363, 425–441 (2008)
- WITKOWSKI, W., BOCKMANN, J., KREUTZ, M. R., and BÖCKERS, T. M.: Cell and molecular biology of the oars tuberalis of the pituitary. *Int. Rev. Cytol.* 185, 157–194 (1999)
- WOODFILL, C. J., ROBINSON, J. E., MALPAUX, B., and KARSCH, F. J.: Synchronization of the circannual reproductive rhythm of the ewe by discrete photoperiodic signals. *Biol. Reprod.* 45, 110–121 (1991)
- WOODFILL, C. J., WAYNE, N. L., MOENTER, S. M., and KARSCH, F. J.: Photoperiodic synchronization of a circannual reproductive rhythm in sheep: identification of season-specific time cues. *Biol. Reprod.* 50, 965–976 (1994)
- ZUCKER, I.: Pineal gland influences period of circannual rhythms of ground squirrels. *Amer. J. Physiol.* 249, R111–R115 (1985)
- ZUCKER, I.: Circannual rhythms. In: TAKAHASHI, J. S., TUREK, F. W., and MOORE, R. Y. (Eds.): *Handbook of Behavioral Neurobiology*. Vol. 12: *Circadian Clocks*; pp. 509–527, New-York: Kluwer Academic/Plenum 2001
- ZUCKER, I., BOSHES, M., and DARK, J.: Suprachiasmatic nuclei influence circannual and circadian rhythms of ground squirrels. *Amer. J. Physiol.* 244, R472–R480 (1983)
- ZUCKER, I., LEE, T. M., and DARK, J.: The suprachiasmatic nucleus and annual rhythms of mammals. In: KLEIN, D. C., MOORE, R. Y., and REPPERT, S. M. (Eds.): *The Suprachiasmatic Nucleus: The Mind's Clock*; pp. 246–259. New York: Oxford University Press 1991

Prof. Dr. Stephan STEINLECHNER  
Institut für Zoologie  
Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover  
Bünteweg 17  
30559 Hannover  
Bundesrepublik Deutschland  
Tel.: +49 511 9538450  
Fax: +49 511 9538586  
E-Mail: stephan.steinlechner@tiho-hannover.de

## **Computermodelle in der Wissenschaft – zwischen Analyse, Vorhersage und Suggestion**

Vorträge anlässlich der Jahresversammlung vom 2. bis 4. Oktober 2009  
zu Halle (Saale)

Nova Acta Leopoldina N. F., Bd. *110*, Nr. 377

Herausgegeben von Thomas LENGAUER (Saarbrücken)

(2011, 352 Seiten, 152 Abbildungen, 4 Tabellen, DVD, 34,95 Euro,

ISBN: 978-3-8047-2802-8)

Nicht nur die Technik- und Naturwissenschaften, sondern auch die Lebens-, die Sozial- und Kognitionswissenschaften, sogar Kunst und Archäologie sind immer stärker durch eine Informatisierung gekennzeichnet, die einige Disziplinen sogar revolutioniert. Standen früher Wissenschaften auf den fundamentalen Säulen Theoriebildung und Experiment, so hat sich in den letzten Jahrzehnten eine dritte gleichberechtigte Komponente herausgebildet – die der digitalen Modellierung, Simulation und Visualisierung von Strukturen und Prozessen. Der Band behandelt mathematische Grundlagen der Computertechnik, Möglichkeiten und Grenzen der Computermodellierung in den Lebenswissenschaften (Biochemie, Proteomanalyse, Systembiologie) und der Medizin (Tumorchirurgie, Hirnforschung, Rehabilitation), Computer als Dialogpartner (Spracherkennung, Schnittstelle zwischen Gehirn und Maschine), Klimamodelle, Computermodellierungen in Physik und Chemie, aber auch Probleme aus Philosophie (Simulation und Erkenntnis, Implikationen der Hirnforschung) und Ökonomie (Konsequenzen der Alterung der Gesellschaft). Die Beiträge bieten sowohl Laien als auch Experten überraschende Einblicke in eine faszinierende Forschungswelt.

## **Einfluss von Melatonin auf Sekretionsrhythmik und Signaltransduktionsprozesse der pankreatischen $\beta$ -Zelle**

### **Melatonin-Insulin-Interaktionen**

Elmar PESCHKE ML (Halle/Saale) und Eckhard MÜHLBAUER (Leipzig)

1 Abbildung

#### *Zusammenfassung*

Melatonin-Applikation senkt im *In-vivo*- und *In-vitro*-Experiment die Insulinsekretion pankreatischer  $\beta$ -Zellen. Die Effekte werden Melatoninrezeptor-mediiert, die pankreatische  $\beta$ -Zelle verfügt über MT1- und MT2-Rezeptoren. Die hochspezifischen Effekte werden über Pertussis toxin-sensitive inhibitorische Gi-Proteine mit konsekutiver Hemmung des Adenylatecyclase/cyclisches Adenosinmonophosphat- (AC/cAMP) sowie Guanylatecyclase/cyclisches Guanosinmonophosphat-System (GC/cGMP) und der Insulinfreisetzung vermittelt. Hingegen wird über den Gq/Phospholipase C/Inositol-1,4,5-triphosphat-Weg Kalzium aus intrazellulären Quellen mobilisiert und die Insulinsekretion erhöht. Dieser (untergeordnete) Weg erlangt erst Bedeutung, wenn Gi-Proteine durch Pertussis toxin blockiert werden. Es konnte ferner gesichert werden, dass sowohl *in vivo* als auch *in vitro* die Insulinsekretion circadian-rhythmisch erfolgt und dass Melatoninapplikation zu einem Phasenshift führt. Mit hoher Wahrscheinlichkeit sind Uhrengene mit ihrer circadianen Expression in pankreatischem Gewebe für die circadian-rhythmische Insulinsekretion verantwortlich. Darüber hinaus wurde der Einfluss von Melatonin auf metabolische Entgleisungen untersucht, die zuvor im Tierexperiment durch das klassische Diabetogen Streptozotocin (STZ) hervorgerufen worden waren. Die Gefährlichkeit des STZ beruht auf der Generierung von reaktiven Sauerstoffradikalen (ROS), wie beispielsweise Methylradikalen. Gegen solche aggressiven ROS ist die pankreatische  $\beta$ -Zelle auf Grund begrenzter antioxidativer Kapazität relativ schutzlos. Zahlreiche Untersuchungen belegen nun, dass Melatonin in supraphysiologischen Dosen von protektiver, antidiabetogener Bedeutung für  $\beta$ -Zellen ist. Melatonin als auch die Expression des limitierenden Enzyms für die Melatoninsynthese, die Arylalkylamin-N-acetyltransferase (AA-NAT), sind bei Typ-2-diabetischen Ratten (bei leicht erhöhtem Insulin-Plasmaspiegel) erniedrigt. Vergleichbar weisen Typ-2-diabetische Patienten erniedrigte Melatoninspiegel auf. In Umkehrung sind der Melatonin Gehalt im Blutplasma und die Expression der AA-NAT bei Typ-1-diabetischen STZ- und LEW.1AR1-*iddm*-Ratten (bei nahezu fehlendem Insulin) erhöht. Interessanterweise werden die erhöhten Melatoninspiegel der IDDM-Ratten nach Insulinsubstitution wieder normalisiert, was den engen funktionellen Zusammenhang zwischen Insulin und Melatonin unterstreicht. Die vorgestellten Befunde belegen, dass sich Melatonin und Insulin antagonisieren, was die Bedeutung von Melatonin für die Diabetogenese unterstreicht. Diese Feststellung wird gestützt durch Ergebnisse weltweiter Genomstudien, in denen ein enger Zusammenhang zwischen *Single Nucleotide Polymorphisms* (SNPs) des MT2-Rezeptor-Locus (*MTNR1b*) und einem erhöhten Risiko, an Typ-2-Diabetes zu erkranken, nachgewiesen wurde. Zusätzlich wurde jüngst bei Glukagon-produzierenden  $\alpha$ -Zellen der pankreatischen Maus-Insel erstmals festgestellt, dass diese ebenfalls Melatonin-Rezeptoren (MT1 + MT2) aufweisen. Während erwartungsgemäß Glukose oder Insulin die Glukagonexpression senkten, wurde sie durch Melatonin statistisch signifikant erhöht, was bedeutet: Melatonin senkt die Insulin- und erhöht die Glukagonsekretion. Von erheblicher Bedeutung sind ferner Überexpressionsexperimente, die der Frage nachgehen, welcher Melatoninrezeptor-Subtyp welcher Funktionskaskade vergesellschaftet ist. Bisherige Ergebnisse machen deutlich, dass die Insulinsekretion durch Melatonin in Zellklonen mit konstitutiv hochregulierten humanen MT2-Rezeptoren die Insulinsekretion weit stärker senkt als in entsprechenden Vergleichszellen. Es ist davon auszugehen, dass die vorgestellten Befunde klinische Bedeutung erlangen.



## Abstract

Application of melatonin inhibits the insulin secretion of pancreatic  $\beta$ -cells *in vivo* and *in vitro*. These effects are melatonin receptor mediated, with the pancreatic  $\beta$ -cell displaying two isoforms, MT1 and MT2. The highly specific effects are mediated *via* pertussis toxin-sensitive inhibitory Gi-proteins, which are linked in an inhibitory manner to both the adenylate cyclase/cyclic adenosine monophosphate (AC/cAMP) and guanylate cyclase/cyclic guanosine monophosphate (GC/cGMP) pathways, and to insulin secretion. On the other hand, insulin secretion is enhanced *via* activation of the Gq/phospholipase C/inositol-1,4,5-triphosphate pathway. This (minor) pathway is of importance only after Gi proteins are blocked by pertussis toxin. Furthermore, it was confirmed *in vivo* and *in vitro* that insulin secretion proceeds in a circadian fashion and that melatonin application phase shifts this pattern. Circadian clock gene activity is likely responsible for the circadian rhythmicity of insulin secretion in pancreatic tissue. In addition, the influence of melatonin on metabolic disturbances was analysed in experiments with animals that had been rendered type 1 diabetic by treatment with the "classical" diabetogen streptozotocin (STZ). The damaging effect of STZ is caused by the generation of reactive oxygen species (ROS), for example, methyl radicals. The limited anti-oxidative capacity of pancreatic  $\beta$ -cells towards aggressive types of ROS makes them vulnerable to cell damage. Numerous studies confirm that melatonin, in supraphysiological doses, is of protective, anti-diabetogenic importance for the  $\beta$ -cell. Melatonin, as well as the expression of the limiting enzyme of melatonin biosynthesis, arylalkylamine-N-acetyltransferase (AA-NAT), are decreased in type 2 diabetic rats (together with slightly increased insulin plasma levels). In a similar manner type 2 diabetic patients display decreased melatonin levels. In contrast, melatonin plasma levels and the expression of AA-NAT are increased in type 1 diabetic STZ- and LEW.1AR1-*iddm* rats (together with negligible insulin levels). Interestingly, these increased melatonin levels in IDDM rats could be normalized by insulin substitution, underscoring a close functional relationship between insulin and melatonin. The results presented here prove that melatonin and insulin are antagonistic, indicating an importance of melatonin in diabetogenesis. This notion is supported by the results of world-wide genome studies that have shown a close relationship between the *single nucleotide polymorphisms* (SNPs) of the MT2 receptor locus (*MTNR1b*) and an increased risk of type 2 diabetes. In addition, it has recently been confirmed that glucagon-producing  $\alpha$ -cells express melatonin receptors (MT1 and MT2). Although both glucose and insulin reduced glucagon expression, as expected, the application of melatonin surprisingly increased glucagon expression in a significant manner. Thus, melatonin inhibits insulin secretion and promotes glucagon secretion. Furthermore, experiments in which melatonin receptors were overexpressed provide valuable information towards clarifying the question as to which receptor isoform is linked to which signal transduction cascade. The results confirm that the melatonin-modulated insulin secretion in cells with a constitutively high expression of the human MT2 receptor is much more strongly inhibited than in control cells. It is to be expected that the results presented here will also prove to be of clinical importance.

## 1. Rückblick

Erste systematische Untersuchungen zur Bedeutung des Pinealorgans für den Kohlenhydratstoffwechsel gehen auf Untersuchungen der rumänischen Gruppe um C. I. PARHON zurück (PARHON 1939, PARHON et al. 1952, MILCU und MILCU 1958, MILCOU et al. 1963b, MILCOU et al. 1966, MILCU et al. 1971, MILCU und NANU 1979). Zusammenfassende Übersichten dazu erschienen in der Rumänischen Akademie der Wissenschaften 1957 „The epiphysis, an endocrine gland“ (MILCU 1957) und 1979 „The pineal gland as a metabolic organ“ (MILCU und NANU 1979) zitiert nach DAMIAN (1989). Mit diesen Arbeiten wurde vergleichsweise früh eine bis in unsere Zeit reichende kontrovers geführte Diskussion zur Bedeutung der Epiphysis cerebri für den Glukosestoffwechsel entfacht. Die Ursachen für die divergenten frühen Ergebnisse beruhen u. a. auf der Nutzung von Epiphysenextrakten (MILCU et al. 1963a), Melatonin wurde bekanntlich erst 1958 von Aaron LERNER und Mitarbeitern aus Rinderepiphysen isoliert (LERNER et al. 1958) und seine Struktur ein Jahr später aufgeklärt (LERNER et al. 1959).

Nachfolgend soll versucht werden, den mühevollen und von Widersprüchen gekennzeichneten Weg der vergangenen Jahrzehnte zur Bedeutung der Epiphyse für den Kohlenhydrat-

stoffwechsel kurz zu skizzieren. Dabei wird das Ziel verfolgt, den Einfluss der Epiphysis cerebri und damit des Melatonins auf die pankreatische Insel, die Insulinsekretion und den Glukosestoffwechsel zu beleuchten, bis hin zur möglichen Bedeutung von Melatonin für die Diabetesprävention. Von besonderer Bedeutung waren in diesem Zusammenhang zweifellos die oben erwähnten frühen Untersuchungen der rumänischen Gruppe, die in zahlreichen Arbeiten zur Frage pinealer Einflüsse auf die pankreatische  $\beta$ -Zelle, die Insulinsekretion sowie den Glukosestoffwechsel Stellung bezog. Die Ergebnisse lassen sich folgendermaßen zusammenfassen. Ein aus Rinderzirbeldrüsen gewonnenes pineales Peptid, das die Autoren „Pinealin“ nannten, wurde von ihnen als Insulin-ähnlich, hypoglykämisierend, anabol, anticholesterinämisch und glomerulotrop charakterisiert (MILCU und MILCU 1958). Das „Pinealin“ erhöhte die Glukosetoleranz und begünstigte die muskuläre und hepatische Glykogenese nach Glukosebelastung. Pinealektomie hingegen erniedrigte die Insulinsekretion, die Glukosetoleranz sowie die muskuläre und hepatische Glykogenese und erhöhte die Pyruvatkonzentration des Blutes (MILCOU et al. 1957a, b, MILCU et al. 1961, 1962, MILCOU et al. 1963a, b, MILCU et al. 1964a, b, 1965, 1967, MILCU 1968, NANU-IONESCU und IONESCU 1969a, NANU et al. 1969).

Spätere eigene (PESCHKE et al. 1986) und Arbeiten der spanischen Gruppe um Enrique BLÁZQUEZ (DIAZ und BLAZQUEZ 1986, MELLADO et al. 1986, 1989, RODRIGUEZ et al. 1989) knüpfen an die ursprünglichen Befunde an. Beschrieben wird eine pinealoprive Hyperglykämie in Einheit mit weiteren „paradiabetischen“ metabolischen Störungen bei pinealektomierten Tieren. Durch Pinealektomie oder bilaterale sympathische Denervation der Epiphyse, was einer funktionellen Pinealektomie entspricht (MUNOZ BARRAGÁN et al. 1983, 1984, 1986), wurden signifikant verringerte Insulinspiegel, erhöhte Blutglukose (DE LIMA et al. 2001) sowie begleitende Glukosetoleranzstörungen beobachtet, die durch Melatoninapplikation verhindert oder zumindest stark eingeschränkt werden konnten (SHIMA et al. 1997). In diesem Zusammenhang sind Mitteilungen bedeutungsvoll, dass Melatonin die Entwicklung des Typ-1-Diabetes hemmt, während Pinealektomie sie befördert (CONTI und MAESTRONI 1996, 1998), und dass Insulin den Plasma-Melatoninspiegel (LYNCH et al. 1973) und den pinealen Melatonin Gehalt (TANNENBAUM et al. 1987) erhöht.

Durch die zitierten Arbeiten wurden ältere oder auch zeitgleich erhobene Befunde in Frage gestellt, die feststellen, dass die Verabreichung von Zirbeldrüsenextrakten von Hyperglykämie gefolgt sei (JORDAN und EYSTER 1911, POPESCU-İNOTESTI 1924, BUTTARO und ROTTINI 1947). Erklärungsansätze bieten ambivalente Ergebnisse der rumänischen Arbeitsgruppe selbst, indem schon früh die später wichtig werdende Feststellung getroffen wird, dass Pinealektomie bei Ratten nach 48-stündigem Fasten die Insulinsekretion zwar senkt, die Glukose-stimulierte Insulinsekretion jedoch erhöht (MILCU et al. 1971). Pineale Hormonfraktionen sollen zunächst zu einer deutlichen Zunahme, konsekutiv jedoch zu einer Abnahme der Insulinsekretion führen (NEACSU 1988). In weiteren Arbeiten mit ähnlich wichtigen Befunden wird die Auffassung vertreten, dass Melatonin die Glukose-induzierte Freisetzung von Insulin bei Ratte und Maus reduziere (ATKINS et al. 1973), nicht jedoch die basale Insulinsekretion, und dass Melatonin-Dauerinfusionen einen äußerst geringen Insulin-senkenden Effekt und keinen Einfluss auf die Blutglukose haben (BAILEY et al. 1974). Zusätzlich wird festgestellt, dass durch Blendung erzielte hohe Melatoninspiegel (BENSON et al. 1971) oder Melatoninapplikation die Blutglukose erhöhen (BURNS 1973, McKEOWN et al. 1975, JOHN et al. 1990, SANDYK 1993, PRAKASH et al. 1998, HOYOS et al. 2000), während Pinealektomie die Blutglukose erniedrigt (CSABA und BARRATH 1971, CSABA und NAGY 1973) und den Insulinspiegel erhöht (NANU-IONESCU und IO-

NESCU 1969b, NANU-IONESCU und MARCEAN 1970, NANU-IONESCU et al. 1970, GORRAY und QUAY 1977, GORRAY et al. 1979, QUAY und GORRAY 1980). Die zitierten Publikationen stehen in Einklang mit der von den Autoren des vorliegenden Beitrages vertretenen Auffassung, dass die Epiphysis cerebri einen suppressiven Effekt auf die Aktivität der pankreatischen  $\beta$ -Zelle ausüben muss, da Melatonin die stimulierte Insulinsekretion im *In-vitro*-Experiment (bei isolierten pankreatischen Inseln und Insulinomazellen INS1) als auch im Tierversuch senkt (PESCHKE et al. 1997, RASMUSSEN et al. 1999, PESCHKE et al. 2000, WOLDEN-HANSON et al. 2000, RASMUSSEN et al. 2001, KEMP et al. 2002, PESCHKE et al. 2002, PICINATO et al. 2002b, PESCHKE et al. 2010), wobei die Effekte von einer Erniedrigung der Glukosetoleranz begleitet sind (DHAR et al. 1983, CAGNACCI et al. 2001).

Auf Grund der aufgeführten Befunde und der Feststellung, dass erhöhte Insulinspiegel die Melatoninausschüttung hemmen (PESCHKE 2008, MULDER et al. 2009) ist heute von einem funktionellen Antagonismus zwischen Melatonin und Insulin auszugehen. Dieser Sachverhalt ist einmal mehr überzeugend vor dem Hintergrund, dass natürlicherweise beim Menschen der Insulinspiegel in der Nacht erniedrigt ist, gerade dann, wenn der Melatoninspiegel erhöht ist, während erhöhte Insulinspiegel am Tag mit erniedrigten Melatoninspiegeln koinzidieren (BODEN et al. 1996).

Wenn auch die oben aufgeführten Arbeiten von Widersprüchlichkeiten insofern gekennzeichnet waren, als dem Melatonin fördernder oder auch hemmender Einfluss auf die Insulinsekretion zuerkannt wurde, war ihnen doch gemeinsam, dass ein funktioneller Zusammenhang zwischen Melatonin, Insulin und Glukose anerkannt wurde. Der Vollständigkeit wegen dürfen jedoch auch Arbeiten nicht verschwiegen werden, in denen jeglicher Einfluss von Melatonin auf die pankreatische  $\beta$ -Zelle und damit auf die Insulinsekretion in Frage gestellt wird. Dazu gehören frühe Arbeiten, in denen keinerlei inhibitorischer Einfluss von Melatonin auf die Glukose-induzierte Insulinsekretion beim Goldhamster festgestellt wurde (FELDMAN und LEBOVITZ 1972). Vergleichsweise konnten weder bei der Maus (FRANKEL und STRANDBERG 1991) noch bei der Ratte (BIZOT-ESPIARD et al. 1998b, NIJIMA et al. 1998) Einflüsse von Melatonin auf die basale oder Glukose-stimulierte Insulinsekretion beobachtet werden.

Ambivalent erscheinen ebenfalls Befunde, die an Vögeln erhoben wurden. Während in einer älteren Arbeit mitgeteilt wurde, dass Melatonin weder in der Photo- noch in der Scotophase die Blutglukose beim Truthahn verändere (JOHN et al. 1983), wurden später an der Taube erhobene Befunde publiziert, die durchaus statistisch signifikante Erhöhungen der Blutglukose nach Melatoninapplikation bestätigten (JOHN et al. 1990). Besondere Beachtung sollte weiterhin Arbeiten geschenkt werden, die abhängig vom Alter der Tiere oder der Photophase zu unterschiedlichen Befunden gelangten. Beispielsweise bewirkte Melatonin bei neugeborenen Tauben Hyperglykämie, während bei adulten Tieren Hypoglykämie festgestellt wurde (MAHATA et al. 1988), und bei Wellensittichen wurde nach Melatoninapplikation unter natürlichen Lichtverhältnissen ebenso wie unter Langtagbedingungen Hyperglykämie, unter Kurztagbedingungen jedoch Hypoglykämie beobachtet (MAITRA et al. 2000a). Aber nicht nur die Länge der Photoperiode, auch unterschiedliche Melatoninmengen oder der Zeitpunkt der Applikation im Tagesgang sollen den Einfluss von Melatonin auf den Glukosestoffwechsel bei Vögeln entscheidend beeinflussen (MAITRA et al. 2000b). Es kann zusammengefasst werden: „Thus, melatonin regulation of glucose homeostasis in birds depends on age and species. The cited findings clearly indicate that melatonin plays a vital role in glucose homeostasis in birds (MAHATA et al. 1988), modulate by norepinephrine and epinephrine (MAHATA 1991). On the other side there's no question that factors other than changes in environmental lighting, which

modify sympathetic nervous tone, can also influence pineal function (LYNCH et al. 1973, LYNCH et al. 1975).“

Trotz aller Diversität zurückliegender Befunde und Ansichten überzeugen aus Sicht der Autoren einige Arbeiten auf Grund ihrer konsequenten experimentellen Versuchsanordnung und Berücksichtigung chronobiologischer Aspekte in dem Sinne, dass Melatonin und Insulin einander offenbar hemmen. Hohe Insulinspiegel wurden bei der Ratte immer dann gefunden, wenn der Melatoninspiegel erniedrigt war (am Tage), und umgekehrt traten niedrige Insulinspiegel, begleitet von hohen Glukosewerten, bei hohen Melatoninspiegeln (in der Nacht) auf (BIZOT-ESPIARD et al. 1998a). Vergleichbare Befunde wurden bei Menschen erhoben, deren Glukosetiter durch Dauerinfusionen konstant gehalten wurden und somit keinen postprandialen Reaktionen unterlagen (BODEN et al. 1996). Damit im Einklang stehen an der Ratte erhobene Befunde, die in überzeugender Weise belegen, dass mit zunehmendem Alter die Melatoninsynthese abnimmt (ein Sachverhalt, der bereits seit Längerem bekannt ist), während Insulin und Leptin zunehmen (RASMUSSEN et al. 1999), und dass durch Melatonin altersbedingte Insulinerhöhungen aufgehalten werden können (RASMUSSEN et al. 2001). Interessant sind Arbeiten (CHAMPNEY et al. 1983, 1985, 1986), in denen festgestellt wird, dass bei diabetischen Hamstern der Melatoninspiegel erniedrigt ist. Hingegen soll Melatonin die Diabetesinzidenz hemmen, während Pinealektomie sie befördert (CONTI und MAESTRONI 1996, 1998). Weitere Untersuchungen bestätigen ebenfalls, dass Melatonin den Glukosemetabolismus und die Insulinsekretion der pankreatischen  $\beta$ -Zelle beeinflusst, jedoch gelang es nicht, die Folgen einer Pinealektomie (nächtliche Erhöhung der Glukosekonzentration im Plasma) durch Melatoningaben aufzuheben (LA FLEUR et al. 2001).

## **2. Jüngere Befunde zum Einfluss von Melatonin auf die pankreatische $\beta$ -Zelle**

Im Jahre 1997 wurden erstmals Daten publiziert, die unter Nutzung eines äußerst effizienten dynamischen Perfusionssystems (CSERNUS et al. 1998) den Einfluss von Indolaminen auf die Insulinsekretion isolierter pankreatischer Inseln der Ratte gewonnen wurden. Es konnte nachgewiesen werden, dass Melatonin die Glukose-, KCl- und Forskolin-stimulierte Insulinsekretion isolierter pankreatischer Inseln neonater Ratten hemmt, während das nahe verwandte und chemisch ähnliche Serotonin (5-Hydroxytryptamin) hingegen die Glukose- und KCl-stimulierte Insulinsekretion erhöht (PESCHKE et al. 1997). Die Aussagen stützen sich auf Untersuchungen, in denen die genannten Stimulantien entweder kurzzeitig-repetitiv oder aber alternativ als Langzeitapplikation im Perifusionssystem getestet wurden. Die Überlegenheit der Perifusionsapparatur beruht unter anderem auf der Möglichkeit, die Sekretionskinetik Insulin-produzierender  $\beta$ -Zellen zu erfassen und zusätzlich systemspezifische Qualitätssicherungen wie beispielsweise Vitalitäts-, Synthese-, Freisetzungs- und Kapazitätskriterien versuchsbegleitend zu erfassen. Im Ergebnis kurzzeitig-repetitiver Stimulationen wurden die Glukose-stimulierte Insulinsekretion in pharmakologischen Dosen von  $5 \mu\text{mol/l}$  Melatonin um 42 % und die KCl-stimulierte um 22 % gesenkt, während  $5 \mu\text{mol/l}$  Serotonin die Glukose-stimulierte Insulinsekretion um 46 % und die KCl-stimulierte Insulinsekretion um 52 % erhöhte. Geringere Effekte unter Einfluss von nahezu physiologischen Konzentrationen von  $5 \text{nmol/l}$  Melatonin belegten den konzentrationsabhängigen Indolamineinfluss auf das Inselorgan. Besonders deutlich war die Dosis-abhängige Senkung der Forskolin-stimulierten Insulinsekretion, was bedeutet, dass Melatonin mit hoher Wahrscheinlichkeit einen

hemmenden Einfluss über das Adenylatcyclase/cAMP-System entfaltet (PESCHKE et al. 2000, 2002).

Die aufgeführten Ergebnisse wurden an isolierten Inseln erhoben und erlaubten deshalb keine Aussagen darüber, ob die Effekte auf einem direkten oder aber indirekt-mittelbaren Melatonineinfluss beruhen. Aus diesem Grunde wurde nach einer Zelllinie gesucht, an der direkte Melatonineinflüsse auf die  $\beta$ -Zelle untersucht werden konnten. Mit der immortalisierten, Insulin-produzierenden, Glukose-responsiven Ratten-Insulinomazelle INS1 war ein Modell gefunden, an dem sich alle an der Insel erhobenen und oben beschriebenen Befunde reproduzieren ließen. Damit konnte erstmals von einem direkten unmittelbaren Einfluss von Melatonin auf die  $\beta$ -Zelle ausgegangen werden. Diese Feststellung ist insbesondere hinsichtlich der im Folgenden darzustellenden Rezeptoranalysen und Signaltransduktionsuntersuchungen von besonderer Bedeutung.

### **3. Untersuchungen zur circadian-rhythmischen Insulinsekretion sowie zum synchronisierenden Melatonin-Einfluss im *In-vitro*-Experiment**

Im Einleitungsteil des Symposiumsbandes war bezugnehmend und in Vorbereitung auf diesen Teil der vorliegenden Darstellung auf die Generierung biologischer Rhythmen im Tierreich eingegangen und herausgestellt worden, dass bei den Säugetieren biologische Rhythmen in einem hypothalamischen Kerngebiet, dem Nucleus suprachiasmaticus, generiert werden, während bei den Vögeln das Pinealorgan als Rhythmusgenerator gilt. Diese im biologischen Organismus selbst generierten Rhythmen, die in aller Regel vom 24-h-Tag abweichen und deshalb „circa“-diane Rhythmen genannt werden, werden durch externe (geophysikalische) Zeitgeber, insbesondere durch das Licht, das als stärkster Zeitgeber überhaupt gilt, synchronisiert. Als circadian gelten Rhythmen mit Periodenlängen zwischen 20 und 28 h, ultradiane Rhythmen weisen Periodenlängen kürzer als 20 h, infradiane Rhythmen Periodenlängen länger als 28 h auf. Darüber hinaus konnten an verschiedenen Geweben von Evertebraten und Vertebraten circadiane Rhythmen im *In-vitro*-System nachgewiesen werden (BÜNNING 1958, RENSING 1970, KADLE und FOLK 1983, EDMUNDS 1988). Obwohl die Insel auf Grund ihrer neuroinsulären Komplexe über eine gewisse Autonomie verfügt und in den Ganglien der Inseln Integrations- bzw. Koordinationszentren gesehen werden (STAGNER et al. 1980, STAGNER und SAMOLS 1985), sind systematische Untersuchungen im *In-vitro*-Experiment zur Generierung circadianer Rhythmen in der pankreatischen Insel und zum Einfluss von Melatonin erst vor 15 Jahren begonnen und 1998 publiziert worden (PESCHKE und PESCHKE 1998). Es galt festzustellen, ob in isolierten pankreatischen Inseln, neben den bekannten hochfrequenten Pulsationen mit Periodenlängen im Sekunden- oder Minutenbereich (WEIGLE 1987, HELLMAN et al. 1994, CUNNINGHAM et al. 1996), auch circadiane Rhythmen der Insulinsekretion generiert werden können und ob möglicherweise Melatonin als hormoneller Zeitgeber synchronisierenden Einfluss auf die pankreatische Insel unter *In-vitro*-Bedingungen nehmen kann.

Durch die Etablierung der bereits beschriebenen Perifusionstechnik waren die Untersuchungen möglich geworden, weil mit dieser *In-vitro*-Technik Beobachtungszeiträume von bis zu 7 Tagen erfasst werden konnten, ohne dass die Inseln messbare Schäden erkennen ließen. Insgesamt wurde der Insulingehalt halbstündig gewonnener Proben von 10 Experimenten radioimmunologisch bestimmt. Mit statistischen Tests wurden die Periodenlänge ( $\tau$ ) mit dem

MacAnova-Programm und die Testung auf Signifikanz mit dem  $\chi^2$ -Periodogramm vorgenommen. Im Ergebnis konnte festgestellt werden, dass circadiane Rhythmen mit Periodenlängen ( $\tau$ ) zwischen 21,8 und 26,2 h auftraten (Mittelwert und Standardabweichung des Mittelwertes:  $23,59 \pm 0,503$  h), wobei der Mittelwert der Insulinfreisetzung  $1038 \pm 13$  pmol/l und der Mittelwert der Amplitude  $88 \pm 17$  pmol/l betragen. Insgesamt konnte bei 7 von 10 Experimenten statistische Signifikanz tagesperiodischer Insulinoszillationen ermittelt werden. Auf Grund der biomathematischen Evaluierung mittels des MacAnova-Programms konnten zusätzlich infra- und ultradiane Oszillationen festgestellt werden, deren Kraftspektren jedoch im Vergleich zu den circadianen Mustern generell geringer waren und hier nicht weiter berücksichtigt werden sollen (Details siehe PESCHKE und PESCHKE im vorliegenden Band S. 253–256).

Nachdem die statistisch signifikante circadian-rhythmische Insulinsekretion pankreatischer Ratten-Inseln *in vitro* als gesichert angesehen werden konnte, war von besonderem Interesse, ob die rhythmische Insulinfreisetzung als konservierte Rhythmik des Spenderorganismus zu verstehen war oder ob die circadian-periodische Insulinsekretion in den isolierten Inseln selbst generiert wird. Um der Beantwortung dieser Frage näher zu kommen, wurden *Phase-response*-Kurven mit Melatonin als hormonellem Zeitgeber erstellt. Würde Melatonin (in unserem Falle in einer Konzentration von 10 nmol/l für 2 h dem Medium zugefügt) zu einer Phasenverschiebung unter Erhalt der Periodenlänge führen, wäre mit hoher Wahrscheinlichkeit belegt, dass die beschriebenen Rhythmen in der Insel selbst generiert werden. Bisher wurden 2 dieser äußerst aufwendigen und kostspieligen Untersuchungen mit dem Ergebnis durchgeführt, dass nach Melatoninapplikation die Periodenlänge beibehalten, die Phase jedoch um 9 h vorverlagert wurde. Dieser Phasenshift berechtigt, davon auszugehen, dass die Insulinsekretion einer circadianen Rhythmik unterliegt, die in der Insel selbst generiert wird. Dieser Befund, der erstmalig unter *In-vitro*-Bedingungen erhoben wurde, ist weiterhin ein Beleg dafür, dass die pankreatische  $\beta$ -Zelle unter dem Einfluss von Melatonin steht (PESCHKE und PESCHKE 1998).

#### **4. Melatoninrezeptor-Ausstattung der pankreatischen $\beta$ -Zelle**

Die Charakterisierung und Klonierung der Melatoninrezeptoren erfolgte durch REPERT und Mitarbeiter (REPERT et al. 1994, 1995, 1996). Durch eigene Untersuchungen (PESCHKE et al. 2000, 2002, PESCHKE 2008) und Bestätigung durch andere Autoren (KEMP et al. 2002, PICINATO et al. 2008) konnte nachgewiesen werden, dass die pankreatische  $\beta$ -Zelle membranständige Melatonin-Rezeptoren vom Typ MT1 aufweist und dass die beschriebene Senkung der Insulinsekretion (PICINATO et al. 2002b) auf einer Bindung von Melatonin an diese membranständigen MT1-Rezeptoren, mediiert über hochaffine Pertussistoxin-sensitive inhibitorische GTP-bindende(Gi)-Proteine, beruht. Anhaltspunkte für die Existenz von MT2-Rezeptoren auf der  $\beta$ -Zelle konnten erst jüngst erbracht werden (MÜHLBAUER und PESCHKE 2007, PESCHKE et al. 2007, PESCHKE 2008). Diesen Befunden lagen zahlreiche Einzeluntersuchungen zugrunde, vor allem aber ein *Primer*-Design, das sich von zurückliegend favorisierten Vorgehensweisen unterschied. Seitdem sind in verschiedenen Publikationen die eigenen Befunde bestätigt sowie erweitert worden. Ferner wurden Versuche unternommen, Rezeptor-medierte Einflüsse des Melatonins in den Kontext klinischer Betrachtungen zu stellen, bis hin zu Spekulationen, ob Melatonin eine Bedeutung für die Diabetogenese haben könnte.

Folgendes Prozedere diente dem Nachweis von MT2-Rezeptoren auf der  $\beta$ -Zelle. Entscheidend war die *Real-time*-Detektion naszierender DNA im Zuge der Polymerase-Ketten-

reaktion (PCR)-Nutzung unter gleichzeitigem Einbau des sehr stabilen, sensitiven, interkalierenden Fluoreszenzfarbstoffes „Eva Green“, wodurch sich die Sensitivität um ein Vielfaches erhöht. Die Laser-angeregte Fluoreszenzemission wurde durch einen Photomultiplier in Echtzeit aufgezeichnet und quantitativ bestimmt. Unter Verwendung der *Real-time-RT-PCR*-Technik und mit speziell angepassten Primern gelang es nun, MT2-spezifische Transkripte in der pankreatischen Insel sowie der Ratten-Insulinomazelllinie (INS1) nachzuweisen. Die genutzten Basensequenzen für den Primer zum MT1-Nachweis waren:

CAACCTGCAAACCGGAAGCTC vorwärts und GGAAAACCACCAGGGCAAT rückwärts.

Für den Primer zum MT2-Rezeptor-Nachweis wurden folgende Basensequenzen genutzt:

CATCCACTTCCTCCTTCCAA vorwärts und TATGGCGAAAACCACAAACA rückwärts.

Beide Primersets führten zur Amplifizierung von Transkriptanteilen des Exon 2. Im Ergebnis gelang es, sowohl MT1- als auch MT2-mRNA entstammende PCR-Produkte zu amplifizieren. Die Gelelektrophoreseseparation der DNA ergab spezifische Banden: 101 bp für das MT1- und 169 bp für das MT2-Amplikon. Durch Spaltung mit zwei Amplikon-spezifischen Restriktionsenzymen an bekannten Schnittstellen konnte nachfolgend die Spezifität des MT2-PCR-Produktes bestätigt werden. Nach Behandlung mit dem Restriktionsenzym Eco 31I ließen sich im analytischen Agarosegel Fragmente mit den spezifischen Molekülgrößen von 103 bp und 66 bp nachweisen, darüber hinaus auch die erwarteten Fragmentgrößen nach Behandlung mit einem weiteren Restriktionsenzym BfiI (108 bp und 61 bp). Die quantitative Auswertung der PCR-Experimente zeigte allerdings, dass die Expression des MT2-Rezeptors sehr viel geringer war, als die des MT1-Rezeptors. Diesem Umstand ist möglicherweise geschuldet, dass ältere Untersuchungen mit konventioneller PCR-Technik zu keinem Ergebnis geführt hatten (MÜHLBAUER und PESCHKE 2007).

Nachdem in Pankreasgewebe, isolierten pankreatischen Inseln und Ratten-Insulinomazellen INS1 der Nachweis des MT2-Rezeptors gelungen war, stellte sich die wichtige Frage der Übertragbarkeit des Ergebnisses auf humanes Material. Im Ergebnis weiterführender Analysen konnte mittels *Real-time-RT-PCR* sowie immunhistochemischer Untersuchungen zweifelsfrei der Nachweis des MT2-Rezeptors auch in menschlichem Pankreasgewebe (Operationsmaterial) erbracht und somit die Übertragbarkeit der Rattenbefunde auf den Menschen belegt werden. Jedoch wird auch beim Menschen die mRNA des MT2-Rezeptors sehr viel schwächer exprimiert. Durch Einbeziehung von Pankreasgewebe Typ-2-diabetischer Patienten gelang es jedoch nachzuweisen, dass die Expressionshöhe sowohl der MT1- als auch MT2-RezeptormRNA bei Diabetikern gegenüber stoffwechselgesunden Patienten stark erhöht ist (PESCHKE und MÜHLBAUER 2007). Bislang noch nicht geklärt ist die Frage, ob sich den unterschiedlichen Melatoninrezeptoren spezielle Funktionszusammenhänge zuordnen lassen wie beispielsweise *Phaseshifting* (PESCHKE und PESCHKE 1998, PICINATO et al. 2002a), das über MT2-Rezeptorsignale vermittelt werden soll (LIU et al. 1997, JIN et al. 2003). Details siehe BÄHR et al. im vorliegenden Band S. 201–205).

In einer Reihe von Publikationen wurden kürzlich die von uns beschriebenen Melatoninrezeptor-Befunde der pankreatischen  $\beta$ -Zelle bestätigt und darüber hinaus ein Zusammenhang zwischen dem Risiko, an Typ-2-Diabetes zu erkranken, und dem Auftreten bestimmter Genvarianten des MT2-Rezeptors (MTNR1b) im Rahmen einer Genom-weiten Assoziationsstudie

unterschiedlicher Populationskohorten erhärtet. Verschiedene Analysen belegten übereinstimmend (LYSSENKO et al. 2009, PROKOPENKO et al. 2009), dass das Auftreten eines bestimmten „single nucleotid polymorphism“ (SNP, rs 10830963), also einer einzigen Basenveränderung gegenüber einer neutralen Sequenz, das Risiko, später an Typ-2-Diabetes zu erkranken, signifikant erhöht. Dieser SNP konnte im Intronbereich des MTNR1b gefunden werden. Ähnlich wie das Gen des MT1-Rezeptors ist auch das des MT2-Rezeptors durch ein großes Intron mit nicht-codierender Sequenz unterbrochen. Der hier diskutierte SNP fällt in den Intronbereich des MTNR1b, berührt also nicht die codierenden, translatierten Abschnitte. Die Interpretation dieses Befundes ist daher bislang offen, zumal kein Überlappen des SNPs mit bekannten Konsensussequenzen für Transkriptionsfaktoren oder Splice-Konsensussequenzen vorliegt (PROKOPENKO et al. 2009). Belegt ist jedoch ein Zusammenhang zwischen dem häufigeren Auftreten dieses SNP mit erhöhtem Nüchternblutglukosespiegel bei den untersuchten Populationen. Außerdem wurden pathologisch veränderte Insulinsekretion (*first-phase insulin response*) im oralen (OGTT) sowie intravenösen Glukosetoleranztest (IVGTT) festgestellt.

In einer weiteren Assoziationsstudie wird ein neuer SNP mit modulatorischer Wirkung auf den Glukosestoffwechsel in einer europäischen Population beschrieben. Dieser SNP (rs 1387153) zeigt ebenfalls einen statistisch signifikanten Zusammenhang mit erhöhten Nüchternblutglukosespiegeln, jedoch in Übereinstimmung mit den vorgenannten Studien keinen wesentlichen Einfluss auf die typischen Risikofaktoren des Typ-2-Diabetes wie Obesitas bzw. erhöhten *Body Mass Index* (BMI). Zudem wird ein kumulativer Effekt dieser MTNR1b-Genvariante zusammen mit bestimmten Varianten der Gene für Glucokinase (GCK), *Glucokinase Regulatory Protein* (GCKR) und das  $\beta$ -Zell-spezifische *Glucose-6-phosphatase-catalytic-subunit-related-protein* (G6PC2) für die Wahrscheinlichkeit der Entstehung eines Typ-2-Diabetes beschrieben. Interessanterweise befindet sich dieser zweite SNP des MTNR1b weit entfernt von dem zuvor beschriebenen, nämlich im 5'-Promotorbereich des Gens, woraus sich ein möglicher Einfluss auf die transkriptionelle Aktivierung ableiten lässt (BOUATIA-NAJI et al. 2009).

Die Arbeit von LYSSENKO et al. (2009) deutet auf eine erhöhte Expression des MT2-Rezeptortranskripts in humanen pankreatischen Inseln des Diabetesrisikotyps hin. Damit steht dieser Befund in Einklang mit erhöhten Expressionswerten des MT2-Rezeptors im humanen Gesamtpankreas bei Typ-2-Diabetikern (PESCHKE et al. 2007). Insgesamt wird davon ausgegangen, dass die hier diskutierten SNPs des MTNR1b-Genlocus als mögliche prognostische Marker für ein erhöhtes Diabetesrisiko genutzt werden könnten. Andere Autoren konnten darüber hinaus nachweisen, dass der von LYSSENKO et al. (2009) und PROKOPENKO et al. (2009) beschriebene SNP rs10830963 in Populationen chinesischer Herkunft (Han) 1,5-fach häufiger vertreten ist als in Populationen kaukasischer Herkunft, verbunden mit entsprechend höherem Erkrankungsrisiko (RONN et al. 2009). Im Übrigen bestätigt die Veröffentlichung von LYSSENKO et al. (2009) die zuvor von uns publizierten Ergebnisse zur Expression des MT2-Rezeptors im humanen Pankreas mittels PCR-Technik und immunhistochemischer Verfahren (MÜHLBAUER und PESCHKE 2007, PESCHKE et al. 2007). Es wird ferner bestätigt, dass die Melatoninrezeptoren – vermittelt über inhibitorische G-Proteine – an die cAMP-Signalkaskade gekoppelt sind. Im Unterschied zu den eigenen Befunden sprechen die von LYSSENKO et al. (2009) aufgeführten Ergebnisse für ein hohes Expressionsniveau des MT2-Rezeptors in humanen Inseln (Verhältnis MT1 : MT2 = 1 : 1), bestätigen jedoch grundsätzlich die Expression sowohl des MT1- als auch des MT2-Rezeptors in der humanen pankreatischen Insel. Der Nachweis des MT1-Rezeptors war zuvor von RAMRACHEYA und Mitarbeitern an humanen  $\beta$ -



Zellen mittels *Single-cell-RT-PCR*-Untersuchungen erbracht worden (RAMRACHEYA et al. 2008), gelang jedoch im Unterschied zu unseren Untersuchungen nicht bei Rodentiern.

Schließlich kann zusammenfassend festgestellt werden, dass LYSSENKO et al. (2009) zu der Überzeugung gelangten, dass die genannten genetischen Zusammenhänge einen therapeutischen Ansatz bieten könnten, durch Einsatz von Melatoninrezeptor-Antagonisten einen Einfluss auf cAMP und konsekutiv die Insulinsekretion zu erlangen. Ob entsprechende Strategien der Diabetestherapie perspektivisch bedeutungsvoll sein werden, bleibt abzuwarten.

## 5. Melatoninrezeptor-vermittelte Signalwege in der pankreatischen $\beta$ -Zelle

### 5.1 Der Gi-Adenylatcyclase-cAMP-Signalweg

Melatonin entfaltet – wie bereits referiert – seine bislang bekannten Rezeptor-medierten Effekte auf dem Weg über Pertussis-toxin-sensitive inhibitorische GTP-bindende Proteine (Gi), die an MT1- und MT2-Membranrezeptoren gekoppelt sind. Die wichtigsten und bekanntesten zellulären Effekte des Melatonins werden über eine Herabregulierung der intrazellulären cAMP-Konzentration vermittelt (VANECEK 1998).

Zurückliegende eigene Untersuchungen haben unter Nutzung von molekularbiologischen, autoradiographischen und funktionellen Untersuchungen sowie Superfusionsexperimenten und Bindungsstudien belegen können, dass die Melatonineffekte an der Insulin-produzierenden  $\beta$ -Zelle ebenfalls über trimere inhibitorische Proteine (Gi), Adenylatcyclase (AC), cAMP und Proteinkinase A (PA) vermittelt werden. Die Ergebnisse wurden an pankreatischen Inseln neonater Ratten (PESCHKE et al. 1997, 2000) sowie an immortalisierten Ratten-Insulinomazellen INS1 (PESCHKE et al. 2002, 2006a, b) gewonnen. Es wurde festgestellt, dass Melatonin auf diesem Weg die Glukose-, KCl- und Forskolin-stimulierte Insulinsekretion senkt, bestätigt und erweitert durch Arbeiten von KEMP et al. (KEMP et al. 2002, PICINATO et al. 2002a, b).

Bedeutungsvoll war in diesem Zusammenhang die Anpassung und Nutzung eines cAMP-RIA an eigene superfusionstechnische Versuchsbedingungen. Es zeigte sich, dass cAMP im Perifusat, also extrazellulär, gemessen werden konnte. Für den aktiven Transport in den extrazellulären Raum werden amphipathische Anionen, sogenannte *Multidrug Resistance Proteins* (MRP) wie MRP4 und MRP5 verantwortlich gemacht (ROSENBERG et al. 1994, BRUNDEGE et al. 1997, FINNEGAN und CAREY 1998, KONDRASHIN et al. 1999, ORLOV und MAKSIMOVA 1999, STEFFGEN et al. 1999). Der Efflux soll energieabhängig und unidirektional erfolgen und durch Substanzen, die die zytoskeletale Mikrotubulus-Assemblierung verhindern, hemmbar sein (RINDLER et al. 1978, BRUNTON und MAYER 1979, BRUNTON und BUSS 1980). Folgende Superfusionsexperimente mit INS1-Zellen sollten weiterhin klären, ob der transmembranöse cAMP-Transporter durch Probenecid hemmbar ist. Publiizierte Ergebnisse machten deutlich (PESCHKE et al. 2002), dass Probenecid die Forskolin-stimulierte, extrazellulär gemessene cAMP-Konzentration durch Blockierung des Exportes von cAMP in den Extrazellulärraum senkt, was zu einer Akkumulation von intrazellulärem cAMP mit konsekutiver Erhöhung der Insulinsekretion führte (FINNEGAN und CAREY 1998, ORLOV und MAKSIMOVA 1999, STEFFGEN et al. 1999, JEDLITSCHKY et al. 2000). Die Befunde belegen, dass cAMP nicht nur für die gut bekannte intrazelluläre Signalvermittlung bedeutungsvoll ist, sondern auch interzellulär Funktionen erfüllt (CHEN et al. 2001). Durch Erweiterung des experimentellen Ansatzes und zusätzlichen Einsatz des

Phosphodiesterase-Hemmers IBMX (3-Isobutyl-1-methylxanthin) wurden erwartungsgemäß sowohl die cAMP- als auch die Insulinkonzentration erhöht (PESCHKE et al. 2002, PESCHKE 2003, 2004). Zusätzlich wurden Ko-Stimulationen von INS1-Zellen mit Clonidin und Forskolin durchgeführt. Clonidin ist ein  $G_{i\alpha}$ -Protein-Stimulator, während Forskolin die Adenylatcyclase stimuliert. Experimentell wurde folgendermaßen vorgegangen: Nach alleiniger Applikation von Forskolin wurden eine Aktivierung der Adenylatcyclase, konsekutive Erhöhung des intrazellulären cAMP-Gehaltes und schließlich erhöhte Insulinsekretion erzielt. Wurde zusätzlich Clonidin appliziert, das das inhibitorische G-Protein  $G_{i\alpha}$  aktiviert, wurden die Forskolin-Effekte gehemmt und der cAMP-Gehalt erniedrigt. Präinkubation der INS1-Zellen mit Pertussistoxin (PTX) hatte zur Folge, dass  $G_{i\alpha}$  blockiert war, Clonidin keine Aktivierung von  $G_{i\alpha}$  auslösen konnte und somit Forskolin zu einer ungehemmten Aktivierung der Adenylatcyclase, der cAMP-Konzentration und konsekutiv zu einer ungehemmten Insulinsekretion führte (PESCHKE et al. 2006b).

## *5.2 Der Gi-Guanylatcyclase-cGMP-Signalweg*

Es ist bekannt, dass Melatonin neben der Modulation der cAMP-Kaskade in verschiedenen Zellen und Geweben auch Einfluss auf den cGMP-Signaltransduktionsweg nimmt. Allerdings wurden zurückliegende Befunde zur Bedeutung von Melatonin auf intrazelluläre cGMP-Konzentrationen kontrovers diskutiert. Zum einen wurde eine cGMP-Erhöhung nach Inkubation mit Melatonin nachgewiesen (LOPEZ-GONZALEZ et al. 1992, FAILLACE et al. 1996), andererseits wurde eine dosisabhängige Verringerung der cGMP-Konzentration nach Applikation von Melatonin beschrieben (VANECEK und VOLLRATH 1989, GILAD et al. 1997, BUBIS und ZISAPEL 1999, PETIT et al. 1999, TAMURA et al. 2006). Dieser Effekt ist spezifisch für den MT2-Rezeptor, über den sowohl die cGMP- als auch cAMP-Signaltransduktionskaskaden gehemmt werden können (PETIT et al. 1999). Untersuchungen zur Wirkung von Melatonin auf weitere Stellglieder der cGMP-Signalkaskade, durchgeführt an unterschiedlichen Geweben und Zellen, unterstreichen den Einfluss des Hormons auf den cGMP-Transduktionsweg: Melatonin moduliert die NO-Konzentration (GITTO et al. 2004, SILVA et al. 2007), senkt die Aktivität der NOS (BETTAHI et al. 1996, POZO et al. 1997, STORR et al. 2002), erhöht die Aktivität der Guanylatcyclase (VESELY 1981, FAILLACE et al. 1996) und inhibiert die Aktivität cGMP-abhängiger Phosphodiesterasen (SATAKE et al. 1991, BUBIS und ZISAPEL 1999). Weiterhin konnte nachgewiesen werden, dass die Aktivität der Guanylatcyclase einem 24-h-Rhythmus mit hohen cGMP-Werten in der Nacht unterliegt, was für eine circadian-rhythmische Regulation der Enzymaktivität spricht (FAILLACE et al. 1996). Zusammenfassend deutet – wenn auch nicht unwidersprochen – die Mehrzahl der Untersuchungen auf einen hemmenden Effekt von Melatonin auf die cGMP-Signalkaskade hin.

Zum Verständnis der durch Melatonin beeinflussten Signaltransduktionsmechanismen in der pankreatischen  $\beta$ -Zelle sind Untersuchungen zur Bedeutung des MT2-Rezeptors sowie zum Einfluss von Melatonin auf die cGMP-Signalkaskade unverzichtbar. Sie tragen entscheidend zur Ergänzung und Erweiterung der Kenntnisse zurückliegender Studien zum MT1-Rezeptor und zur Wirkung von Melatonin auf die cAMP- und IP3-Transduktionswege bei (PESCHKE et al. 2000, 2002, BACH et al. 2005, PESCHKE 2006, PESCHKE et al. 2006a, b, PESCHKE und MÜHLBAUER 2007, PESCHKE 2008).

Mit der Entdeckung und Erstbeschreibung des MT2-Rezeptors in der pankreatischen  $\beta$ -Zelle (MÜHLBAUER und PESCHKE 2007, PESCHKE et al. 2007) erhob sich die Frage, welche physiologische Bedeutung dieser Rezeptortyp für die Vermittlung des Melatoninsignals hat und ob über

den MT2-Rezeptor die cGMP-Signalkaskade in Insulin-produzierenden  $\beta$ -Zellen beeinflusst wird. Zur Klärung dieses Sachverhaltes wurden zellphysiologische und molekularbiologische Untersuchungen an INS1-Zellen und Langerhansschen Inseln der Ratte durchgeführt. Zunächst bestand das Ziel darin herauszufinden, ob der MT2-Rezeptor an der Melatonin-vermittelten Senkung der Insulinfreisetzung pankreatischer  $\beta$ -Zellen beteiligt ist. Die Ergebnisse von Zellinkubationsversuchen bestätigten den bereits bekannten Effekt aus Perfusionsexperimenten: Melatonin senkt die Forskolin-stimulierte Insulinsekretion bei INS1-Zellen signifikant (PESCHKE et al. 2000, 2002). Vorinkubation mit dem unspezifischen Melatoninrezeptor-Antagonisten Luzindol bewirkte eine teilweise Hemmung des Melatonineffektes, wohingegen die Präinkubation mit dem spezifischen MT2-Rezeptor-Antagonisten 4-Phenyl-2-propionamidotetralin (4P-PDOT) die Insulin-senkende Melatoninwirkung nahezu vollständig aufhob (STUMPF et al. 2008, 2009). Daraus kann geschlossen werden, dass die Insulin-senkende Wirkung von Melatonin in pankreatischen  $\beta$ -Zellen nicht, wie bisher angenommen, ausschließlich MT1-Rezeptor-mediert ist, sondern auch über den MT2-Rezeptor vermittelt wird. In Kenntnis, dass Melatonin über den MT2-Rezeptor andernorts neben dem cAMP- auch den cGMP-Signalweg beeinflusst, wurden Untersuchungen zur cGMP-vermittelten Transduktionskaskade in der pankreatischen  $\beta$ -Zelle und zur Wirkung von Melatonin auf diesen Signalweg durchgeführt.

Nach Charakterisierung der cGMP-Signalkaskade in der pankreatischen Insel und INS1-Zelle sowie Experimenten zur funktionellen Bedeutung des MT2-Rezeptors für die Insulinsekretion sollte der Frage nachgegangen werden, ob Melatonin einen Einfluss auf die cGMP-Konzentration der pankreatischen  $\beta$ -Zelle hat. In Folgeversuchen wurden INS1-Zellen zwecks Hemmung des cGMP-Abbaus mit dem unspezifischen Phosphodiesterase-Hemmer IBMX vorbehandelt. Die Inkubation mit Melatonin führte zu einer signifikanten Senkung der IBMX-stimulierten cGMP-Konzentration in Abhängigkeit von Dosis und Inkubationszeit. Zwecks Untersuchung der Melatonin-Rezeptorspezifität wurden der unspezifische Melatoninrezeptor-Antagonist Luzindol sowie der spezifische MT2-Rezeptor-Antagonist 4P-PDOT eingesetzt (DUBOCOVICH et al. 1997, NONNO et al. 1999). Die Vorinkubation sowohl mit Luzindol als auch mit 4P-PDOT hob in eindrucksvoller Weise den cGMP-senkenden Melatonineffekt nahezu vollständig auf. Daraus kann geschlossen werden, dass die cGMP-senkende Wirkung von Melatonin in pankreatischen  $\beta$ -Zellen Rezeptor-vermittelt ist. Luzindol ist ein unspezifischer, kompetitiver Melatoninrezeptor-Antagonist mit einer 15- bis 25-fach höheren Affinität für den MT2-Rezeptor im Vergleich zum MT1-Rezeptor. Hingegen weist 4P-PDOT mit einer 300- bis 22000-fach höheren Affinität zum MT2-Rezeptor eine sehr hohe Selektivität für diesen Rezeptortyp auf (DUBOCOVICH et al. 1997, NONNO et al. 1999). Die Tatsache, dass der Einsatz beider Rezeptorblocker die cGMP-senkende Wirkung von Melatonin fast vollständig aufhebt, stützt die Annahme, dass Melatonin diesen Effekt über den MT2-Rezeptor vermittelt. Bedauerlicherweise ist kein gut etablierter selektiver MT1-Rezeptor-Antagonist verfügbar, um MT1-Rezeptor-spezifische Effekte blockieren zu können.

### 5.3 Der Gq-Phospholipase-C-IP3-Signalweg

Schließlich erhob sich die Frage, ob die Rezeptor-medierte Melatoninwirkungen in der pankreatischen  $\beta$ -Zelle allein auf dem Adenylatcyclase-cAMP- sowie Guanylatcyclase-cGMP-Weg vermittelt werden und sich alle Befunde auf der Grundlage dieser Wege erklären lassen. Schon bald wurde deutlich, dass sich verschiedene Melatonineffekte über die Nutzung des Phospholipase C(PLC)-IP3-Weges erklären ließen und dass dieser Weg eine besondere Be-

deutung haben müsse. Entscheidend war in diesem Zusammenhang die Anpassung eines kommerziell vertriebenen IP3-RIA an das eigene  $\beta$ -Zell-System, die Ratten-Insulinomazelle INS1. Zunächst wurde getestet, welche Isoformen des IP3-Rezeptors in der INS1-Zelle konserviert und nachweisbar sind, anschließend der Einfluss von Carbachol auf die IP3-Freisetzung untersucht. Im Ergebnis konnten durch Einsatz spezifischer Primer die Amplifikationsprodukte für IP3R-1, IP3R-2 und IP3R-3 detektiert und der Nachweis erbracht werden, dass Carbachol die IP3-Freisetzung in der INS1-Zelle erhöht (BACH et al. 2005). Die sich anschließenden Untersuchungen dienten nun der Frage, ob auch Melatonin einen Einfluss auf diesen Signalweg nimmt. Die Ergebnisse waren eindeutig, Melatonin erhöhte dosisabhängig die IP3-Freisetzung und konsekutiv die Insulinsekretion (!). Dieser Befund wurde zusätzlich durch den Einsatz des kompetitiven Melatoninrezeptor-Antagonisten Luzindol (der auch schon in der Nachweiskette zur Melatoninbedeutung für den AC/cAMP- und GC/cGMP-Weg eine wichtige Rolle gespielt hatte) erhärtet. Der IP3-steigernde Einfluss von Melatonin wurde durch Luzindol aufgehoben. Zahlreiche Zusatzuntersuchungen, wie beispielsweise kombinierte Gaben von Melatonin und Carbachol, ließen keinen Zweifel, dass Melatonin den IP3-Gehalt erhöht. (Details siehe MÜHLBAUER et al. im vorliegenden Band S. 235–239.)

Nachdem feststand, dass Melatonin auch einen Insulin-steigernden Einfluss auf die INS1-Zelle hat und dass dieser Effekt über eine Aktivierung des IP3-Systems vermittelt wird, erhob sich die Frage, ob der zytosolische  $\text{Ca}^{2+}$ -Gehalt gesteigert wird, woraus sich eine Erhöhung der Insulinsekretion erklären würde. Zusätzlich musste geklärt werden, ob die mögliche Erhöhung des  $\text{Ca}^{2+}$ -Gehaltes aus intrazellulären Kompartimenten oder aus dem Extrazellulärraum stammt. Die Antwort konnte auf Grund konfokalmikroskopischer Laser-Scanning-Befunde gegeben werden. Nach Melatoninapplikation stieg, ebenso wie nach Carbacholbehandlung, der intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Gehalt an. Dass das  $\text{Ca}^{2+}$  aus intrazellulären Kompartimenten stammen musste, wurde durch Experimente gesichert, in denen die Melatoningabe den INS1-Zellen im  $\text{Ca}^{2+}$ -freien Medium verabreicht wurde. Immer stieg das intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$  an, so dass feststand, dass es nur aus intrazellulären Kompartimenten stammen konnte. Damit schließt sich die Nachweiskette: Melatonin erhöht durch Aktivierung des IP3-Systems den IP3-Gehalt und konsekutiv die Insulinkonzentration (BACH et al. 2005, PESCHKE et al. 2006a, PESCHKE 2008).

Durch die geschilderten Signaltransduktionswege, nämlich den Einfluss von Melatonin auf den AC/cAMP- sowie GC/cGMP-Weg mit hemmender und auf den Gq/PLC/IP3-Weg mit steigernder Bedeutung für die Insulinsekretion, musste geklärt werden, wie die Einzeleffekte getrennt werden könnten. Dazu musste der Gi/AC/cAMP-Weg gehemmt werden, was durch Blockierung des inhibitorischen G-Proteins (Gi) mittels PTX ermöglicht wurde. Nur nach Hemmung der cAMP-Kaskade gelang es, den Rezeptor-medierten Einfluss von Melatonin auf das Gq/PLC/IP3-System zu erfassen. Offen bleibt bislang die Frage, warum und unter welchen Bedingungen Melatonin in der  $\beta$ -Zelle unterschiedliche Funktionskaskaden zu aktivieren vermag.

Bisher standen die Melatoninrezeptor-Ausstattung sowie die Vermittlung des Melatonineinflusses auf Signalkaskaden der pankreatischen  $\beta$ -Zelle im Zentrum der Betrachtungen. Auf das mögliche Vorkommen von Melatoninrezeptoren auf anderen Inselzellen, wie beispielsweise  $\alpha$ -Zellen, wurde bislang nicht eingegangen, obwohl in jüngsten Arbeiten dazu Aussagen getroffen wurden. Im Einzelnen ist festzustellen, dass isolierte pankreatische  $\alpha$ -Zellen des Menschen über MT1-Rezeptoren verfügen (RAMRACHEYA et al. 2008), während bei murinen  $\alpha$ -Zellen (BÄHR et al. 2011) beide Melatoninrezeptoren (MT1 und MT2) nachgewiesen wurden. Melatoninapplikation führte zu einer statistisch signifikant erhöhten

Expression als auch Sekretion von Glukagon. Diese Reaktionen waren unter hyperglykämischer Stoffwechselsituation ausgeprägter als unter normoglykämischen Bedingungen. Insgesamt kann also festgestellt werden, dass Melatonin Rezeptor-mediiert nicht nur die pankreatische  $\beta$ -Zelle (Insulinsenkung), sondern auch die  $\alpha$ -Zelle (Glukagonerhöhung) beeinflusst wird. Die Ergebnisse sind in dem Sinne systematisierbar, als in beiden Fällen die Reaktionen zur Glukoseerhöhung beitragen. (Details siehe BÄHR et al. im vorliegenden Band S. 197–200.)

## 6. Melatonin-Insulin-Interaktionen bei Typ-1- und Typ-2-diabetischen Tiermodellen sowie Patienten

Im nächsten Teil soll nun kurz referiert werden, in welcher Weise diabetische Stoffwechselentgleisungen Einfluss auf die Synthese und Sekretion von Melatonin nehmen. Dazu konnte von uns erstmals 2006 Stellung bezogen werden, nachdem es gelungen war nachzuweisen, dass Typ-2-diabetische Goto-Kakizaki (GK)-Ratten einen erniedrigten Melatoninplasmagehalt aufweisen, der sich mit einem erhöhten Melatoninrezeptorstatus (*Real-time*-RT-PCR-Untersuchungen) pankreatischer  $\beta$ -Zellen paarte (PESCHKE et al. 2006b). In dieser Arbeit konnte zweifelsfrei nachgewiesen werden, dass leicht erhöhte Insulinspiegel der Typ-2-diabetischen GK-Ratten mit einer Senkung der Melatoninsynthese und konsekutiven Melatoninsekretion koinzidierten. Parallel konnten Tagesprofile der Melatoninsekretion von Typ-2-diabetischen Patienten erfasst und, in Übereinstimmung mit den Ergebnissen von GK-Ratten, eine deutliche Absenkung von Melatonin im Plasma nachgewiesen werden. Erhärtet wurden die Befunde durch Bestimmungen der Arylalkylamin-N-acetyl-transferase (AA-NAT)-Enzymaktivität von Epiphysen (die AA-NAT wird als limitierendes Enzym der Melatoninsynthese angesehen), die bei den GK-Ratten gegenüber stoffwechselgesunden Wistar-Ratten ebenfalls erniedrigt war. Dieser Befund war von erhöhter Expression der AA-NAT-mRNA begleitet. Dass es sich hier um einen Kompensationsmechanismus handelt, kann nur vermutet werden. Schließlich war bei den GK-Ratten die pineale Insulinrezeptorexpression erniedrigt, die Melatoninrezeptorexpression der  $\beta$ -Zellen jedoch erhöht. Hinzu kam, dass perfusionstechnische *Ex-vivo*-Untersuchungen von Epiphysen unter dem Einfluss von Insulin eindeutige Erniedrigungen Norepinephrin-stimulierter Melatoninsynthese zeigten. Etwa zeitgleich wurde der Einfluss von Insulin auf die Norepinephrin(NE)-stimulierte Melatoninsynthese explantierter Rattenepiphysen durch GARCIA und Mitarbeiter (GARCIA et al. 2008) bestätigt, jedoch im Gegensatz zu den eigenen Befunden festgestellt, dass Insulin die NE-stimulierte Melatoninsynthese ebenso wie die Tryptophanhydroxylase potenziert. Bereits 2 Jahre später wurde von derselben Gruppe eingeräumt, dass jedoch unter bestimmten Bedingungen (gemeint waren unterschiedliche Untersuchungszeitpunkte im Tagesgang) Insulin die Melatoninsynthese reduziert (PELLICARI-GARCIA et al. 2010).

Diese bisher skizzierten eigenen Befunde waren so eindeutig und überzeugend, dass dem Zusammenhang weiter nachgegangen wurde und an vorhandenem menschlichem Pankreasgewebe (Operationsmaterial) von Stoffwechsel-unauffälligen sowie Typ-2-diabetischen Patienten Rezeptoranalysen durchgeführt wurden. Zunächst konnte in Übereinstimmung mit den an der Ratte erhobenen Befunden die Melatoninrezeptorausstattung (MT1 und MT2) auch der menschlichen  $\beta$ -Zelle nachgewiesen werden. Zusätzlich wurde festgestellt, dass das menschliche Pankreas – im Vergleich zum MT2-Rezeptor – eine höhere Expression des MT1-Rezep-

tors aufweist und dass – wie oben bereits bei der GK-Ratte festgestellt – die Expression beider Melatoninrezeptoren im Pankreas von Typ-2-Diabetikern erhöht ist. (Details siehe PESCHKE et al. im vorliegenden Band S. 245–251.)

Eine *erste Zusammenfassung* erlaubt festzustellen, dass bei Typ-2-diabetischen GK-Ratten als auch bei Typ-2-diabetischen Patienten erhöhtes Plasmainsulin mit erniedrigter AA-NAT-Enzymaktivität sowie Melatoninsynthese und -sekretion koinzidieren und dass erniedrigter Plasmamelatoningehalt von erhöhter Melatoninrezeptor-mRNA-Expression der pankreatischen  $\beta$ -Zellen begleitet ist. Bislang wurde jedoch noch nicht geklärt, ob es wirklich der erhöhte Insulinspiegel ist, der die Melatoninsenkung zur Folge hat, da nicht ausgeschlossen werden konnte, dass gegebenenfalls auch der erhöhte Glukosespiegel im Plasma die Ursache für die beschriebenen Effekte sein könnte (siehe Abb. 1).

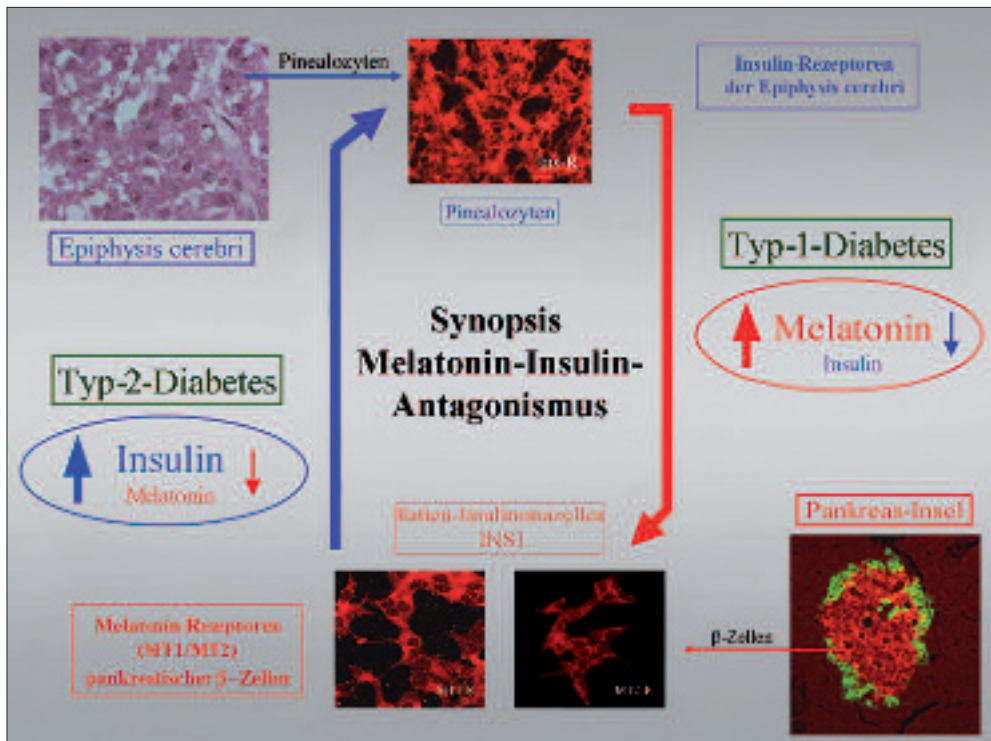


Abb. 1 Synopsis Melatonin-Insulin-Antagonismus

Um sich der Klärung dieser Frage zu nähern, wurden sowohl 6 als auch 45 Wochen alte Wistar-Ratten mit dem klassischen Diabetogen Streptozotocin (STZ, 60 mg/kg Körpergewicht) zur Entwicklung eines Typ-1-Diabetes intraperitoneal behandelt und nach 6 Wochen im Tagesgang (alle 3 h je 5 Tiere) getötet. Im Ergebnis des aufwendigen tierexperimentellen Vorgehens wurden Tagesprofile von jeweils jungen (12 Wochen) als auch älteren (51 Wochen) Kontroll- als auch STZ-Ratten gewonnen, wobei die STZ-Tiere erwartungsgemäß extrem erhöhte Glukosewerte im Plasma, in überraschender Weise aber auch erhöhten Melatoninplasmagehalt aufwiesen. Die Melatoninerhöhungen der STZ-Tiere waren verbunden mit erhöhter

Expression pinealer AA-NAT und erhöhter Expression pinealer Insulinrezeptor-mRNA. Dieses Ergebnis war nicht erwartet worden, und die Veröffentlichung der Ergebnisse der 12 Wochen alten Tiere wurde zunächst solange zurückgehalten, bis die Ergebnisse der 2. Experimentalserie (51 Wochen alte Tiere) vorlagen. Auf Grund der Übereinstimmung der Ergebnisse bei jungen als auch älteren Tieren – nämlich erniedrigtes bis fehlendes Insulin koinzidiert mit erhöhtem Plasmamelatonin – konnte davon ausgegangen werden, dass nicht die Glukose, sondern das niedrige (fast fehlende) Insulin (als Ergebnis der  $\beta$ -Zell-Zerstörung durch STZ) die Ursache der Melatoninerhöhung sein müsste. Dennoch blieb eine Unsicherheit, die darin bestand, dass STZ zwar relativ spezifisch die pankreatische  $\beta$ -Zelle zerstört, zusätzliche (unbekannte) Lateraleffekte aber nicht auszuschließen waren. Um auch diese Frage eindeutig beantworten zu können, wurden mit dankenswerter Unterstützung der Medizinischen Hochschule Hannover Typ-1-diabetische IDDM-Ratten (Spontanmutation durch Autoimmunerkrankung mit Unter- gang der insulinproduzierenden  $\beta$ -Zellen) sowie deren Hintergrundstamm LEW.1AR1 in die Untersuchungen einbezogen. Die Tiere entwickeln um den 60. Lebensstag einen Typ-1-Diabetes, der nach wenigen Tagen auf Grund totalen Insulinmangels zum Tode führt. Die bisherigen Untersuchungsergebnisse, die im Tagesgang (alle 3 h unter L : D = 12 : 12) sowohl bei männlichen als auch weiblichen Tieren erhoben wurden, bestätigen die zuvor beschriebenen STZ-Befunde, nämlich, dass Insulinmangel von erhöhten Melatoninplasmakonzentrationen begleitet ist. Diese Befunde werden durch zusätzliche Ergebnisse gestützt, wie beispielsweise erhöhte Expression von Enzymen der Melatoninsynthesekaskade (AA-NAT und HIOMT) sowie erhöhte Expression der pinealen Insulinrezeptor- und  $\beta$ 1-Adrenozeptor-mRNA, ebenso der Transkripte der Uhrgene *Per1* und *Bmal1* bei den Typ-1-diabetischen Ratten. Insulin- substitution mittels Pelletimplantation restituierte die Ergebnisse weitgehend. Das spricht dafür, dass die pinealen Veränderungen durch den Insulinmangel zustande kommen. (Details siehe HOFMANN et al. im vorliegenden Band S. 221–226.)

Eine *zweite Zusammenfassung* erlaubt festzustellen, dass bei Typ-1-diabetischen STZ-Ratten, ebenso wie bei Typ-1-diabetischen IDDM-Ratten, erniedrigtes bzw. fehlendes Plasmainsulin mit erhöhter Melatoninsynthese und -sekretion koinzidieren (siehe Abb. 1).

Derzeit werden umfängliche HPLC-, molekularbiologische *Real-time*-RT-PCR sowie weiterführende perfusionstechnische Untersuchungen an explantierten (*ex vivo*) Epiphysen durchgeführt, um Ursachen und Sinnhaftigkeit des eindeutigen Antagonismus zwischen Insulin und Melatonin zu verstehen.

Ein Erklärungsansatz könnte darin bestehen, dass in der Insulin-senkenden Funktion des Melatonins ein Schutz der pankreatischen  $\beta$ -Zelle vor exzessiver Insulinsekretion und damit Überforderung der  $\beta$ -Zelle zu sehen ist. Dafür spricht – wie oben bereits hervorgehoben – dass Melatonin in unseren Experimenten allein die stimulierte Insulinsekretion hemmt. Dieses bislang spekulative Konzept orientiert sich an der Tatsache, dass beim Menschen nachts der Melatoninplasmagehalt hoch ist, zu einer Zeit, in der – in aller Regel – wenig Insulin auf Grund fehlender Nahrungsaufnahme gebraucht wird. Inwieweit dieses Konzept auch auf die nachtaktive Ratte übertragbar ist, bleibt abzuwarten. Nicht unwesentlich könnte auch die Tatsache sein, dass mit zunehmendem Alter der Melatoningehalt im Plasma stetig abnimmt und die Typ-2-Diabetesinzidenz steigt. Dieser Zusammenhang trifft jedoch nur für den Typ-2-Diabetes zu, der auf einer  $\beta$ -Zell-Überforderung mit zunächst relativem und schließlich absolutem Insulinmangel beruht. Erst wenn die  $\beta$ -Zelle infolge einer totalen Überforderung „ausgebrannt“ ist (wovor Melatonin möglicherweise schützt), ist die Senkung der stimulierten Insulinsekretion durch Melatonin funktionell nicht mehr sinnvoll.

Im Ergebnis der hier vorgestellten Resultate und Deutungsversuche wird in einer *dritten Zusammenfassung* festgestellt, dass die Autoren dem Melatonin eine Schutzfunktion vor langfristig ungezügelter Insulinsekretion zuerkennen (Melatonin hemmt die stimulierte Insulinsekretion).

## **7. Funktionelle Bedeutung des Insulin-Melatonin-Antagonismus für Klinik und Diabetologie unter Einbeziehung von Katecholaminen – ein Klärungsversuch**

So eindeutig sich der geschilderte Insulin-Melatonin-Antagonismus sowohl bei Typ-2-diabetischen Goto-Kakizaki-Ratten als auch Typ-1-diabetischen STZ- bzw. IDDM-Ratten nachweisen ließ, so schwer fällt es, die funktionelle Bedeutung des Gegensatzes zu durchschauen. Im letzten Kapitel wurde sicherlich zu Recht hervorgehoben, dass dem Melatonin eine Schutzfunktion für die pankreatische  $\beta$ -Zelle in dem Sinne zukommt, dass Melatonin die stimulierte (also stark erhöhte Insulinsekretion) hemmt und damit die  $\beta$ -Zelle vor Überforderung schützt. Dieser Schutz bleibt begrenzt, da mit zunehmendem Alter, wenn die Inzidenz des Typ-2-Diabetes ansteigt, die Melatoninproduktion stark absinkt. Ferner führt bekannterweise die längerfristige Überforderung der  $\beta$ -Zelle dazu, dass die  $\beta$ -Zelle „ausbrennt“ und ein ursprünglicher Typ-2-Diabetes sich Richtung Typ-1-Diabetes entwickelt.

Folgend wird der Versuch unternommen, auf der Grundlage der erhobenen Befunde eine Erklärung zu wagen. Die Basis für den Insulin-Melatonin-Antagonismus bildet die Koinzidenz erhöhten Plasmamelatonins und erhöhter epiphysärer Adrenozeptor- $\beta$ 1-Expression Typ-1-diabetischer IDDM-Ratten, wobei der bekannte Insulin-Noradrenalin-Gegensatz den Schlüssel zum Verständnis des funktionellen Zusammenhanges darstellt. Typ-1-diabetische Ratten weisen beispielsweise erhöhten Noradrenalinhalt im Blutplasma (CHENG et al. 2001), der Herz (KUNCOVA et al. 2005) und Wadenmuskulatur (BAVIERA et al. 2008), der Niere und Leber (PATEL et al. 1997) sowie in Pankreata auf, ohne jedoch zu einer Verringerung der Insulinsekretion in perfundierten Pankreata diabetischer STZ-Ratten zu führen (OSTENSON et al. 1993).

Auf Grund der zitierten Arbeiten und eigener Befunde lassen sich die Angaben folgendermaßen verdichten. Typ-1-diabetische Ratten weisen neben erniedrigtem Insulingehalt im Plasma erhöhte epiphysäre Adrenozeptor- $\beta$ 1-Expression, verbunden mit erhöhtem Adrenalin und Noradrenalin im Plasma sowie gesteigertem Katecholamin-Metabolismus (BITAR et al. 1987) auf. Andererseits zeigen Typ-2-diabetische Goto-Kakizaki-Ratten bei leicht erhöhtem Insulingehalt erniedrigte Adrenalin- und Noradrenalin-Spiegel im Plasma (PESCHKE und MÜHLBAUER 2007). Ob die Erhöhung von Katecholaminen auf einer Hemmung der Katechol-O-methyltransferase-Aktivität beruht, wie bei STZ-Ratten in der Leber beschrieben (WANG et al. 2002), oder auf einer verstärkten Synthese, bleibt abzuwarten. Da Noradrenalin den stärksten Stimulator der Synthese und Ausschüttung von Melatonin darstellt (Noradrenalin stimuliert in der Epiphyse über Aktivierung der  $\beta$ 1-Adrenozeptoren die cAMP- und über  $\alpha$ 1-Adrenozeptoren die IP3-Kaskade), bietet der geschilderte Antagonismus zwischen Katecholaminen und Insulin die Grundlage für das Verständnis des Melatonin-Insulin-Antagonismus. Für die Akzeptanz des geschilderten Zusammenhanges spricht die Tatsache, dass durch Insulinsubstitution die Veränderungen wieder normalisiert werden. (Details siehe HOFMANN et al. im vorliegenden Band S. 221–226.)

In Umkehrung der Verhältnisse zum Typ-1-Diabetes finden sich bei Typ-2-diabetischen Goto-Kakizaki-Ratten bei leicht erhöhtem Insulinspiegel erniedrigte Katecholaminwerte



(Adrenalin und Noradrenalin) im Plasma und verringerte Noradrenalin-Konzentrationen in den Epiphysen (PESCHKE und MÜHLBAUER 2007). Der Insulin-Noradrenalin-Gegensatz konnte also bestätigt werden und lässt sich in überzeugender Weise für den Insulin-Melatonin-Antagonismus verantwortlich machen. (Details siehe PESCHKE et al. im vorliegenden Band S. 245–251.)

Abschließend ist der Frage nachzugehen, welcher Vorteil dem Organismus aus der Melatoninerhöhung bei Typ-1-Diabetes erwächst. Dazu nehmen zahlreiche Publikationen Stellung, indem sie feststellen, dass Melatonin Typ-1-Diabetes-bedingten Stress vermindert (REITER 1997, 1998a, b, 1999, BRÖMME et al. 2000, REITER et al. 2009, HARDELAND et al. 1993, BRÖMME und PESCHKE 2003, HARDELAND et al. 2003, HARDELAND 2005, HARDELAND und PANDI-PERUMAL 2005). Melatoninapplikation schützt die  $\beta$ -Zelle gegen oxidativen Stress (LENZEN 2008), sowohl durch Alloxan (WINIARSKA et al. 2006) als auch durch Streptozotocin induziert (ARMAGAN et al. 2006, KLEPAC et al. 2006, SUDNIKOVICH et al. 2007). Ferner wird festgestellt, dass Melatonin ebenfalls einen kurativen Effekt auf Diabetes-induzierte Folgeerscheinungen (PASKALOGLU et al. 2004), wie beispielsweise Gefäßkomplikationen (SUDNIKOVICH et al. 2007), entwickelt. (Details siehe HARDELAND im vorliegenden Band S. 137–160.)

## 8. Zusammenfassung

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass Melatonin die Insulinsekretion beeinflusst. Die Einflussnahme erfolgt über MT1- als auch MT2-Rezeptoren auf 2 intrazelluläre Signaltransduktionswege: (a) mediiert über inhibitorische Gi-Proteine auf dem Adenylatcyclase/cAMP-Weg mit dem Ergebnis einer Insulinsekretionshemmung und (b) mediiert über Gq-Proteine auf dem Phospholipase-C/IP3-Weg mit dem Ergebnis einer Insulinsekretionssteigerung. Ein zusätzlicher MT2-Rezeptor/cGMP-Weg ist nachgewiesen (STUMPF et al. 2008, 2009). Die Bedeutung der Proteinkinasen A und C sowie der *Insulin receptor substrate-1/phosphatidylinositol 3-kinase pathway* (*IRS-1/PI-3-kinase*) wurden berücksichtigt.

Ferner wurde festgestellt, dass die Insulinsekretion sowohl *in vivo* als auch *in vitro* einem circadianen Rhythmus folgt, der in der pankreatischen Insel selbst generiert wird (peripherer Oszillator). Melatonin, eingesetzt als Zeitgeber, hatte einen maßgeblichen Effekt auf die Synchronisation, nicht aber auf die Periodenlänge oder Amplitude. Die mögliche bzw. wahrscheinliche Bedeutung von Uhrengenen sowie deren circadiane Oszillationen für die Generierung des Insulin-Tagesrhythmus wurde diskutiert. Besonders umfangreich wurde der Einfluss des experimentellen Diabetogens Streptozotocin auf die Insulinsekretion sowie die Diabetes-präventive Bedeutung von Melatonin dargestellt, da die Literatur zu diesem Themenkomplex äußerst umfangreich und einheitlich ist. Melatonin hat eine protektive Bedeutung, vermag die Schwere der durch Diabetogene ausgelösten metabolischen Entgleisungen zu mindern und das auf Grund der allgemein akzeptierten Radikal-Scavenger-Bedeutung des Melatonins.

Typ-2-Diabetiker haben erniedrigte Melatoninspiegel, erniedrigte AA-NAT-Aktivität der Epiphyse bei erhöhter Expression der pinealen AA-NAT-mRNA. Die Expression der Insulinrezeptor-mRNA von Epiphysen Typ-2-diabetischer Ratten ist erniedrigt. Die mRNA der pankreatischen MT1- als auch MT2-Rezeptorexpression ist bei Typ-2-diabetischen Ratten als auch beim Menschen erhöht, ebenso wie die Expression der nukleären Orphan-Rezeptoren ROR $\alpha$ , RZR $\beta$  und ROR $\gamma$ . Das für die Melatoninsynthese entscheidend wichtige Norepinephrin ist bei Typ-2-diabetischen Ratten erniedrigt, ebenso wie der Plasma-Adrenalinsspiegel. Es bleibt

zu untersuchen, in wie starkem Maße Melatoninspiegelveränderungen von kausaler Bedeutung für die Diabetogenese sind. Bislang ist nicht geklärt, ob die diabetische Stoffwechselentgleisung, die erniedrigten Katecholamine von Diabetikern oder eine allgemein akzeptierte sympathische Neuropathie mit allen konsekutiven Veränderungen den entscheidenden Einfluss auf die erniedrigte Melatonin synthese haben. Ferner ist nicht eindeutig geklärt, ob Melatonin bei seinen normalerweise niedrigen Konzentrationen tatsächlich infolge seiner Radikal-Scavenger-Funktion bzw. seiner antioxidativen Bedeutung antidiabetogen wirkt (REITER 1997, 1998a, b, 1999, BRÖMME et al. 2000, REITER et al. 2009). Es steht jedoch außer Frage, dass es einen durch viele Einzelbefunde gestützten funktionellen Zusammenhang zwischen Melatonin und Insulin sowie Melatonin und Diabetes gibt. Es bleibt zu untersuchen, ob es sich dabei um pharmakologische Effekte gegenseitiger Beeinflussung, Radikal-neutralisierende Effekte oder aber, wofür viel spricht, um Desynchronisationen in Folge verringerter Melatoninspiegel handelt.

### *Literatur*

- ARMAGAN, A., UZ, E., YILMAZ, H. R., SOYUPEK, S., OKSAY, T., and OZCELIK, N.: Effects of melatonin on lipid peroxidation and antioxidant enzymes in streptozotocin-induced diabetic rat testis. *Asian J. Androl.* 8, 595–600 (2006)
- ATKINS, T. W., BAILEY, C. J., and MATTY, A. J.: The effect of melatonin on insulin secretion in rat and mouse. *J. Endocrinol.* 58, XVII–XVIII (1973)
- BACH, A. G., WOLGAST, S., MÜHLBAUER, E., and PESCHKE, E.: Melatonin stimulates inositol-1,4,5-trisphosphate and  $\text{Ca}^{2+}$  release from INS1 insulinoma cells. *J. Pineal Res.* 39, 316–323 (2005)
- BÄHR, I., MÜHLBAUER, E., SCHUCHT, H. and PESCHKE, E.: Melatonin stimulates glucagon secretion in vitro and in vivo. *J. Pineal Res.* 50, 336–344 (2011)
- BAILEY, C. J., ATKINS, T. W., and MATTY, A. J.: Melatonin inhibition of insulin secretion in the rat and mouse. *Horm. Res.* 5, 21–28 (1974)
- BAVIERA, A. M., ZANON, N. M., NAVEGANTES, L. C., MIGLIORINI, R. H., and KETTELHUT, I. C.: Chemical sympathectomy further increases muscle protein degradation of acutely diabetic rats. *Muscle Nerve* 38, 1027–1035 (2008)
- BENSON, B., MILLER, C. W., and SORRENTINO, S.: Effects of blinding on blood glucose and serum insulin-like activity in rats. *Texas Rep. Biol. Med.* 29, 513–525 (1971)
- BETTAHI, I., POZO, D., OSUNA, C., REITER, R. J., ACUNA-CASTROVIEJO, D., and GUERRERO, J. M.: Melatonin reduces nitric oxide synthase activity in rat hypothalamus. *J. Pineal Res.* 20, 205–210 (1996)
- BITAR, M. S., KOULU, M., RAPOPORT, S. I., and LINNOILA, M.: Adrenal catecholamine metabolism and myocardial adrenergic receptors in streptozotocin diabetic rats. *Biochem. Pharmacol.* 36, 1011–1016 (1987)
- BIZOT-ESPIARD, J. G., DOUBLE, A., GUARDIOLA-LEMAITRE, B., DELAGRANGE, P., KTORZA, A., and PENICAUD, L.: Diurnal rhythms in plasma glucose, insulin, growth hormone and melatonin levels in fasted and hyperglycaemic rats. *Diabetes Metab.* 24, 235–240 (1998a)
- BIZOT-ESPIARD, J. G., DOUBLE, A., COUSIN, B., LESIEUR, D., GUARDIOLA-LEMAITRE, B., DELAGRANGE, P., KTORZA, A., and PENICAUD, L.: Lack of melatonin effects on insulin action in normal rats. *Horm. Metab. Res.* 30, 711–716 (1998b)
- BODEN, G., RUIZ, J., URBAIN, J. L., and CHEN, X.: Evidence for a circadian rhythm of insulin secretion. *Amer. J. Physiol.* 271, E246–252 (1996)
- BOUATIA-NAJI, N., BONNEFOND, A., CAVALCANTI-PROENCA, C., SPARSO, T., HOLMKVIST, J., MARCHAND, M., DELPLANQUE, J., LOBBENS, S., ROCHELEAU, G., DURAND, E., DE GRAEVE, F., CHEVRE, J. C., BORCH-JOHNSEN, K., HARTIKAINEN, A. L., RUOKONEN, A., TICHET, J., MARRE, M., WEILL, J., HEUDE, B., TAUBER, M., LEMAIRE, K., SCHUTT, F., ELLIOTT, P., JORGENSEN, T., CHARPENTIER, G., HADJADI, S., CAUCHI, S., VAXILLAIRE, M., SLADEK, R., VISVIKIS-SIEST, S., BALKAU, B., LEVY-MARCHAL, C., PATTOU, F., MEYRE, D., BLAKEMORE, A. I., JARVELIN, M. R., WALLEY, A. J., HANSEN, T., DINA, C., PEDERSEN, O., and FROGUEL, P.: A variant near MTNR1B is associated with increased fasting plasma glucose levels and type 2 diabetes risk. *Nature Genet.* 41, 89–94 (2009)
- BRÖMME, H. J., MORKE, W., PESCHKE, E., EBELT, H., and PESCHKE, D.: Scavenging effect of melatonin on hydroxyl radicals generated by alloxan. *J. Pineal Res.* 29, 201–208 (2000)
- BRÖMME, H. J., und PESCHKE, E.: Molekulare Mechanismen der Alloxan-Toxizität sowie die radikalfangende und antidiabetogene Bedeutung von Melatonin. *Abh. Sächs. Akad. Wiss. Math-nat.wiss. Kl.* 60, 137–162 (2003)

- BRUNDEGE, J. M., DIAO, L., PROCTOR, W. R., and DUNWIDDIE, T. V.: The role of cyclic AMP as a precursor of extracellular adenosine in the rat hippocampus. *Neuropharmacology* 36, 1201–1210 (1997)
- BRUNTON, L. L., and BUSS, J. E.: Export of cyclic AMP by mammalian reticulocytes. *J. Cyclic Nucleotide Res.* 6, 369–377 (1980)
- BRUNTON, L. L., and MAYER, S. E.: Extrusion of cyclic AMP from pigeon erythrocytes. *J. Biol. Chem.* 254, 9714–9720 (1979)
- BUBIS, M., and ZISAPEL, N.: Involvement of cGMP in cellular melatonin responses. *Biol. Cell* 91, 45–49 (1999)
- BÜNNING, E.: Das Weiterlaufen der „physiologischen Uhr“ im Säugerdarm ohne zentrale Steuerung. *Naturwissenschaften* 45, 68 (1958)
- BURNS, J. K.: Serum sodium and potassium and blood glucose levels in cynomolgus monkeys after administration of melatonin. *J. Physiol. Lond.* 232, 84P–85P (1973)
- BUTTARO, C. H., and ROTTINI, E.: Ormoni e tasso aminoacidemico; azione dell'estratto epifisario sul tasso aminoacidemico. *Minerva Med.* 38, 54–56 (1947)
- CAGNACCI, A., ARANGINO, S., RENZI, A., PAOLETTI, A. M., MELIS, G. B., CAGNACCI, P., and VOLPE, A.: Influence of melatonin administration on glucose tolerance and insulin sensitivity of postmenopausal women. *Clin. Endocrinol. (Oxford)* 54, 339–346 (2001)
- CHAMPNEY, T. H., BRAINARD, G. C., RICHARDSON, B. A., and REITER, R. J.: Experimentally-induced diabetes reduces nocturnal pineal melatonin content in the Syrian hamster. *Comp. Biochem. Physiol. A* 76, 199–201 (1983)
- CHAMPNEY, T. H., HOLTORF, A. P., CRAFT, C. M., and REITER, R. J.: Hormonal modulation of pineal melatonin synthesis in rats and Syrian hamsters: effects of streptozotocin-induced diabetes and insulin injections. *Comp. Biochem. Physiol. A* 83, 391–395 (1986)
- CHAMPNEY, T. H., STEGER, R. W., CHRISTIE, D. S., and REITER, R. J.: Alterations in components of the pineal melatonin synthetic pathway by acute insulin stress in the rat and Syrian hamster. *Brain Res.* 338, 25–32 (1985)
- CHEN, Z. S., LEE, K., and KRUGH, G. D.: Transport of cyclic nucleotides and estradiol 17- $\beta$ -D-glucuronide by multidrug resistance protein 4. *J. Biol. Chem.* 276, 33747–33754 (2001)
- CHENG, J. T., LIU, I. M., CHI, T. C., and TZENG, T. F.: Release of beta-endorphin by prostaglandin E2 to lower plasma glucose in streptozotocin-induced diabetic rats. *Horm. Metab. Res.* 33, 439–443 (2001)
- CONTI, A., and MAESTRONI, G. J.: Role of the pineal gland and melatonin in the development of autoimmune diabetes in non-obese diabetic mice. *J. Pineal Res.* 20, 164–172 (1996)
- CONTI, A., and MAESTRONI, G. J.: Melatonin rhythms in mice: role in autoimmune and lymphoproliferative diseases. *Ann. New York Acad. Sci.* 840, 395–410 (1998)
- CSABA, G., and BARATH, P.: Are Langerhan's islets influenced by the pineal body? *Experientia* 27, 962 (1971)
- CSABA, G., and NAGY, S. U.: The regulatory role of the pineal gland on the thyroid gland, adrenal medulla and islets of Langerhans. *Acta Biol. Med. Ger.* 31, 617–619 (1973)
- CSERNUS, V. J., HAMMER, T., PESCHKE, D., and PESCHKE, E.: Dynamic insulin secretion from perfused rat pancreatic islets. *Cell Mol. Life Sci.* 54, 733–743 (1998)
- CUNNINGHAM, B. A., DEENEY, J. T., BLISS, C. R., CORKEY, B. E., and TORNHEIM, K.: Glucose-induced oscillatory insulin secretion in perfused rat pancreatic islets and clonal  $\beta$ -cells (HIT). *Amer. J. Physiol.* 271, E702–E710 (1996)
- DAMIAN, E.: The antisteroid, antigonadotropic and metabolism-regulation activity of the pineal gland. *Rev. Roum. Med. Endocrinol.* 27, 57–64 (1989)
- DHAR, M., DAYAL, S. S., RAMESH BABU, C. S., and ARORA, S. R.: Effect of melatonin on glucose tolerance and blood glucose circadian rhythm in rabbits. *Indian J. Physiol. Pharmacol.* 27, 109–117 (1983)
- DIAZ, B., and BLAZQUEZ, E.: Effect of pinealectomy on plasma glucose, insulin and glucagon levels in the rat. *Horm. Metab. Res.* 18, 225–229 (1986)
- DUBOCOVICH, M. L., MASANA, M. I., IACOB, S., and SAURI, D. M.: Melatonin receptor antagonists that differentiate between the human Mel1a and Mel1b recombinant subtypes are used to assess the pharmacological profile of the rabbit retina ML1 presynaptic heteroreceptor. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 355, 365–375 (1997)
- EDMONDS, L. N.: Cellular and Molecular Bases of Biological Clocks. Models and Mechanisms for Circadian Time-keeping; pp. 166–297. New York, Berlin, Heidelberg, London, Paris, Tokyo: Springer 1988
- FAILLACE, M. P., KELLER SARMIENTO, M. I., and ROSENSTEIN, R. E.: Melatonin effect on the cyclic GMP system in the golden hamster retina. *Brain Res.* 711, 112–117 (1996)
- FELDMAN, J. M., and LEBOVITZ, H. E.: Structural determinants of indole amine action on in vitro insulin release. *Endocrinology* 91, 809–816 (1972)
- FINNEGAN, R. B., and CAREY, G. B.: Characterization of cyclic AMP efflux from swine adipocytes in vitro. *Obes. Res.* 6, 292–298 (1998)
- FRANKEL, B. J., and STRANDBERG, M. J.: Insulin release from isolated mouse islets in vitro: no effect of physiological levels of melatonin or arginine vasotocin. *J. Pineal Res.* 11, 145–148 (1991)

- GARCIA, R. A., AFECHÉ, S. C., SCIALFA, J. H., DO AMARAL, F. G., DOS SANTOS, S. H., LIMA, F. B., YOUNG, M. E., and CIPOLLA-NETO, J.: Insulin modulates norepinephrine-mediated melatonin synthesis in cultured rat pineal gland. *Life Sci.* 82, 108–114 (2008)
- GILAD, E., MATZKIN, H., and ZISAPÉL, N.: Inactivation of melatonin receptors by protein kinase C in human prostate epithelial cells. *Endocrinology* 138, 4255–4261 (1997)
- GITTO, E., REITER, R. J., CORDARO, S. P., LA ROSA, M., CHIURAZZI, P., TRIMARCHI, G., GITTO, P., CALABRO, M. P., and BARBERI, I.: Oxidative and inflammatory parameters in respiratory distress syndrome of preterm newborns: beneficial effects of melatonin. *Amer. J. Perinatol.* 21, 209–216 (2004)
- GORRAY, K. C., and QUAY, W. B.: Evidence for a pineal contribution in mechanisms governing glucose homeostasis during darkness. 59<sup>th</sup> Annual Meeting, Endocrine Soc, Program and Abstracts 306 (1977)
- GORRAY, K. C., QUAY, W. B., and EWART, R. B.: Effects of pinealectomy and pineal incubation medium and sonicates on insulin release by isolated pancreatic islets in vitro. *Horm. Metab. Res.* 11, 432–436 (1979)
- HARDELAND, R.: Antioxidative protection by melatonin: multiplicity of mechanisms from radical detoxification to radical avoidance. *Endocrine* 27, 119–130 (2005)
- HARDELAND, R., COTO-MONTES, A., and POEGGELER, B.: Circadian rhythms, oxidative stress, and antioxidative defense mechanisms. *Chronobiol. Int.* 20, 921–962 (2003)
- HARDELAND, R., and PANDI-PERUMAL, S. R.: Melatonin, a potent agent in antioxidative defense: actions as a natural food constituent, gastrointestinal factor, drug and prodrug. *Nutr. Metab. (Lond.)* 2, 22 (2005)
- HARDELAND, R., REITER, R. J., POEGGELER, B., and TAN, D. X.: The significance of the metabolism of the neurohormone melatonin: antioxidative protection and formation of bioactive substances. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 17, 347–357 (1993)
- HELLMAN, B., GYLFE, E., BERGSTEIN, P., GRAPENGIESSER, E., LUND, P. E., BERTS, A., TENGHOLM, A., PIPELEERS, D. G., and LING, Z.: Glucose induces oscillatory  $Ca^{2+}$  signalling and insulin release in human pancreatic beta cells. *Diabetologia* 37 (Suppl. 2), 11–20 (1994)
- HOYOS, M., GUERRERO, J. M., PEREZ-CANO, R., OLIVAN, J., FABIANI, F., GARCIA-PERGANEDA, A., and OSUNA, C.: Serum cholesterol and lipid peroxidation are decreased by melatonin in diet-induced hypercholesterolemic rats. *J. Pineal Res.* 28, 150–155 (2000)
- JEDLITSCHKY, G., BURCHELL, B., and KEPPLER, D.: The multidrug resistance protein 5 functions as an ATP-dependent export pump for cyclic nucleotides. *J. Biol. Chem.* 275, 30069–30074 (2000)
- JIN, X., GALL, C. VON, PIESCHL, R. L., GRIBKOFF, V. K., STEHLE, J. H., REPERT, S. M., and WEAVER, D. R.: Targeted disruption of the mouse Mel(1b) melatonin receptor. *Mol. Cell. Biol.* 23, 1054–1060 (2003)
- JOHN, T. M., BEAMISH, F. W., and GEORGE, J. C.: Diurnal impact of locomotory activity and melatonin and N-acetylserotonin treatment on blood metabolite levels in the rainbow trout. *Arch. Int. Physiol. Biochim.* 91, 115–120 (1983)
- JOHN, T. M., VISWANATHAN, M., GEORGE, J. C., and SCANES, C. G.: Influence of chronic melatonin implantation on circulating levels of catecholamines, growth hormone, thyroid hormones, glucose, and free fatty acids in the pigeon. *Gen. Comp. Endocrinol.* 79, 226–232 (1990)
- JORDAN, H. E., and EYSTER, J. A. E.: The physiological action of extracts of the pineal body. *Amer. J. Physiol.* 29, 115–123 (1911)
- KADLE, R., and FOLK, G. E.: Importance of circadian rhythms in animal cell culture. *Comp. Biochem. Physiol.* 76A, 773–776 (1983)
- KEMP, D. M., ÜBEDA, M., and HABENER, J. F.: 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 (2002)
- KLEPAC, N., RUDES, Z., and KLEPAC, R.: Effects of melatonin on plasma oxidative stress in rats with streptozotocin induced diabetes. *Biomed. Pharmacother.* 60, 32–35 (2006)
- KONDRASHIN, A., NESTEROVA, M., and CHO-CHUNG, Y. S.: Cyclic adenosine 3':5'-monophosphate-dependent protein kinase on the external surface of LS-174T human colon carcinoma cells. *Biochemistry* 38, 172–179 (1999)
- KUNCOVA, J., SVIGLEROVA, J., TONAR, Z., and SLAVIKOVA, J.: Heterogenous changes in neuropeptide Y, norepinephrine and epinephrine concentrations in the hearts of diabetic rats. *Auton. Neurosci.* 121, 7–15 (2005)
- LA FLEUR, S. E., KALSBECK, A., WORTEL, J., VAN DER VLIET, J., and BUIJS, R. M.: Role for the pineal and melatonin in glucose homeostasis: pinealectomy increases night-time glucose concentrations. *J. Neuroendocrinol.* 13, 1025–1032 (2001)
- LENZEN, S.: Oxidative stress: the vulnerable beta cell. *Biochem. Soc. Trans.* 36, 343–347 (2008)
- LERNER, A. B., CASE, J. D., and HEINZELMAN, R. V.: Structure of melatonin. *J. Amer. Chem. Soc.* 81, 6084–6092 (1959)
- LERNER, A. B., CASE, J. D., TAKAHASHI, Y., LEE, T. H., and MORI, W.: Isolation of melatonin, the pineal gland factor that lightens melanocytes. *J. Amer. Chem. Soc.* 80, 2587 (1958)

- LIMA, L. M. DE, DOS REIS, L. C., and LIMA, M. A. DE: Influence of the pineal gland on the physiology, morphometry and morphology of pancreatic islets in rats. *Braz. J. Biol.* 61, 333–340 (2001)
- LIU, C., WEAVER, D. R., JIN, X., SHEARMAN, L. P., PIESCHL, R. L., GRIBKOFF, V. K., and REPPERT, S. M.: Molecular dissection of two distinct actions of melatonin on the suprachiasmatic circadian clock. *Neuron* 19, 91–102 (1997)
- LOPEZ-GONZALEZ, M. A., CALVO, J. R., OSUNA, C., and GUERRERO, J. M.: Interaction of melatonin with human lymphocytes: evidence for binding sites coupled to potentiation of cyclic AMP stimulated by vasoactive intestinal peptide and activation of cyclic GMP. *J. Pineal Res.* 12, 97–104 (1992)
- LYNCH, H. J., ENG, J. P., and WURTMAN, R. J.: Control of pineal indole biosynthesis by changes in sympathetic tone caused by factors other than environmental lighting. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 70, 1704–1707 (1973)
- LYNCH, H. J., HSUAN, M., and WURTMAN, R. J.: Sympathetic neural control of indoleamine metabolism in the rat pineal gland. *Adv. Exp. Med. Biol.* 54, 93–114 (1975)
- LYSSENKO, V., NAGORNY, C. L., ERDOS, M. R., WIERUP, N., JONSSON, A., SPEGEL, P., BUGLIANI, M., SAXENA, R., FEX, M., PULIZZI, N., ISOMAA, B., TUOMI, T., NILSSON, P., KUUSISTO, J., TUOMILEHTO, J., BOEHNKE, M., ALTSHULER, D., SUNDLER, F., ERIKSSON, J. G., JACKSON, A. U., LAAKSO, M., MARCHETTI, P., WATANABE, R. M., MULDER, H., and GROOP, L.: Common variant in MTNR1B associated with increased risk of type 2 diabetes and impaired early insulin secretion. *Nature Genet.* 41, 82–88 (2009)
- MAHATA, S. K.: Effect of insulin on serotonin, 5-hydroxyindole-acetic acid, norepinephrine, epinephrine and corticosterone contents in chick. *Neuroscience Lett.* 121, 115–118 (1991)
- MAHATA, S. K., MANDAL, A., and GHOSH, A.: Influence of age and splanchnic nerve on the action of melatonin in the adrenomedullary catecholamine content and blood glucose level in the avian group. *J. Comp. Physiol. B* 158, 601–607 (1988)
- MAITRA, S. K., DEY, M., DEY, R., BHATTACHARYA, S., and SENGUPTA, A.: Influence of photoperiods on glycemic and adrenal catecholaminergic responses to melatonin administrations in adult male roseringed parakeets, *Psittacula krameri* Neumann. *Indian J. Exp. Biol.* 38, 1111–1116 (2000a)
- MAITRA, S. K., DEY, M., DUTTA, S., BHATTACHARYA, S., DEY, R., and SENGUPTA, A.: Influences of graded dose of melatonin on the levels of blood glucose and adrenal catecholamines in male roseringed parakeets (*Psittacula krameri*) under different photoperiods. *Arch. Physiol. Biochem.* 108, 444–450 (2000b)
- MCKEOWN, B. A., JOHN, T. M., and GEORGE, J. C.: Diurnal variation in effects of melatonin on plasma growth hormone and glucose in the pigeon. *Endocr. Exp.* 9, 263–268 (1975)
- MELLADO, M. C., RODRIGUEZ, M. V., DIAZ, B., DIEGO, J. G. DE, ALVAREZ, E., and BLÁZQUEZ, E.: Role of the pineal gland in the normal maintenance of circulating levels and of liver receptor concentrations of insulin and glucagon in the rat. In: REITER, R. J., and BLÁZQUEZ, E. (Eds.): *Proceedings of the Workshop on the Pineal Gland*, Salamanca; pp. 52–56 (1986)
- MELLADO, C., RODRIGUEZ, V., DIEGO, J. G. DE, ALVAREZ, E., and BLÁZQUEZ, E.: Effect of pinealectomy and of diabetes on liver insulin and glucagon receptor concentrations in the rat. *J. Pineal Res.* 6, 295–306 (1989)
- MILCOU, I., NANU, L., and MARCEAN, R.: [Existence of a hypoglycemic pineal hormone synergistic with insulin.]. *Ann. Endocrinol. (Paris)* 18, 612–620 (1957a)
- MILCOU, I., NANU, L., MARCEAN, R., et IONESCO, V.: L'action de l'insuline sur le métabolisme glucidique chez l'animal épiphysectomisé. *Rev. Roum. Endocr.* 3, 127–131 (1966)
- MILCOU, S. M., MILCOU, I., et NANU, L.: Le rôle de la glande pinéale dans le métabolisme des glucides. *Ann. Endocr. (Paris)* 24, 233–254 (1963a)
- MILCOU, S. M., MILCOU, I., et NANU, L.: Le rôle de la glande pinéale dans le métabolisme des glucides. *Ann. Endocrinol. (Paris)* 24, 233–254 (1963b)
- MILCOU, S. M., VREJOIN, G., MARCEAN, R., and NANU, L.: Effect of a hypoglycemic pineal hormone on the endocrine pancreas in alloxanized animals; morphological study. *Ann. Endocrinol. (Paris)* 18, 621–627 (1957b)
- MILCU, I., et NANU, L.: Glanda pineala ca organ metabolic. Bucaresti: Ed. Academiei RSR 1979
- MILCU, I., NANU, L., and MARCEAN, R.: Glucide tolerance in rabbits in experimental epiphysial syndromes. *Stud. Cercet. Endocrinol.* 15, 307–312 (1964a)
- MILCU, I., MARCEAN, R., et IONESCU, V.: Controlul actiunii melatoninei asupra glicemiei. *Stud. Cercet. Endocr.* 18, 405–409 (1967)
- MILCU, I., NANU, L., MARCEAN, R., et SITARU, S.: Probleme in legatura cu testarea biologica a functiei hipoglicemianta a epifizei. *Stud. Cercet. Endocr.* 2, 719–729 (1961)
- MILCU, I., NANU, L., and SITARU, T.: Comparative study of the hypoglycemic hormone content of the pineal body in Bovidae. *Stud. Cercet. Endocrinol.* 13, 365–372 (1962)
- MILCU, I., NANU, L., MARCEAN, R., et SITARU, S.: L'action de l'extrait pinéal et de la pinéalectomie sur le glycogène hépatique et musculaire après infusion prolongée de glucose. *Stud. Cercet. Endocr.* 14, 651–655 (1963a)

- MILCU, I., NANU, L., MARCEAN, R., and SITARU, S.: The action of pineal extract and epiphysectomy on hepatic and muscular glycogen after prolonged infusion of glucose. *Stud. Cercet. Endocrinol* 14, 651–655 (1963b)
- MILCU, I., NANU, L., MARCEAN, R., and SITARU, S.: Research on the diabetogenic effects of epiphysectomy in the Lamb. *Stud. Cercet. Endocrinol* 15, 507–513 (1964b)
- MILCU, I., NANU, L., MARCEAN, R., et IONESCU, V.: Efectul epifizectomiei asupra metabolismului glucidici. Studii pe sobolan. *Stud. Cercet. Endocrinol* 16, 17–24 (1965)
- MILCU, S. M.: Epifiza, glanda endocrina. Bucuresti: Ed. Academiei 1957
- MILCU, S. M.: Role de l'épiphyse dans le metabolisme glucidique. *J. Annu. Diabetol. Hotel Dieu* 9, 163–180 (1968)
- MILCU, S. M., und MILCU, I.: Über ein hypoglykämisch wirkendes Hormon in der Zirbeldrüse. *Medizinische* 17, 711–715 (1958)
- MILCU, S. M., NANU-IONESCU, L., and MILCU, I.: The effect of pinealectomy on plasma insulin in rats. In: WOLSTENHOLME, G. E. W., and KNIGHT, J. (Eds.): *The Pineal Gland*; pp. 345–357. Edinburgh: Churchill Livingstone 1971
- MÜHLBAUER, E., and PESCHKE, E.: 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 (2007)
- MULDER, H., NAGORNY, C. L., LYSSENKO, V., and GROOP, L.: Melatonin receptors in pancreatic islets: good morning to a novel type 2 diabetes gene. *Diabetologia* 52, 1240–1249 (2009)
- MUNOZ BARRAGÁN, L., LÓPEZ GIL, J. A., TORANZO, D., BLÁZQUEZ, J. L., PIZARRO, M. D. L., PASTOR, F. E., and MOSQUEIRA, M. I.: The pineal gland: a neuroendocrine „crossroad“. In: REITER, R. J., and BLÁZQUEZ, E. (Eds.): *Proceedings of the Workshop on the Pineal Gland, Salamanca*; pp. 57–61 (1986)
- MUNOZ BARRAGÁN, L., TORANZO, D., BLÁZQUEZ, E., GHIGLIONE, M., and PASTOR, F. E.: Role of the pineal gland on insulin and glucagon release of control and diabetic rats. *Diabetes* 32, 141A (1983)
- MUNOZ BARRAGÁN, L., TORANZO, D., BLÁZQUEZ, E., PASTOR, F. E., MOSQUEIRA, M. I., LÓPEZ, J. A., and BLÁZQUEZ, J. J.: A radio-immunoanalytical and immunocytochemical study on A and B insular cells in response to pinealectomy or pineal denervation. *Diabetologia* 27, 313A (1984)
- NANU-IONESCU, L., and IONESCU, V.: The pineal gland and insulin metabolism. I. The plasma level of total insulin activity and of „free“ and „bound“ insulin in experimental apinealism. *Stud. Cercet. Endocrinol* 20, 237–243 (1969a)
- NANU-IONESCU, L., et IONESCU, V.: La glande pinéale et le métabolisme de l'insuline. I. Le niveau sanguin de l'activité insulinique totale et de l'insuline „libre“ et „liée“ dans l'apinéalisme expérimental. *Stud. Cerc. Endocr.* 20, 237–243 (1969b)
- NANU-IONESCU, L., et MARCEAN, R.: La glande pinéale et le métabolisme de l'insuline. II. Les facteurs plasmatique anti-insuliniques dans l'apinéalisme expérimental. *Rev. Roum. Endocr.* 2, 55–61 (1970)
- NANU-IONESCU, L., MARCEAN, R., IONESCU, V., et MILCU, I.: La glande pinéale et le métabolisme de l'insuline. Niveau plasmatique de l'activité insulinique „suppressible“ et „non-suppressible“ dans l'apinéalisme expérimental. *Rev. Roum. Endocr.* 7, 135–143 (1970)
- NANU, L., MARCEAN, R., IONESCU, V., and MILCOU, I.: Correlations between pineal body and pyruvemia levels. *Rev. Roum. Endocrinol.* 6, 141–147 (1969)
- NEACSU, C.: Pineal-pancreas interaction: pineal hormone E5 action on insulin activity. *Physiologie* 25, 119–127 (1988)
- NIJIMA, A., CHUN, S. J., SHIMA, T., BIZOT-ESPIARD, J. G., GUARDIOLA-LEMAITRE, B., and NAGAI, K.: Effect of intravenous administration of melatonin on the efferent activity of the adrenal nerve. *J. Auton. Nerv. Syst.* 71, 134–138 (1998)
- NONNO, R., PANNACCI, M., LUCINI, V., ANGELONI, D., FRASCHINI, F., and STANKOV, B. M.: Ligand efficacy and potency at recombinant human MT2 melatonin receptors: evidence for agonist activity of some mt1-antagonists. *Br. J. Pharmacol.* 127, 1288–1294 (1999)
- ORLOV, S. N., and MAKSIMOVA, N. V.: Efflux of cyclic adenosine monophosphate from cells: mechanisms and physiological implications. *Biochemistry (Moscow)* 64, 127–135 (1999)
- OSTENSON, C. G., HJEMDAHL, P., and EFENDIC, S.: Release of catecholamines is increased but does not contribute to the impaired insulin secretion in the perfused pancreata of diabetic rats. *Pancreas* 8, 34–38 (1993)
- PARHON, C. I.: *Congrès d'Endocrinologie de Bucarest* 1, 187 (1939)
- PARHON, C. I., POTOP, I., FELIX, E., et BOERU, V.: Influenta epifizectomiei si a administrarii de extract epifisar asupra unor data metabolice privind mineralele (Ca, K, P, Si, Mg), lipidele, protidele si glucidele, la sobolanul alb adult. *Stud. Cercet. Endocr.* 3, 321–329 (1952)
- PASKALOGLU, K., SENER, G., and AYANGOLU-DULGER, G.: Melatonin treatment protects against diabetes-induced functional and biochemical changes in rat aorta and corpus cavernosum. *Eur. J. Pharmacol.* 499, 345–354 (2004)

- PATEL, K. P., ZHANG, K., HEIN, M., and MAYHAN, W. G.: Peripheral noradrenergic turnover in streptozotocin-induced diabetic rats. *Diabetes Res. Clin. Pract.* 35, 1–9 (1997)
- PELICARI-GARCIA, R. A., MARCAL, A. C., SILVA, J. A., CARMO-BUONFIGLIO, D., AMARAL, F. G., AFECHÉ, S. C., CIPOLLA-NETO, J., and CARVALHO, C. R. O.: Insulin temporal sensitivity and its signaling pathway in the rat pineal gland. *Life Sci.* 87, 169–174 (2010)
- PESCHKE, D., PESCHKE, E., PEIL, J., and MESS, B.: Zum Einfluss von Gangliektomie (Ganglia cervicalia superiora) bei Normaltemperatur und Kälteexposition auf Leberglykogen- und Blutglukose-Tagesmuster der Wistar-Ratte unter Berücksichtigung der Epiphysis cerebri. *Acta Histochem.* 80, 159–174 (1986)
- PESCHKE, E.: Zum Einfluss von Melatonin auf Insulinsekretion, Signaltransduktion und Sekretionsrhythmus pankreatischer B-Zellen in vitro. *Abh. Sächs. Akad. Wiss. Math-nat.wiss. Kl.* 60, 89–119 (2003)
- PESCHKE, E.: Über den phylogenetischen Funktionswandel des Pinealorgans und seine Bedeutung für die Insulinsekretion bei Mammalia. *Sitzungsber. Sächs. Akad. Wiss. Math-nat.wiss. Kl.* 129 (2004)
- PESCHKE, E.: Neue Aspekte der Bedeutung von Melatonin für die Insulinsekretion. *Jahrbuch 2005. Leopoldina (R. 3)* 51, 345–354 (2006)
- PESCHKE, E.: Melatonin, endocrine pancreas and diabetes. *J. Pineal Res.* 44, 26–40 (2008)
- PESCHKE, E., and MÜHLBAUER, E.: Funktionelle Beziehungen zwischen Melatonin und Insulin – Untersuchungsergebnisse an stoffwechselgesunden und diabetischen Versuchstieren und Patienten. In: PESCHKE, E. (Ed.): *Endokrinologie III. Vorträge im Rahmen des Projektes „Zeitstrukturen endokriner Systeme“*. *Abh. Sächs. Akad. Wiss. Leipzig* 64, 103–118 (2007)
- PESCHKE, E., BACH, A. G., and MÜHLBAUER, E.: Parallel signaling pathways of melatonin in the pancreatic beta-cell. *J. Pineal Res.* 40, 184–191 (2006a)
- PESCHKE, E., FAUTECK, J. D., MUSSHOF, U., SCHMIDT, F., BECKMANN, A., and PESCHKE, D.: Evidence for a melatonin receptor within pancreatic islets of neonate rats: functional, autoradiographic, and molecular investigations. *J. Pineal Res.* 28, 156–164 (2000)
- PESCHKE, E., FRESE, T., CHANKIEWITZ, E., PESCHKE, D., PREISS, U., SCHNEYER, U., SPESSERT, R., and MÜHLBAUER, E.: 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 (2006b)
- PESCHKE, E., MÜHLBAUER, E., MUSSHOF, U., CSERNUS, V. J., CHANKIEWITZ, E., and PESCHKE, D.: Receptor (MT(1)) mediated influence of melatonin on cAMP concentration and insulin secretion of rat insulinoma cells INS-1. *J. Pineal Res.* 33, 63–71 (2002)
- PESCHKE, E., and PESCHKE, D.: Evidence for a circadian rhythm of insulin release from perfused rat pancreatic islets. *Diabetologia* 41, 1085–1092 (1998)
- PESCHKE, E., PESCHKE, D., HAMMER, T., and CSERNUS, V.: Influence of melatonin and serotonin on glucose-stimulated insulin release from perfused rat pancreatic islets in vitro. *J. Pineal Res.* 23, 156–163 (1997)
- PESCHKE, E., SCHUCHT, H., and MÜHLBAUER, E.: Long-term enteral administration of melatonin reduces plasma insulin and increases expression of pineal insulin receptors in both Wistar and type 2-diabetic Goto-Kakizaki rats. *J. Pineal Res.* 49, 373–381 (2010)
- PESCHKE, E., STUMPF, I., BAZWINSKY, I., LITVAK, L., DRALLE, H., and MÜHLBAUER, E.: Melatonin and type 2 diabetes – a possible link? *J. Pineal Res.* 42, 350–358 (2007)
- PETTIT, L., LACROIX, I., COPPET, P. DE, STROSBERG, A. D., and JOCKERS, R.: Differential signaling of human Mel1a and Mel1b melatonin receptors through the cyclic guanosine 3'-5'-monophosphate pathway. *Biochem. Pharmacol.* 58, 633–639 (1999)
- PICINATO, M. C., HABER, E. P., CARPINELLI, A. R., and CIPOLLA-NETO, J.: Daily rhythm of glucose-induced insulin secretion by isolated islets from intact and pinealectomized rat. *J. Pineal Res.* 33, 172–177 (2002a)
- PICINATO, M. C., HABER, E. P., CIPOLLA-NETO, J., CURI, R., OLIVEIRA CARVALHO, C. R. DE, and CARPINELLI, A. R.: Melatonin inhibits insulin secretion and decreases PKA levels without interfering with glucose metabolism in rat pancreatic islets. *J. Pineal Res.* 33, 156–160 (2002b)
- PICINATO, M. C., HIRATA, A. E., CIPOLLA-NETO, J., CURI, R., CARVALHO, C. R., ANHE, G. F., and CARPINELLI, A. R.: Activation of insulin and IGF-1 signaling pathways by melatonin through MT1 receptor in isolated rat pancreatic islets. *J. Pineal Res.* 44, 88–94 (2008)
- POPESCU-INOTESTI, C.: L'insuline par voie rachidienne insuline et épiglandol. *Rev. Française d'Endocr.* 2, 346–348 (1924)
- POZO, D., REITER, R. J., CALVO, J. R., and GUERRERO, J. M.: Inhibition of cerebellar nitric oxide synthase and cyclic GMP production by melatonin via complex formation with calmodulin. *J. Cell Biochem.* 65, 430–442 (1997)
- PRAKASH, P., LALORAYA, M., and KUMAR, P.: Influence of a melatonin implant on the free radical load in avian thyroid and its relation with thyroid hormonogenesis. *Biochem. Mol. Biol. Int.* 46, 1249–1258 (1998)

- PROKOPENKO, I., LANGENBERG, C., FLOREZ, J. C., SAXENA, R., SORANZO, N., THORLEIFSSON, G., LOOS, R. J., MANNING, A. K., JACKSON, A. U., AULCHENKO, Y., POTTER, S. C., ERDOS, M. R., SANNA, S., HOTTENGA, J. J., WHEELER, E., KAAKINEN, M., LYSSSENKO, V., CHEN, W. M., AHMADI, K., BECKMANN, J. S., BERGMAN, R. N., BOCHUD, M., BONNYCASTLE, L. L., BUCHANAN, T. A., CAO, A., CERVINO, A., COIN, L., COLLINS, F. S., CRISPONI, L., GEUS, E. J. DE, DEHGHAN, A., DELOUKAS, P., DONEY, A. S., ELLIOTT, P., FREIMER, N., GATEVA, V., HERDER, C., HOFMAN, A., HUGHES, T. E., HUNT, S., ILLIG, T., INOUE, M., ISOMAA, B., JOHNSON, T., KONG, A., KRESTYANINOVA, M., KUUSISTO, J., LAAKSO, M., LIM, N., LINDBLAD, U., LINDGREN, C. M., MCCANN, O. T., MOHLKE, K. L., MORRIS, A. D., NAITZA, S., ORRU, M., PALMER, C. N., POUTA, A., RANDALL, J., RATHMANN, W., SARAMIES, J., SCHEET, P., SCOTT, L. J., SCUTERI, A., SHARP, S., SIBBRANDS, E., SMIT, J. H., SONG, K., STEINTHORSDDOTTIR, V., STRINGHAM, H. M., TUOMI, T., TUOMILEHTO, J., UITTERLINDEN, A. G., VOIGHT, B. F., WATERWORTH, D., WICHMANN, H. E., WILLEMSEN, G., WITTEMAN, J. C., YUAN, X., ZHAO, J. H., ZEGGINI, E., SCHLESSINGER, D., SANDHU, M., BOOMSMA, D. I., UDA, M., SPECTOR, T. D., PENNIX, B. W., ALTSHULER, D., VOLLENWEIDER, P., JARVELIN, M. R., LAKATTA, E., WAEBER, G., FOX, C. S., PELTONEN, L., GROOP, L. C., MOOSER, V., CUPPLES, L. A., THORSTEINSDOTTIR, U., BOEHNKE, M., BARROSO, I., et al.: Variants in MTNR1B influence fasting glucose levels. *Nature Genet.* *41*, 77–81 (2009)
- QUAY, W. B., and GORRAY, K. C.: Pineal effects on metabolism and glucose homeostasis: evidence for lines of humoral mediation of pineal influences on tumor growth. *J. Neural. Transm.* *47*, 107–120 (1980)
- RAMRACHEYA, R. D., MULLER, D. S., SQUIRES, P. E., BRERETON, H., SUGDEN, D., HUANG, G. C., AMIEL, S. A., JONES, P. M., and PERSAUD, S. J.: Function and expression of melatonin receptors on human pancreatic islets. *J. Pineal Res.* *44*, 273–279 (2008)
- RASMUSSEN, D. D., BOLDT, B. M., WILKINSON, C. W., YELLON, S. M., and MATSUMOTO, A. M.: Daily melatonin administration at middle age suppresses male rat visceral fat, plasma leptin, and plasma insulin to youthful levels. *Endocrinology* *140*, 1009–1012 (1999)
- RASMUSSEN, D. D., MITTON, D. R., LARSEN, S. A., and YELLON, S. M.: Aging-dependent changes in the effect of daily melatonin supplementation on rat metabolic and behavioral responses. *J. Pineal Res.* *31*, 89–94 (2001)
- REITER, R. J.: Antioxidant actions of melatonin. *Adv. Pharmacol.* *38*, 103–117 (1997)
- REITER, R. J.: Cytoprotective properties of melatonin: presumed association with oxidative damage and aging. *Nutrition* *14*, 691–696 (1998a)
- REITER, R. J.: Oxidative damage in the central nervous system: protection by melatonin. *Prog. Neurobiol.* *56*, 359–384 (1998b)
- REITER, R. J.: Oxidative damage to nuclear DNA: amelioration by melatonin. *NEL Review. Neuro. Endocrinol. Lett.* *20*, 145–150 (1999)
- REITER, R. J., PAREDES, S. D., MANCHESTER, L. C., and TAN, D. X.: Reducing oxidative/nitrosative stress: a newly discovered genre for melatonin. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* *44*, 175–200 (2009)
- RENSING, L.: Die circadiane Rhythmik von Zellen in vitro. *Zool. Anz.* *1970*, 166–171 (1970)
- REPPERT, S. M., WEAVER, D. R., and EBISAWA, T.: Cloning and characterization of a mammalian melatonin receptor that mediates reproductive and circadian responses. *Neuron* *13*, 1177–1185 (1994)
- REPPERT, S. M., WEAVER, D. R., and GODSON, C.: Melatonin receptors step into the light: cloning and classification of subtypes. *Trends Pharmacol. Sci.* *17*, 100–102 (1996)
- REPPERT, S. M., WEAVER, D. R., CASSONE, V. M., GODSON, C., and KOLAKOWSKI, L. F., Jr.: Melatonin receptors are for the birds: molecular analysis of two receptor subtypes differentially expressed in chick brain. *Neuron* *15*, 1003–1015 (1995)
- RINDLER, K. J., BASHOR, M. M., SPITZER, N., and SAIER M. H., Jr.: Regulation of adenosine 3':5'-monophosphate efflux from animal cells. *J. Biol. Chem.* *253*, 5431–5436 (1978)
- RODRIGUEZ, V., MELLADO, C., ALVAREZ, E., DE DIEGO, J. G., and BLAZQUEZ, E.: Effect of pinealectomy on liver insulin and glucagon receptor concentrations in the rat. *J. Pineal Res.* *6*, 77–88 (1989)
- RONN, T., WEN, J., YANG, Z., LU, B., DU, Y., GROOP, L., HU, R., and LING, C.: A common variant in MTNR1B, encoding melatonin receptor 1B, is associated with type 2 diabetes and fasting plasma glucose in Han Chinese individuals. *Diabetologia* *52*, 830–833 (2009)
- ROSENBERG, P. A., KNOWLES, R., P. K. K., and LI, Y.: Beta-adrenergic receptor-mediated regulation of extracellular adenosine in cerebral cortex in culture. *J. Neurosci.* *14*, 2953–2965 (1994)
- SANDYK, R.: Weak magnetic fields antagonize the effects of melatonin on blood glucose levels in Parkinson's disease. *Int. J. Neurosci.* *68*, 85–91 (1993)
- SATAKE, N., OE, H., SAWADA, T., and SHIBATA, S.: The mode of vasorelaxing action of melatonin in rabbit aorta. *Gen. Pharmacol.* *22*, 219–221 (1991)
- SHIMA, T., CHUN, S. J., NIJIMA, A., BIZOT-ESPIARD, J. G., GUARDIOLA-LEMAITRE, B., HOSOKAWA, M., and NAGAI, K.: Melatonin suppresses hyperglycemia caused by intracerebroventricular injection of 2-deoxy-D-glucose in rats. *Neuroscience Lett.* *226*, 119–122 (1997)



- SILVA, C. L., TAMURA, E. K., MACEDO, S. M., CECON, E., BUENO-ALVES, L., FARSKY, S. H., FERREIRA, Z. S., and MARKUS, R. P.: Melatonin inhibits nitric oxide production by microvascular endothelial cells in vivo and in vitro. *Br. J. Pharmacol.* 151, 195–205 (2007)
- STAGNER, J. I., and SAMOLS, E.: Role of intrapancreatic ganglia in regulation of periodic insular secretion. *Amer. J. Physiol.* 248, E522–E530 (1985)
- STAGNER, J. I., SAMOLS, E., and WEIR, G. C.: Sustained oscillations of insulin, glucagon, and somatostatin from the isolated canine pancreas during exposure to a constant glucose concentration. *J. Clin. Invest.* 65, 939–942 (1980)
- STEFFGEN, J., ROHRBACH, S., BEERY, E., ERSOY, D., JARRY, H., METTEN, M., BORNSTEIN, S. R., MÜLLER, G. A., and BURCKHARDT, G.: Demonstration of a probenecid-inhibitable anion exchanger involved in the release of cortisol and cAMP and in the uptake of p-aminohippurate in bovine adrenocortical cells. *Cell. Physiol. Biochem.* 9, 72–80 (1999)
- STORR, M., KOPFITZ, P., SIBAIEV, A., SAUR, D., KURIAK, M., FRANCK, H., SCHUSDZIARRA, V., and ALLESCHER, H. D.: Melatonin reduces non-adrenergic, non-cholinergic relaxant neurotransmission by inhibition of nitric oxide synthase activity in the gastrointestinal tract of rodents in vitro. *J. Pineal Res.* 33, 101–108 (2002)
- STUMPF, I., BAZWINSKY, I., and PESCHKE, E.: Modulation of the cGMP signaling pathway by melatonin in pancreatic beta-cells. *J. Pineal Res.* 46, 140–147 (2009)
- STUMPF, I., MÜHLBAUER, E., and PESCHKE, E.: Involvement of the cGMP pathway in mediating the insulin-inhibitory effect of melatonin in pancreatic beta-cells. *J. Pineal Res.* 45, 318–327 (2008)
- SUDNIKOVICH, E. J., MAKSIMCHIK, Y. Z., ZABRODSKAYA, S. V., KUBYSHIN, V. L., LAPSHINA, E. A., BRYSEWSKA, M., REITER, R. J., and ZAVODNIK, I. B.: Melatonin attenuates metabolic disorders due to streptozotocin-induced diabetes in rats. *Eur. J. Pharmacol.* 569, 180–187 (2007)
- TAMURA, E. K., SILVA, C. L., and MARKUS, R. P.: Melatonin inhibits endothelial nitric oxide production in vitro. *J. Pineal Res.* 41, 267–274 (2006)
- TANNENBAUM, M. G., REITER, R. J., VAUGHAN, M. K., TROIANI, M. E., and GONZALEZ-BRITO, A.: Adrenalectomy prevents changes in rat pineal melatonin content and N-acetyltransferase activity induced by acute insulin stress. *J. Pineal Res.* 4, 395–402 (1987)
- VANECEK, J.: Cellular mechanisms of melatonin action. *Physiol. Rev.* 78, 687–721 (1998)
- VANECEK, J., and VOLLRATH, L.: Melatonin inhibits cyclic AMP and cyclic GMP accumulation in the rat pituitary. *Brain Res.* 505, 157–159 (1989)
- VESELY, D. L.: Melatonin enhances guanylate cyclase activity in a variety of tissues. *Mol. Cell. Biochem.* 35, 55–58 (1981)
- WANG, J. P., LIU, I. M., TZENG, T. F., and CHENG, J. T.: Decrease in catechol-O-methyltransferase activity in the liver of streptozotocin-induced diabetic rats. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 29, 419–422 (2002)
- WEIGLE, D. S.: Pulsatile secretion on fuel-regulatory hormones. *Diabetes* 36, 764–775 (1987)
- WINIARSKA, K., FRACZYK, T., MALINSKA, D., DROZAK, J., and BRYLA, J.: Melatonin attenuates diabetes-induced oxidative stress in rabbits. *J. Pineal Res.* 40, 168–176 (2006)
- WOLDEN-HANSON, T., MITTON, D. R., MCCANTS, R. L., YELLON, S. M., WILKINSON, C. W., MATSUMOTO, A. M., and RASMUSSEN, D. D.: Daily melatonin administration to middle-aged male rats suppresses body weight, intraabdominal adiposity, and plasma leptin and insulin independent of food intake and total body fat. *Endocrinology* 141, 487–497 (2000)

Prof. Dr. Elmar PESCHKE  
Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg  
Institut für Anatomie und Zellbiologie  
Große Steinstraße 52  
06097 Halle (Saale)  
Bundesrepublik Deutschland  
Tel.: +49 345 5571709  
Fax: +49 345 5574053  
E-Mail: elmar.peschke@medizin.uni-halle.de

## Über welche Mechanismen wirkt Melatonin protektiv gegenüber oxidativem Stress?

Rüdiger HARDELAND (Göttingen)

Mit 2 Abbildungen

### Zusammenfassung

Antioxidative Protektion durch Melatonin ist mit einer Vielzahl von Publikationen belegt. In vielen Studien wurden hohe Melatoninkonzentrationen eingesetzt, die direktes Radikalfangen erlauben, aber *in vivo* nicht anwendbar sind. Beschriebene Aufregulierungen antioxidativer Enzyme haben sich verschiedentlich als variabel, konditional oder gewebespezifisch erwiesen. Allerdings wurde wiederholt gezeigt, dass Melatonin ein hohes Verhältnis von reduziertem zu oxidiertem Glutathion begünstigt. Dies mag zum Teil über eine Regulation Glutathion-synthetisierender und -reduzierender Enzyme erklärt werden, aber auch in Beziehung zu anderweitig induzierten Verminderungen der Oxidantienbildung stehen. Antioxidative Protektion sollte sich nicht nur durch Eliminierung bereits entstandener Radikale erreichen lassen, sondern auch durch die Abschwächung radikalgenerierender Prozesse. Verschiedene Mechanismen lassen sich identifizieren, durch die Melatonin die Radikalbildung bei physiologischen Konzentrationen reduziert. Dies umfasst mehrere antiexzitatorische und antiinflammatorische Effekte, die Modulation des mitochondrialen Elektronentransports und auch die interne Koordination circadianer Rhythmen. In Modellen von Sepsis, Endotoxämie und Exzitotoxizität erscheint die Herabregulation der induzierbaren und/oder der neuronalen NO-Synthase durch Melatonin entscheidend dafür zu sein, dass Blockaden der mitochondrialen Elektronentransportkette aufgehoben werden, die ohne diese Intervention zu Elektronendissipation und folglich Radikalbildung führen.

### Abstract

Numerous publications have demonstrated antioxidative protection by melatonin, under various conditions and in different models. In quite a number of studies, high melatonin concentrations were used that allow direct scavenging of free radicals, but are inapplicable *in vivo*. Upregulations of antioxidant enzymes by melatonin have been described, but several of these effects are variable, conditional or tissue-specific. Nevertheless, melatonin was repeatedly shown to favor a high ratio of reduced/oxidized glutathione. These effects may be partially explained by a control of glutathione-synthesizing and -reducing enzymes, but might be also related to otherwise induced reductions of oxidant formation. Antioxidative protection may not only be achieved by detoxification of free radicals already formed, but also by attenuation of radical generation. Various mechanisms can be identified, by which melatonin is capable of reducing radical formation at physiological concentrations. These include various antiexcitatory and antiinflammatory effects, modulation of mitochondrial electron transport, and also the internal coordination of circadian rhythms. In models of sepsis, endotoxemia and excitotoxicity, the downregulation of inducible and/or neuronal NO synthases by melatonin seems to be crucial for preventing blockades of the mitochondrial electron transport chain that lead, without intervention, to electron leakage and, thus, radical formation.

### 1. Einleitung

Nach der Entdeckung des nicht-enzymatischen Umsatzes von Melatonin (HARDELAND et al. 1991, 1993a, b) initiierte insbesondere das *in vitro* beobachtete effiziente Fangen von Hydroxylradikalen (TAN et al. 1993) geradezu eine Flut von Arbeiten über die antioxidativen Wir-

kungen dieses Indolamins. Seither sind diese Befunde diverse Male zusammengefasst worden (z. B. REITER 1998, REITER et al. 2000, 2001, 2002, 2003, TAN et al. 2002, HARDELAND 2005).

Antioxidative Protektion durch Melatonin ist sicherlich nicht allein ein Phänomen bei Wirbeltieren und betrifft ebensowenig nur das zirkulierende Melatonin in seiner Eigenschaft als Pinealhormon. Im Säuger wird es ebenfalls in diversen anderen Organen und Zellen gebildet, wie Retina, membranöser Cochlea, Knochenmark, Gastrointestinaltrakt, Harderscher Drüse, Leukozyten, vermutlich auch der Haut und an diversen weiteren Orten (HARDELAND 1997, 2008, PANDI-PERUMAL et al. 2006, HARDELAND und POEGGELER 2008), ohne von dort unter basalen Bedingungen nennenswert in die Zirkulation abgegeben zu werden. Schon die Tatsache, dass allein die Gesamtmenge des gastrointestinalen Systems ca. 400- bis 500-mal höher ist als jene des Pinealorgans (HUETHER 1993, BUBENIK 2002), weist auf die Bedeutung des Gewebemelatonins auch im Kontext der Protektion hin. Zudem ist Melatonin außerhalb der Tiere geradezu ubiquitär verbreitet und kommt in Bakterien, einzelligen Eukaryoten diverser Taxa, Makroalgen, Pflanzen und Pilzen in z. T. sehr hohen Konzentrationen vor (HARDELAND und FUHRBERG 1996, HARDELAND 1999, HARDELAND und POEGGELER 2003, HARDELAND et al. 2007b). Antioxidative Protektion durch Melatonin mag in der Evolution eine ursprüngliche Eigenschaft darstellen, zu der weitere Funktionen später hinzugetreten sind (HARDELAND et al. 1993b, 1995, TAN et al. 2010).

Wiewohl die antioxidativen Wirkungen von Melatonin gerade bei Säugern umfangreich dokumentiert sind, müssen zwei Einschränkungen verdeutlicht werden. Zum einen sind viele der Resultate nur mit pharmakologischen Dosen erzielt worden, nicht selten gar bei Konzentrationen, die im oberen mikromolaren oder gar millimolaren Bereich liegen und bei Tieren *in vivo* nicht mehr anwendbar sind. Zum anderen sind die Interpretationen sehr oft auf das direkte Radikalfangen fokussiert, was vielleicht noch solange Sinn ergibt, wie hohe Dosen von Oxidotoxinen eine entsprechende Neutralisation der reaktiven Intermediate durch Radikalfänger erfordern, wobei dann allerdings die experimentelle Situation von einer physiologischen oder auch pathophysiologischen oft weit entfernt ist. Schon unter stöchiometrischen Gesichtspunkten vermag eine bei Wirbeltieren niederkonzentrierte Substanz wie Melatonin kaum die Quantitäten freier Radikale zu entgiften, die bei normalen Bildungsraten entstehen (HARDELAND et al. 2003a). Ausnahmen dürften allenfalls bei einigen, keineswegs allen, Melatonin synthetisierenden Organen bestehen, wie etwa der Harderschen Drüse von Nagern (HARDELAND und POEGGELER 2008), oder aber außerhalb der Wirbeltiere. Bei mehreren Dinoflagellaten (ANTOLÍN et al. 1997, FUHRBERG et al. 1997), einer Reihe von Pflanzen (CHEN et al. 2003, HARDELAND et al. 2007b) und auch manchmal wirbellosen Tieren wie etwa Scolopendern (CHEN et al. 2003) wurden Melatoninkonzentrationen gefunden, die in Einzelfällen kurzfristig bis in den millimolaren Bereich hinein reichen können.

Die antioxidativen Wirkungen von Melatonin, die zweifelsfrei auch bei physiologischen oder niedrigen pharmakologischen Dosen nachweisbar sind, bedürften demnach weiterer Erklärungen. In der Literatur sind hier vor allem Aufregulationen antioxidativer und Herabregulationen prooxidativer Enzyme ins Feld geführt worden (REITER et al. 2000, 2002, 2003). Derartige Effekte existieren bei Wirbeltieren in der Tat, doch sind sie keineswegs in allen Organen gleichermaßen ausgeprägt und oft konditional (HARDELAND et al. 2003a, HARDELAND 2005). In welchem Umfang und unter welchen Bedingungen diese Effekte von Bedeutung sein können, wird im Folgenden zu diskutieren sein.

Die somit immer noch unbefriedigenden Erklärungen der antioxidativen Schutzwirkung von Melatonin erforderten neue Interpretationen. Hieraus entwickelte sich der Gedanke, dass,

statt der Entgiftung bereits entstandener Radikale, eine Vermeidung erhöhter Radikalbildung den Schlüssel zum Verständnis darstellen könnte (HARDELAND et al. 2003a, HARDELAND 2005, 2009a).

## 2. Direktes Radikalfangen: Bedingungen und Grenzen

Die Fähigkeit von Melatonin, Hydroxylradikale ( $\bullet\text{OH}$ ), also die höchstreaktiven im Organismus gebildeten freien Radikale, effizient zu fangen, steht als chemische Eigenschaft außer Frage. Mehrere Labors haben in verschiedenen Systemen Reaktionsraten zwischen 1,2 und  $7,5 \times 10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  bestimmt (POEGGELER et al. 1994, MATUSZAK et al. 1997, STASICA et al. 1998, CHYAN et al. 1999, MAHAL et al. 1999). Diese auf den ersten Blick günstig erscheinende Eigenschaft ist jedoch keine Garantie für ein quantitativ relevantes Fangen von  $\bullet\text{OH}$  *in vivo* unter physiologischen oder moderaten pharmakologischen Bedingungen. Aufgrund seiner extrem hohen Reaktivität ist es wahrscheinlicher, dass ein  $\bullet\text{OH}$  mit einer anderen, höher als Melatonin konzentrierten Substanz reagiert. Dementsprechend liegt die Halbwertszeit von  $\bullet\text{OH}$  im Nanosekundenbereich, und folglich ist auch die Reichweite dermaßen kurz, dass sich dieses Radikal zumeist in unmittelbarer Nähe seines Entstehungsortes umsetzt. Durch die Interaktion von  $\bullet\text{OH}$  mit Reaktionspartnern entstehen jedoch in der Mehrzahl der Fälle andere freie Radikale, die organischer oder anorganischer Natur sein können. Bezüglich des Melatonins stellt sich dann die Frage, ob dieses eine hinreichende Affinität zu den sekundären Radikalen besitzt, um sie entgiften zu können. Physiologisch und pathophysiologisch dürfte dies im Falle der Carbonatradikale ( $\text{CO}_3^{\bullet-}$ ) von Bedeutung sein, welche u. a. durch Wasserstoffabstraktion seitens  $\bullet\text{OH}$  aus  $\text{HCO}_3^-$  entstehen und ebenfalls von Melatonin gefangen werden (ZHANG et al. 1998, HARDELAND et al. 2003b). Eine weitere Möglichkeit der  $\text{CO}_3^{\bullet-}$ -Bildung besteht im Zerfall des Peroxynitrit- $\text{CO}_2$ -Addukts ( $\text{ONOOCO}_2^-$ ) (ZHANG et al. 1999b, BLANCHARD et al. 2000, GUENTHER et al. 2005). Die Bedeutung von  $\text{CO}_3^{\bullet-}$  wird vermutlich viel zu wenig beachtet, obwohl diverse radikalische Umsätze durch Zugabe von  $\text{HCO}_3^-$  substanziell gesteigert werden können und  $\text{CO}_3^{\bullet-}$  in physiologische Nitrierungsreaktionen eingeschaltet sein kann (HARDELAND et al. 2009a, HARDELAND 2009b). Dieser Aspekt sowie die Antagonisierung durch Melatonin dürfte insbesondere hinsichtlich des mitochondrialen Elektronenflusses von besonderer Bedeutung sein und wird in Abschnitt 6 behandelt. Ein Beitrag dieses Indolamins zum direkten Radikalfangen in Mitochondrien mag bei pharmakologischen Dosen, etwa unter Bedingungen einer experimentellen Sepsis, von Bedeutung sein (HARDELAND 2009b).

Obwohl das direkte Radikalfangen durch Melatonin in der Literatur oft in das Zentrum der Argumentation gestellt wird, ist dessen Anteil in tierexperimentellen Modellen oft unklar und kaum jemals nach eindeutigen Kriterien erfasst. Der übliche Verweis auf die ebenfalls beschriebene Regulation anti- und prooxidativer Enzyme erscheint unzureichend und verstellt geradezu eine klare Aufarbeitung der quantitativen Verhältnisse. Der proportionale Anteil der Antagonisierung einer aufgrund mitochondrialer Dysfunktion erhöhten Radikalbildung ist nie bestimmt worden, obwohl dieser Beitrag beträchtlich sein mag. Am klarsten ist die Bedeutung des direkten Radikalfangens *in vivo* außerhalb der Tiere, und zwar bei Organismen, die Melatonin in hohen mikromolaren Konzentrationen synthetisieren. Der Dinoflagellat *Lingulodinium polyedrum* (Syn. *Gonyaulax polyedra*) wird durch hohe, aber physiologisch mögliche Melatonin-Konzentrationen vor Oxidotoxinen wie  $\text{H}_2\text{O}_2$ , Paraquat und Buthioninsulfoximin geschützt, obwohl die üblichen antioxidativen Enzyme wie Peroxidasen und Superoxidid-

mutasen durch das Indolamin nicht aufreguliert, letztere sogar herabreguliert werden (ANTOLÍN et al. 1997, HARDELAND et al. 1999, 2005, HARDELAND und COTO-MONTES 2000). Ein erheblicher Anteil des direkten Radikalfangens kann ferner bei der Verminderung von Strahlenschäden angenommen werden (SHARMA und HALDAR 2006, HUSSEIN et al. 2008, ONAL et al. 2011). Grundsätzlich dürfte das direkte Radikalfangen in vielen Untersuchungen dann von Belang gewesen sein, wenn hohe mikromolare oder gar millimolare Konzentrationen von Melatonin *in vitro* oder in Zell- bzw. Gewebekulturen eingesetzt worden sind. Deren physiologische Relevanz für Wirbeltiere sei aber dahingestellt.

### 3. Aufregulationen antioxidativer Enzyme

Die Aufregulation mehrerer antioxidativer Enzyme durch Melatonin ist wiederholt in der Literatur zusammengefasst worden (REITER et al. 2003, HARDELAND und PANDI-PERUMAL 2005, HARDELAND 2005, PANDI-PERUMAL et al. 2006, HARDELAND und PÖGGELER 2008). Dieses wurde für Glutathionperoxidase, Glutathionreductase,  $\gamma$ -Glutamylcysteinsynthase, Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase, Haemoperoxidase/Catalase sowie Cu, Zn- und Mn-Superoxiddismutasen beschrieben. Die Relevanz dieser Befunde wird vermutlich oft überschätzt. Die Erhöhungen insbesondere von Haemoperoxidase/Catalase sowie den Superoxiddismutasen haben sich des Öfteren als konditional, gewebeabhängig oder nur schwach ausgeprägt erwiesen (HARDELAND und PANDI-PERUMAL 2005, HARDELAND 2005). Oft blieben die Steigerungen im unteren Prozentbereich, wurden nicht selten nur auf der mRNA-Ebene gezeigt, besaßen ungewöhnliche Dosisabhängigkeiten oder waren hin und wieder gar nicht demonstrierbar (ANTOLÍN et al. 1996, KOTLER et al. 1998, WAKATSUKI et al. 2001b, OKATANI et al. 2001, 2002b, DZIĘGIEL et al. 2003, BALKAN et al. 2004, OHTA et al. 2004, MAURIZ et al. 2007). Ausnahmsweise wurden sogar Abnahmen unter dem Einfluss von Melatonin festgestellt (GÜRDÖL et al. 2001). Selbst wenn Steigerungen auf mäßigem statistischem Niveau signifikant sind, stellt sich dennoch, auch angesichts der beobachteten Variabilität, die Frage nach der Relevanz von Erhöhungen im unteren Prozentbereich.

Einheitlicher ist die Datenlage bei der Glutathionperoxidase, welche in den meisten Untersuchungen durch Melatonin deutlich stimuliert wurde (BARLOW-WALDEN et al. 1995, HARDELAND 2005, PANDI-PERUMAL et al. 2006). Dieses Enzym und ebenso die Glutathionreductase haben gerade im Hinblick auf den Schutz von Mitochondrien durch Melatonin eine neue, sehr aktuelle Bedeutung erlangt (RODRÍGUEZ et al. 2007a, b, 2008, ACUÑA-CASTROVIEJO et al. 2007, HARDELAND und COTO-MONTES 2010). Allerdings sind selbst für die Glutathionperoxidase Ausnahmen bekannt geworden. Nur in der Leber älterer, nicht aber junger Ratten wurde das Enzym auf Proteinebene stimuliert (MAURIZ et al. 2007). Im cerebralen Cortex der Maus war keine Steigerung auf mRNA-Ebene festzustellen (OLCESE et al. 2009).

Bemerkenswerterweise erwies sich Melatonin auch in all jenen Studien als protektiv, in denen die antioxidativen Enzyme nicht oder nur wenig aufreguliert worden waren. Da dies bei niedrigeren Dosen kaum durch direktes Radikalfangen erklärbar sein dürfte, mag es als Hinweis dafür gelten, dass die Schutzwirkung durch andere Mechanismen zustande gekommen sein sollte.

#### 4. Herabregulationen prooxidativer Enzyme

Die Herabregulation prooxidativer Enzyme sollte nicht einfach als eine gewissermaßen negative Variante der Aufregulation antioxidativer Enzyme aufgefasst werden. Hierbei ist gemäß Nachweislage und vor allem aber auch der Bedeutung im pathophysiologischen Kontext eine prinzipielle Unterscheidung zwischen Lipoxygenasen und NO-Synthasen zu treffen.

Herabregulationen wurden sowohl für die 5- (CARLBERG und WIESENBERG 1995, STEINHILBER et al. 1995, UZ und MANEV 1998, MANEV et al. 1998) als auch die 12-Lipoxygenase (ZHANG et al. 1999a) beschrieben. Im Falle der 5-Lipoxygenase wurde dies durch eine Wirkung über den nukleären Rezeptor ROR $\alpha$  erklärt. Vor kurzem wurde jedoch für mehrere Leukozytenlinien gezeigt, dass Melatonin die 5-Lipoxygenase stattdessen aufregulieren kann und dadurch prooxidativ wirkt, Effekte, die einem Calmodulin-abhängigen Signalweg zugeschrieben wurden (RADOGNA et al. 2009b).

Während die pro- versus antioxidative Bilanz der Lipoxygenaseregulation zu klären bleibt, besteht wesentlich größere Klarheit hinsichtlich der Herabregulation zweier NO-Synthasen, der neuronalen (nNOS) und der induzierbaren (iNOS). Im Gegensatz hierzu wird das endotheliale Isoenzym (eNOS) von Melatonin nur wenig bzw. allenfalls indirekt beeinflusst (WANG et al. 2005, PARK, S. W., et al. 2007, KOH 2008, SÖNMEZ et al. 2009). Den Effekten auf nNOS und iNOS sei jedoch vorweg geschickt, dass diese zwar schon bei physiologischen und niedrigen pharmakologischen Konzentrationen von Melatonin zu beobachten sind, aber andererseits basale oder leicht erhöhte Raten der NO-Bildung offenbar noch nicht hemmen. So wird der die neuronale Aktivität im Gehirn reflektierende circadiane Rhythmus der cerebralen NO-Metabolite bei der Ratte durch das hierzu parallel oszillierende Melatonin keineswegs unterdrückt (CLÉMENT et al. 2003, HARDELAND et al. 2003a). Dies erscheint insofern als wichtig, als zum einen die normale NO-vermittelte Kommunikation im ZNS nicht unterbrochen werden sollte, zum anderen aber auch, weil NO in basalen oder leicht erhöhten Konzentrationen den mitochondrialen Elektronenfluss positiv beeinflusst und sogar antioxidativ wirkt (ROBB und CONNOR 2002, SAITO et al. 2005, BANERJEE et al. 2008, HARDELAND 2009a). Die Herabregulation von nNOS und iNOS ist demnach als ein Begrenzungsmechanismus anzusehen, welcher überhöhte NO-Spiegel verhindert, die zu Ca<sup>2+</sup>-Überladung, neuronaler Exzitotoxizität, mitochondrialen Blockaden und Schäden durch sekundär gebildete freie Radikale führen (HARDELAND 2009a, b, HARDELAND et al. 2009a).

Die Herabregulation der nNOS beruht offenbar vor allem auf einer Hemmung des Enzyms, wobei Effekte über Calmodulin eine Rolle spielen mögen (LEÓN et al. 2000, 2006, ACUÑA-CASTROVIEJO et al. 2005, ENTRENA et al. 2005). Eine entsprechende Wirkung wurde in diesen Arbeiten ferner durch den Melatonin-Metaboliten N<sup>1</sup>-Acetyl-5-methoxykynuramin (AMK) erzielt. Obwohl die Inhibition bereits ab 10<sup>-11</sup> M nachweisbar und damit potenter als jene von Melatonin war, ist die physiologische Rolle von AMK bei Wirbeltieren unbekannt. Pharmakologische Effekte hingegen sind für AMK beschrieben (HARDELAND et al. 2009b).

Die Herabregulation der iNOS durch Melatonin stellt demgegenüber einen Effekt auf der Expressionsebene dar, wobei sich insbesondere eine mitochondriale Subform (mt-iNOS) als wichtig erwiesen hat, welche vermutlich ihr Lokalisationssignal durch Proteinmodifikation erhält (LÓPEZ et al. 2006a, b, ESCAMES et al. 2006a, b, 2007, LÓPEZ et al. 2009, TAPIAS et al. 2009). Die mitochondriale Variante fehlt bei iNOS-Knockouts. Melatonin antagonisiert effizient die inflammatorische ebenso wie die exzitotoxische Aufregulation von iNOS bzw. mt-iNOS bei Leukozyten einschließlich Mikroglia bzw. bei Astrozyten (TAPIAS et al. 2009,

HARDELAND und COTO-MONTES 2010). Auch im Fall der iNOS ist eine entsprechende Hemmung durch den Melatoninmetaboliten AMK beobachtet worden (TAPIAS et al. 2009). Der Begrenzung der Aktivitäten von iNOS und nNOS kommt eine besondere Bedeutung für die Aufrechterhaltung des mitochondrialen Elektronenflusses zu (siehe Abschnitt 6).

### 5. Das Konzept der Radikalvermeidung und seine verschiedenen Ebenen

Der Grundgedanke, dass die Vermeidung übermäßiger Radikalbildung mehr zur antioxidativen Protektion beitragen könnte als das Fangen bereits gebildeter Radikale (HARDELAND et al. 2003a, HARDELAND 2005, 2009a), bietet im Falle des Melatonins eine Vielzahl von Ansatzpunkten für Erklärungen von beobachteten Effekten (Abb. 1).

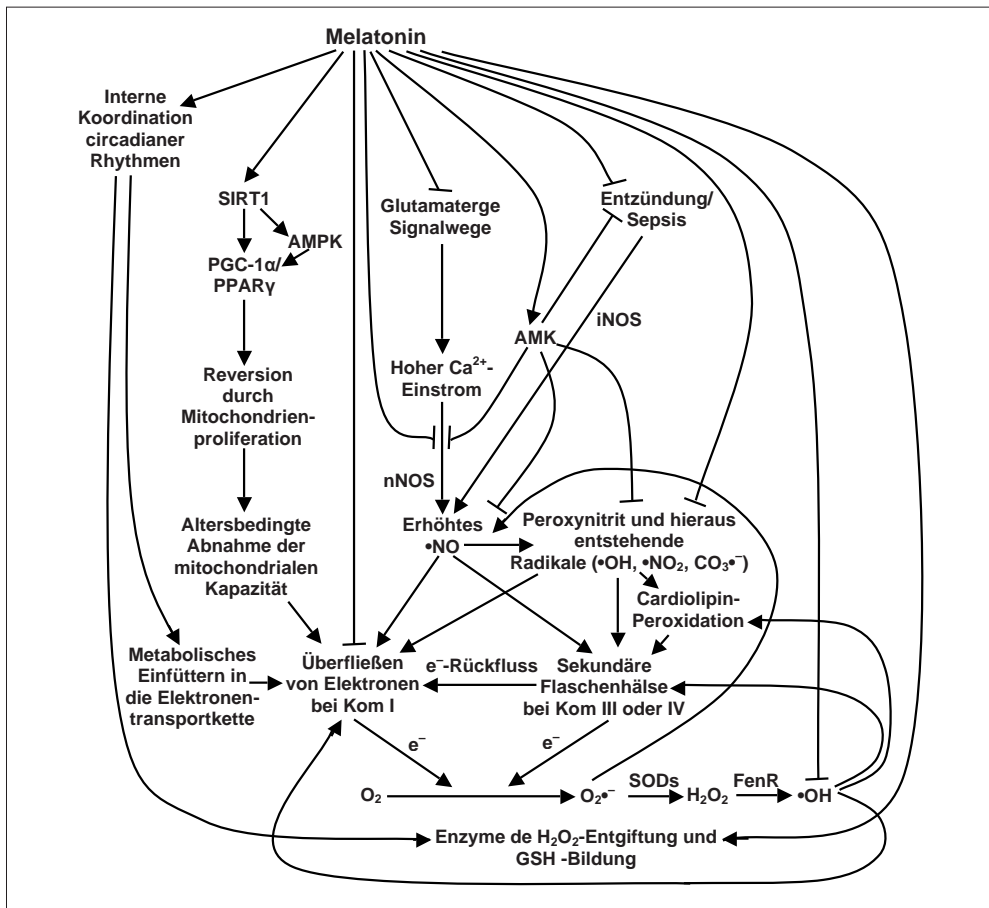


Abb. 1 Überblick über radikalvermeidende Effekte von Melatonin, insbesondere auf mitochondrialer Ebene. Abkürzungen: AMK, *N*<sup>1</sup>-Acetyl-5-methoxykynuramin; AMPK, AMP-aktivierte Proteinkinase; FenR, Fenton-Reaktion; iNOS, induzierbare NO-Synthase; Kom, Komplex (der Atmungskette); nNOS, neuronale NO-Synthase; PGC-1 $\alpha$ , Peroxisomenproliferator-aktivierter Rezeptor- $\gamma$  Coactivator-1 $\alpha$ ; PPAR $\gamma$ , Peroxisomenproliferator-aktivierter Rezeptor- $\gamma$ ; SODs, Superoxiddismutasen.

Die Radikalvermeidung mag bereits auf der chronobiologischen Ebene einsetzen, auf der Melatonin eine synchronisierende Rolle spielt. Dies geht über die bekannte Rückkopplung auf den circadianen Schrittmacher, den Suprachiasmatischen Nucleus (SCN), und die dort ansetzenden phasenverschiebenden Wirkungen (LIU et al. 1997, JIN et al. 2003, KORF und VON GALL 2006) weit hinaus und betrifft ebenso periphere circadiane Oszillatoren, ferner die Phasenbeziehungen zellulärer Paralleloszillatoren, die auf der alternativen Verwendung verschiedener, einander substituierender Uhrengene beruhen. Melatonin wird offensichtlich bereits für die Aufrechterhaltung peripherer circadianer Schwingungen benötigt. So zeigen in der Nebennierenrinde Melatonin-defizienter Mäuse die zum zellulären Kernoszillator gehörenden Proteine PER1, CRY2 und BMAL1 keine nennenswerten Amplituden, während sie bei Melatonin-profizienten Mäusen robuste Rhythmen aufweisen (TORRES-FARFAN et al. 2006). Wirkungen auf zelluläre Paralleloszillatoren wurden im SCN der Ratte gefunden (AGEZ et al. 2009). Obwohl die direkten Effekte von Melatonin auf die Expression von Uhren-Genen im SCN meist als gering eingeschätzt werden, führte Pinealektomie zu einer abnormalen Phasenbeziehung zwischen *Per1* und *Per2* der beiden betreffenden Paralleloszillatoren, was durch Verabreichung von Melatonin revertiert werden konnte. Dass korrekte interne und externe Phasenbeziehungen circadianer Rhythmen für die Vermeidung von Schäden durch freie Radikale von Bedeutung sind, deuten Experimente an Mutanten von Uhren-Genen bei so unterschiedlichen Organismen wie *Drosophila* und Goldhamster an. Sowohl kurzperiodige (*Per<sup>S</sup>*) als auch arrhythmische (*Per<sup>0</sup>*) Mutanten der Taufliege zeigten erhöhte oxidative Schäden (COTO-MONTES und HARDELAND 1997, 1999), ebenso wie die kurzperiodige Hamstermutante *Tau* (COTO-MONTES et al. 2001), bei der die oxidativ besonders vulnerable Hardersche Drüse untersucht worden war.

Eine weitere Ebene der Radikalvermeidung besteht im Zentralnervensystem, aber auch bei anderen erregbaren Zellen, in der Antagonisierung von Überexzitation bzw. Exzitotoxizität. Melatonin verfügt über diverse antiexzitorische Effekte, die je nach Zelltyp variieren. Sie stehen oft in Beziehung zu den über die Schlafförderung hinausgehenden sedierenden, den antikonvulsiven, antihyperalgesiven, antinozizeptiven und vielleicht auch anxiolytischen Wirkungen (HARDELAND und PÖEGGELER 2008). Zusätzlich zu der bereits erwähnten Hemmung der nNOS und der Herabregulation der mikroglialen und astrozytären iNOS sind Modulationen von GABA<sub>A</sub>- (PRADA et al. 2005) und Glutamatrezeptoren (MUÑOZ-HOYOS et al. 1998, ESCAMES et al. 2004, MOLINA-CARBALLO et al. 2007), insbesondere des metabotropen Rezeptors GRM3 (= mGlu<sub>3</sub>) (PRADA und UDIN 2005), Effekte auf K<sup>+</sup>-Ströme (LIU et al. 2007) und Potenzierung Strychnin-sensitiver Glycin-induzierter Ströme (ZHANG et al. 2007, ZHAO et al. 2010) beschrieben worden, die an den jeweiligen Wirkorten die Erregung herabsetzen. Typischerweise sind diese Effekte mit Erniedrigungen der zytosolischen Ca<sup>2+</sup>-Konzentration verbunden, was u. a. auch einer Ca<sup>2+</sup>-Überladung der Mitochondrien und damit dem Zusammenbrechen des mitochondrialen Membranpotentials ( $\Delta\Psi_m$ ) entgegenwirkt. Ein hiermit verbundener unbeeinträchtigter Elektronenfluss vermeidet eine erhöhte Elektronendissipation in der Atmungskette und somit eine vermehrte Radikalbildung. Eine besondere Bedeutung in diesem Geschehen kommt hierbei der Begrenzung der Synthese von NO und hieraus hervorgehenden reaktiven Intermediaten zu (siehe Abschnitt 6).

In entsprechender Weise vermag Melatonin durch antiinflammatorische Effekte zur Radikalvermeidung beizutragen. Es sei jedoch darauf hingewiesen, dass Melatonin nicht grundsätzlich entzündungshemmend wirkt. Bei Monozyten und von diesen abgeleiteten Zelllinien löst es direkt die Freisetzung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) aus (MORREY et al. 1994, CRISTOFANON et al. 2009, RADOGNA et al. 2009a). Darüber hinaus stimuliert es die Sekretion



proinflammatorischer Cytokine wie IL-1, IL-6, IL-12, TNF $\alpha$  und IFN $\gamma$  durch Monozyten und T-Helfer-Zellen (GARCÍA-MAURIÑO et al. 1997, 1998, 1999, BARJAVEL et al. 1998, GUERRERO et al. 2000). Dem gegenüber steht eine Reihe antiinflammatorischer Effekte. In Experimenten mit bakteriellem Lipopolysaccharid (LPS) wurden wiederholt Entzündungshemmungen erzielt (REITER et al. 1998, PERIANAYAGAM et al. 2005, LEE, Y. D., et al. 2009), bei denen im Gegensatz zu den eben genannten Befunden TNF $\alpha$  herabreguliert wurde (FJAERLI et al. 1999, BAYKAL et al. 2000, PERIANAYAGAM et al. 2005, SHANG et al. 2009). Eine Hemmung der TNF $\alpha$ -Freisetzung wurde auch für Mastzellen angenommen (MALDONADO et al. 2010). Ferner hemmte Melatonin die LPS-induzierte Freisetzung von CC-Chemokinen (PARK, H. J., et al. 2007). Ein weiterer antiinflammatorischer Effekt betrifft die Herabregulation der Cyclooxygenase 2 (COX-2) bei Makrophagen (MAYO et al. 2005, DENG et al. 2006), was bislang jedoch nur bei sehr hohen Konzentrationen untersucht wurde. In der Lunge von Ratten wurden Hemmungen der COX-2-Expression *in vivo* nach pharmakologischen Melatonin Dosen gefunden (CUZZOCREA et al. 1999). Bei kultivierten Brustkrebszellen wurde hingegen eine Unterdrückung der Expression von COX-1 und COX-2 auf mRNA-Ebene schon bei 1 nM Melatonin gezeigt (MARTÍNEZ-CAMPA et al. 2009). Bei Makrophagen wurde eine Herabregulation von COX-2 auch für die Melatonin-Metaboliten *N*<sup>1</sup>-Acetyl-*N*<sup>2</sup>-formyl-5-methoxykynuramin (AFMK) und AMK beschrieben (MAYO et al. 2005). Zusätzlich zur Erniedrigung der COX-2-Expression ist für AMK eine Inhibition der Cyclooxygenase auf Enzymebene bekannt, die jene durch Acetylsalicylsäure (Aspirin) deutlich übertrifft, jedoch zum Zeitpunkt der Beschreibung nicht hinsichtlich der Isoenzyme untersucht wurde (KELLY et al. 1984). Ob und in welchem Umfang die Effekte der Kynuramine von Relevanz unter physiologischen Bedingungen oder nach pharmakologischer Gabe von Melatonin sind, ist noch unbekannt. Über die Bildung von Prostaglandinen hinaus besteht ein Antagonismus von Melatonin auch gegenüber Wirkungen von PGE<sub>2</sub>, dessen Hemmung der IL-2-Produktion von dem Indolamin blockiert wird (CARRILLO-VICO et al. 2003). Ob sich dieser Antagonismus auch auf weitere Effekte von PGE<sub>2</sub> im inflammatorischen Kontext erstreckt, wäre von großem Interesse, ist jedoch nicht untersucht. Die stärksten antiinflammatorischen Wirkungen von Melatonin, die in den extremen Entzündungsmodellen von Endotoxämie oder Coecalligatur/Punktion offenkundig wurden, betreffen jedoch die Herabregulation der iNOS, mit der äußerst wichtigen Folge einer substanziellen Protektion der Mitochondrien.

## 6. Direkte und indirekte mitochondriale Effekte von Melatonin im Dienste der Radikalvermeidung

Um die Rolle von Melatonin auf mitochondrialer Ebene zu verstehen, bedarf es einer Erörterung der Ursachen der Radikalbildung in diesen Organellen sowie der, im kybernetischen Sinne, positiven Rückkopplungsmechanismen, die zu einem dramatischen Ansteigen solcher Prozesse führen können. Die Entstehung mitochondrialer Dysfunktion ist in mehrfacher Hinsicht bedeutsam. Nach heutiger Kenntnis ist eine beachtenswerte Zahl von Krankheiten hiermit verbunden, was zu der zugespitzten Bezeichnung als „powerhouse of disease“ (LANE 2006) geführt hat. Abgesehen von erblich bedingten Ursachen sind es vor allem altersassoziierte neurodegenerative Erkrankungen und Vorgänge des Alterns selbst, die ein Versagen mitochondrialer Funktionen mit sich bringen, die erhöhte Radikalbildung nach sich ziehen und in Mitophagie, mitochondriale Verarmung der Zellen, verminderte Energieeffizienz und Apoptose münden können.

Häufig beginnt die Beeinträchtigung der mitochondrialen Aktivität mit partiellen Blockaden des Elektronenflusses innerhalb der Atmungskette, wodurch der Elektronendissipation Vorschub geleistet wird und die auf molekularen Sauerstoff übertragenen Elektronen zur Bildung von Superoxidanionen ( $O_2^{\bullet-}$ ) führen. Nur ein Teil dieser noch eher niederreaktiven Radikale kann durch die mitochondrialen Mn- und die zytosolische Cu,Zn-Superoxiddismutase (Mn-SOD und Cu,Zn-SOD) eliminiert werden, vor allem deswegen, weil das von den NO-Synthasen gebildete  $\bullet NO$ , die radikalische Form der drei NO-Redoxstufen, eine ähnlich hohe Affinität wie die SODs zu  $O_2^{\bullet-}$  besitzt. Wieviel  $O_2^{\bullet-}$  durch die SODs zu  $O_2$  und  $H_2O_2$  umgewandelt wird, hängt folglich von den Bildungsraten beider Radikale ab. Wichtiger aber als die bloße Verminderung der  $O_2^{\bullet-}$ -Konzentration ist jedoch eine durch Reduktion der  $\bullet NO$ -Synthese mögliche Minimierung der Kombination der beiden Radikale (Abb. 2), denn das Addukt, Peroxynitrit ( $ONOO^-$ ), stellt nicht nur eine sehr reaktive Substanz dar, sondern auch eine Quelle höherreaktiver und mitochondrientoxischer Radikale. Protonierung von Peroxynitrit zur undissoziierten Säure ( $ONOOH$ ) wird von deren schnellem Zerfall zu  $\bullet OH$  und Stickstoffdioxid ( $\bullet NO_2$ ) gefolgt. Eine zweite Möglichkeit besteht in der Bildung des bereits oben erwähnten  $CO_2$ -Addukts,  $ONOCO_2^-$ , welches entsprechend in  $CO_3^{\bullet-}$  und  $\bullet NO_2$  zerfällt (SQUADRITO und PRYOR 1998, DUCROCQ et al. 1999, GUENTHER et al. 2005, HARDELAND 2009a, b, HARDELAND et al. 2009a). Angesichts der mitochondrialen  $CO_2$ -Bildung ist dieser zweite Weg begünstigt.

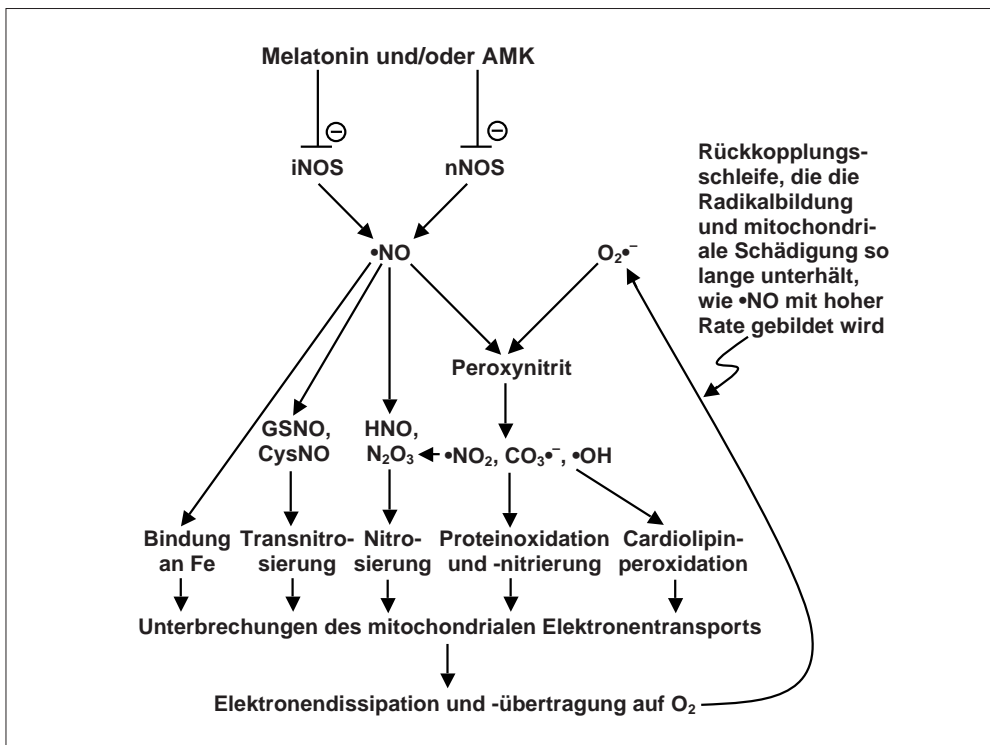


Abb. 2 Mechanismen der bei hoher  $\bullet NO$ -Syntheserate fortschreitenden Schädigung der Mitochondrien, mit der Folge verstärkter Radikalbildung, sowie die Unterbrechung bzw. Verhinderung dieses *Circulus vitiosus* durch Herabregulation von iNOS und nNOS durch Melatonin und seinen Metaboliten AMK. Abkürzungen: GSNO, S-Nitrosoglutathion; CysNO, S-Nitrosocystein; weitere Abkürzungen wie in Abb. 1.

Trotz der bereits erwähnten Tatsache, dass moderat erhöhte •NO-Konzentrationen eher das Funktionieren der Atmungskette begünstigen (Zusammenfassung bei HARDELAND 2009a), führen hohe Bildungsraten von •NO, wie sie bei Exzitotoxizität und schweren Entzündungsreaktionen auftreten, zu gravierenden mitochondrialen Dysfunktionen. Unter extremen Bedingungen wie etwa Sepsis können •NO und seine reaktiven Metabolite die Atmung nahezu vollständig blockieren (DUNGEL et al. 2008).

Die oxidierenden Radikale, •OH und  $\text{CO}_3^{\bullet-}$ , vermögen u. a. Proteine der Atmungskette zu modifizieren und Lipidperoxidation einzuleiten. Hierbei ist die Peroxidation von Cardiolipin insofern von besonderer Bedeutung, als dieses Lipid der inneren Mitochondrienmembran für die strukturelle Integrität der Komplexe III und IV der Atmungskette erforderlich ist (KLINGEN et al. 2007, LESNEFSKY und HOPPEL 2008, LESNEFSKY et al. 2009, WENZ et al. 2009). Möglicherweise besitzt Cardiolipin eine zusätzliche Bedeutung für Komplex I (PETROSILLO et al. 2009). Insbesondere die Kombination von  $\text{CO}_3^{\bullet-}$  and •NO<sub>2</sub> stellt ein physiologisches Nitrierungsgemisch dar (ZHANG et al. 2000, KALYANARAMAN et al. 2001, GUENTHER et al. 2005, HARDELAND et al. 2009a), wiewohl die klassische Nitrierung nicht-radikalischer Natur ist. Bevorzugt werden hierdurch strukturell zugängliche Tyrosylreste nitriert, was sich in den Mitochondrien dramatisch auswirken kann. Nach Ischämie/Reperfusion am Herzen wurden 23 Tyrosin-nitrierte Proteine identifiziert, von denen allein 10 mitochondrial lokalisiert waren (LIU et al. 2009). Unter solchen Bedingungen stark erhöhter •NO-Synthese waren mehrere Untereinheiten der Komplexe I und III betroffen, ebenso wie die  $\alpha$ -Untereinheit der ATP-Synthase (LIU et al. 2009, LEE, H. M., et al. 2009). In anderen Modellen wurde eine Tyrosin-Nitrierung der Untereinheit NDUF8 von Komplex I (DAVIS et al. 2010), der Fp-Untereinheit von Komplex II (CHEN et al. 2008, DAVIS et al. 2010), der mitochondrialen Creatin-Kinase, der Dihydrolipoamid-Dehydrogenase sowie des spannungsabhängigen Anionenkanals VDAC1 beschrieben (DAVIS et al. 2010).

Über die nitrierenden und oxidierenden Effekte der Peroxynitritmetabolite hinaus trägt bereits das wesentlich weniger reaktive •NO zu Blockaden der Atmungskette bei. Als Eisenligand vermag es an Eisenatome der Atmungskette in Hämen und Eisen-Schwefel-Clustern zu binden (Abb. 2). Darüber hinaus sind alle drei Redoxstufen des NO über unterschiedliche Mechanismen zu nitrosieren imstande (HARDELAND et al. 2007a), was in den Mitochondrien insbesondere Sulfhydrylgruppen von Proteinen betrifft (HARDELAND 2009a, HARDELAND et al. 2009a). Die ionischen Redoxstufen können durch verschiedene Interkonversionen von Stickstoffmetaboliten, u. a. auch durch Dismutation von zwei •NO zu NO<sup>+</sup> und NO<sup>-</sup> (bei physiologischem pH protoniert zu HNO) als Nebenreaktion der mitochondrialen Mn-SOD (FILIPOVIĆ et al. 2007) entstehen. Nitrosierung ist ferner möglich durch kombinierte Wirkungen von Elektronen-abstrahierenden Radikalen und •NO, durch das •NO/•NO<sub>2</sub>-Addukt N<sub>2</sub>O<sub>3</sub> oder durch Transnitrosierungsreaktionen von S-Nitrosothiolen, wie S-Nitrosoglutathion und S-Nitrosocystein (Abb. 2), die bei hohen Bildungsraten von •NO entstehen (HARDELAND 2009a, HARDELAND et al. 2009a). Transnitrosierung von Proteinthiolen ist bei respirasomalen Untereinheiten gezeigt worden, insbesondere in Komplex I, mit der Folge erhöhter Elektronendissipation (BROWN und BAL-PRICE 2003, DAHM et al. 2006). Nitrosierung wurde auch für das Nitrosodioxy-Radikal (ONOO•), das Radikal-Analog des Peroxynitrits, diskutiert (BLANCHARD et al. 2000), doch ist dies bislang noch nicht für respirasomale Proteine gezeigt.

Diese kurze Zusammenfassung der möglichen Reaktionen von •NO und seinen Metaboliten zeigt, in wie vielfältiger, aber auch profunder Weise eine stark erhöhte •NO-Bildung über Koordination an Eisen, Nitrosierungs-, Nitrierungs- und Oxidationsvorgänge die Funktion der

Mitochondrien beeinträchtigen kann. Zugleich wird hierdurch klar, welche Bedeutung einer Herabregulation von iNOS und nNOS durch Melatonin zukommt. Diese Annahme wird eindrucksvoll durch Befunde unterstützt, die zeigen, dass nicht nur Melatonin, sondern auch – im inflammatorischen Kontext – ein *Knockout* der iNOS die Mitochondrien substantiell zu schützen vermag (LÓPEZ et al. 2006a, b, ESCAMES et al. 2006a, b, 2007, LÓPEZ et al. 2009, TAPIAS et al. 2009). Insgesamt zeigen Arbeiten an Modellen von Exzitotoxizität, Hirnschädigung, Endotoxämie und Sepsis in bemerkenswerter Konsistenz, dass Melatonin die Morphologie von Mitochondrien schützt, oxidativen Stress erniedrigt, die Hemmung der Komplexe I, III und IV, manchmal auch von Komplex II, verhindert oder mindert, das Verhältnis von reduziertem zu oxidiertem Glutathion aufrecht erhält, die mitochondriale Energie-Effizienz und die ATP-Synthese begünstigt (WAKATSUKI et al. 2001a, b, ACUÑA-CASTROVIEJO et al. 2002, 2003, 2005, 2007, KHALDY et al. 2003, ESCAMES et al. 2003, 2006a, b, 2007, LÓPEZ, L. C., et al. 2006a, b, LÓPEZ, A., et al. 2009, MA et al. 2009, TAPIAS et al. 2009).

An dieser Stelle ergibt sich die prinzipielle Frage nach der Beziehung zwischen mitochondrialer Funktion bzw. Dysfunktion und der Radikalbildung in diesem Organell. Die klassische Sichtweise setzt die Elektronendissipation in Beziehung zu den Atmungszuständen, z. B. Übergängen zwischen Zustand 3 und 4. Obwohl diese Sichtweise für nicht-kompromittierte Zellen eine gewisse Berechtigung besitzt, erklärt sie pathophysiologische und toxikologisch induzierte Änderungen kaum zufriedenstellend. Hierfür erscheint eine Betrachtung der partiellen Blockaden des Elektronenflusses wichtiger, welche zu sekundären Flaschenhälsen in der Elektronentransportkette führen (GENOVA et al. 2004, GONG et al. 2005, HARDELAND 2009a, b, HARDELAND et al. 2009a, HENDERSON et al. 2009, CHEN et al. 2010, DURAND et al. 2010, HARDELAND und COTO-MONTES 2010). Zunächst ist festzuhalten, dass der Elektronenfluss ohnehin keinen stetigen, nur langsam modulierten Prozess darstellt, sondern eine hochgradige Dynamik besitzt. Eine Art *Stop-and-go*-Verkehr mit intermittierendem Elektronenüberfließen und gegebenenfalls auch -rückfließen scheint bereits unter basalen Bedingungen der Realität eher zu entsprechen. Hiermit im Einklang steht die Beobachtung der sogenannten *superoxide flashes* (WANG et al. 2008, SHEU et al. 2008), pulsartigen Übertragungen von Elektronen auf molekularen Sauerstoff, die auf Diskontinuitäten im Elektronenfluss hinweisen. Unter Bedingungen von Anoxie/Reoxygenierung, einer klassischen Methode zur Generierung von oxidativem Stress, erscheinen diese Pulse der Freisetzung von  $O_2^{\bullet-}$  mit erhöhter Rate (SHEU et al. 2008).

Als Orte der Elektronendissipation sind insbesondere die Komplexe I und III der Atmungskette studiert worden. In Komplex I geschieht dies am Eisen-Schwefel-Cluster N2, welches in der sogenannten Amphipathischen Rampe lokalisiert ist, einer Extrusion des Komplexes in den Matrixraum (GENOVA et al. 2001, 2004, LENAZ et al. 2002, 2006, OHNISHI et al. 2005). Aufgrund dieser Lokalisation erscheint das hier gebildete  $O_2^{\bullet-}$  primär in der Matrix. Hingegen wird  $O_2^{\bullet-}$  von Komplex III nach beiden Seiten der inneren Membran abgegeben (MIWA und BRAND 2005). Die Elektronendissipation an diesem Ort wird auf einen Elektronenstau an der Qo-Stelle zurückgeführt, welcher durch eine Unterbrechung des intramonomeren Elektronentransfers zwischen den beiden  $b_L$ -Hämen entsteht (GONG et al. 2005). Die vor kurzem berichtete Lokalisation der NAD(P)H-Oxidase 4 (Nox4) in Komplex IV (BLOCK et al. 2009) deutet an, dass  $O_2^{\bullet-}$  auch in diesem Respirasom gebildet wird. Ob Melatonin in direkter Weise auf die Aktivität von Nox4 Einfluss nimmt, ist unbekannt, so wie generell die Beziehungen zwischen Nox-Isoenzymen und dem Indolamin wenig untersucht sind. Bislang ist eine Unterdrückung der mikroglialen Radikalbildung durch Hemmung der Phosphorylierung der

Nox-Untereinheit p47 bekannt geworden (ZHOU et al. 2008), doch ist unklar, ob Entsprechendes auch für das mitochondriale Isoenzym gelten könnte.

Die durch Melatonin erzeugten, oben erwähnten Erhöhungen der Aktivitäten der Komplexe I, III und IV dürften den Unterbrechungen des Elektronenflusses entgegenwirken und somit die Bildung von  $O_2^{\bullet-}$  vermindern (HARDELAND 2009a, b, HARDELAND et al. 2009a). Wenn diese Vorstellung richtig ist, dann reduziert Melatonin in zweierlei Hinsicht die mitochondriale Radikalbildung, zum einen durch Begrenzung der  $\bullet$ NO-Synthese (Abb. 2), was die Bildung hochreaktiver Folgeprodukte reduziert, und zum anderen durch Begünstigung des Elektronenflusses. Hierdurch wird die zur immer weiter gehenden Blockade führende und sich aufschaukelnde Entstehung von  $O_2^{\bullet-}$  und Peroxynitrit unterbrochen.

An der Unterstützung des Elektronenflusses durch Melatonin dürften mehrere Prozesse beteiligt sein. Neben der Verminderung oxidativer, nitrativer und nitrosativer Schäden in der Elektronentransportkette einschließlich der Lipidumgebung ist von einer zusätzlich erhöhten Expression respirasomaler Untereinheiten auszugehen. Letzteres ist zumindest für drei Untereinheiten von Komplex IV gezeigt (ACUÑA-CASTROVIEJO et al. 2003). Neuere, noch nicht im experimentellen Detail veröffentlichte, aber bereits anderweitig zitierte (HARDELAND und PÖEGGELER 2007, HARDELAND 2009a, b, HARDELAND et al. 2009a) Befunde (PÖEGGELER und PAPPOLLA, unveröff.) zeigen eine weitere Möglichkeit auf. Hiernach existiert in Komplex I eine hochaffine Bindungsstelle für Melatonin ( $K_i = 150$  pM), die, gemäß Konkurrenz mit regionspezifischen Liganden in der Amphipathischen Rampe, in der Nähe des Eisen-Schwefel-Clusters N2 liegen müsste. Dies könnte bedeuten, dass Melatonin an jenem Ort, d. h. am Eingang in den Stoffwechselweg, an der Regulation der Elektronenflussrate direkt beteiligt ist.

## **7. Die Bedeutung antioxidativer Protektion durch Melatonin für das Altern und altersassoziierte Erkrankungen**

Vieles spricht dafür, dass die bislang erwähnten Mechanismen der antioxidativen Protektion durch Melatonin auch im gerontologischen Kontext von Bedeutung sind. Insbesondere sind all jene Prozesse, die im Zusammenhang mit den Überlegungen zur Radikalvermeidung genannt wurden, bei Vorgängen der Alterung sowie der Genese und Progression altersassoziierter Erkrankungen betroffen. Die Melatonin-Sekretion nimmt mit fortschreitendem Alter ab, entzündliche und neurodegenerative Prozesse treten vermehrt auf, und ebenso sind Funktionsverluste der Mitochondrien evident (Zusammenfassung in HARDELAND 2009a, HARDELAND und COTO-MONTES 2010).

Ob Lebensverlängerung durch Melatonin möglich ist, muss trotz derartiger Berichte zumindest als umstritten gelten (PÖEGGELER 2005). Schutz der Mitochondrien während des Alterungsprozesses wurde hingegen wiederholt beschrieben. Bei Melatonin-behandelten Nagern wird immer wieder beobachtet, dass sie auch im fortgeschrittenen Alter noch recht gesund erscheinen, keine auffälligen Skeletterkrankungen zeigen sowie ein intaktes und glänzendes Fell besitzen, was unter der Bezeichnung „Methusalem-Syndrom“ in die Literatur eingegangen ist (PÖEGGELER 2005). Gleichwohl leben die Tiere im Allgemeinen nicht nennenswert länger, zumindest dann nicht, wenn sie nicht einem vornehmlich an Krebserkrankungen sterbenden, zu meist auch Melatonin-defizienten Stamm angehören. Typischerweise sterben sie relativ plötzlich ohne äußerlich zuvor erkennbare Anzeichen von Krankheit.

Ein großer Teil der altersbezogenen Studien ist an dem Seneszenz-akzelerierten Mäusestamm SAMP8 durchgeführt worden, der im Experiment mit dem normal alternden Stamm SAMR1 verglichen werden kann, welcher denselben genetischen Hintergrund besitzt. Diverse Effekte von potentiell Wert für ein gesundes Altern wurden mehrfach beschrieben: Unterdrückungen altersabhängiger Entzündungsprozesse (RODRÍGUEZ et al. 2007c); Aufrechterhaltung der Zahl der Pyramidenzellen und der peripheren Lokalisation von Mitochondrien in der C1-Schicht des Hippocampus (CHENG et al. 2008); Verhinderung von Expressionsabnahme des Alterungssuppressorgens *Sirt1*, Stimulation der p53-Phosphorylierung, Reduktionen von Amyloid- $\beta$ -Aggregaten, Abnahme des proapoptotischen Faktors Bid, Zunahme des antiapoptotischen Faktors Bcl-x<sub>L</sub> (GUTIERREZ-CUESTA et al. 2008); Hemmung der Tau-Hyperphosphorylierung seitens der Tau-Kinase GSK3 $\beta$ , Reduktion der Spaltung des Cdk5-Aktivators p35 zum Hyperaktivator p25 (GUTIERREZ-CUESTA et al. 2007), wobei der letztere Effekt hinsichtlich der negativen Auswirkungen langanhaltender starker Aktivierungen der Gedächtnis-relevanten Kinase Cdk5 auf Langzeitpotenzierung, hippocampal gefördertes Lernen und Überleben von Neuronen von Bedeutung ist (FISCHER et al. 2005, LAFERLA und KITAZAWA 2005). Während diese Effekte durchaus indirekt mit antioxidativer Protektion in Beziehung stehen können, sind auch direkte Wirkungen von Melatonin bei SAMP8-Mäusen hinsichtlich der Reduktion von Lipidperoxidation, der oxidativen Modifikation von Proteinen (OKATANI et al. 2002b, CABALLERO et al. 2008) und DNA im Gehirn (MORIOKA et al. 1999) beschrieben worden. Die im Gehirn gezeigten Erhöhungen der Glutathion-Peroxidase mögen zu gering für eine effektive antioxidative Protektion sein (OKATANI et al. 2002b), doch waren solche Aufregulationen in Leber, Herz und Zwerchfell deutlicher ausgeprägt (OKATANI et al. 2002a, RODRÍGUEZ et al. 2007b, 2008).

Wirkungen von Melatonin auf respirasomale Aktivitäten bei SAMP8-Mäusen wurden wiederholt beschrieben, in der Leber für die Komplexe I und IV (OKATANI et al. 2002a, c, 2003), im Herzen für die Komplexe I und III, in geringerem Ausmaß für Komplex IV (RODRÍGUEZ et al. 2007a), im Gehirn für Komplex I, bei vernachlässigbaren Änderungen von Komplex III und IV (CARRETERO et al. 2009). In einer dieser Studien wurde zudem bei den SAMP8-Mäusen eine Verlängerung der mittleren Lebenszeit von ca. 18 auf 23 Monate und der maximalen Lebenszeit von ca. 24 auf 27 Monate beschrieben, während allerdings die Verlängerungen bei SAMR1 wesentlich geringer ausfielen (RODRÍGUEZ et al. 2008).

Ein weiterer, sehr aktueller alterungsbezogener Aspekt der Melatoninwirkungen, der vielversprechend erscheint, im Ausmaß seiner tatsächlichen Bedeutung aber noch nicht abgeschätzt werden kann, betrifft die Beziehung zu Sirtuinen. Mehrere Subformen dieser Deacetylasen mit Alterungssuppressorfunktion besitzen eine Beziehung zur Funktion der Mitochondrien, sind teils mitochondrial lokalisiert oder beeinflussen deren Proliferation (GUARENTE 2008, HARDELAND 2009a, HARDELAND und COTO-MONTES 2010). Inzwischen existieren mehrere Publikationen zu diesem Thema, die bislang jedoch nur die Subform SIRT1 betreffen. Diese wird durch Melatonin im Gehirn von SAMP8-Mäusen (GUTIERREZ-CUESTA et al. 2008) und in Primärkulturen von neonatalen Neuronen des Rattencerebellums (TAJES et al. 2009) aufreguliert. Im Hippocampus schlafdeprivierter Ratten verhinderte Melatonin Abnahmen von SIRT1 (CHANG et al. 2009). In den Neuronenkulturen des Cerebellums erhöhte Melatonin die Deacetylierung diverser SIRT1-Substrate wie PGC-1 $\alpha$ , FoxO1, NF $\kappa$ B und p53, Effekte, die durch den SIRT1-Inhibitor Sirtinol weitgehend revertiert wurden (TAJES et al. 2009). Auf die Beziehung zwischen Melatonin und Sirtuinen sowie den zusammenfließenden Signalwegen des Energiestoffwechsels, der antioxidativen und circadianen Kontrolle sowie jenen der Mitochondrienproliferation und der Alterungssuppressorgene hatten wir hingewiesen (HARDELAND 2009a, HARDELAND und

COTO-MONTES 2010). Insbesondere die Deacetylierung des für die Mitochondrienproliferation zentralen Faktors PGC-1 $\alpha$  deutet darauf hin, dass Melatonin *in vivo* auch die Aufrechterhaltung der mitochondrialen Stoffwechselkapazität über die mitochondriale Gesamtmasse in der Zelle unterstützt. Dies bedeutet nicht nur eine ausreichende ATP-Versorgung, sondern zugleich auch die Erhaltung einer funktionsfähigen Mitochondrienmasse, die es bei höherer Substratzufuhr nicht zu übermäßiger Elektronendissipation kommen lässt.

Zwischen Melatonin und SIRT1 mag eine weitere Querverbindung existieren, die zukünftige Aufmerksamkeit verdient und möglicherweise über das circadiane System zur Radikalvermeidung beiträgt. Für SIRT1 wurde eine Modulation der Chromatin-Remodellierung über das Protein CLK (= CLOCK) des circadianen Kernoszillators gezeigt, wodurch zumindest periphere Oszillatoren über die Interaktion des CLK/BMAL1-Komplexes beeinflusst werden (NAKAHATA et al. 2009). Dies bedeutet, dass Melatonin, der wichtigste interne nicht-photische Synchronisator, auch über SIRT1 auf die periphere circadiane Genexpression Einfluss nimmt und somit auch zur Phasenkoordination circadian regulierter Endprozesse beiträgt. Die typische altersbedingte Abnahme der nächtlichen Melatonin-Sekretion (KARASEK und REITER 2002, KARASEK 2004) dürfte folglich zu circadianen Dysregulationen führen, die vermutlich auch die Radikalbildung erhöhen (HARDELAND et al. 2003a) und inzwischen, unter expliziter Einbeziehung von SIRT1, mit altersabhängiger Krebsentstehung in Verbindung gebracht worden sind (JUNG-HYNES und AHMAD 2009).

Die Vielfalt altersbedingter Erkrankungen ist immer wieder mit Melatonindefizienz bzw. Störungen melatoninerner Signalwege assoziiert worden, so bei Diabetes Typ 2 (PESCHKE 2008, STAIGER et al. 2008, BOUATIA-NAJI et al. 2009, SPARSØ et al. 2009, LIU et al. 2010) oder neurodegenerativen Erkrankungen (REITER et al. 1998, 2002, SRINIVASAN et al. 2005, 2006), ferner mit der Abflachung circadianer Rhythmen und erhöhter Radikalbildung sowie mitochondrialer Dysfunktion, die hiermit verbunden sein können. Interessanterweise sind bei den neurodegenerativen Erkrankungen wie Morbus Alzheimer, Parkinson, Huntington und Amyotropher Lateralsklerose mitochondriale Dysfunktionen nicht nur auf der Ebene von Elektronentransport und -dissipation, oxidativen, nitrosativen und nitrativen Schäden sowie Abnahmen von  $\Delta\Psi_m$  evident, sondern zeigen sich auch in der Balance zwischen mitochondrialer Fusion und Fragmentierung, mit profunden Konsequenzen für die intrazelluläre Verteilung dieser Organellen (WANG et al. 2009a, b, SU et al. 2009). Im Verlauf der Krankheitsprogression werden die Mitochondrien typischerweise kürzer und verschwinden immer mehr aus der Zellperipherie. Diese periphere Depletion ist mit verminderter ATP-Bildung, Anstiegen der Radikalbildung und Verlust von *spines* der Neuriten verbunden (WANG et al. 2008, 2009b). Zugleich wurde bei Morbus Alzheimer eine zunehmende Herabregulation der fusionsbegünstigenden Proteine DLP1 (= Drp1), OPA1, Mfn1 und Mfn2 sowie eine Aufregulation des fragmentierungsauslösenden Fis1 beobachtet, was im Experiment auch direkt durch Überexpression von APP (= *amyloid precursor protein*) erreicht werden kann. Obwohl die Fragmentierung als eine Art Schutzmechanismus aufgefasst werden kann (JOU 2008), durch den sich geschädigte Mitochondriensegmente durch Mitophagie eliminieren lassen, führt ein solcher Prozess, wenn er sich andauernd fortsetzt, zunächst zum Verlust von Konnektivität und hernach zu neuronalem Zelltod.

Es ist verschiedentlich versucht worden, neurodegenerativen Erkrankungen durch Melatonin entgegenzuwirken (Zusammenfassung bei REITER et al. 1998, 2002, SRINIVASAN et al. 2005, 2006). Im Gegensatz zu einigen experimentellen Modellen ist der klinische Gewinn relativ beschränkt geblieben. Dies ist jedoch nicht grundsätzlich einer unzureichenden Effizienz

hinsichtlich der Radikalbildung oder einem mechanistischen Mangel von Melatonin zuzuschreiben, sondern eher der Aussichtslosigkeit, nach Diagnose einer üblicherweise schon fortgeschrittenen Krankheit die Progression noch aufhalten zu können. Bereits im transgenen Alzheimer-Mausmodell zeigt sich, dass bei frühem Einsetzen der Behandlung die Krankheitsverläufe später beginnen und verlangsamt sind (MATSUBARA et al. 2003), bei späterer Behandlung jedoch unwirksam bleiben (QUINN et al. 2005).

## **8. Ausblick**

Über welche Mechanismen Melatonin protektiv wirkt, hängt in erster Linie von den experimentellen Bedingungen ab. Direktes Radikalfangen dürfte nur bei hohen Konzentrationen des Indolamins eine Rolle spielen und somit bei Wirbeltieren allenfalls in einigen Melatonin-synthetisierenden Organen wie dem Pinealorgan selbst und, bei Nagern, der Harderschen Drüse von Bedeutung sein. Bei physiologischen oder moderat erhöhten pharmakologischen Konzentrationen dürfte die Aufregulation antioxidativer Enzyme im Einzelfall zur Protektion beitragen, doch sollte diese Annahme nicht über die Maßen generalisiert werden, was in der Literatur allerdings häufig geschehen ist. Diese Aufregulationen haben sich bei einigen Enzymen als zelltypspezifisch und oft im Ausmaß begrenzt erwiesen, so dass eine solche Rolle des Melatonins nicht von vornherein als gegeben anzusehen ist, sondern im Einzelfall geprüft werden muss. Das Kriterium sollte nicht allein die statistische Nachweisbarkeit sein, sondern zuvorderst die Höhe der Steigerung. Auch sind weder Erhöhungen auf mRNA- noch auf Protein-Ebene entscheidend, sondern die Aktivität, da im ersteren Fall posttranskriptionale Regulationsmechanismen außer Acht bleiben, im letzteren durch Western-Blot erfasste Proteinmengen auch inaktives, gegebenenfalls durch Oxidantien geschädigtes, Enzym enthalten können. Eventuell sind unter den Aufregulationen die Steigerungen im Glutathion-Stoffwechsel von größerer Bedeutung, da diese, zwar nicht immer, aber doch sehr häufig gefunden worden sind. Möglicherweise ist das Zusammenspiel der Glutathion-Peroxidase mit den Enzymen der Glutathion-Bildung und -Reduktion,  $\gamma$ -Glutamylcysteinsynthase, Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase und Glutathionreductase, für die Mitochondrien von besonderer Bedeutung. Wiederholt wurde bei Tieren unter oxidativem/nitrosativen/nitrativem Stress das Verhältnis von reduziertem zu oxidiertem Glutathion (GSH/GSSG) durch Melatonin normalisiert (LÓPEZ et al. 2006a, b, ESCAMES et al. 2006b, 2007). In welchem Umfang dies jedoch einer Aufregulation zuzuschreiben oder durch Vermeidung NO-abhängiger Blockaden mit der Folge geringeren GSH-Verbrauchs zu erklären ist, bedürfte der genauen Untersuchung.

Die Effekte von Melatonin auf prooxidative Enzyme erscheinen hingegen als bedeutsam, soweit nNOS und iNOS betroffen sind, während die Redoxbilanz bei den Lipoxygenasen überprüft werden müsste. Die Begrenzung der beiden NOS-Isoenzyme dürfte sowohl unter exzitotoxischen als auch inflammatorischen Bedingungen wesentlich zur Aufrechterhaltung des mitochondrialen Elektronentransports und zur Vermeidung erhöhter Radikalgenerierung beitragen. Ob dies auch gleichermaßen für Alterungsprozesse gilt, mag zwar aufgrund bisheriger Daten naheliegend sein und zweifellos eine attraktive Idee darstellen, bleibt jedoch genauer zu prüfen. Insbesondere in Hinblick auf ein gesundes Altern wäre die Gesamtheit all der von Melatonin beeinflussten Mechanismen, die der Radikalvermeidung dienen können oder könnten, von zukünftigem Interesse, einschließlich weiterer entzündungshemmender Effekte, antiexzitatorischer Wirkungen und auch der internen Koordination circadianer Rhythmen.



Literatur

- ACUÑA-CASTROVIEJO, D., ESCAMES, G., CARAZO, A., LEÓN, J., KHALDY, H., and REITER, R. J.: Melatonin, mitochondrial homeostasis and mitochondrial-related diseases. *Curr. Top. Med. Chem.* 2, 133–151 (2002)
- ACUÑA-CASTROVIEJO, D., ESCAMES, G., LEÓN, J., CARAZO, A., and KHALDY, H.: Mitochondrial regulation by melatonin and its metabolites. *Adv. Exp. Med. Biol.* 527, 549–557 (2003)
- ACUÑA-CASTROVIEJO, D., ESCAMES, G., LÓPEZ, L. C., HITOS, A. B., and LEÓN, J.: Melatonin and nitric oxide: two required antagonists for mitochondrial homeostasis. *Endocrine* 27, 159–168 (2005)
- ACUÑA-CASTROVIEJO, D., ESCAMES, G., RODRÍGUEZ, M. I., and LÓPEZ, L. C.: Melatonin role in the mitochondrial function. *Front. Biosci.* 12, 947–963 (2007)
- AGEZ, L., LAURENT, V., GUERRERO, H. Y., PÉVET, P., MASSON-PÉVET, M., and GAUER, F.: Endogenous melatonin provides an effective circadian message to both the suprachiasmatic nuclei and the pars tuberalis of the rat. *J. Pineal Res.* 46, 95–105 (2009)
- ANTOLÍN, I., OBST, B., BURKHARDT, S., and HARDELAND, R.: Antioxidative protection in a high-melatonin organism: The dinoflagellate *Gonyaulax polyedra* is rescued from lethal oxidative stress by strongly elevated, but physiologically possible concentrations of melatonin. *J. Pineal Res.* 23, 182–190 (1997)
- ANTOLÍN, I., RODRÍGUEZ, C., SAÍNZ, R. M., MAYO, J. C., URÍA, H., KOTLER, M. L., RODRÍGUEZ-COLUNGA, M. J., TOLIVIA, D., and MENÉNDEZ-PELÁEZ, A.: Neurohormone melatonin prevents cell damage: effect on gene expression for antioxidant enzymes. *FASEB J.* 10, 882–890 (1996)
- BALKAN, J., SENER, G., CEVIKBAŞ, U., KEYER-UYSAL, M., and UYSAL, M.: Melatonin improved the disturbances in hepatic prooxidant and antioxidant balance and hepatotoxicity induced by a high cholesterol diet in C57BL/6J mice. *Int. J. Vitam. Nutr. Res.* 74, 349–354 (2004)
- BANERJEE, R., SARAVANAN, K. S., THOMAS, B., SINDHU, K. M., and MOHANAKUMAR, K. P.: Evidence for hydroxyl radical scavenging action of nitric oxide donors in the protection against 1-methyl-4-phenylpyridinium-induced neurotoxicity in rats. *Neurochem. Res.* 33, 985–995 (2008)
- BARJAVEL, M. J., MAMDOUH, Z., RAGHBATE, N., and BAKOUCHE, O.: Differential expression of the melatonin receptor in human monocytes. *J. Immunol.* 160, 1191–1197 (1998)
- BARLOW-WALDEN, L. R., REITER, R. J., ABE, M., PABLOS, M., MENENDEZ-PELAEZ, A., CHEN, L.-D., and POEGGELER, B.: Melatonin stimulates brain glutathione peroxidase activity. *Neurochem. Int.* 26, 497–502 (1995)
- BAYKAL, A., ISKIT, A. B., HAMALOGU, E., GUC, M. O., HASCELİK, G., and SAYEK, I.: Melatonin modulates mesenteric blood flow and TNF $\alpha$  concentrations after lipopolysaccharide challenge. *Eur. J. Surg.* 166, 722–727 (2000)
- BLANCHARD, B., POMPON, D., and DUCROCQ, C.: Nitrosation of melatonin by nitric oxide and peroxynitrite. *J. Pineal Res.* 29, 184–192 (2000)
- BLOCK, K., GORIN, Y., and ABBOUD, H. E.: Subcellular localization of Nox4 and regulation in diabetes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 106, 14385–14390 (2009)
- 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, J. C., BORCH-JOHNSEN, K., HARTIKAINEN, A. L., RUOKONEN, A., TICHET, J., MARRE, M., WEILL, J., HEUDE, B., TAUBER, M., LEMAIRE, K., SCHUIT, F., ELLIOTT, P., JØRGENSEN, T., CHARPENTIER, G., HADJADI, S., CAUCHI, S., VAXILLAIRE, M., SLADER, R., VISVIKIS-SIEST, S., BALKAU, B., LÉVY-MARCHAL, C., PATTOU, F., MEYRE, D., BLAKEMORE, A. I., JARVELIN, M. R., WALLEY, A. J., HANSEN, T., DINA, C., PEDERSEN, O., and FROGUEL, P.: A variant near MTNR1B is associated with increased fasting plasma glucose levels and type 2 diabetes risk. *Nature Genet.* 41, 89–94 (2009)
- BROWN, G. C., and BAL-PRICE, A.: Inflammatory neurodegeneration mediated by nitric oxide, glutamate, and mitochondria. *Mol. Neurobiol.* 27, 325–355 (2003)
- BUBENIK, G. A.: Gastrointestinal melatonin: localization, function, and clinical relevance. *Dig. Dis. Sci.* 47, 2336–2348 (2002)
- CABALLERO, B., VEGA-NAREDO, I., SIERRA, V., HUIDOBRO-FERNÁNDEZ, C., SORIA-VALLES, C., DE GONZALO-CALVO, D., TOLIVIA, D., GUTIERREZ-CUESTA, J., PALLÀS, M., CAMINS, A., RODRÍGUEZ-COLUNGA, M. J., and COTO-MONTES, A.: Favorable effects of a prolonged treatment with melatonin on the level of oxidative damage and neurodegeneration in senescence-accelerated mice. *J. Pineal Res.* 45, 302–311 (2008)
- CARLBERG, C., and WIESENBERG, I.: The orphan receptor family RZR/ROR, melatonin and 5-lipoxygenase: an unexpected relationship. *J. Pineal Res.* 18, 171–178 (1995)
- CARRETERO, M., ESCAMES, G., LÓPEZ, L. C., VENEGAS, C., DAYOUB, J. C., GARCÍA, L., and ACUÑA-CASTROVIEJO, D.: Long-term melatonin administration protects brain mitochondria from aging. *J. Pineal Res.* 47, 192–200 (2009)
- CARRILLO-VICO, A., GARCÍA-MAURIÑO, S., CALVO, J. R., and GUERRERO, J. M.: Melatonin counteracts the inhibitory effect of PGE2 on IL-2 production in human lymphocytes via its mt1 membrane receptor. *FASEB J.* 17, 755–757 (2003)

- CHANG, H. M., WU, U. I., and LAN, C. T.: Melatonin preserves longevity protein (sirtuin 1) expression in the hippocampus of total sleep-deprived rats. *J. Pineal Res.* 47, 211–220 (2009)
- CHEN, C. L., CHEN, J., RAWALE, S., VARADHARAJ, S., KAUMAYA, P. P., ZWEIER, J. L., and CHEN, Y. R.: Protein tyrosine nitration of the flavin subunit is associated with oxidative modification of mitochondrial complex II in the post-ischemic myocardium. *J. Biol. Chem.* 283, 27991–28003 (2008)
- CHEN, G., HUO, Y., TAN, D.-X., LIANG, Z., ZHANG, W., and ZHANG, Y.: Melatonin in Chinese medicinal herbs. *Life Sci.* 73, 19–26 (2003)
- CHEN, J., CHEN, C. L., RAWALE, S., CHEN, C. A., ZWEIER, J. L., KAUMAYA, P. T., and CHEN, Y. R.: Peptide-based antibodies against glutathione-binding domains suppress superoxide production mediated by mitochondrial complex I. *J. Biol. Chem.* 285, 3168–3180 (2010)
- CHENG, S., MA, C., QU, H., FAN, W., PANG, J., and HE, H.: Differential effects of melatonin on hippocampal neurodegeneration in different aged accelerated senescence prone mouse-8. *Neuroendocrinol. Lett.* 29, 91–99 (2008)
- CHYAN, Y.-J., PÖEGGELER, B., OMAR, R. A., CHAIN, D. G., FRANGIONE, B., GHISO, J., and PAPPOLLA, M. A.: Potent neuroprotective properties against the Alzheimer  $\beta$ -amyloid by an endogenous melatonin-related indole structure, indole-3-propionic acid. *J. Biol. Chem.* 274, 21937–21942 (1999)
- CLÉMENT, P., GHARIB, A., CESPUGLIO, R., and SARDA, N.: Changes in sleep-wake cycle architecture and cortical nitric oxide release during ageing in the rat. *Neuroscience* 116, 863–870 (2003)
- COTO-MONTES, A., and HARDELAND, R.: Diurnal time patterns of protein carbonyl in *Drosophila melanogaster*: Comparison of wild-type flies and clock mutants. In: HARDELAND, R. (Ed.): *Biological Rhythms and Antioxidative Protection*; pp. 119–126. Göttingen: Cuvillier 1997
- COTO-MONTES, A., and HARDELAND, R.: Diurnal rhythm of protein carbonyl as an indicator of oxidative damage in *Drosophila melanogaster*: Influence of clock gene alleles and deficiencies in the formation of free-radical scavengers. *Biol. Rhythm Res.* 30, 383–391 (1999)
- COTO-MONTES, A., TOMÁS-ZAPICO, C., RODRÍGUEZ-COLUNGA, M. J., TOLIVIA-CADRECHA, D., MARTÍNEZ-FRAGA, J., HARDELAND, R., and TOLIVIA, D.: Effects of the circadian mutation 'tau' on the Harderian glands of Syrian hamsters. *J. Cell. Biochem.* 83, 426–434 (2001)
- CRISTOFANON, S., UGUCCIONI, F., CERELLA, C., RADOGNA, F., DICATO, M., Ghibelli, L., and DIEDERICH, M.: Intracellular prooxidant activity of melatonin induces a survival pathway involving NF- $\kappa$ B activation. *Ann. New York Acad. Sci.* 1171, 472–478 (2009)
- CUZZOCREA, S., COSTANTINO, G., MAZZON, E., and CAPUTI, A. P.: Regulation of prostaglandin production in carageenan-induced pleurisy by melatonin. *J. Pineal Res.* 27, 9–14 (1999)
- DAHM, C. C., MOORE, K., and MURPHY, M. P.: Persistent S-nitrosation of complex I and other mitochondrial membrane proteins by S-nitrosothiols but not nitric oxide or peroxynitrite: implications for the interaction of nitric oxide with mitochondria. *J. Biol. Chem.* 281, 10056–10065 (2006)
- DAVIS, C. W., HAWKINS, B. J., RAMASAMY, S., IRRINKI, K. M., CAMERON, B. A., ISLAM, K., DASWANI, V. P., DOONAN, P. J., MANEVICH, Y., and MADESH, M.: Nitration of the mitochondrial complex I subunit NDUFB8 elicits RIP1- and RIP3-mediated necrosis. *Free Radic. Biol. Med.* 48, 306–317 (2010)
- DENG, W. G., TANG, S. T., TSENG, H. P., and WU, K. K.: Melatonin suppresses macrophage cyclooxygenase-2 and inducible nitric oxide synthase expression by inhibiting p52 acetylation and binding. *Blood* 108, 518–524 (2006)
- DUCROCQ, C., BLANCHARD, B., PIGNATELLI, B., and OHSHIMA, H.: Peroxynitrite, an endogenous oxidizing and nitrating agent. *Cell Mol. Life Sci.* 55, 1068–1077 (1999)
- DUNDEL, P., MITTERMAYER, R., HAINDL, S., OSIPOV, A., WAGNER, C., REDL, H., and KOZLOV, A. V.: Illumination with blue light reactivates respiratory activity of mitochondria inhibited by nitric oxide, but not by glycerol trinitrate. *Arch. Biochem. Biophys.* 471, 109–115 (2008)
- DURAND, G., PÖEGGELER, B., ORTIAL, S., POLIDORI, A., VILLAMENA, F. A., BÖKER, J., HARDELAND, R., PAPPOLLA, M. A., and PUCCI, B.: Amphiphilic amide nitrones: a new class of protective agents acting as modifiers of mitochondrial metabolism. *J. Med. Chem.* 53, 4849–4861 (2010)
- DZIĘGIEL, P., MURAWSKA-CIAŁOWICZ, E., JETHON, Z., JANUSZEWSKA, L., PODHORSKA-OKOŁÓW, M., SUROWIAK, P., ZAWADZKI, M., RABCZYŃSKI, J., and ZABEL, M.: Melatonin stimulates the activity of protective antioxidative enzymes in myocardial cells of rats in the course of doxorubicin intoxication. *J. Pineal Res.* 35, 183–187 (2003)
- ENTRENA, A., CAMACHO, M. E., CARRIÓN, M. D., LÓPEZ-CARA, L. C., VELASCO, G., LEÓN, J., ESCAMES, G., ACUÑA-CASTROVIEJO, D., TAPIAS, V., GALLO, M. A., VIVÓ, A., and ESPINOSA, A.: Kynurenamines as neural nitric oxide synthase inhibitors. *J. Med. Chem.* 48, 8174–8181 (2005)
- ESCAMES, G., ACUÑA-CASTROVIEJO, D., LÓPEZ, L. C., TAN, D.-X., MALDONADO, M. D., SÁNCHEZ-HIDALGO, M., LEÓN, J., and REITER, R. J.: Pharmacological utility of melatonin in the treatment of septic shock: experimental and clinical evidence. *J. Pharm. Pharmacol.* 58, 1153–1165 (2006a)

- ESCAMES, G., LEÓN, J., LÓPEZ, L. C., and ACUÑA-CASTROVIEJO, D.: Mechanisms of N-methyl-D-aspartate receptor inhibition by melatonin in the rat striatum. *J. Neuroendocrinol.* *16*, 929–935 (2004)
- ESCAMES, G., LEÓN, J., MACÍAS, M., KHALDY, H., and ACUÑA-CASTROVIEJO, D.: Melatonin counteracts lipopolysaccharide-induced expression and activity of mitochondrial nitric oxide synthase in rats. *FASEB J.* *17*, 932–934 (2003)
- ESCAMES, G., LÓPEZ, L. C., ORTIZ, F., LÓPEZ, A., GARCÍA, J. A., ROS, E., and ACUÑA-CASTROVIEJO, D.: Attenuation of cardiac mitochondrial dysfunction by melatonin in septic mice. *FEBS J.* *274*, 2135–2147 (2007)
- ESCAMES, G., LÓPEZ, L. C., TAPIAS, V., UTRILLA, P., REITER, R. J., HITOS, A. B., LEÓN, J., RODRÍGUEZ, M. I., and ACUÑA-CASTROVIEJO, D.: Melatonin counteracts inducible mitochondrial nitric oxide synthase-dependent mitochondrial dysfunction in skeletal muscle of septic mice. *J. Pineal Res.* *40*, 71–78 (2006b)
- FILIPOVIĆ, M. R., STANIĆ, D. RAIČEVIĆ, S. SPASIĆ, M., and NIKETIĆ, V.: Consequences of MnSOD interactions with nitric oxide: nitric oxide dismutation and the generation of peroxynitrite and hydrogen peroxide. *Free Radic. Res.* *41*, 62–72 (2007)
- FISCHER, A., SANANBENESI, F., PANG, P. T., LU, B., and TSAI, L. H.: Opposing roles of transient and prolonged expression of p25 in synaptic plasticity and hippocampus-dependent memory. *Neuron* *48*, 825–838 (2005)
- FJAERLI, O., LUND, T., and OSTERUD, B.: The effect of melatonin on cellular activation processes in human blood. *J. Pineal Res.* *26*, 50–55 (1999)
- FUHRBERG, B., HARDELAND, R., POEGGELER, B., and BEHRMANN, G.: Dramatic rises of melatonin and 5-methoxytryptamine in *Gonyaulax* exposed to decreased temperature. *Biol. Rhythm Res.* *28*, 144–150 (1997)
- GARCÍA-MAURIÑO, S., GONZÁLEZ-HABA, M. G., CALVO, J. R., RAFII-EL-IDRISSI, M., SANCHEZ-MARGALET, V., GOBERNA, R., and GUERRERO, J. M.: Melatonin enhances IL-2, IL-6, and IFN- $\gamma$  production by human circulating CD4<sup>+</sup> cells: a possible nuclear receptor-mediated mechanism involving T helper type 1 lymphocytes and monocytes. *J. Immunol.* *159*, 574–581 (1997)
- GARCÍA-MAURIÑO, S., GONZÁLEZ-HABA, M. G., CALVO, J. R., GOBERNA, R., and GUERRERO, J. M.: Involvement of nuclear binding sites for melatonin in the regulation of IL-2 and IL-6 production by human blood mononuclear cells. *J. Neuroimmunol.* *92*, 76–84 (1998)
- GARCÍA-MAURIÑO, S., POZO, D., CARRILLO-VICO, A., CALVO, J. R., and GUERRERO, J. M.: Melatonin activates Th1 lymphocytes by increasing IL-12 production. *Life Sci.* *65*, 2143–2150 (1999)
- GENOVA, M. L., MERLO PICH, M., BERNACCHIA, A., BIANCHI, C., BIONDI, A., BOVINA, C., FALASCA, A. I., FORMIGGINI, G., PARENTI CASTELLI, G., and LENAZ, G.: The mitochondrial production of reactive oxygen species in relation to aging and pathology. *Ann. New York Acad. Sci.* *1011*, 86–100 (2004)
- GENOVA, M. L., VENTURA, B., GIULIANO, G., BOVINA, C., FORMIGGINI, G., PARENTI CASTELLI, G., and LENAZ, G.: The site of production of superoxide radical in mitochondrial Complex I is not a bound ubiquinone but presumably iron-sulfur cluster N2. *FEBS Lett.* *505*, 364–368 (2001)
- GONG, X., YU, L., XIA, D., and YU, C. A.: Evidence for electron equilibrium between the two hemes  $b_L$  in the dimeric cytochrome *bc1* complex. *J. Biol. Chem.* *280*, 9251–9257 (2005)
- GUARENTE, L.: Mitochondria – a nexus for aging, calorie restriction, and sirtuins? *Cell* *132*, 171–176 (2008)
- GUENTHER, A. L., SCHMIDT, S. I., LAATSCH, H., FOTSO, S., NESS, H., RESSMEYER, A.-R., POEGGELER, B., and HARDELAND, R.: Reactions of the melatonin metabolite AMK (*N*<sup>1</sup>-acetyl-5-methoxykynuramine) with reactive nitrogen species: Formation of novel compounds, 3-acetamidomethyl-6-methoxycinnolinone and 3-nitro-AMK. *J. Pineal Res.* *39*, 251–260 (2005)
- GUERRERO, J. M., POZO, D., GARCÍA-MAURIÑO, S., CARRILLO, A., OSUNA, C., MOLINERO, P., and CALVO, J. R.: Nuclear receptors are involved in the enhanced IL-6 production by melatonin in U937 cells. *Biol. Signals Recept.* *9*, 197–202 (2000)
- GÜRDÖL, F., GENÇ, S., ÖNER-İYIDOGAN, Y., and SÜZME, R.: Coadministration of melatonin and estradiol in rats: effects on oxidant status. *Horm. Metab. Res.* *33*, 608–611 (2001)
- GUTIERREZ-CUESTA, J., SUREDA, F. X., ROMEU, M., CANUDAS, A. M., CABALLERO, B., COTO-MONTES, A., CAMINS, A., and PALLÀS, M.: Chronic administration of melatonin reduces cerebral injury biomarkers in SAMP8. *J. Pineal Res.* *42*, 394–402 (2007)
- GUTIERREZ-CUESTA, J., TAJES, M., JIMÉNEZ, A., COTO-MONTES, A., CAMINS, A., and PALLÀS, M.: Evaluation of potential pro-survival pathways regulated by melatonin in a murine senescence model. *J. Pineal Res.* *45*, 497–505 (2008)
- HARDELAND, R.: Melatonin: Multiple functions in signaling and protection. In: ALTMAYER, P., HOFFMANN, K., and STÜCKER, M. (Eds.): *Skin Cancer and UV Radiation*; pp. 186–198. Berlin, Heidelberg: Springer 1997
- HARDELAND, R.: Melatonin and 5-methoxytryptamine in non-metazoans. *Reprod. Nutr. Dev.* *39*, 399–408 (1999)
- HARDELAND, R.: Antioxidative protection by melatonin – Multiplicity of mechanisms from radical detoxification to radical avoidance. *Endocrine* *27*, 119–130 (2005)

*Über welche Mechanismen wirkt Melatonin protektiv gegenüber oxidativem Stress?*

- HARDELAND, R.: Melatonin, hormone of darkness and more – occurrence, control mechanisms, actions and bioactive metabolites. *Cell Mol. Life Sci.* 65, 2001–2018 (2008)
- HARDELAND, R.: Neuroprotection by radical avoidance: search for suitable agents. *Molecules* 14, 5054–5102 (2009a)
- HARDELAND, R.: Melatonin, mitochondrial electron flux and leakage: recent findings and resolution of contradictory results. *Adv. Stud. Biol.* 1, 207–230 (2009b)
- HARDELAND, R., BACKHAUS, C., and FADAVI, A.: Reactions of the NO redox forms NO<sup>+</sup>, •NO and HNO (protonated NO<sup>+</sup>) with the melatonin metabolite N<sup>1</sup>-acetyl-5-methoxykynuramine. *J. Pineal Res.* 43, 382–388 (2007a)
- HARDELAND, R., BALZER, I., POEGGELER, B., FUHRBERG, B., URÍA, H., BEHRMANN, G., WOLF, R., MEYER, T. J., and REITER R. J.: On the primary functions of melatonin in evolution: Mediation of photoperiodic signals in a unicell, photooxidation and scavenging of free radicals. *J. Pineal Res.* 18, 104–111 (1995)
- HARDELAND, R., BURKHARDT, S., ANTOLÍN, I., FUHRBERG, B., and COTO-MONTES, A.: Melatonin and 5-methoxytryptamine in the bioluminescent dinoflagellate *Gonyaulax polyedra*: Restoration of the circadian glow peak after suppression of indoleamine biosynthesis or oxidative stress. *Adv. Exp. Med. Biol.* 460, 387–390 (1999)
- HARDELAND, R., and COTO-MONTES, A.: Chronobiology of oxidative stress and anti-oxidative defense mechanisms. In: PANDALAI, S. G. (Ed.): *Recent Research Developments in Comparative Biochemistry and Physiology. Vol. 1*, pp. 123–137. Trivandrum: Transworld Research Network 2000
- HARDELAND, R., and COTO-MONTES, A.: New vistas on oxidative damage and aging. *Open Biol. J.* 3, 39–52 (2010)
- HARDELAND, R., COTO-MONTES, A., and POEGGELER, B.: Circadian rhythms, oxidative stress and antioxidative defense mechanisms. *Chronobiol. Int.* 20, 921–962 (2003a)
- HARDELAND, R., and FUHRBERG, B.: Ubiquitous melatonin – Presence and effects in unicells, plants and animals. *Trends Comp. Biochem. Physiol.* 2, 25–45 (1996)
- HARDELAND, R., FUHRBERG, B., BEHRMANN, G., and BALZER, I.: Sleep-latency reducing pineal hormone melatonin as a scavenger of free radicals: hemin-catalysed formation of N<sup>1</sup>-acetyl-N<sup>2</sup>-formyl-5-methoxykynuramine. *Sleep Res.* 22, 621 (1993a)
- HARDELAND, R., and PANDI-PERUMAL, S. R.: Melatonin, a potent agent in antioxidative defense: Actions as a natural food constituent, gastrointestinal factor, drug and prodrug. *Nutr. Metab. (Lond.)* 2, article no. 22 (2005)
- HARDELAND, R., PANDI-PERUMAL, S. R., and POEGGELER, B.: Melatonin in plants – Focus on a vertebrate night hormone with cytoprotective properties. *Funct. Plant Sci. Biotechnol.* 1, 32–45 (2007b)
- HARDELAND, R., and POEGGELER, B.: Non-vertebrate melatonin. *J. Pineal Res.* 34, 233–241 (2003)
- HARDELAND, R., and POEGGELER, B.: Actions of melatonin, its structural and functional analogs in the central nervous system and the significance of metabolism. *Cent. Nerv. Syst. Agents Med. Chem.* 7, 289–303 (2007)
- HARDELAND, R., and POEGGELER, B.: Melatonin beyond its classical functions. *Open Physiol. J.* 1, 1–23 (2008)
- HARDELAND, R., POEGGELER, B., BALZER, I., and BEHRMANN, G.: Common basis of photoperiodism in phylogenetically distant organisms and its possible origins. *J. Interdiscipl. Cycle Res.* 22, 122–123 (1991)
- HARDELAND, R., POEGGELER, B., BALZER, I., and BEHRMANN, G.: A hypothesis on the evolutionary origins of photoperiodism based on circadian rhythmicity of melatonin in phylogenetically distant organisms. In: GUTENBRUNNER, C., HILDEBRANDT, G., and MOOG, R. (Eds.): *Chronobiology and Chronomedicine*; pp. 113–120. Frankfurt (Main), Berlin, Bern, New York, Paris, Wien: Lang 1993b
- HARDELAND, R., POEGGELER, B., NIEBERGALL, R., and ZELOSKO, V.: Oxidation of melatonin by carbonate radicals and chemiluminescence emitted during pyrrole ring cleavage. *J. Pineal Res.* 34, 17–25 (2003b)
- HARDELAND, R., POEGGELER, B., and PAPPOLLA, M. A.: Mitochondrial actions of melatonin – an endeavor to identify their adaptive and cytoprotective mechanisms. In: PESCHKE, E. (Ed.): *Endokrinologie IV. Abh. Sächs. Akad. Wiss., Math.-nat.wiss. Kl. Bd. 65, Heft 3, S. 14–31*. Stuttgart, Leipzig: Verlag Sächsische Akademie der Wissenschaften/Hirzel 2009a
- HARDELAND, R., TAN, D.-X., and REITER, R. J.: Kynuramines, metabolites of melatonin and other indoles: the resurrection of an almost forgotten class of biogenic amines. *J. Pineal Res.* 47, 109–126 (2009b)
- HARDELAND, R., ZSIZSIK, B. K., ANTOLÍN, I., BURKHARDT, S., COTO-MONTES, A., and POEGGELER, B.: The bioluminescent dinoflagellate *Lingulodinium polyedrum* as a test organism for pro- and antioxidant effects. *J. Endocrinol. Reprod.* 9, 11–18 (2005)
- HENDERSON, J. R., SWALWELL, H., BOULTON, S., MANNING, P., MCNEIL, C. J., and BIRCH-MACHIN, M. A.: Direct, real-time monitoring of superoxide generation in isolated mitochondria. *Free Radic. Res.* 43, 796–802 (2009)
- HUETHER G.: The contribution of extrapineal sites of melatonin synthesis to circulating melatonin levels in higher vertebrates. *Experientia* 49, 665–670 (1993)
- HUSSEIN, M. R., ABU-DIEF, E. E., KAMEL, E., ABU EL-GHAIT, A. T., ABDULWAHED, S. R., and AHMAD, M. H.: Melatonin and roentgen irradiation-induced acute radiation enteritis in Albino rats: an animal model. *Cell Biol. Int.* 32, 1353–1361 (2008)

- JIN, X., VON GALL, C., PIESCHL, R. L., GRIBKOFF, V. K., STEHLE, J. H., REPPERT, S. M., and WEAVER, D. R.: Targeted disruption of the mouse Mel<sub>1b</sub> melatonin receptor. *Mol. Cell. Biol.* 23, 1054–1060 (2003)
- JOU, M.-J.: Pathophysiological and pharmacological implications of mitochondria-targeted reactive oxygen species generation in astrocytes. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 60, 1512–1526 (2008)
- JUNG-HYNES, B., and AHMAD, N.: SIRT1 controls circadian clock circuitry and promotes cell survival: a connection with age-related neoplasms. *FASEB J.* 23, 2803–2809 (2009)
- KALYANARAMAN, B., JOSEPH, J., and ZHANG, H.: Bicarbonate enhances nitration and oxidation reactions in biological systems – role of reactive oxygen and nitrogen species. *Adv. Exp. Med. Biol.* 500, 175–182 (2001)
- KARASEK, M.: Melatonin, human aging, and age-related diseases. *Exp. Gerontol.* 39, 1723–1729 (2004)
- KARASEK, M., and REITER, R. J.: Melatonin and aging. *Neuroendocrinol. Lett.* 23, Suppl. 1, 14–16 (2002)
- KELLY, R. W., AMATO, F., and SEAMARK, R. F.: N-Acetyl-5-methoxy kynurenamine, a brain metabolite of melatonin, is a potent inhibitor of prostaglandin biosynthesis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 121, 372–379 (1984)
- KHALDY, H., ESCAMES, G., LEÓN, J., BIKIDAOUENE L., and ACUÑA-CASTROVIEJO, D.: Synergistic effects of melatonin and deprenyl against MPTP-induced mitochondrial damage and DA depletion. *Neurobiol. Aging* 24, 491–500 (2003)
- KLINGEN, A. R., PALSDOTTIR, H., HUNTE, C., and ULLMANN, G. M.: Redox-linked protonation state changes in cytochrome bc1 identified by Poisson-Boltzmann electrostatics calculations. *Biochim. Biophys. Acta* 1767, 204–221 (2007)
- KOH, P. O.: Melatonin regulates nitric oxide synthase expression in ischemic brain injury. *J. Vet. Med. Sci.* 70, 747–750 (2008)
- KORF, H. W., and GALL, C. VON: Mice, melatonin and the circadian system. *Mol. Cell. Endocrinol.* 252, 57–68 (2006)
- KOTLER, M., RODRÍGUEZ, C., SÁINZ, R. M., ANTOLÍN, I., and MENÉNDEZ-PELÁEZ, A.: Melatonin increases gene expression for antioxidant enzymes in rat brain cortex. *J. Pineal Res.* 24, 83–89 (1998)
- LA FERLA, F. M., and KITAZAWA, M.: Antipodal effects of p25 on synaptic plasticity, learning, and memory – too much of a good thing is bad. *Neuron* 48, 711–712 (2005)
- LANE, N.: Mitochondrial disease: Powerhouse of disease. *Nature* 440, 600–602 (2006)
- LEE, H. M., REED, J., GREELEY, G. H. Jr., and ENGLANDER, E. W.: Impaired mitochondrial respiration and protein nitration in the rat hippocampus after acute inhalation of combustion smoke. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 235, 208–215 (2009)
- LEE, Y. D., KIM, J. Y., LEE, K. H., KWAK, Y. J., LEE, S. K., KIM, O. S., SONG, D. Y., LEE, J. H., BAIK, T. K., KIM, B. J., KIM, J. Y., and BAIK, H. W.: Melatonin attenuates lipopolysaccharide-induced acute lung inflammation in sleep-deprived mice. *J. Pineal Res.* 46, 53–57 (2009)
- LENAZ, G., BOVINA, C., D'AURELIO, M., FATO, R., FORMIGGINI, G., GENOVA, M. L., GIULIANO, G., MERLO PICH, M., PAOLUCCI, U., PARENTI CASTELLI, G., and VENTURA, B.: Role of mitochondria in oxidative stress and aging. *Ann. New York Acad. Sci.* 959, 199–213 (2002)
- LENAZ, G., FATO, R., GENOVA, M. L., BERGAMINI, C., BIANCHI C., and BIONDI, A.: Mitochondrial complex I: Structural and functional aspects. *Biochim. Biophys. Acta* 1757, 1406–1420 (2006)
- LEÓN, J., ESCAMES, G., RODRÍGUEZ, M. I., LÓPEZ, L. C., TAPIAS, V., ENTRENA, A., CAMACHO, E., CARRIÓN, M. D., GALLO, M. A., ESPINOSA, A., TAN, D.-X., REITER, R. J., and ACUÑA-CASTROVIEJO, D.: Inhibition of neuronal nitric oxide synthase activity by N1-acetyl-5-methoxykynuramine, a brain metabolite of melatonin. *J. Neurochem.* 98, 2023–2033 (2006)
- LEÓN, J., MACÍAS, M., ESCAMES, G., CAMACHO, E., KHALDY, H., MARTÍN, M., ESPINOSA, A., GALLO, M. A., and ACUÑA-CASTROVIEJO, D.: Structure-related inhibition of calmodulin-dependent neuronal nitric-oxide synthase activity by melatonin and synthetic kynurenines. *Mol. Pharmacol.* 58, 967–975 (2000)
- LESNEFSKY, E. J., and HOPPEL, C. L.: Cardiopilin as an oxidative target in cardiac mitochondria in the aged rat. *Biochim. Biophys. Acta* 1777, 1020–1027 (2008)
- LESNEFSKY, E. J., MINKLER, P., and HOPPEL, C. L.: Enhanced modification of cardiopilin during ischemia in the aged heart. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 46, 1008–1015 (2009)
- LIU, B., TEWARI, A. K., ZHANG, L., GREEN-CHURCH, K. B., ZWEIER, J. L., CHEN, Y. R., and HE, G.: Proteomic analysis of protein tyrosine nitration after ischemia reperfusion injury: mitochondria as the major target. *Biochim. Biophys. Acta* 1794, 476–485 (2009)
- LIU, C., WEAVER, D. R., JIN, X., SHEARMAN, L. P., PIESCHL, R. L., GRIBKOFF, V. K., and REPPERT, S. M.: Molecular dissection of two distinct actions of melatonin on the suprachiasmatic circadian clock. *Neuron* 19, 91–102 (1997)
- LIU, C., WU, Y., LI, H., QI, Q., LANGENBERG, C., LOOS, R. J., and LIN, X.: MTNR1B rs10830963 is associated with fasting plasma glucose, HbA1C and impaired  $\beta$ -cell function in Chinese Hans from Shanghai. *BMC Med. Genet.* 11, article no. 59 (2010)

*Über welche Mechanismen wirkt Melatonin protektiv gegenüber oxidativem Stress?*

- LIU, L. Y., HOFFMAN, G. E., FEI, X. W., LI, Z., ZHANG, Z. H., and MEI, Y. A.: Delayed rectifier outward  $K^+$  current mediates the migration of rat cerebellar granule cells stimulated by melatonin. *J. Neurochem.* *102*, 333–344 (2007)
- LÓPEZ, A., GARCÍA, J. A., ESCAMES, G., VENEGAS, C., ORTIZ, F., LÓPEZ, L. C., and ACUÑA-CASTROVIEJO, D.: Melatonin protects the mitochondria from oxidative damage reducing oxygen consumption, membrane potential, and superoxide anion production. *J. Pineal Res.* *46*, 188–198 (2009)
- LÓPEZ, L. C., ESCAMES, G., ORTIZ, F., ROS, E., and ACUÑA-CASTROVIEJO, D.: Melatonin restores the mitochondrial production of ATP in septic mice. *Neuroendocrinol. Lett.* *27*, 623–630 (2006a)
- LÓPEZ, L. C., ESCAMES, G., TAPIAS, V., UTRILLA, P., LEÓN, J., and ACUÑA-CASTROVIEJO, D.: Identification of an inducible nitric oxide synthase in diaphragm mitochondria from septic mice: its relation with mitochondrial dysfunction and prevention by melatonin. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* *38*, 267–278 (2006b)
- MA, J., SHAW, V. E., and MITROFANIS, J.: Does melatonin help save dopaminergic cells in MPTP-treated mice? *Parkinsonism Relat. Disord.* *15*, 307–314 (2009)
- MAHAL, H. S., SHARMA, H. S., and MUKHERJEE, T.: Antioxidant properties of melatonin: a pulse radiolysis study. *Free Radic. Biol. Med.* *26*, 557–565 (1999)
- MALDONADO, M. D., MORA-SANTOS, M., NAJI, L., CARRASCOSA-SALMORAL, M. P., NARANJO, M. C., and CALVO, J. R.: Evidence of melatonin synthesis and release by mast cells. Possible modulatory role on inflammation. *Pharmacol. Res.* *62*, 282–287 (2010)
- MANEV, H., UZ, T., and QU, T.: Early upregulation of hippocampal 5-lipoxygenase following systemic administration of kainate to rats. *Restor. Neurol. Neurosci.* *12*, 81–85 (1998)
- MARTÍNEZ-CAMPA, C., GONZÁLEZ, A., MEDIAVILLA, M. D., ALONSO-GONZÁLEZ, C., ALVAREZ-GARCÍA, V., SÁNCHEZ-BARCELÓ, E. J., and COS, S.: Melatonin inhibits aromatase promoter expression by regulating cyclooxygenases expression and activity in breast cancer cells. *Br. J. Cancer* *101*, 1613–1619 (2009)
- MATSUBARA, E., BRYANT-THOMAS, T., PACHECO QUINTO, J., HENRY, T. L., POEGGELER, B., HERBERT, D., CRUZ-SANCHEZ, F., CHYAN, Y.-J., SMITH, M. A., PERRY, G., SHOJI, M., ABE, K., LEONE, A., GRUNDKE-KBAL, I., WILSON, G. L., GHISO, J., WILLIAMS, C., REFOLO, L. M., PAPPOLLA, M. A., CHAIN, D. G., and NERIA, E.: Melatonin increases survival and inhibits oxidative and amyloid pathology in a transgenic model of Alzheimer's disease. *J. Neurochem.* *85*, 1101–1108 (2003)
- MATUSZAK, Z., RESZKA, K., and CHIGNELL, C. F.: Reaction of melatonin and related indoles with hydroxyl radicals: EPR and spin trapping investigations. *Free Radic. Biol. Med.* *23*, 367–372 (1997)
- MAURIZ, J. L., MOLPECERES, V., GARCÍA-MEDIAVILLA, M. V., GONZÁLEZ, P., BARRIO, J. P., and GONZÁLEZ-GALLEGO, J.: Melatonin prevents oxidative stress and changes in antioxidant enzyme expression and activity in the liver of aging rats. *J. Pineal Res.* *42*, 222–230 (2007)
- MAYO, J. C., SAINZ, R. M., TAN, D.-X., HARDELAND, R., LEON, J., RODRIGUEZ, C., and REITER, R. J.: Anti-inflammatory actions of melatonin and its metabolites, N1-acetyl-N2-formyl-5-methoxykynuramine (AFMK) and N1-acetyl-5-methoxykynuramine (AMK), in macrophages. *J. Neuroimmunol.* *165*, 139–149 (2005)
- MIWA, S., and BRAND, M. D.: The topology of superoxide production by complex III and glycerol 3-phosphate dehydrogenase in *Drosophila* mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta* *1709*, 214–219 (2005)
- MOLINA-CARBALLO, A., MUÑOZ-HOYOS, A., SÁNCHEZ-FORTE, M., UBEROS-FERNÁNDEZ, J., MORENO-MADRID, F., and ACUÑA-CASTROVIEJO, D.: Melatonin increases following convulsive seizures may be related to its anticonvulsant properties at physiological concentrations. *Neuropediatrics* *38*, 122–125 (2007)
- MORIOKA, N., OKATANI, Y., and WAKATSUKI, A.: Melatonin protects against age-related DNA damage in the brains of female senescence-accelerated mice. *J. Pineal Res.* *27*, 202–209 (1999)
- MORREY, K. M., MCLACHLAN, J. A., SERKIN, C. D., and BAKOUCHE, O.: Activation of human monocytes by the pineal hormone melatonin. *J. Immunol.* *153*, 2671–2680 (1994)
- MUÑOZ-HOYOS, A., SÁNCHEZ-FORTE, M., MOLINA-CARBALLO, A., ESCAMES, G., MARTIN-MEDINA, E., REITER, R. J., MOLINA-FONT, J. A., and ACUÑA-CASTROVIEJO, D.: Melatonin's role as an anticonvulsant and neuronal protector: Experimental and clinical evidence. *J. Child Neurol.* *13*, 501–509 (1998)
- NAKAHATA, Y., SAHAR, S., ASTARITA, G., KALUZOVA, M., and SASSONE-CORSI, P.: Circadian control of the NAD<sup>+</sup> salvage pathway by CLOCK-SIRT1. *Science* *324*, 654–657 (2009)
- OHNISHI, S. T., OHNISHI, T., MURANAKA, S., FUJITA, H., KIMURA, H., UEMURA, K., YOSHIDA, K., and UTSUMI, K.: A possible site of superoxide generation in the complex I segment of rat heart mitochondria. *J. Bioenerg. Biomembr.* *37*, 1–15 (2005)
- OHTA, Y., KONGO-NISHIMURA, M., MATSURA, T., YAMADA, K., KITAGAWA, A., and KISHIKAWA, T.: Melatonin prevents disruption of hepatic reactive oxygen species metabolism in rats treated with carbon tetrachloride. *J. Pineal Res.* *36*, 10–17 (2004)
- OKATANI, Y., WAKATSUKI, A., and REITER, R. J.: Melatonin protects hepatic mitochondrial respiratory chain activity in senescence-accelerated mice. *J. Pineal Res.* *32*, 143–148 (2002a)

- OKATANI, Y., WAKATSUKI, A., REITER, R. J., and MIYAHARA, Y.: Melatonin reduces oxidative damage of neural lipids and proteins in senescence-accelerated mouse. *Neurobiol. Aging* 23, 639–644 (2002b)
- OKATANI, Y., WAKATSUKI, A., REITER, R. J., and MIYAHARA, Y.: Hepatic mitochondrial dysfunction in senescence-accelerated mice: correction by long-term, orally administered physiological levels of melatonin. *J. Pineal Res.* 33, 127–133 (2002c)
- OKATANI, Y., WAKATSUKI, A., REITER, R. J., and MIYAHARA, Y.: Acutely administered melatonin restores hepatic mitochondrial physiology in old mice. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 35, 367–375 (2003)
- OKATANI, Y., WAKATSUKI, A., SHINOHARA, K., KANEDA, C., and FUKAYA, T.: Melatonin stimulates glutathione peroxidase activity in human chorion. *J. Pineal Res.* 30, 199–205 (2001)
- OLCESE, J. M., CAO, C., MORI, T., MAMCARZ, M. B., MAXWELL, A., RUNFELDT, M. J., WANG, L., ZHANG, C., LIN, X., ZHANG, G., and ARENDASH, G. W.: Protection against cognitive deficits and markers of neurodegeneration by long-term oral administration of melatonin in a transgenic model of Alzheimer disease. *J. Pineal Res.* 47, 82–96 (2009)
- ONAL, C., KAYASELÇUK, F., TOPKAN, E., YAVUZ, M., BACANLI, D., and YAVUZ, A.: Protective effects of melatonin and octreotide against radiation-induced intestinal injury. *Dig. Dis. Sci.* 56, 359–367 (2011)
- PANDI-PERUMAL, S. R., SRINIVASAN, V., MAESTRONI, G. J. M., CARDINALI, D. P., POEGGELER, B., and HARDELAND, R.: Melatonin – Nature’s most versatile biological signal? *FEBS J.* 273, 2813–2838 (2006)
- PARK, H. J., KIM, H. J., RA, J., HONG, S. J., BAIK, H. H., PARK, H. K., YIM, S. V., NAH, S. S., CHO, J. J., and CHUNG, J. H.: Melatonin inhibits lipopolysaccharide-induced CC chemokine subfamily gene expression in human peripheral blood mononuclear cells in a microarray analysis. *J. Pineal Res.* 43, 121–129 (2007)
- PARK, S. W., CHOI, S. M., and LEE, S. M.: Effect of melatonin on altered expression of vasoregulatory genes during hepatic ischemia/reperfusion. *Arch. Pharm. Res.* 30, 1619–1624 (2007)
- PERIANAYAGAM, M. C., OXENKRUG, G. F., and JABER, B. L.: Immune-modulating effects of melatonin, N-acetylsertotonin, and N-acetyldopamine. *Ann. New York Acad. Sci.* 1053, 386–393 (2005)
- PESCHKE, E.: Melatonin, endocrine pancreas and diabetes. *J. Pineal Res.* 44, 26–40 (2008)
- PETROSILLO, G., MATERA, M., MORO, N., RUGGIERO, F. M., and PARADIES, G.: Mitochondrial complex I dysfunction in rat heart with aging: critical role of reactive oxygen species and cardiolipin. *Free Radic. Biol. Med.* 46, 88–94 (2009)
- POEGGELER, B.: Melatonin, aging, and age-related diseases: perspectives for prevention, intervention, and therapy. *Endocrine* 27, 201–212 (2005)
- POEGGELER, B., SAARELA, S., REITER, R. J., TAN, D.-X., CHEN, L.-D., MANCHESTER, L. C., and BARLOW-WALDEN, L. R.: Melatonin – a highly potent endogenous radical scavenger and electron donor: new aspects of the oxidation chemistry of this indole accessed in vitro. *Ann. New York Acad. Sci.* 738, 419–420 (1994)
- PRADA, C., and UDIN, S. B.: Melatonin decreases calcium levels in retinotectal axons of *Xenopus laevis* by indirect activation of group III metabotropic glutamate receptors. *Brain Res.* 1053, 67–76 (2005)
- PRADA, C., UDIN, S. B., WIECHMANN, A. F., and ZHDANOVA, I. V.: Stimulation of melatonin receptors decreases calcium levels in *Xenopus* tectal cells by activating GABA<sub>C</sub> receptors. *J. Neurophysiol.* 94, 968–978 (2005)
- QUINN, J., KULHANEK, D., NOWLIN, J., JONES, R., PRATICÒ, D., ROKACH, J., and STACKMAN, R.: Chronic melatonin therapy fails to alter amyloid burden or oxidative damage in old Tg2576 mice: implications for clinical trials. *Brain Res.* 1037, 209–213 (2005)
- RADOGNA, F., PATERNOSTER, L., DE NICOLA, M., CERELLA, C., AMMENDOLA, S., BEDINI, A., TARZIA, G., AQUILANO, K., CRIOLO, M., and GHIBELLI, L.: Rapid and transient stimulation of intracellular reactive oxygen species by melatonin in normal and tumor leukocytes. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 239, 37–45 (2009a)
- RADOGNA, F., SESTILI, P., MARTINELLI, C., PAOLILLO, M., PATERNOSTER, L., ALBERTINI, M. C., ACCORSI, A., GUALANDI, G., and GHIBELLI, L.: Lipoxygenase-mediated pro-radical effect of melatonin via stimulation of arachidonic acid metabolism. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 238, 170–177 (2009b)
- REITER, R. J.: Oxidative damage in the central nervous system: protection by melatonin. *Prog. Neurobiol.* 56, 359–384 (1998)
- REITER, R. J., ACUÑA-CASTROVIEJO, D., TAN, D.-X., and BURKHARDT, S.: Free radical-mediated molecular damage. Mechanisms for the protective actions of melatonin in the central nervous system. *Ann. New York Acad. Sci.* 939, 200–215 (2001)
- REITER, R. J., GARCIA, J. J., and PIE, J.: Oxidative toxicity in models of neurodegeneration: responses to melatonin. *Restor. Neurol. Neurosci.* 12, 135–142 (1998)
- REITER, R. J., TAN, D.-X., and BURKHARDT, S.: Reactive oxygen and nitrogen species and cellular and organismal decline: amelioration with melatonin. *Mech. Ageing Dev.* 123, 1007–1019 (2002)
- REITER, R. J., TAN, D.-X., MAYO, J. C., SAINZ, R. M., LEON, J., and CZARNOCKI, Z.: Melatonin as an antioxidant: biochemical mechanisms and pathophysiological implications in humans. *Acta Biochim. Pol.* 50, 1129–1146 (2003)
- REITER, R. J., TAN, D.-X., QI, W., MANCHESTER, L. C., KARBOWNIK, M., and CALVO, J. R.: Pharmacology and physiology of melatonin in the reduction of oxidative stress *in vivo*. *Biol. Signals Recept.* 9, 160–171 (2000)

- ROBB, S. J., and CONNOR, J. R.: Nitric oxide protects astrocytes from oxidative stress. *Ann. New York Acad. Sci.* 962, 93–102 (2002)
- RODRÍGUEZ, M. I., CARRETERO, M., ESCAMES, G., LÓPEZ, L. C., MALDONADO, M. D., TAN, D.-X., REITER, R. J., and ACUÑA-CASTROVIEJO, A.: Chronic melatonin treatment prevents age-dependent cardiac mitochondrial dysfunction in senescence-accelerated mice. *Free Radic. Res.* 41, 15–24 (2007a)
- RODRÍGUEZ, M. I., ESCAMES, G., LÓPEZ, L. C., GARCÍA, J. A., ORTIZ, F., LÓPEZ, A., and ACUÑA-CASTROVIEJO, D.: Melatonin administration prevents cardiac and diaphragmatic mitochondrial oxidative damage in senescence-accelerated mice. *J. Endocrinol.* 194, 637–643 (2007b)
- RODRÍGUEZ, M. I., ESCAMES, G., LÓPEZ, L. C., LÓPEZ, A., GARCÍA, J. A., ORTIZ, F., and ACUÑA-CASTROVIEJO, D.: Chronic melatonin treatment reduces the age-dependent inflammatory process in senescence-accelerated mice. *J. Pineal Res.* 42, 272–279 (2007c)
- RODRÍGUEZ, M. I., ESCAMES, G., LÓPEZ, L. C., LÓPEZ, A., GARCÍA, J. A., ORTIZ, F., SÁNCHEZ, V., ROMEU, M., and ACUÑA-CASTROVIEJO, D.: Improved mitochondrial function and increased life span after chronic melatonin treatment in senescent prone mice. *Exp. Gerontol.* 43, 749–756 (2008)
- SAITO, K., IKEDA, M., YOSHIOKA, H., and TOMITA, T.: Nitric oxide and effect of a radical scavenger *N-tert-butyl- $\alpha$ -phenylnitronone* on stroke in a rat model. *Pharmacology* 73, 76–80 (2005)
- SHANG, Y., XU, S. P., WU, Y., JIANG, Y. X., WU, Z. Y., YUAN, S. Y., and YAO, S. L.: Melatonin reduces acute lung injury in endotoxemic rats. *Chin. Med. J. (Engl.)* 122, 1388–1393 (2009)
- SHARMA, S., and HALDAR, C.: Melatonin prevents X-ray irradiation induced oxidative damage in peripheral blood and spleen of the seasonally breeding rodent, *Funambulus pennanti* during reproductively active phase. *Int. J. Radiat. Biol.* 82, 411–419 (2006)
- SHEU, S. S., WANG, W., CHENG, H., and DIRKSEN, R. T.: Superoxide flashes: illuminating new insights into cardiac ischemia/reperfusion injury. *Future Cardiol.* 4, 551–554 (2008)
- SÓNMEZ, M. F., NARIN, F., AKKUŞ, D., and OZDAMAR, S.: Effect of melatonin and vitamin C on expression of endothelial NOS in heart of chronic alcoholic rats. *Toxicol. Ind. Health* 25, 385–393 (2009)
- SPARSØ, T., BONNEFOND, A., ANDERSSON, E., BOUATIA-NAJL, N., HOLMKVIST, J., WEGNER, L., GRARUP, N., GJESING, A. P., BANASIK, K., CAVALCANTI-PROENÇA, C., MARCHAND, M., VAXILLAIRE, M., CHARPENTIER, G., JARVELIN, M. R., TICHET, J., BALKAU, B., MARRE, M., LÉVY-MARCHAL, C., FAERCH, K., BORCH-JOHNSEN, K., JØRGENSEN, T., MADSBAD, S., POULSEN, P., VAAG, A., DINA, C., HANSEN, T., PEDERSEN, O., and FROGUEL, P.: G-allele of intronic rs10830963 in MTNR1B confers increased risk of impaired fasting glycemia and type 2 diabetes through an impaired glucose-stimulated insulin release: studies involving 19,605 Europeans. *Diabetes* 58, 1450–1456 (2009)
- SQUADRITO, G. L., and PRYOR, W. A.: Oxidative chemistry of nitric oxide: the roles of superoxide, peroxyntirite, and carbon dioxide. *Free Radic. Biol. Med.* 25, 392–403 (1998)
- SRINIVASAN, V., PANDI-PERUMAL, S. R., CARDINALI, D. P., POEGGELER, B., and HARDELAND, R.: Melatonin in Alzheimer's disease and other neurodegenerative disorders. *Behav. Brain Funct.* 2, article no. 15 (2006)
- SRINIVASAN, V., PANDI-PERUMAL, S. R., MAESTRONI, G. J. M., ESQUIFINO, A. I., HARDELAND, R., and CARDINALI, D. P.: Role of melatonin in neurodegenerative diseases. *Neurotox. Res.* 7, 293–318 (2005)
- STASICA, P., ULANSKI, P., and ROSIAK, J. M.: Reactions of melatonin with radicals in deoxygenated aqueous solution. *J. Radioanal. Nucl. Chem.* 232, 107–113 (1998)
- STAIGER, H., MACHICAO, F., SCHÄFER, S. A., KIRCHHOFF, K., KANTARTZIS, K., GUTHOFF, M., SILBERNAGEL, G., STEFAN, N., HÄRING, H. U., and FRITSCH, A.: Polymorphisms within the novel type 2 diabetes risk locus MTNR1B determine  $\beta$ -cell function. *PLoS One* 3, article no. e3962 (2008)
- STEINHILBER, D., BRUNGS, M., WERZ, O., WIESENBERG, I., DANIELSSON, C., KAHLEN, J. P., NAYERI, S., SCHRÄDER, M., and CARLBERG, C.: The nuclear receptor for melatonin represses 5-lipoxygenase gene expression in human B lymphocytes. *J. Biol. Chem.* 270, 7037–7040 (1995)
- SU, B., WANG, X., ZHENG, L., PERRY, G., SMITH, M. A., and ZHU, X.: Abnormal mitochondrial dynamics and neurodegenerative diseases. *Biochim. Biophys. Acta* 1802, 135–142 (2009)
- TAJES, M., GUTIERREZ-CUESTA, J., ORTUÑO-SAHAGUN, D., CAMINS, A., and PALLÀS, M.: Anti-aging properties of melatonin in an in vitro murine senescence model: involvement of the sirtuin 1 pathway. *J. Pineal Res.* 47, 228–237 (2009)
- TAN, D.-X., CHEN, L.-D., POEGGELER, B., MANCHESTER, L. C., and REITER, R. J.: Melatonin: a potent, endogenous hydroxyl radical scavenger. *Endocr. J.* 1, 57–60 (1993)
- TAN, D.-X., HARDELAND, R., MANCHESTER, L. C., PAREDES, S. D., KORKMAZ, A., SAINZ, R. M., MAYO, J. C., FUENTES-BROTO, L., and REITER, R. J.: The changing biological roles of melatonin during evolution: from an antioxidant to signals of darkness, sexual selection and fitness. *Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.* 85, 607–623 (2010)
- TAN, D.-X., REITER, R. J., MANCHESTER, L. C., YAN, M. T., EL-SAWI, M., SAINZ, R. M., MAYO, J. C., KOHEN, R., ALLEGRA, M., and HARDELAND, R.: Chemical and physical properties and potential mechanisms: melatonin as a broad spectrum antioxidant and free radical scavenger. *Curr. Top. Med. Chem.* 2, 181–197 (2002)



- TAPIAS, V., ESCAMES, G., LÓPEZ, L. C., LÓPEZ, A., CAMACHO, E., CARRIÓN, M. D., ENTRENA, A., GALLO, M. A., ESPINOSA, A., and ACUÑA-CASTROVIEJO, D.: Melatonin and its brain metabolite  $N^1$ -acetyl-5-methoxykynuramine prevent mitochondrial nitric oxide synthase induction in parkinsonian mice. *J. Neurosci. Res.* 87, 3002–3010 (2009)
- TORRES-FARFAN, C., SERÓN-FERRÉ, M., DINET, V., and KORF, H. W.: Immunocytochemical demonstration of day/night changes of clock gene protein levels in the murine adrenal gland: differences between melatonin-proficient (C3H) and melatonin-deficient (C57BL) mice. *J. Pineal Res.* 40, 64–70 (2006)
- UZ, T., and MANEV, H.: Circadian expression of pineal 5-lipoxygenase mRNA. *Neuroreport* 9, 783–786 (1998)
- WAKATSUKI, A., OKATANI, Y., SHINOHARA, K., IKENOUE, N., and FUKAYA, T.: Melatonin protects against ischemia/reperfusion-induced oxidative damage to mitochondria in fetal rat brain. *J. Pineal Res.* 31, 167–172 (2001a)
- WAKATSUKI, A., OKATANI, Y., SHINOHARA, K., IKENOUE, N., KANEDA, C., and FUKAYA, T.: Melatonin protects fetal rat brain against oxidative mitochondrial damage. *J. Pineal Res.* 30, 22–28 (2001b)
- WANG, W., FANG, H., GROOM, L., CHENG, A., ZHANG, W., LIU, J., WANG, X., LI, K., HAN, P., ZHENG, M., YIN, J., WANG, W., MATTSON, M. P., KAO, J. P., LAKATTA, E. G., SHEU, S. S., OUYANG, K., CHEN, J., DIRKSEN, R. T., and CHENG, H.: Superoxide flashes in single mitochondria. *Cell* 134, 279–290 (2008)
- WANG, W. Z., FANG, X. H., STEPHENSON, L. L., BAYNOSA, R. C., KHIABANI, K. T., and ZAMBONI, W. A.: Microcirculatory effects of melatonin in rat skeletal muscle after prolonged ischemia. *J. Pineal Res.* 39, 57–65 (2005)
- WANG, X., SU, B., LEE, H. G., LI, X., PERRY, G., SMITH, M. A., and ZHU, X.: Impaired balance of mitochondrial fission and fusion in Alzheimer's disease. *J. Neuroscience* 29, 9090–9103 (2009a)
- WANG, X., SU, B., ZHENG, L., PERRY, G., SMITH, M. A., and ZHU, X.: The role of abnormal mitochondrial dynamics in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *J. Neurochem.* 109, Suppl. 1, 153–159 (2009b)
- WENZ, T., HIELSCHER, R., HELLWIG, P., SCHÄGGER, H., RICHERS, S., and HUNTE, C.: Role of phospholipids in respiratory cytochrome bc<sub>1</sub> complex catalysis and supercomplex formation. *Biochim. Biophys. Acta* 1787, 609–616 (2009)
- ZHANG, H., AKBAR, M., and KIM, H. Y.: Melatonin: an endogenous negative modulator of 12-lipoxygenation in the rat pineal gland. *Biochem. J.* 344, 487–493 (1999a)
- ZHANG, H., JOSEPH, J., FELIX, C., and KALYANARAMAN, B.: Bicarbonate enhances the hydroxylation, nitration, and peroxidation reactions catalyzed by copper, zinc superoxide dismutase. Intermediacy of carbonate anion radical. *J. Biol. Chem.* 275, 14038–14045 (2000)
- ZHANG, H., SQUADRITO, G. L., and PRYOR, W. A.: The reaction of melatonin with peroxynitrite: formation of melatonin radical cation and absence of stable nitrated products. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 251, 83–87 (1998)
- ZHANG, H., SQUADRITO, G. L., UPPU, R., and PRYOR, W. A.: Reaction of peroxynitrite with melatonin: A mechanistic study. *Chem. Res. Toxicol.* 12, 526–534 (1999b)
- ZHANG, M., CAO, L. H., and YANG, X. L.: Melatonin modulates glycine currents of retinal ganglion cells in rat. *Neuroreport* 18, 1675–1678 (2007)
- ZHAO, W. J., ZHANG, M., MIAO, Y., YANG, X. L., and WANG, Z.: Melatonin potentiates glycine currents through a PLC/PKC signalling pathway in rat retinal ganglion cells. *J. Physiol.* 588, 2605–2619 (2010)
- ZHOU, J., ZHANG, S., ZHAO, X., and WIE, T.: Melatonin impairs NADPH oxidase assembly and decreases superoxide anion production in microglia exposed to amyloid- $\beta_{1-42}$ . *J. Pineal Res.* 45, 157–165 (2008)

Prof. Dr. Rüdiger HARDELAND  
Johann-Friedrich-Blumenbach-Institut für  
Zoologie und Anthropologie  
Georg-August-Universität Göttingen  
Berliner Straße 28  
37073 Göttingen  
Bundesrepublik Deutschland  
Tel.: +49 551 395414  
Fax: +49 551 395438  
E-Mail: rhardel@gwdg.de

## **Wachen und Schlafen: Erkenntnisse aus der Genetik der circadianen Rhythmik**

Peter YOUNG (Münster)

### *Zusammenfassung*

Viele Störungen der circadianen Rhythmik und andere Schlafstörungen mit genetischen Grundlagen sind nicht einzelnen Genen zuzuordnen. Für die meisten Schlafstörungen wird eine komplexe Genetik angenommen. Assoziationen zu bestimmten HLA-Loci wurden für die Narkolepsie, das Schlafwandeln, die REM-Verhaltensstörung und das Kleine-Levin-Syndrom gezeigt. Mittels genomweiter Assoziationsanalyse wurde für das *Restless-Legs*-Syndrom eine Assoziation zu verschiedenen Genen gezeigt. Einzelne krankheitsverursachende Gene konnten erst für sehr wenige Schlafstörungen beschrieben werden. Hierzu zählen verschiedene Syndrome, die durch eine Störung der circadianen Rhythmik entstehen, wie das Syndrom der vorverlagerten Schlafphase und das Syndrom der verzögerten Schlafphase. Weiterhin stellt das Kongenitale zentrale Hypoventilationssyndrom eine Schlafstörung dar, die mit einem einzelnen Gendefekt assoziiert ist. In Zukunft sind auf Grund der technischen Möglichkeiten mittels genomweiter Assoziationsanalysen zunehmende Erkenntnisse zu Assoziationen mit neuen Genloci zu erwarten. Diese werden es ermöglichen, die biologischen Grundlagen von Schlafstörungen besser zu verstehen und neue Therapieoptionen zu entwickeln. Für die genetische Erforschung von Schlafstörungen ist die exakte Phänotypisierung, die auch eine kardiorespiratorische Polysomnographie beinhaltet, unerlässlich.

### *Abstract*

Many sleep disorders have a strong genetic background which is rarely monogenetic. Most sleep disorders are supposed to be complex genetic disorders. Associations between the HLA-system and circadian rhythm disorders, narcolepsy, sleep walking, REM-behavioral disorder and Kleine-Levin Syndrome were shown. Restless legs syndrome was found to be associated with different genes using a genome wide association approach. In future new associations will be found due to new technologies improving our knowledge about the biological basis of sleep disorders. This knowledge will lead to new therapeutical options. For further investigations the exact description of the specific phenotypes will be essential using cardiorespiratory polysomnography as one of the most important prerequisite.

### **1. Einleitung**

Physiologischer Schlaf und Schlafstörungen unterliegen neben äußeren Einflüssen auch einem starken genetischen Einfluss. Genetische Komponenten, die sich im individuellen Schlafverhalten und in verschiedenen Schlafstörungen widerspiegeln, sind in den letzten Jahren zunehmend in das Interesse sowohl der klinischen Schlafmedizin als auch der neurowissenschaftlichen Forschung gerückt. Besonders Störungen der circadianen Rhythmik bilden einen Fokus im Interesse für die grundlegenden physiologischen und pathophysiologischen Zusammenhänge für Wachen und Schlafen. Mit Hilfe von Zwillingstudien wurde bereits in den vergangenen Jahren die Bedeutung von genetischen Faktoren für die Mikroarchitektur des Schlafes gezeigt (LINKOWSKI 1999), und es gibt mittlerweile einige Studien, in denen die Kon-

kordanz für verschiedene Schlafstörungen bei monozygoten und dizygoten Zwillingen untersucht wurde (WATSON et al. 2006, ARMITAGE et al. 2007, KOSKENVUO et al. 2007). Neben Zwillingsstudien dienen Familienuntersuchungen ebenfalls zum weiterführenden Verständnis von genetischen und somit auch den biologischen Grundlagen von Wachen und Schlafen sowie von verschiedenen Formen von Schlafstörungen (Übersicht bei DAUVILLIERS et al. 2005). Mittlerweile sind die molekulargenetischen Techniken und Verfahren so weit entwickelt, dass es möglich geworden ist, weit entfernt von der Untersuchung der Assoziation definierter Erkrankungen mit einem einzelnen Kandidatengen, große Patientengruppen auf die Assoziation mit verschiedenen Genen und chromosomalen Loci durch genomweite Analysen zu untersuchen. Der Nutzen solcher Untersuchungen und der daraus gewonnenen Erkenntnisse dient dem besseren Verständnis der biologischen Grundlagen von Störungen der circadianen Rhythmik und anderen Schlafstörungen. In der heutigen sogenannten „Postgenomik-Ära“ zeigt sich immer häufiger, dass gerade auf Grund der biologischen Erkenntnisse in der initialen Identifizierung des Gendefektes Therapiestrategien entwickelt werden konnten. Eines der eindrucksvollsten Beispiele liefert in der Schlafmedizin die Identifizierung eines Gendefektes für die Narkolepsie, so dass auch das entsprechende Peptid Hypocretin identifiziert wurde und sich mittlerweile der erste Hypocretinantagonist in der klinischen Erprobung befindet (Übersichten bei NISHINO 2007, ROECKER und COLEMAN 2008).

## 2. Schlafstörungen

Die Internationale „Classification of Sleep Disorders II“ (ICSD II) unterscheidet eine große Anzahl verschiedener Schlafstörungen. Bislang liegen nur für einen Teil dieser Störungen genetische Daten vor. Im Folgenden werden die genetischen Befunde für Schlafstörung vorgestellt, die (a) aus einer Störung der circadianen Rhythmik resultieren, die (b) mit nächtlichen Atmungsstörungen assoziiert sind oder die (c) mit gestörter nächtlicher Motorik einhergehen.

### 2.1 Genetik circadianer Rhythmusstörungen

Die genetischen Grundlagen der physiologischen circadianen Rhythmik werden in den letzten Jahren immer besser verstanden. Einzelne Mitglieder der sogenannten CLOCK-Gen-Familie sind mittlerweile bekannt. Sie sind sowohl bezüglich ihrer Funktion für die circadiane Rhythmik als auch in ihrer Funktion für die Entstehung psychiatrischer Erkrankungen sowie in ihrer Bedeutung für die Entstehung von malignen Erkrankungen beschrieben (Übersichten bei GERY und KOEFFLER 2007, MCCLUNG 2007, SEHGAL et al. 2007, SIEPKA et al. 2007).

### 2.2 Verzögertes-Schlafphasen-Syndrom (*Delayed Sleep Phase Syndrome, DSPS*)

Das DSPS bezeichnet eine Verschiebung der Wachphase in die Nacht hinein. Patienten mit einem DSPS sind in der Regel bis lange in die Nacht aktiv und finden erst in der zweiten Nachthälfte Schlaf, der dann wiederum bis zu den Mittagsstunden am Folgetag dauern kann. Der Phänotyp dieser Schlafstörung ist sehr variabel und lässt sich bislang nur sehr schwer vom physiologischen Abendtyp abgrenzen. Möglicherweise werden in Zukunft molekularbiologische Techniken die Phänotypisierung erleichtern, indem die individuelle Expression

von CLOCK-Genen *in vitro* sichtbar gemacht wird (BROWN et al. 2008). Bislang ist jedoch die Aktimetrie über 7–14 Tage die Methode der Wahl zur Diagnosestellung und Phänotypisierung von Störungen der circadianen Rhythmik (MORGENTHALER et al. 2007, OKAWA und UCHIYAMA 2007). Für diese Schlafstörung wurden Assoziationen zum Humanen Leukozyten-Antigen (HLA)-Locus HLA DR1 und einem SNP im *Per1*-Gen sowie dem damit verbundenen Casein-Kinase-I-Epsilon-Gen gefunden (EBISAWA et al. 2001, CASTRO et al. 2008).

### 2.3 Vorgezogenes-Schlafphasen-Syndrom (*Advanced Sleep Phase Syndrome, ASPS*)

Das ASPS ist im Gegensatz zum DSPS durch die Vorverlagerung der Schlafphasen gekennzeichnet und lässt sich eindeutiger von anderen physiologischen Schlafrhythmen abgrenzen. Es wurden Familien identifiziert, in denen diese Schlafstörung einem autosomal dominanten Erbgang folgt. In diesen Familien wurden Mutationen im *Per2*-Gen gefunden, die mit dem klinischen Phänotyp, bestimmt mittels Aktimetrie, segregieren (TOH et al. 2001).

### 2.4 Kleine-Levin-Syndrom

Die klinischen Merkmale des seltenen Kleine-Levin-Syndroms (KLS) sind prolongierte Phasen der Hypersomnie, die über mehrere Tage und Wochen andauern können und gefolgt werden von Phasen des Wachseins, verbunden mit Hypersexualität und Hyperphagie (ARNULF et al. 2005, PEARCE 2008). Diese Symptome erinnern an Formen des Winterschlafs bei verschiedenen homoiothermen Tieren und werden aus diesem Grund auch zu den Störungen der circadianen Rhythmik gezählt. Das Auftreten bei Geschwistern des ohnehin sehr seltenen sporadischen KLS (KATZ und ROPPER 2002) legt die vermutliche Beteiligung genetischer Faktoren nahe und wird durch eine Assoziation mit dem HLA-Locus HLA DQB1 0201 gestützt (BAHAMMAM et al. 2008). Aus genetischer Sicht konnte bislang kein Hinweis gefunden werden, dass das hypocretinerge System mit dem KLS assoziiert ist, obwohl Patienten mit KLS eine Reduktion des Peptids Hypocretin im Liquor aufweisen können (DAUVILLIERS et al. 2003a).

## 3. Genetik schlafbezogener Atmungsstörungen

In der Gruppe der schlafbezogenen Atmungsstörungen stehen das Obstruktive Schlafapnoesyndrom (OSAS), als die häufigste Schlafstörung überhaupt und nachgewiesener Risikofaktor für kardiovaskuläre (WEISS et al. 1999, SHAMSUZZAMAN et al. 2003, DOPP et al. 2007) und zerebrovaskuläre Erkrankungen (DZIEWAS et al. 2005, 2008), sowie das Kongenitale zentrale Hypoventilationssyndrom im Mittelpunkt dieser Übersicht.

### 3.1 Das Obstruktive Schlafapnoesyndrom (OSAS)

Das Obstruktive Schlafapnoesyndrom (OSAS) ist mit einer Prävalenz von 3 bis 6 % bei Patienten mittleren Alters die häufigste Form der schlafbezogenen Atmungsstörungen (YOUNG et al. 1993, 1997, PUNJABI 2008). Das klinische Bild ist geprägt durch einen unerholsamen Nachtschlaf, Monotonieintoleranz und Tagesschläfrigkeit. Die Diagnose eines OSAS lässt

sich polysomnographisch stellen. Die Anzahl der Hypopnoen und Apnoen, gemessen mittels nasalem Luftstrom, wird als Index pro Stunde, genannt Apnoe-Hypopnoeindex (AHI), als Maß für den Schweregrad eines OSAS verwendet. Als weitere diagnostische Kriterien werden Enttächtigungen und Weckreaktionen verwertet (*Report* 1999, REDLINE et al. 2007). In dieser Übersicht wird nicht auf die Assoziation des OSAS mit Erkrankungen, die mit einer gestörten kraniofazialen Morphologie einhergehen, eingegangen (SCHWAB 2005, BANNO und KRYGER 2007, MUNTZ et al. 2008). In der Gruppe der kraniofazialen Fehlbildungen sind verschiedene Kandidatengene bekannt. In den Fällen, in denen kraniofaziale Fehlbildungen zu einem OSAS führen, lässt sich meist schon im Kindesalter ein OSAS finden (MUNTZ et al. 2008, SCHWAB 2005). Die familiäre Assoziation des OSAS zu kraniozephalen Dysmorphien wird stärker als die Assoziation zur Obesitas eingeschätzt (GUILLEMINAULT et al. 1995).

Durch Zwillingsstudien mit monozygoten und dizygoten Zwillingen wurde gezeigt, dass eine starke genetische Komponente für das OSAS besteht (CARMELLI et al. 2004). Assoziationen zu spezifischen Genen wurden beschrieben, ohne dass diese jedoch in größeren Untersuchungen repliziert werden konnten. Am Beispiel einer beschriebenen Assoziation des PMP22-Gens, welches für eine Form der Hereditären Motorischen und Sensiblen Neuropathien (HMSN) als Kandidatengen gilt, wurde die Ko-Segregation in einer großen HMSN-Familie beschrieben (DEMATTEIS et al. 2001). Dieser Befund konnte bislang nicht bestätigt werden und wurde auch nicht durch genomweite Analysen bei Afro-Amerikanern bestätigt (PALMER et al. 2004). Dass die genetischen Grundlagen des OSAS multipel sind, lässt sich auch mit Hilfe des ApoE-Allels zeigen. Dieses Allel wurde immer wieder als mögliches assoziiertes Gen für die Entstehung eines OSAS beschrieben (FOLEY et al. 2001, KADOTANI et al. 2001, GOZAL et al. 2007, KALRA und CHAKRABORTY 2007, KALRA et al. 2008). Eine kürzlich publizierte Studie mit über 1000 „OSAS-Patienten“ lässt den Schluss zu, dass es sich beim ApoE-Allel um ein Suszeptibilitätsallel für das OSAS handelt (LARKIN et al. 2006).

### 3.2 Zentrale Atmungsstörungen

In der Gruppe der zentralen Atmungsstörungen gibt es sehr verschiedene Formen von im Schlaf auftretenden Störungen. Das Kongenitale zentrale Hypoventilationssyndrom wird auch als „Undines-Fluch-Syndrom“ bezeichnet und ist gekennzeichnet durch die nächtliche Abflachung der Atmung mit konsekutiver Hyperkapnie und Desaturierung. Es konnte kürzlich gezeigt werden, dass dieses Syndrom mit Mutationen im *Phox2B*-Gen assoziiert ist (TROCHET et al. 2005). Das *Phox2B*-Gen ist somit das erste krankheitsverursachende Gen für eine Form der zentralen Atmungsstörungen im Schlaf (GAULTIER et al. 2004). Die Funktion von *Phox2b* ist bislang nicht abschließend geklärt. *Phox2B*-defiziente Mäuse zeigen ebenfalls nächtliche Hyperkapnien und Desaturierungen sowie eine Reduktion der parafazialen Hirnstammneurone (DUBREUIL et al. 2008).

## 4. Genetik von Schlafstörungen mit abnormer Motorik

In dieser Gruppe werden die genetischen Aspekte von Schlafstörungen besprochen, die sich durch eine abnorme Motorik auszeichnen. Zu dieser Gruppe gehören Schlafstörungen aus verschiedenen Untergruppen der ICSD II.

#### 4.1 Periodische Beinbewegungen und Restless-Legs-Syndrom

Periodische Beinbewegungen im Schlaf (PLMS) werden bei ca. 80 % der Patienten mit einem *Restless-Legs-Syndrom* (RLS) beobachtet (PATEL 2002, LESAGE und HENING 2004). Die klinische Unterscheidung dieser beiden Erkrankungen ist wichtig (STIASNY et al. 2002, KARATAS 2007, SATIJA und ONDO 2008), da es sich beim RLS um eine klinische Diagnose handelt. Die vorherrschenden Symptome sind Bewegungsunruhe mit unangenehmen Sensationen, die in Ruhe und am Abend zunehmen und sich durch Bewegung bessern (ALLEN et al. 2003). „RLS-Familien“ mit autosomal dominantem Erbgang sind bekannt. In der Region um Quebec wurden Familien mit gemeinsamem *Founder* beschrieben, bei denen eine Assoziation zu Chromosom 19 gefunden wurde (MONTPLAISIR et al. 1985, DESAUTELS et al. 2001). Eine andere Familien-Studie hat gezeigt, dass das Manifestationsalter sich bei familiären RLS nicht von sporadischen RLS-Fällen unterscheidet (WINKELMANN et al. 2002). Die Penetranz ist jedoch variabel, und somit kann der klinische Phänotyp nicht immer eindeutig zugeordnet werden (MONTPLAISIR et al. 1985). Entgegen der Annahme, dass das dopaminerge System genetisch mit dem RLS assoziiert sein könnte, wurden zu den entsprechenden Genen und Genloci keine Assoziationen gefunden (DESAUTELS et al. 2001, WINKELMANN et al. 2006). Kürzlich wurden nun mittels genomweiter Analyse verschiedene Kandidatengene für das RLS identifiziert. Die Kandidatengene *MEIS1*, *BTBD9*, *MAP2K5*, *LBXCOR1* (WINKELMANN et al. 2008) und *PTPRD* (WINKELMANN et al. 2007) konnten allesamt nicht den bislang bekannten chromosomalen Genorten auf Chromosom 12 (DESAUTELS et al. 2001, WINKELMANN et al. 2006) oder auf Chromosom 14 (BONATI et al. 2003) zugeordnet werden. Die biologische Funktion der kürzlich identifizierten Gene ist bislang nicht abschließend geklärt, und eine biologische Zuordnung zum klinischen Phänotyp des RLS muss in den nächsten Jahren mit Hilfe geeigneter biologischer Modelle und Methoden untersucht werden. Für das isolierte PLMS wurde ebenfalls erst kürzlich eine Assoziation zum *BTBD9*-Gen beschrieben (WINKELMAN 2007). Durch die erst kürzlich identifizierten Gene wird sehr deutlich, dass es sich beim PLMS und beim RLS um Erkrankungen handeln muss, die einen komplexen genetischen Hintergrund haben (TROTTI et al. 2008, WINKELMANN 2008).

#### 4.2 Parasomnien

Aus der Gruppe der Parasomnien werden die bislang bekannten genetischen Aspekte der Non-REM-Parasomnien, dem Schlafwandeln und dem *Pavor nocturnus*, vorgestellt. Von dieser Gruppe der Parasomnien müssen die REM-Parasomnien getrennt werden, da sie klinisch eine andere Entität darstellen (ICSD II). Aus dieser Gruppe liegen für die REM-Verhaltensstörung einige wenige genetische Untersuchungen vor.

##### 4.2.1 Schlafwandeln

Schlafwandeln besteht in der Regel aus komplexen nicht-stereotypen Handlungen oder Bewegungen, die typischerweise aus dem Tiefschlaf heraus auftreten. Schlafwandeln ist die häufigste Non-REM-Parasomnie mit einer Prävalenz von ca. 20 % bei Kindern (HUBLIN et al. 1997) und einer Prävalenz von 1 bis 3 % bei Erwachsenen (ABE und SHIMAKAWA 1966). Die Prävalenz bei Erwachsenen ist somit mit der Prävalenz der Epilepsie bei Erwachsenen vergleichbar (HUBLIN et al. 1997, 2001). Neben fremdanamnестischen Hinweisen auf nächtliche

Handlungen, für die der Betroffene in der Regel anamnestisch ist, findet sich regelhaft eine Tages schläfrigkeit als Leitsymptom nach Nächten, in denen Schlafwandeln aufgetreten ist. Daneben findet sich bei Schlafwandlern auch eine Häufung von Depressionen und Angststörungen (KALES et al. 1980, GAU und SOONG 1999).

Frühe Untersuchungen zur Erbllichkeit von Schlafwandeln anhand von Zwillingsstudien lassen einen starken genetischen Hintergrund vermuten (KALES et al. 1980, ABE et al. 1984). Angehörige von Schlafwandlern haben ein 10-fach erhöhtes Risiko selber Schlafwandeln als Non-REM-Parasomnie zu entwickeln (KALES et al. 1980). Es ist allerdings bislang weder geklärt, ob es eindeutige Erbgänge bei den familiären Formen des Schlafwandeln gibt, noch welcher Grad der Penetranz für die Ausbildung des Phänotypes vorliegt. Eine starke Assoziation zum HLA-Locus HLA DQB1 0501 und DQB1 0402 (LECENDREUX et al. 2003) konnte gezeigt werden. Eine Replikation dieser Befunde ist bislang nicht erfolgt. Möglicherweise ist die klinische Charakterisierung von Parasomnien auf Grund der häufig nur anamnestisch vorliegenden Angaben nicht ausreichend, um einen einheitlichen Phänotyp bei einer ausreichend großen Gruppe von Patienten herauszuarbeiten. Hier sind weitere Studien zur klinischen Phänotypisierung von Schlafwandlern in Zukunft notwendig. Polysomnographische Studien zum Schlafwandeln wären hier wünschenswert, um auch Patienten mit nächtlichen frontalen Anfällen, als die wichtigste Differentialdiagnose, eindeutig von der Gruppe der Schlafwandler zu trennen. Des Weiteren muss auch bedacht werden, dass die häufigste REM-Parasomnie, die REM-Verhaltensstörung, einen Haplotyp auf HLADQB1 0402 mit dem Schlafwandeln gemeinsam hat und es auch Patienten gibt, die eine REM-Verhaltensstörung und Schlafwandeln aufweisen und als sogenanntes Parasomnie-overlap-Syndrom gelten (SCHENCK et al. 1997).

#### 4.2.2 Pavor nocturnus

Der *Pavor nocturnus* ist gekennzeichnet durch eine abrupte Weckreaktion zumeist aus dem Tiefschlaf, häufig verbunden mit angstbesetztem Schreien. Die Prävalenz bei Kindern beträgt 3,5–15 % (HUBLIN et al. 1999) und bei Erwachsenen weniger als 1 %. Einige Familien mit autosomal dominant segregierendem *Pavor nocturnus* sind beschrieben (HALLSTROM 1972). Obwohl polysomnographische Daten nicht vorliegen, wurde die Prävalenz des *Pavor nocturnus* mit 96 % angegeben, wenn ein Familienmitglied 1. bis 3. Grades ebenfalls an einem *Pavor nocturnus* erkrankt ist (KALES et al. 1980). Bei Kindern wurde eine vergleichbare Prävalenz beschrieben (DIMARIO und EMERY 1987). Im Gegensatz zum Schlafwandeln liegen bislang keine Daten zu chromosomalen Loci oder zu einzelnen Genen vor.

#### 4.3 REM-Verhaltensstörung

Die REM-Verhaltensstörung ist typischerweise durch eine fehlende Absenkung des Muskeltonus im REM-Schlaf gekennzeichnet (SCHENCK et al. 1987, SCHENCK und MAHOWALD 2005). Das klinische Bild reicht von der alleinigen Beibehaltung des Muskeltonus im REM-Schlaf über Phasen der tonischen oder phasischen Muskeltonuserhöhung bis zur Ausführung komplexer, scheinbar organisierter, Handlungsabfolgen (SCHENCK und MAHOWALD 2005). Die REM-Verhaltensstörung ist eng assoziiert mit neurodegenerativen Erkrankungen wie dem Morbus Parkinson und anderen Syn-Nukleopathien (SCHENCK et al. 1996, BOEVE et al. 2003). Im Zusammenhang mit dem Morbus Parkinson wird eine REM-Verhaltensstörung bei bis zu

25 % diagnostiziert und sogar als früher präklinischer Marker für einen Morbus Parkinson angesehen (SCHENCK et al. 1996, COMELLA et al. 1998, TRENKWALDER 1998). Eine Kongregation der REM-Verhaltensstörung mit Mutationen im Parkin-Gen bei familiären Parkinsonsyndromen ist bislang jedoch nicht beschrieben. Eine Assoziation mit dem HLA-System auf dem Locus HLA DQB 05 und DQB1 06 konnte gefunden werden (SCHENCK et al. 1996).

#### 4.4 Bruxismus

Bruxismus, bekannt als nächtliches Zähneknirschen und Zähnepressen, ist bislang in seiner Auswirkung auf die Mikroarchitektur des Schlafes nur in kleinen Studien untersucht. Es wird kontrovers diskutiert, inwieweit Bruxismus tatsächlich die Schlafarchitektur und die Erholungsfunktion des Schlafes beeinflusst (BOUTROS et al. 1993, MACALUSO et al. 1998). Die Prävalenz wird mit ca. 30 % bei Kindern und 17 % bei Erwachsenen angegeben. 21 bis 50 % von klinisch als „Bruxisten“ identifizierten Patienten haben einen Verwandten ersten Grades, der selber unter Bruxismus leidet (HUBLIN et al. 2001). In Zwillingsstudien konnte eine höhere Konkordanz für Bruxismus bei monozygoten Zwillingen als bei dizygoten Zwillingen gefunden werden (LINDQVIST 1974). In den meisten Studien dient der typische Abrieb der Backenzähne mit Schliffacetten als phänotypisch wichtigstes Merkmal (WALTERS 2007). Polysomnographische Studien für eine qualitative und quantitative Erfassung des Bruxismus in der Nacht sind selten (KATO et al. 1999, 2003a, b, 2007). Um größere Patientenkollektive zu untersuchen, sind bislang nur wenige Methoden der ambulanten nächtlichen Aufzeichnungen für Bruxismus etabliert und validiert, die auch gleichzeitig eine Zuordnung zu verschiedenen Schlafstadien zulassen (DOERING et al. 2008).

#### 4.5 Narkolepsie

Die klinischen Symptome der Narkolepsie, wie imperativer Schlafdrang und hypnagoge Halluzinationen, sind keine Zeichen abnormer nächtlicher Motorik. Allerdings ist die Dissoziation von der im REM-Schlaf auftretenden Muskelatonie, wie sie bei der Kataplexie zu beobachten ist, und dem pathologisch früh einsetzenden REM-Schlaf (sogenannter *Sleep-onset-REM*) als Zeichen pathologischer Motorik zu werten. Aus diesem Grund werden die genetischen Aspekte der Narkolepsie an dieser Stelle besprochen. Die Prävalenz der Narkolepsie beträgt in westlichen Ländern 0,026 % (ALDRICH 1992), und sie wird als Modellerkrankung für die Degeneration des hypocretinergen Systems angesehen (SELBACH und HAAS 2006, ZEITZER et al. 2006). Der Verlust von Neuronen im dorsolateralen Hypothalamus korreliert sehr gut mit dem Verlust von freiem messbarem Hypocretin im Liquor von narkoleptischen Patienten mit Kataplexie (NISHINO et al. 2000, DAUVILLIERS et al. 2003b).

Die Narkolepsie war die erste Schlafstörung, bei der eine Assoziation mit dem HLA-System gefunden wurde. Die HLA-Allele DR2/DQw1 sind zu 85–95 % bei Kaukasiern mit Narkolepsie nachweisbar (PERAITA-ADRADOS et al. 1999). Die HLA-Allele DQB1 0602, DRQB1501, DRQB1 0101 und DQA1 0102 sind sehr eng mit der Narkolepsie mit Kataplexie assoziiert (MIGNOT et al. 1995, LIN et al. 2001, CHABAS et al. 2003). 98 % der kaukasischen Narkolepsie-Patienten mit Kataplexie tragen das HLA Allel DQB1 0602, während nur 40 % der Narkolepsie-Patienten ohne Kataplexie dieses Allel tragen (PLANELLES et al. 1997). Da es eine Überlappung des HLA DQB1 0602-Locus zwischen Narkolepsie-Patienten und Gesunden gibt, ist es unwahrscheinlich, dass dieses Allel für die Ausbildung der Krankheit verantwortlich



ist. Das HLA DQB1 0602-Allel könnte aber einen Suszeptibilitätseffekt auf den klinischen Phänotyp der Narkolepsie haben.

Mittels Kopplungsanalysen in Familien konnte ein chromosomaler Locus auf Chromosom 21 beschrieben werden (LECENDREUX et al. 2003, KAWASHIMA et al. 2006). Entgegen der Befunde aus Studien an Inzuchtstämmen bei Hunden, in denen das Hypocretinsystem als das krankheitsverursachende System identifiziert werden konnte (LIN et al. 1999), konnte bei der humanen Narkolepsie, eine Familie ausgenommen, keine Assoziation zu Genen des Hypocretinsystems gefunden werden (CHABAS et al. 2003).

Erst kürzlich wurde mittels einer genomweiten Analyse ein Einzelnukleotidpolymorphismus (*single nucleotide polymorphism* = SNP) in einer großen Anzahl von japanischen, koreanischen, afrikanischen und europäischen Narkolepsie-Patienten identifiziert, der zwischen dem Genlocus für das *CPT1B*- und dem *CHKB*-Gen liegt. Funktionell sind beide Gene plausibel, da *CPT1B* in der  $\beta$ -Oxidation als Signalweg für die Regulation von *theta*-Frequenzen im REM-Schlaf verantwortlich gemacht wird und *CHKB* an der Metabolisierung von Cholin, als Vorstufe des Acetylcholins als „Wach“-induzierendem Transmitters, beteiligt ist (MIYAGAWA et al. 2008). Weiterhin ist kürzlich eine Assoziation zu einem protektiven HLA-Marker beschrieben worden (HOR et al. 2010). Ebenfalls wird eine Assoziation zu Genen der circadianen Rhythmik auch für die Narkolepsie diskutiert (unveröffentlichte Ergebnisse).

## 5. Ausblick

Die genetischen Grundlagen von Störungen der circadianen Rhythmik und von Schlafstörungen sind vielfältig. Es ist davon auszugehen, dass nur in seltenen Fällen tatsächlich monogenetisch nach MENDEL vererbte Erkrankungen vorliegen und zukünftig einzelne Kandidatengene in großer Anzahl identifiziert werden. Insbesondere die letzten Jahre haben gezeigt, dass die Zukunft der Erforschung der genetischen Grundlagen von Schlafstörungen in genomweiten Analysen zur Untersuchung der Assoziation des klinischen Phänotyps mit genetischen Markern liegt. Hier werden große, eindeutig phänotypisierte Patientenkollektive und entsprechend gut charakterisierte Kontrollkollektive benötigt werden. Die besondere Herausforderung in der Schlafmedizin stellt die saubere Phänotypisierung dieser Patientengruppen mittels guter klinischer Anamnesen, mit klinischen Untersuchungen und dem wichtigsten neurophysiologischen Mittel, der Polysomnographie, dar. Erstrebenswert wäre auch, entsprechend phänotypisierte, gesunde Kontrollkollektive in die großen genomweiten Analysen einfließen zu lassen. Diese Erkenntnisse werden dazu beitragen, neue biologisch basierte Therapiestrategien zu entwickeln (BUNNEY und BUNNEY 2000, LIN und CIVELLI 2004, MOON et al. 2007).

## Literatur

- ABE, K., AMATOMI, M., and ODA, N.: Sleepwalking and recurrent sleeptalking in children of childhood sleepwalkers. *Amer. J. Psychiatry* 141, 800–801 (1984)
- ABE, K., and SHIMAKAWA, M.: Predisposition to sleep-walking. *Psychiatr. Neurol. (Basel)* 152, 306–312 (1966)
- ALDRICH, M. S.: Narcolepsy. *Neurology* 42, 34–43 (1992)
- ALLEN, R. P., PICCHIETTI, D., HENING, W. A., TRENKWALDER, C., WALTERS, A. S., and MONTPLAISI, J.: Restless legs syndrome: diagnostic criteria, special considerations, and epidemiology. A report from the restless legs syndrome diagnosis and epidemiology workshop at the National Institutes of Health. *Sleep Med.* 4, 101–119 (2003)

- ARMITAGE, R., LANDIS, C., HOFFMANN, R., LENTZ, M., WATSON, N. F., GOLDBERG, J., and BUCHWALD, D.: The impact of a 4-hour sleep delay on slow wave activity in twins discordant for chronic fatigue syndrome. *Sleep* 30, 657–662 (2007)
- ARNULF, I., ZEITZER, J. M., FILE, J., FARBER, N., and MIGNOT, E.: Kleine-Levin syndrome: a systematic review of 186 cases in the literature. *Brain* 128, 2763–2776 (2005)
- BAHAMMAM, A. S., GADELRAH, M. O., OWAIS, S. M., ALSWAT, K., and HAMAM, K. D.: Clinical characteristics and HLA typing of a family with Kleine-Levin syndrome. *Sleep Med.* 9, 575–578 (2008)
- BANNO, K., and KRYGER, M. H.: Sleep apnea: clinical investigations in humans. *Sleep Med.* 8, 400–426 (2007)
- BOEVE, B. F., SILBER, M. H., PARISI, J. E., DICKSON, D. W., FERMAN, T. J., BENARROCH, E. E., SCHMEICHEL, A. M., SMITH, G. E., PETERSEN, R. C., AHLKOG, J. E., MATSUMOTO, J. Y., KNOPMAN, D. S., SCHENCK, C. H., and MAHOWALD, M. W.: Synucleinopathy pathology and REM sleep behavior disorder plus dementia or parkinsonism. *Neurology* 61, 40–45 (2003)
- BONATI, M. T., FERINI-STRAMBI, L., ARIDON, P., OLDANI, A., ZUCCONI, M., and CASARI, G.: Autosomal dominant restless legs syndrome maps on chromosome 14q. *Brain* 126, 1485–1492 (2003)
- BOUTROS, N. N., MONTGOMERY, M. T., NISHIOKA, G., and HATCH, J. P.: The effects of severe bruxism on sleep architecture: a preliminary report. *Clin. Electroencephalogr.* 24, 59–62 (1993)
- BROWN, S. A., KUNZ, D., DUMAS, A., WESTERMARK, P. O., VANSELOW, K., TILMANN-WAHSCHAFFE, A., HERZEL, H., and KRAMER, A.: Molecular insights into human daily behavior. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105, 1602–1607 (2008)
- BUNNEY, W. E., and BUNNEY, B. G.: Molecular clock genes in man and lower animals: possible implications for circadian abnormalities in depression. *Neuropsychopharmacology* 22, 335–345 (2000)
- CARMELLI, D., COLRAIN, I. M., SWAN, G. E., and BLIWISE, D. L.: Genetic and environmental influences in sleep-disordered breathing in older male twins. *Sleep* 27, 917–922 (2004)
- CASTRO, R. M., BARBOSA, A. A., PEDRAZZOLI, M., and TUFIK, S.: Casein kinase I epsilon (CKI $\epsilon$ ) N408 allele is very rare in the Brazilian population and is not involved in susceptibility to circadian rhythm sleep disorders. *Behav. Brain Res.* 193, 156–157 (2008)
- CHABAS, D., TAHERI, S., RENIER, C., and MIGNOT, E.: The genetics of narcolepsy. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* 4, 459–483 (2003)
- COMELLA, C. L., NARDINE, T. M., DIEDERICH, N. J., and STEBBINS, G. T.: Sleep-related violence, injury, and REM sleep behavior disorder in Parkinson's disease. *Neurology* 51, 526–529 (1998)
- DAUVILLIERS, Y., BAUMANN, C. R., CARLANDER, B., BISCHOF, M., BLATTER, T., LECENDREUX, M., MALY, F., BESSET, A., TOUCHON, J., BILLIARD, M., TAFTI, M., and BASSETTI, C. L.: CSF hypocretin-1 levels in narcolepsy, Kleine-Levin syndrome, and other hypersomnias and neurological conditions. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 74, 1667–1673 (2003)
- DAUVILLIERS, Y., BILLIARD, M., and MONTPLAISIR, J.: Clinical aspects and pathophysiology of narcolepsy. *Clin. Neurophysiol.* 114, 2000–2017 (2003)
- DAUVILLIERS, Y., MARET, S., and TAFTI, M.: Genetics of normal and pathological sleep in humans. *Sleep Med. Rev.* 9, 91–100 (2005)
- DEMATTEIS, M., PEPIN, J. L., JEANMART, M., DESCHAUX, C., LABARRE-VILA, A., and LEVY, P.: Charcot-Marie-Tooth disease and sleep apnoea syndrome: a family study. *Lancet* 357, 267–272 (2001)
- DESAUTELS, A., TURECKI, G., MONTPLAISIR, J., SEQUEIRA, A., VERNER, A., and ROULEAU, G. A.: Identification of a major susceptibility locus for restless legs syndrome on chromosome 12q. *Amer. J. Hum. Genet.* 69, 1266–1270 (2001)
- DI MARIO, F. J., Jr., and EMERY, E. S., 3rd: The natural history of night terrors. *Clin. Pediatr. (Phila.)* 26, 505–511 (1987)
- DOERING, S., BOECKMANN, J. A., HUGGER, S., and YOUNG, P.: Ambulatory polysomnography for the assessment of sleep bruxism. *J. Oral Rehabil.* 35, 572–576 (2008)
- DOPP, J. M., REICHMUTH, K. J., and MORGAN, B. J.: Obstructive sleep apnea and hypertension: mechanisms, evaluation, and management. *Curr. Hypertens. Rep.* 9, 529–534 (2007)
- DUBREUIL, V., RAMANANTSOA, N., TROCHET, D., VAUBOURG, V., AMIEL, J., GALLEGGO, J., BRUNET, J. F., and GORIDIS, C.: A human mutation in Phox2b causes lack of CO $_2$  chemosensitivity, fatal central apnea, and specific loss of parafacial neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105, 1067–1072 (2008)
- DZIEWAS, R., HUMPERT, M., HOPMANN, B., KLOSKA, S. P., LUDEMANN, P., RITTER, M., DITTRICH, R., RINGELSTEIN, E. B., YOUNG, P., and NABAVI, D. G.: Increased prevalence of sleep apnea in patients with recurring ischemic stroke compared with first stroke victims. *J. Neurol.* 252, 1394–1398 (2005)
- DZIEWAS, R., WALDMANN, N., BONPERT, M., HOR, H., MULLER, T., OKEGWO, A., RINGELSTEIN, E. B., and YOUNG, P.: Increased prevalence of obstructive sleep apnoea in patients with Charcot-Marie-Tooth disease: a case control study. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 79, 829–831 (2008)

- EBISAWA, T., UCHIYAMA, M., KAJIMURA, N., MISHIMA, K., KAMEI, Y., KATOH, M., WATANABE, T., SEKIMOTO, M., SHIBUI, K., KIM, K., KUDO, Y., OZEKI, Y., SUGISHITA, M., TOYOSHIMA, R., INOUE, Y., YAMADA, N., NAGASE, T., OZAKI, N., OHARA, O., ISHIDA, N., OKAWA, M., TAKAHASHI, K., and YAMAUCHI, T.: Association of structural polymorphisms in the human period3 gene with delayed sleep phase syndrome. *EMBO Rep.* 2, 342–346 (2001)
- FOLEY, D. J., MASAKI, K., WHITE, L., and REDLINE, S.: Relationship between apolipoprotein E epsilon4 and sleep-disordered breathing at different ages. *JAMA* 286, 1447–1448 (2001)
- GAU, S. F., and SOONG, W. T.: Psychiatric comorbidity of adolescents with sleep terrors or sleepwalking: a case-control study. *Aust. N. Z. J. Psychiatry* 33, 734–739 (1999)
- GAULTIER, C., AMIEL, J., DAUGER, S., TRANG, H., LYONNET, S., GALLEGO, J., and SIMONNEAU, M.: Genetics and early disturbances of breathing control. *Pediatr. Res.* 55, 729–733 (2004)
- GERY, S., and KOEFFLER, H. P.: The role of circadian regulation in cancer. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 72, 459–464 (2007)
- GOZAL, D., CAPDEVILA, O. S., KHEIRANDISH-GOZAL, L., and CRABTREE, V. M.: APOE epsilon 4 allele, cognitive dysfunction, and obstructive sleep apnea in children. *Neurology* 69, 243–249 (2007)
- GUILLEMINAULT, C., PARTINEN, M., HOLLMAN, K., POWELL, N., and STOOHS, R.: Familial aggregates in obstructive sleep apnea syndrome. *Chest* 107, 1545–1551 (1995)
- HALLSTROM, T.: Night terror in adults through three generations. *Acta Psychiatr. Scand.* 48, 350–352 (1972)
- HOR, H., KUTALIK, Z., DAUVILLIERS, Y., VALSESIA, A., LAMMERS, G. J., DONJACOUR, C. E., IRANZO, A., SANTAMARIA, J., PERAITA ADRADOS, R., VICARIO, J. L., OVEREEM, S., ARNULF, I., THEODOROU, I., JENNUM, P., KNUDSEN, S., BASSETTI, C., MATHIS, J., LECENDREUX, M., MAYER, G., GEISLER, P., BENETO, A., PETIT, B., PFISTER, C., BURKI, J. V., DIDELOT, G., BILLIARD, M., ERCILLA, G., VERDIJN, W., CLAAS, F. H., VOLLENWIDER, P., WAEBER, G., WATERWORTH, D. M., MOOSER, V., HEINZER, R., BECKMANN, J. S., BERGMANN, S., and TAFTI, M.: Genome-wide association study identifies new HLA class II haplotypes strongly protective against narcolepsy. *Nature Genet.* 42, 786–789 (2010)
- HUBLIN, C., KAPRIO, J., PARTINEN, M., HEIKKILA, K., and KOSKENVUO, M.: Prevalence and genetics of sleepwalking: a population-based twin study. *Neurology* 48, 177–181 (1997)
- HUBLIN, C., KAPRIO, J., PARTINEN, M., and KOSKENVUO, M.: Parasomnias: co-occurrence and genetics. *Psychiatr. Genet.* 11, 65–70 (2001)
- HUBLIN, C., KAPRIO, J., PARTINEN, M., and KOSKENVUO, M.: Limits of self-report in assessing sleep terrors in a population survey. *Sleep* 22, 89–93 (1999)
- KADOTANI, H., KADOTANI, T., YOUNG, T., PEPPARD, P. E., FINN, L., COLRAIN, I. M., MURPHY, G. M. Jr., and MIGNOT, E.: Association between apolipoprotein E epsilon4 and sleep-disordered breathing in adults. *JAMA* 285, 2888–2890 (2001)
- KALES, A., SOLDATOS, C. R., BIXLER, E. O., LADDA, R. L., CHARNEY, D. S., WEBER, G., and SCHWEITZER, P. K.: Hereditary factors in sleepwalking and night terrors. *Br. J. Psychiatry* 137, 111–118 (1980)
- KALRA, M., and CHAKRABORTY, R.: Genetic susceptibility to obstructive sleep apnea in the obese child. *Sleep Med.* 8, 169–175 (2007)
- KALRA, M., PAL, P., KAUSHAL, R., AMIN, R. S., DOLAN, L. M., FITZ, K., KUMAR, S., SHENG, X., GUHA, S., MALLIK, J., DEKA, R., and CHAKRABORTY, R.: Association of ApoE genetic variants with obstructive sleep apnea in children. *Sleep Med.* 9, 260–265 (2008)
- KARATAS, M.: Restless legs syndrome and periodic limb movements during sleep: diagnosis and treatment. *Neurologist* 13, 294–301 (2007)
- KATO, T., DAL-FABBRO, C., and LAVIGNE, G. J.: Current knowledge on awake and sleep bruxism: overview. *Alpha Omegan* 96, 24–32 (2003a)
- KATO, T., MASUDA, Y., and MORIMOTO, T.: Patterns of masseter muscle activities during sleep in guinea pigs. *Arch. Oral Biol.* 52/4, 385–386 (2007)
- KATO, T., MONTPLAISIR, J. Y., BLANCHET, P. J., LUND, J. P., and LAVIGNE, G. J.: Idiopathic myoclonus in the oromandibular region during sleep: a possible source of confusion in sleep bruxism diagnosis. *Mov. Disord.* 14, 865–871 (1999)
- KATO, T., THIE, N. M., HUYNH, N., MIYAWAKI, S., and LAVIGNE, G. J.: Topical review: sleep bruxism and the role of peripheral sensory influences. *J. Orofac. Pain.* 17, 191–213 (2003b)
- KATZ, J. D., and ROPPER, A. H.: Familial Kleine-Levin syndrome: two siblings with unusually long hypersomnic spells. *Arch. Neurol.* 59, 1959–1961 (2002)
- KAWASHIMA, M., TAMIYA, G., OKA, A., HOHJOH, H., JUJI, T., EBISAWA, T., HONDA, Y., INOKO, H., and TOKUNAGA, K.: Genomewide association analysis of human narcolepsy and a new resistance gene. *Amer. J. Hum. Genet.* 79, 252–263 (2006)
- KOSKENVUO, M., HUBLIN, C., PARTINEN, M., HEIKKILA, K., and KAPRIO, J.: Heritability of diurnal type: a nationwide study of 8753 adult twin pairs. *J. Sleep Res.* 16, 156–162 (2007)

- LARKIN, E. K., PATEL, S. R., REDLINE, S., MIGNOT, E., ELSTON, R. C., and HALLMAYER, J.: Apolipoprotein E and obstructive sleep apnea: evaluating whether a candidate gene explains a linkage peak. *Genet. Epidemiol.* *30*, 101–110 (2006)
- LECENDREUX, M., BASSETTI, C., DAUVILLIERS, Y., MAYER, G., NEIDHART, E., and TAFTI, M.: HLA and genetic susceptibility to sleepwalking. *Mol. Psychiatry* *8*, 114–117 (2003)
- LESAGE, S., and HENING, W. A.: The restless legs syndrome and periodic limb movement disorder: a review of management. *Semin. Neurol.* *24*, 249–259 (2004)
- LIN, L., FARACO, J., LI, R., KADOTANI, H., ROGERS, W., LIN, X., QIU, X., DE JONG, P. J., NISHINO, S., and MIGNOT, E.: The sleep disorder canine narcolepsy is caused by a mutation in the hypocretin (orexin) receptor 2 gene. *Cell* *98*, 365–376 (1999)
- LIN, L., HUNGS, M., and MIGNOT, E.: Narcolepsy and the HLA region. *J. Neuroimmunol.* *117*, 9–20 (2001)
- LIN, S. H., and CIVELLI, O.: Orphan G protein-coupled receptors: targets for new therapeutic interventions. *Ann. Med.* *36*, 204–214 (2004)
- LINDQVIST, B.: Bruxism in twins. *Acta Odontol. Scand.* *32*, 177–187 (1974)
- LINKOWSKI, P.: EEG sleep patterns in twins. *J. Sleep Res.* *8* (Suppl. 1) 11–13 (1999)
- MACALUSO, G. M., GUERRA, P., DI GIOVANNI, G., BOSELLI, M., PARRINO, L., and TERZANO, M. G.: Sleep bruxism is a disorder related to periodic arousals during sleep. *J. Dent. Res.* *77*, 565–573 (1998)
- MCCLUNG, C. A.: Role for the Clock gene in bipolar disorder. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* *72*, 637–644 (2007)
- MIGNOT, E., TAFTI, M., DEMENT, W. C., and GRUMET, F. C.: Narcolepsy and immunity. *Adv. Neuroimmunol.* *5*, 23–37 (1995)
- MIYAGAWA, T., KAWASHIMA, M., NISHIDA, N., OHASHI, J., KIMURA, R., FUJIMOTO, A., SHIMADA, M., MORISHITA, S., SHIGETA, T., LIN, L., HONG, S. C., FARACO, J., SHIN, Y. K., JEONG, J. H., OKAZAKI, Y., TSUIJI, S., HONDA, M., HONDA, Y., MIGNOT, E., and TOKUNAGA, K.: Variant between CPT1B and CHKB associated with susceptibility to narcolepsy. *Nature Genet.* *40*, 1324–1328 (2008)
- MONTPLAISIR, J., GODBOUT, R., BOGHEN, D., DECHAMPLAIN, J., YOUNG, S. N., and LAPIERRE, G.: Familial restless legs with periodic movements in sleep: electrophysiologic, biochemical, and pharmacologic study. *Neurology* *35*, 130–134 (1985)
- MOON, H. J., CHOI, J. S., PARK, E. J., KANG, C. Y., JEON, Y. W., LEE, K. H., RHA, H. K., and HAN, S. I.: Effects of chromosomal variations on pharmacokinetic activity of zolpidem in healthy volunteers: an array-based comparative genomic hybridization study. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *356*, 981–987 (2007)
- MORGENTHALER, T., ALESSI, C., FRIEDMAN, L., OWENS, J., KAPUR, V., BOEHLECKE, B., BROWN, T., CHESSON, A. Jr., COLEMAN, J., LEE-CHIONG, T., PANCER, J., and SWICK, T. J.: Practice parameters for the use of actigraphy in the assessment of sleep and sleep disorders: an update for 2007. *Sleep* *30*, 519–529 (2007)
- MUNTZ, H., WILSON, M., PARK, A., SMITH, M., and GRIMMER, J. F.: Sleep disordered breathing and obstructive sleep apnea in the cleft population. *Laryngoscope* *118*, 348–353 (2008)
- NISHINO, S.: The hypocretin/orexin receptor: therapeutic prospective in sleep disorders. *Expert. Opin. Investig. Drugs* *16*, 1785–1797 (2007).
- NISHINO, S., RIPLEY, B., OVEREEM, S., LAMMERS, G. J., and MIGNOT, E.: Hypocretin (orexin) deficiency in human narcolepsy. *Lancet* *355*, 39–40 (2000)
- OKAWA, M., and UCHIYAMA, M.: Circadian rhythm sleep disorders: characteristics and entrainment pathology in delayed sleep phase and non-24-h sleep-wake syndrome. *Sleep Med. Rev.* *11*, 485–496 (2007)
- PALMER, L. J., BUXBAUM, S. G., LARKIN, E. K., PATEL, S. R., ELSTON, R. C., TISHLER, P. V., and REDLINE, S.: Whole genome scan for obstructive sleep apnea and obesity in African-American families. *Amer. J. Respir. Crit. Care Med.* *169*, 1314–1321 (2004)
- PATEL, S.: Restless legs syndrome and periodic limb movements of sleep: fact, fad, and fiction. *Curr. Opin. Pulm. Med.* *8*, 498–501 (2002)
- PEARCE, J. M.: Kleine-Levin syndrome: history and brief review. *Eur. Neurol.* *60*, 212–214 (2008)
- PERAITA-ADRADOS, R., EZPELETA, D., BALAS, A., and VICARIO, J. L.: Narcolepsy-cataplexy syndrome associated with DRB1\*0806-DQB\*0602 haplotype in a Caucasian patient. *Sleep Res. Online* *2*, 29–31 (1999)
- PLANELLES, D., PUIG, N., BENETO, A., GOMEZ, E., RUBIO, P., MIRABET, V., BONANAD, S., BLASCO, I., and MONTORO, J.-A.: HLA-DQA, -DQB and -DRB allele contribution to narcolepsy susceptibility. *Eur. J. Immunogenet.* *24*, 409–421 (1997)
- PUNJABI, N. M.: The epidemiology of adult obstructive sleep apnea. *Proc. Amer. Thorac Soc.* *5*, 136–143 (2008)
- REDLINE, S., BUDHIRAJA, R., KAPUR, V., MARCUS, C. L., MATEIKA, J. H., MEHRA, R., PARTHASARTHY, S., SOMERS, V. K., STROHL, K. P., SULT, L. G., GOZAL, D., WISE, M. S., and QUAN, S. F.: The scoring of respiratory events in sleep: reliability and validity. *J. Clin. Sleep Med.* *3*, 169–200 (2007)

- Report (American Academy of Sleep Medicine Task Force): Sleep-related breathing disorders in adults: recommendations for syndrome definition and measurement techniques in clinical research. The Report of an American Academy of Sleep Medicine Task Force. *Sleep* 22, 667–689 (1999)
- ROECKER, A. J., and COLEMAN, P. J.: Orexin receptor antagonists: medicinal chemistry and therapeutic potential. *Curr. Top. Med. Chem.* 8, 977–987 (2008)
- SATJIA, P., and ONDO, W. G.: Restless legs syndrome: pathophysiology, diagnosis and treatment. *CNS Drugs* 22, 497–518 (2008)
- SCHENCK, C. H., BOYD, J. L., and MAHOWALD, M. W.: A parasomnia overlap disorder involving sleepwalking, sleep terrors, and REM sleep behavior disorder in 33 polysomnographically confirmed cases. *Sleep* 20, 972–981 (1997)
- SCHENCK, C. H., BUNDLIE, S. R., and MAHOWALD, M. W.: Delayed emergence of a parkinsonian disorder in 38% of 29 older men initially diagnosed with idiopathic rapid eye movement sleep behaviour disorder. *Neurology* 46, 388–393 (1996)
- SCHENCK, C. H., BUNDLIE, S. R., PATTERSON, A. L. and MAHOWALD, M. W.: Rapid eye movement sleep behavior disorder. A treatable parasomnia affecting older adults. *JAMA* 257, 1786–1789 (1987)
- SCHENCK, C. H., and MAHOWALD, M. W.: Rapid eye movement sleep parasomnias. *Neurol. Clin.* 23, 1107–1126 (2005)
- SCHWAB, R. J.: Genetic determinants of upper airway structures that predispose to obstructive sleep apnea. *Respir. Physiol. Neurobiol.* 147, 289–298 (2005)
- SEHGAL, A., JOINER, W., CROCKER, A., KOH, K., SATHYANARAYANAN, S., FANG, Y., WU, M., WILLIAMS, J. A., and ZHENG, X.: Molecular analysis of sleep: wake cycles in *Drosophila*. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 72, 557–564 (2007)
- SELBACH, O., and HAAS, H. L.: Hypocretins: the timing of sleep and waking. *Chronobiol. Int.* 23, 63–70 (2006)
- SHAMSUZZAMAN, A. S., GERSH, B. J., and SOMERS, V. K.: Obstructive sleep apnea: implications for cardiac and vascular disease. *JAMA* 290, 1906–1914 (2003)
- SIEPKA, S. M., YOO, S. H., PARK, J., LEE, C., and TAKAHASHI, J. S.: Genetics and neurobiology of circadian clocks in mammals. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 72, 251–259 (2007)
- STIASNY, K., OERTEL, W. H., and TRENKWALDER, C.: Clinical symptomatology and treatment of restless legs syndrome and periodic limb movement disorder. *Sleep Med. Rev.* 6, 253–265 (2002)
- TOH, K. L., JONES, C. R., HE, Y., EIDE, E. J., HINZ, W. A., VIRSHUP, D. M., PTACEK, L. J., and FU, Y. H.: An hPer2 phosphorylation site mutation in familial advanced sleep phase syndrome. *Science* 291, 1040–1043 (2001)
- TRENKWALDER, C.: Sleep dysfunction in Parkinson's disease. *Clin. Neurosci.* 5, 107–114 (1998)
- TROCHET, D., HONG, S. J., LIM, J. K., BRUNET, J. F., MUNNICH, A., KIM, K. S., LYONNET, S., GORIDIS, C., and AMIEL, J.: Molecular consequences of PHOX2B missense, frameshift and alanine expansion mutations leading to autonomic dysfunction. *Hum. Mol. Genet.* 14, 3697–3708 (2005)
- TROTTI, L. M., BHADRIRAJU, S., and RYE, D. B.: An update on the pathophysiology and genetics of restless legs syndrome. *Curr. Neurol. Neurosci. Rep.* 8, 281–287 (2008)
- WALTERS, A. S.: Clinical identification of the simple sleep-related movement disorders. *Chest* 131, 1260–1266 (2007)
- WATSON, N. F., GOLDBERG, J., ARGUELLES, L., and BUCHWALD, D.: Genetic and environmental influences on insomnia, daytime sleepiness, and obesity in twins. *Sleep* 29, 645–649 (2006)
- WEISS, J. W., LAUNOIS, S. H., ANAND, A., and GARPESTAD, E.: Cardiovascular morbidity in obstructive sleep apnea. *Prog. Cardiovasc. Dis.* 41, 367–376 (1999)
- WINKELMAN, J. W.: Periodic limb movements in sleep-endophenotype for restless legs syndrome? *New Engl. J. Med.* 357, 703–705 (2007)
- WINKELMANN, J.: Genetics of restless legs syndrome. *Curr. Neurol. Neurosci. Rep.* 8, 211–216 (2008)
- WINKELMANN, J., LICHTNER, P., PUTZ, B., TRENKWALDER, C., HAUKE, S., MEITINGER, T., STROM, T., and MULLER-MYHSOK, B.: Evidence for further genetic locus heterogeneity and confirmation of RLS-1 in restless legs syndrome. *Mov. Disord.* 21, 28–33 (2006)
- WINKELMANN, J., LICHTNER, P., SCHORMAIR, B., UHR, M., HAUKE, S., STIASNY-KOLSTER, K., TRENKWALDER, C., PAULUS, W., PEGLAU, I., EISENSEHR, I., ILLIG, T., WICHMANN, H. E., PFISTER, H., GOLIC, J., BETTECKEN, T., PUTZ, B., HOLSBOER, F., MEITINGER, T., and MULLER-MYHSOK, B.: Variants in the neuronal nitric oxide synthase (nNOS, NOS1) gene are associated with restless legs syndrome. *Mov. Disord.* 23, 350–358 (2008)
- WINKELMANN, J., MULLER-MYHSOK, B., WITTCHEN, H. U., HOCK, B., PRAGER, M., PFISTER, H., STROHLE, A., EISENSEHR, I., DICHGANS, M., GASSER, T., and TRENKWALDER, C.: Complex segregation analysis of restless legs syndrome provides evidence for an autosomal dominant mode of inheritance in early age at onset families. *Ann. Neurol.* 52, 297–302 (2002)
- WINKELMANN, J., SCHORMAIR, B., LICHTNER, P., RIPKE, S., XIONG, L., JALILZADEH, S., FULDA, S., PUTZ, B., ECKSTEIN, G., HAUKE, S., TRENKWALDER, C., ZIMPRICH, A., STIASNY-KOLSTER, K., OERTEL, W., BACHMANN, C. G., PAULUS, W., PEGLAU, I., EISENSEHR, I., MONTPLAISIR, J., TURECKI, G., ROULEAU, G., GIEGER, C., ILLIG, T., WICHMANN, H. E.,

- HOLSBOER, F., MULLER-MYHSOK, B., and MEITINGER, T.: Genome-wide association study of restless legs syndrome identifies common variants in three genomic regions. *Nature Genet.* 39, 1000–1006 (2007)
- YOUNG, T., EVANS, L., FINN, L., and PALTA, M.: Estimation of the clinically diagnosed proportion of sleep apnea syndrome in middle-aged men and women. *Sleep* 20, 705–706 (1997)
- YOUNG, T., PALTA, M., DEMPSEY, J., SKATRUD, J., WEBER, S., and BADR, S.: The occurrence of sleep-disordered breathing among middle-aged adults. *New Engl. J. Med.* 328, 1230–1235 (1993)
- ZEITZER, J. M., NISHINO, S., and MIGNOT, E.: The neurobiology of hypocretins (orexins), narcolepsy and related therapeutic interventions. *Trends Pharmacol. Sci.* 27, 368–374 (2006)

Prof. Dr. Peter YOUNG  
Klinik und Poliklinik für Neurologie  
Sektion Schlafmedizin  
Albert-Schweitzer-Straße 33  
48149 Münster  
Bundesrepublik Deutschland  
Tel.: +49 251 8348331  
Fax: +49 251 8348181  
E-Mail: young@uni-muenster.de

# **Der Begriff der Natur**

## **Wandlungen unseres Naturverständnisses und seine Folgen**

### **Gaterslebener Begegnung 2009**

gemeinsam veranstaltet  
vom Leibniz-Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung Gatersleben  
und von der Deutschen Akademie der Naturforscher Leopoldina  
vom 7. bis 9. Mai 2009

Nova Acta Leopoldina N. F., Bd. 109, Nr. 376  
Herausgegeben von Anna M. WOBUS (Gatersleben), Ulrich WOBUS (Gatersleben)  
und Benno PARTHIER (Halle/Saale)  
(2010, 266 Seiten, 50 Abbildungen, 1 Tabelle, 29,95 Euro, ISBN 978-3-8047-2801-1)

Das Verhältnis des Menschen zur „Natur“ ist in seiner Geschichte durch unterschiedliche Beziehungen geprägt. Seit der Aufklärung wird die Natur dem Menschen zu seiner Nutzung untergeordnet und zunehmend ausgebeutet. Natur wurde zum Objekt technischen, ökonomischen und politischen Handelns. Spätestens seit Mitte des vorigen Jahrhunderts wissen wir um die akute Gefährdung natürlicher Lebensräume.

Die Gaterslebener Begegnung 2009 widmete sich daher dem Thema „Der Begriff der Natur“ und untersuchte Wandlungen des Naturverständnisses sowie die Folgen der gegenwärtigen Auffassungen von Natur. Behandelt werden unser Bild vom Leben, die Frage „Was ist Natur?“ aus verschiedenen Perspektiven und die philosophische Analyse der Stellung des Menschen in der Natur. Beiträge zum Naturverständnis in der Gegenwartskunst und zum Problemkomplex Naturrecht und Bioethik sowie eine Diskussion „Frieden mit der Natur“ ergänzen den Band.

## Diagnostik und Therapie chronobiologischer Störungen im schlafmedizinischen Alltag

Tilmann MÜLLER (Münster)

Mit 3 Abbildungen

### Zusammenfassung

Schlafen und Wachen werden durch einen endogenen circadianen Rhythmus gesteuert, der zusätzlich zu einer homöostatischen Komponente über Zeitpunkt, Dauer und Qualität des menschlichen Nachtschlafs entscheidet. In der Internationalen Klassifikation der Schlafstörungen (ICSD-2) findet sich in Kapitel IV eine explizite Auflistung circadianer Schlaf-Wach-Rhythmus-Störungen. Die Diagnostik dieser Störungen umfasst neben einer umfassenden Anamnese zusätzliche spezielle Fragebögen zum Morgen-Abend-Typus, Schlafprotokolle und aktigraphische Messungen. Die therapeutischen Interventionen lassen sich in drei Kategorien einteilen: (a) Vorgabe festgelegter Zubettgeh- und Aufstehzeiten (*sleep scheduling/chronotherapy*), (b) Phasenverschiebung des circadianen Schlaf-Wach-Rhythmus mit Hilfe von Zeitgebern (Licht und Melatonin) und (c) medikamentöse Interventionen zur Verbesserung von Schlaf und Vigilanz. Interessanterweise ist der Aspekt biologischer Rhythmen bislang in der Diagnostik und Therapie der primären Insomnie, als einer der häufigsten Schlafstörungsarten, weitgehend unberücksichtigt geblieben. Unsere eigenen Daten zeigen jedoch, dass eine Morgen-Abend-Typus-Disposition bei einem Großteil dieser Patienten nachweisbar ist und eine entsprechend unterschiedliche therapeutische Herangehensweise impliziert. Gängige Therapieprogramme zur Behandlung primärer Insomnien berücksichtigen diese mögliche chronobiologische Dimension der Störung nicht und dürften sich im Einzelfall aus chronobiologischer Sicht sogar nachteilig auswirken (z. B. die nächtliche Lichtexposition als Folge der sogenannten Stimulus-Kontroll-Technik). Melatonin, obgleich ein genuines Chronotherapeutikum, wurde unlängst in der EU in retardierter Form als „Hypnotikum“ zur Behandlung primärer Insomnien zugelassen. Dabei ist unklar, ob nicht z. B. eine künstlich erhöhte Melatoninkonzentration in der ersten Nachthälfte bei Morgentypen als Zeitgeber zum falschen Zeitpunkt zu einer Exazerbation der Störung führt. Insgesamt ist daher festzustellen, dass im schlafmedizinischen Alltag chronobiologische Erkenntnisse zurzeit noch eine unzureichende Rolle spielen.

### Abstract

Sleep and wakefulness are controlled by an endogenous circadian rhythm, which together with a homeostatic component determines the timing, duration and quality of the human night sleep. The International Classification of Sleep Disorders (ICSD-2) contains an explicit list of circadian sleep-wake rhythm disorders in Chapter IV. The diagnosis of these disorders requires a comprehensive anamnesis of the sleep-wake-behavior, additional special morningness-eveningness questionnaires, sleep logs and actigraphy. Treatment strategies fall into three categories: (a) prescribed sleep scheduling (i.e. chronotherapy), (b) circadian phase shifting with light exposure and melatonin administration and (c) medications that can promote sleep or wakefulness. Interestingly, the aspect of chronobiology has been largely ignored in the treatment of chronic primary insomnia, as one of the most common types of sleep disorders. However, our own data show that a morningness-eveningness type disposition is detectable in a substantial portion of these patients and implies a correspondingly different therapeutic approach. Current therapies for the treatment of primary insomnia do not take into account this possible chronobiological dimension of the problem. From a chronobiological point of view they might even have detrimental effects in particular cases (e.g. dysfunctional nighttime light exposure as a result of the so-called stimulus-control techniques). Melatonin, although a genuine chronotherapeutic drug, was recently approved in the EU as a “hypnotic” for the treatment of primary insomnia. In this context it is unclear for example in early morning awakening insomnia whether or not an artificially increased melatonin concentration in the first half of the night acts as a *Zeitgeber* at the wrong time and can lead to an exacerbation of the disorder. Overall chronobiological findings still play an insufficient role in the clinical practice of sleep medicine.



## 1. Einführung: Grundlagen der Schlafregulation

Schlafen und Wachen werden durch zwei fundamentale Prozesse reguliert: einer homöostatischen und einer endogen-rhythmischen Komponente, die beide durch externe Faktoren modifiziert werden können (BORBÉLY 1982). Die homöostatische Komponente bzw. der bei BORBÉLY sogenannte „Prozess S“ entspricht der Dauer der vorangegangenen Wachzeit. Nimmt diese zu, so nehmen auch das Schlafbedürfnis bzw. die nachfolgende Schlafdauer und Schlafintensität zu. Als physiologisches Korrelat dieser Komponente gilt der Tiefschlaf, da seine Dauer proportional der vorausgegangenen Wachzeit ist und sein Anteil mit dem zeitlichen Verlauf der Schlafperiode progressiv abnimmt. Die homöostatische Komponente spielt auch phänomenologisch in der Sichtweise von Patienten mit chronischen Insomnien und wissenschaftlich bei der Planung von entsprechenden Therapiestudien eine herausragende Rolle. Die Sichtweise des Patienten fokussiert jede Nacht und jeden Morgen aufs Neue auf die Frage: „Wie viele Stunden habe ich heute geschlafen.“ (Dieses Merkmal ist so ausgeprägt, dass man in der Fachliteratur treffender Weise von einer „performance anxiety“ spricht, die dem Insomniepatienten den Schlaf raubt, indem er den Schlaf in seiner subjektiven Wahrnehmung und Bewertung zur Leistung stilisiert.) Aber auch der wissenschaftliche Blickwinkel in Therapiestudien ist im Ergebnis vorrangig auf quantitative Variablen wie Einschlafdauer und Gesamtschlafdauer eingeschränkt, während qualitative Aspekte wie Schlafkontinuität, Leistungsfähigkeit und subjektive Befindlichkeit am Tage kaum Berücksichtigung finden.

Die endogen-rhythmische Komponente bzw. der „Prozess C“ bewirkt, dass unabhängig von der Wachdauer die Einschlafneigung und Schlafdauer im Laufe des 24-h-Tages variieren. Langzeituntersuchungen unter zeitgeberfreien Bedingungen ergaben, dass die meisten biologischen Parameter eine endogen aktiv gesteuerte Rhythmik aufweisen (WEVER 1979). Diese regelmäßigen Schwankungen bleiben auch ohne externe Zeitgeber wie z. B. Hell/Dunkel-Einflüsse erhalten. Die Dauer der Rhythmik beträgt dann allerdings im Mittel > 24 h und wird daher als circadian bezeichnet.

Als wichtigster endogener Schrittmacher der circadianen Rhythmik gilt der hypothalamische Nucleus suprachiasmaticus (SCN), der über den retinohypothalamischen Trakt ohne Umschaltung mit Hell/Dunkel-Information aus der Retina versorgt wird (KLEIN et al. 1991). Über das cervicale Rückenmark wird das Signal vom SCN zum Pinealorgan weitergeleitet und bewirkt dort – bei ausreichender Reizstärke – die Hemmung der Melatoninausschüttung.

Unter natürlichen Lebensbedingungen gehen diese endogenen rhythmischen Schwankungen synchron mit dem Hell/Dunkel-Wechsel einher. So beginnt die Körpertemperatur am frühen Abend zu sinken, erreicht ihr Minimum gegen Ende der Nacht und beginnt kurz vor dem Erwachen wieder zu steigen. Daran gekoppelt findet sich der Einschlafzeitpunkt in der Regel 5–6 h vor dem Temperaturminimum bzw. dem circadianen Tiefpunkt. Ungefähr 1–3 h nach Durchschreiten des Temperaturminimums kommt es umgekehrt zum Erwachen. Die Melatoninsekretion beginnt ca. 2 h vor dem Einschlafzeitpunkt bzw. 7 h vor dem Temperaturminimum, erreicht ihren Höhepunkt zwischen 1:00 Uhr und 3:00 Uhr nachts und geht dann bis um 9:00 Uhr morgens auf ein kaum noch nachweisbares Niveau zurück.

Kommt es – wie im Falle von Schichtarbeit – zu einer Abkopplung des Schlaf-Wach-Rhythmus vom Temperatur- und Melatoninrhythmus, dann kann die Schlafdauer abhängig vom Zeitpunkt bzw. der Phasenlage innerhalb des circadianen Rhythmus erheblich variieren.

Bei einem verzögerten Einschlafzeitpunkt zwischen 7:00 und 11:00 Uhr morgens, d. h. bei ansteigender Körpertemperatur, erreicht sie ein Minimum, nimmt bei weiterer Verzögerung allmählich wieder zu und steigt bei einem Einschlafzeitpunkt um ca. 19 h auf ein Maximum an. Wird der Einschlafzeitpunkt noch weiter hinausgezögert, dann fällt die nachfolgende Schlafdauer trotz der inzwischen auf 40 h angewachsenen Wachzeit wieder auf ihr normales Ausgangsniveau ab (AKERSTEDT und GILLBERG 1981).

Die Kopplung der endogenen Oszillatoren führt weiterhin dazu, dass dispositionelle Unterschiede in diesem Bereich sich auch in einem unterschiedlichen Schlaf-Wach-Verhalten niederschlagen: So zeigen sich bei den volkstümlich als „Lerchen“ und „Eulen“ bezeichneten Morgen- und Abendtypen entsprechende Unterschiede im circadianen Temperaturverlauf (HORNE und ÖSTBERG 1977, KERCKHOFF 1985). Die Körpertemperatur der Abendtypen weist dabei eine größere Amplitude und ein um ca. 2 h gegenüber Morgentypen verschobenes Maximum auf. Entsprechend gehen sie später zu Bett und fühlen sich in der ersten Tageshälfte weniger vital („Morgenmuffel“) als Morgentypen, bei denen umgekehrt der steilere Abfall der Temperaturkurve am Abend eine entsprechend frühere Zubettgehzeit bedingt. Entsprechend ihrer unterschiedlichen circadianen Rhythmik haben Abendtypen ein erhöhtes Risiko für Einschlafstörungen, Morgentypen hingegen für Durchschlafstörungen und Früh-erwachen.

Die zeitliche Abweichung der endogenen Rhythmik vom 24-h-Tag macht eine tagtägliche Anpassung und Synchronisation des Organismus mit der Außenwelt erforderlich. Licht erweist sich dabei – entsprechend der Physiologie des SCN – als wichtigster Zeitgeber, um die endogene circadiane Rhythmik mit dem 24-h-Hell-Dunkel-Rhythmus unserer Umwelt zu synchronisieren. Die Wirksamkeit von Licht als Zeitgeber hängt dabei von mehreren Variablen ab.

Abhängig vom Zeitpunkt der Lichtexposition bzw. der jeweiligen circadianen Phasenlage kann Licht durch Suppression der Melatoninsekretion eine Phasenvorverlagerung, Phasenverzögerung oder keinen Einfluss haben (KHALSA et al. 2003). Licht in den Abendstunden bzw. vor dem circadianen Minimum kann eine Phasenverzögerung von bis zu mehreren Stunden bewirken. Umgekehrt kommt es bei einer Lichtexposition in der zweiten Nachthälfte bzw. nach dem circadianen Minimum zu einer Phasenvorverlagerung (siehe Abb. 1). Die Größe dieser Effekte ist abhängig von der Lichtintensität. Während erste Studien in den 1980er Jahren davon ausgingen, dass nur sogenanntes „bright light“, d. h. weißes Licht mit einer dem Tageslicht vergleichbaren Intensität von 2500–10000 Lux, eine Melatonsuppression bewirken könne (LEWY et al. 1985), zeigen neuere Arbeiten, dass auch wesentlich geringere Lichtstärken von 100–200 Lux Phasenverschiebungen zur Folge haben können (BOIVIN und CZEISLER 1998, ZEITZER et al. 2000). Praktisch bedeutet dies, dass die Exposition mit normaler Raumbeleuchtungsstärke, z. B. in der zweiten Nachthälfte, eine Phasenvorverlagerung bewirken kann, was unter therapeutischen und schlafhygienischen Gesichtspunkten von Bedeutung ist. Neben der Lichtintensität spielen ferner die Dauer der Lichtexposition und die Wellenlänge des Lichts für mögliche chronobiologische Effekte eine Rolle. Inzwischen ist nachgewiesen, dass das Auge spezielle retinale Ganglienzellen besitzt, die unabhängig von den klassischen visuellen Photorezeptoren eine nichtvisuelle Funktion als circadiane Photorezeptoren haben (BERSON 2003). Sie verfügen über ein eigenes Photopigment, das Melanopsin. Dieses hat sein Absorptionsmaximum im Bereich von 459–486 nm, was in etwa dem blauen Licht des Morgenhimmels entspricht. Lichtquellen, die diesen Wellenlängenbereich verstärkt abstrahlen, sind daher besonders geeignet, den SCN maximal zu stimulieren und Melatonin zu supprimieren (WRIGHT und LACK 2001).

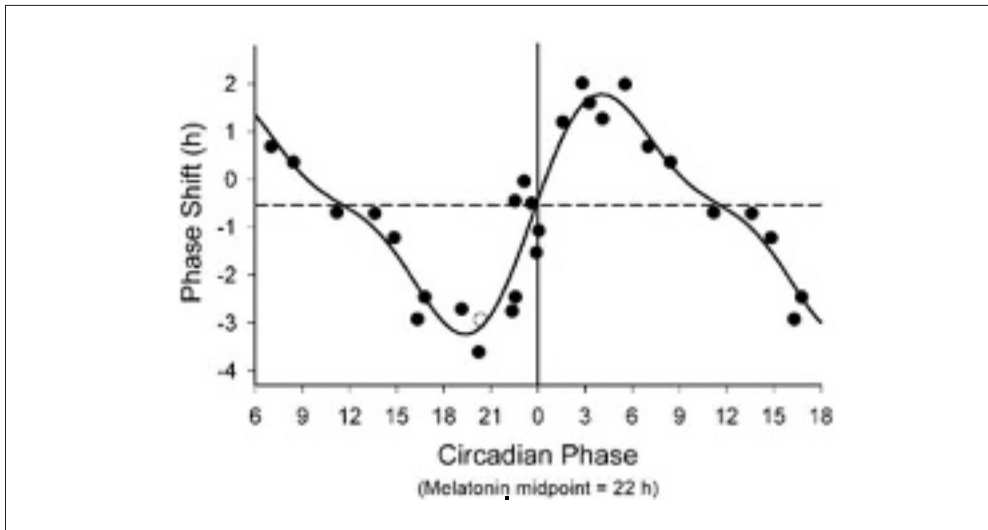


Abb. 1 Phasen-Response-Kurve für Licht mit einer Intensität von 10000 Lux (aus KHALSA et al. 2003)

Dies ist unter praktischen Gesichtspunkten insofern bedeutsam, als moderne Energiesparlampen, aber auch Laptop-Bildschirme einen Peak in genau diesem Wellenlängenbereich des blauen Lichts aufweisen. Erste Studien zeigen, dass die Benutzung entsprechender Bildschirme in den Abendstunden zu einer signifikanten Unterdrückung und Verzögerung der Melatoninausschüttung führen kann (CAJOCHEN et al. 2010). Bereits eine 30-minütige Blaulichtexposition am Abend kann zu einer Verkürzung der ersten Tiefschlafphase in der Nacht beitragen (STOLL et al. 2010).

## 2. Circadiane Schlaf-Wach-Rhythmusstörungen

Störungen der verschiedenen Komponenten des biologischen Rhythmus können zu einer heterogenen Gruppe von Schlaf-Wach-Störungen führen, denen die Unfähigkeit gemeinsam ist, zur gewünschten Zeit schlafen zu können. In der internationalen Klassifikation der Krankheiten (ICD-10) finden sich circadiane Schlaf-Wach-Rhythmusstörungen relativ undifferenziert unter dem Diagnoseschlüssel F51.2 (eher psychisch bedingt) und G47.2 (eher organisch bedingt) wieder. In der über 80 verschiedene Diagnosen umfassenden Internationalen Klassifikation der Schlafstörungen (ICSD: *American Academy of Sleep Medicine* 2005) stellen die circadianen Schlaf-Wach-Rhythmusstörungen hingegen eine von fünf weiteren Oberklassifikationen dar (Insomnien, schlafbezogene Atmungsstörungen, Hypersomnien, schlafbezogene Bewegungsstörungen und Parasomnien) und sind wie folgt weiter differenziert:

- verzögertes Schlafphasensyndrom,
- vorverlagertes Schlafphasensyndrom,
- irregulärer Schlaf-Wach-Rhythmus,
- freilaufender Schlaf-Wach-Rhythmus,
- Jetlag,
- Schichtarbeit.

Darüber hinaus gibt es eine diagnostische Kategorie für circadiane Rhythmusstörungen aufgrund körperlicher Erkrankungen (hierzu zählen vor allem neurodegenerative Erkrankungen wie Alzheimer-Demenz und Parkinson, Blindheit und hepatische Enzephalopathien) und substanzinduzierte circadiane Rhythmusstörungen.

Die Häufigkeit circadianer Schlaf-Wach-Rhythmusstörungen ist unzureichend dokumentiert. Schlafstörungen als Folge von Schichtarbeit dürften angesichts der weiten Verbreitung von Schichtarbeit (ca. 10 % der Erwerbstätigen; KNAUTH und HORNBERGER 1995) am häufigsten sein. 32 % der Nachtschichtarbeiter und 26 % der Wechselschichtarbeiter erfüllen die Kriterien einer Schlaf-Wach-Störung als Folge von Schichtarbeit (DRAKE et al. 2004). Dennoch ist der Anteil an Patienten mit der Diagnose einer circadianen Schlaf-Wach-Rhythmusstörung im Vergleich zu anderen schlafmedizinischen Diagnosen eher verschwindend gering (ca. 2 %; DAGAN und EISENSTEIN 1999). Zu den häufigsten Differentialdiagnosen dieser Gruppe zählt das verzögerte Schlafphasensyndrom.

### *2.1 Verzögertes Schlafphasensyndrom*

Das verzögerte Schlafphasensyndrom (*Delayed Sleep Phase Syndrom* – DSPS) ist eine Störung, bei der die Hauptbeschwerde in Einschlafstörungen besteht, wenn die Patienten versuchen, zu „normalen“ Zeiten ins Bett zu gehen. Die Hauptschlafphase selber ist in der Regel ungestört. Dem DSPS liegt eine Phasenverzögerung der circadianen Schlaf-Wach-Rhythmik zugrunde: Körpertemperatur und Melatoninausschüttung weisen ebenso wie die spontane Einschlafbereitschaft und Aufwachzeit einen verzögerten Verlauf im Vergleich zu gesunden Kontrollen auf. Neben genetischen Faktoren (Polymorphismen im circadianen Clock-Gen *hPer3*) spielen Umwelteinflüsse (Lichtexposition, Schichtarbeit, Fernreisen) und Alter (höhere Prävalenz in der Adoleszenz und bei jungen Erwachsenen) bei der Entstehung und Aufrechterhaltung eine Rolle. DSPS ist damit letztendlich eine extreme Variante der normalen Abendtypus-Disposition. Als Faustregel spricht man von einem DSPS, wenn die habituelle frei gewählte Zubettgehzeit um mehr als zwei Stunden von der sozialen Norm abweicht.

Soziale und gesellschaftliche Verpflichtungen (Schule, Beruf), die ein normal frühes Aufstehen erforderlich machen, führen beim DSPS werktags zu einer verkürzten Schlafdauer und kumulierender Schläfrigkeit, welche die Patienten an freien Tagen durch exzessives Ausschlafen kompensieren. Der Versuch, durch früheres Zubettgehen an Werktagen für eine ausreichende Schlafdauer zu sorgen, führt nicht nur zu Einschlafstörungen, sondern sekundär häufig auch zu einer zunehmenden Fehlkonditionierung im Sinne einer psychophysiologischen Insomnie.

Therapeutisch hat sich der Einsatz von Zeitgebern (Melatonin, Lichtexposition) in Kombination mit verhaltensmedizinischen Maßnahmen als effektiv erwiesen. Chronotherapeutisch ist je nach Ausprägung der Störung und den sozialen Gegebenheiten des Patienten abzuwägen, ob in der initialen Therapiephase eine rasche Vorverlagerung (z. B. alle drei Tage zwei Stunden später zu Bett gehen bis zu Erreichung der angezielten konventionellen Zubettgehzeit) oder eine langsamere, gegen die innere Uhr gerichtete, Rückwärtsverlagerung zu bevorzugen ist (LACK und WRIGHT 2007a, b).

### *2.2 Vorverlagertes Schlafphasensyndrom*

Das vorverlagerte Schlafphasensyndrom ist der Gegenpol zum verzögerten Schlafphasensyndrom. Es handelt sich also um eine Extremvariante der normalen Morgentypus-Disposition,

bei welcher der Einschlafzeitpunkt auf eine Zeit zwischen 18:00 und 21:00 Uhr vorverlagert ist und es entsprechend zu einem Früherwachen zwischen 2:00 Uhr und 5:00 Uhr kommt. Ähnlich wie bei einem DSPS werden genetische Faktoren (Mutationen des circadianen Clock-Gens *hPer2*) als mögliche Ursache gerade bei jüngeren Patienten diskutiert (TOH et al. 2001). Da sich mit zunehmendem Alter die Phasendisposition auf der Zeitachse nach links verschiebt, findet sich das vorverlagerte Schlafphasensyndrom gehäuft vor allem bei älteren Patienten, die zuvor eine noch normale Morgentypusdisposition aufwiesen. Im hohen Alter tragen institutionelle Bedingungen (vorzeitiges zu Bett bringen von Bewohnern in Pflege- und Altersheimen) zur Entstehung und Aufrechterhaltung bei.

### 2.3 Irregulärer Schlaf-Wach-Rhythmus

Im Gegensatz zum verzögerten und vorverlagerten Schlafphasensyndrom findet sich beim irregulären Schlaf-Wach-Rhythmus keine erkennbare Rhythmizität. Schlafen und Wachen wechseln variabel im Laufe des 24-h-Tages, und die Betroffenen haben gleichzeitig – je nach Tageszeit – Symptome einer Insomnie und/oder Hypersomnie. Als Ursache werden anatomisch bedingte oder funktionelle Störungen des circadianen Schrittmachers vermutet, wie man sie gehäuft bei Demenzerkrankten und Kindern mit mentaler Retardierung vorfindet. Schlechte Schlafhygiene und das Fehlen externer Zeitgeber wie Licht, körperliche Aktivitäten und sozial vorgegebene Termine z. B. bei institutionalisierten Patienten können mit zur Auslösung und Aufrechterhaltung beitragen.

### 2.4 Freilaufender Schlaf-Wach-Rhythmus

Ein freilaufender Schlaf-Wach-Rhythmus ist dadurch charakterisiert, dass Schlafen und Wachen allein durch die Periodendauer des endogenen Schrittmachers bestimmt sind und nicht durch Zeitgeber auf einen 24-h-Rhythmus resynchronisiert werden. Da die endogene Periodendauer größer ist als 24 h, kommt es entsprechend zu einer kontinuierlichen Verzögerung der Hauptschlafphase. Dieses Phänomen findet sich experimentell unter Isolationsbedingungen wie z. B. in den Bunkerexperimenten am Max-Planck-Institut (ASCHOFF 1967). Als tatsächliche Schlafstörung findet es sich bevorzugt bei vollständig blinden Menschen (NAKAGAWA et al. 1992).

### 2.5 Jetlag

Beim Jet lag kommt es vorübergehend zu einer Diskrepanz zwischen endogenem Rhythmus und externem 24-h-Tag-Nacht-Rhythmus als Folge eines abrupten Zeitonenwechsels. Typische Symptome sind gestörter Schlaf, Tagesschläfrigkeit, allgemeine Befindlichkeitsstörungen und Magen-Darm-Beschwerden. Die Schwere der Jetlag-Symptomatik nimmt mit der Anzahl der überflogenen Zeitonen zu. Als Faustregel gilt, dass zur Resynchronisation mit der neuen Umwelt ein Tag pro Zeitzone benötigt wird. Bei mehr als 6 h Diskrepanz kann es jedoch auch zu einer erheblich längeren Resynchronisationsphase kommen. Ältere Menschen sind in der Regel stärker und länger vom Jetlag betroffen. Eine Übersicht zum Thema Jetlag findet sich bei HAIMOV und ARENDT (1999).

## 2.6 Schichtarbeit

Bei Schlaf-Wach-Störungen als Folge von Schichtarbeit kommt es typischerweise nach Nachtschichten oder vor Frühschichten zu ausgeprägteren Schlafstörungen. Typisch sind z. B. Einschlafstörungen vor Frühschichten, wenn der Betroffene versucht, durch ein vorzeitiges Zubettgehen auf eine ausreichende Schlafdauer zu kommen, oder umgekehrt Durchschlafstörungen bzw. ein vorzeitiges Erwachen nach Nachtschichten, wenn die Hauptschlafphase bei aufsteigender Körpertemperatur erfolgt und dadurch in aller Regel verkürzt ist. Ein weiteres Symptom der Schichtarbeit stellt die erhöhte Einschlafneigung und Fehlerrate während der Nachtschichten dar (AKERSTEDT 2003). Besonders anfällig für solche Schichtarbeits syndrome sind Morgenmenschen, die aufgrund ihrer endogenen Rhythmik die größten Schwierigkeiten haben, nachts einerseits wach zu bleiben und andererseits nach Nachtschichten morgens einzuschlafen. Abendmenschen haben umgekehrt geringere Schwierigkeiten, die Nachtschicht zu bewältigen. Ihr Hauptproblem besteht darin, vor Frühschichten auf eine ausreichende Schlafdauer zu kommen, da ihr biologischer Rhythmus auf ein vorzeitiges Zubettgehen mit Einschlafstörungen reagiert. Generell ist Wechselschichtarbeit (mit Nachtschichten) mit einem erhöhten gesundheitlichen Risiko für Magen-Darm-, Stoffwechsel- und Herz-Kreislauf-erkrankungen assoziiert (KNUTSSON 2003). Bei Nachtschichtarbeiterinnen findet sich außerdem ein erhöhtes Risiko für Brustkrebserkrankungen (HANSEN 2001), das möglicherweise auf die lichtinduzierte nächtliche Melatoninsuppression zurückzuführen ist. Therapeutisch besteht bei Schlafstörungen im Rahmen von Schichtarbeit immer das Dilemma, dass die beste Therapie – nämlich die Beendigung der Schichtarbeit – in der Regel aufgrund der ökonomisch-gesellschaftlichen Rahmenbedingungen nicht möglich ist. Diagnostisch ist meistens eine sehr sorgfältige Anamnese der Symptome und der Alltagsgestaltung für jede Schicht erforderlich, um Ansatzpunkte für günstige Copingstrategien zu finden, die dem jeweiligen Individuum eine erträgliche Anpassung an ein eigentlich chronobiologisch *per se* ungünstiges Verhaltensmuster erlauben.

## 3. Diagnostik und Therapie von Schlaf-Wach-Rhythmusstörungen

### 3.1 Diagnostik

Klinisch präsentieren sich Patienten mit circadianen Schlaf-Wach-Rhythmusstörungen vorrangig mit einer Klage über Ein- oder Durchschlafstörungen und/oder Tagesschläfrigkeit. Diagnostisch besteht daher immer die Gefahr, dass die Störung irrtümlich als eigenständige Insomnie oder Hypersomnie fehldiagnostiziert wird (z. B. kommt es häufig vor, dass das Früherwachen von Patienten mit einem vorverlagerten Schlafphasensyndrom wegen der Ähnlichkeit der Symptomatik als Insomnie im Rahmen einer Depression – gekennzeichnet ebenfalls durch ein Früherwachen – eingestuft wird). Erst eine genauere schlafmedizinische Anamnese, die detailliert Schlaf- und Alltagsgewohnheiten, Störungsgeschichte und andere schlafmedizinisch relevante Symptome abfragt, kann einer solchen Fehldiagnostik vorbeugen.

Im klinischen Alltag ist die der Anamnese nachgeordnete valide Messung circadianer Phasemarker (Körpertemperatur, Melatonin-tagesprofil, Zeitpunkt des Beginns der Melatoninsekretion am Abend) in der Regel nicht praktikabel, da diese Messungen aufgrund von Maskierungseffekten durch Licht, Mahlzeiten, Temperatur und Bewegung eine aufwendige sogenannte „constant routine“ voraussetzen.

Alternativ wird in den diagnostischen Kriterien der ICSD bei circadianen Schlaf-Wach-Rhythmusstörungen die Verwendung von Schlaf-Wach-Protokollen oder einer Aktigraphie über mindestens sieben Tage empfohlen. Zusätzlich können Fragebögen zur Erfassung der Morgen- versus Abendtypus-Ausprägung zur Anwendung kommen. Eine kardiorespiratorische Polysomnographie ist in der Regel bei circadianen Schlaf-Wach-Rhythmusstörungen nicht zwingend erforderlich, sondern dient je nach individueller Symptomatik dem Ausschluss anderer schlafmedizinisch relevanter Ursachen.

Schlafprotokolle bzw. sogenannte Schlaftagebücher stellen sowohl in der experimentellen als auch klinischen Schlafforschung das am häufigsten verwendete Messinstrument dar. Sie sind einfach und zeitsparend zu handhaben (ca. 2–3 min Bearbeitungszeit abends vor dem Zubettgehen und morgens nach dem Aufstehen) und gelten als valides und reliables Instrument (HOFFMANN et al. 1997). Zwar besteht, absolut betrachtet, eine Diskrepanz zwischen subjektiven und objektiven (polysomnographischen) Messmethoden von Schlafparametern (so werden insbesondere die tatsächliche Aufwachhäufigkeit unter- und die Wachdauer in der Nacht subjektiv erheblich überschätzt), aber diese Diskrepanzen nehmen nur bei Insomniepatienten größere Ausmaße an, und beide Methoden korrelieren insgesamt zufriedenstellend miteinander (CARSKADON et al. 1976, COATES et al. 1982).

Aktigraphen sind Messgeräte von der Größe einer Armbanduhr, die zur Aufzeichnung von Beschleunigung bzw. Bewegung über mehrere Tage oder Wochen am Hand- oder Fußgelenk getragen werden. Aus dem resultierenden Ruhe-Aktivitätsmuster (siehe Abb. 2) lässt sich nicht nur die Schlafdauer zuverlässig ableiten, sondern die Ergebnisse korrelieren auch signifikant mit Messungen des Melatonin- und des Körpertemperaturrhythmus (ANCOLI-ISRAEL et al. 2003, LITTNER et al. 2003).

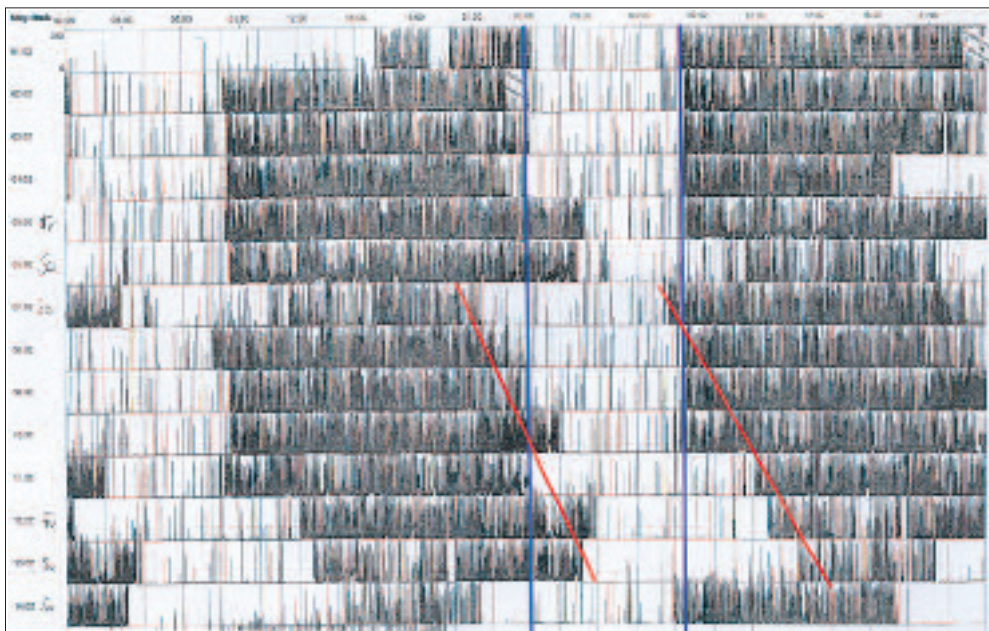


Abb. 2 Aktivitätsmuster eines Abendtypus mit progredienter Phasenverzögerung der Zubettgeh- und Aufstehzeiten (rot markiert), nachdem der Patient am Wochenende erkennbar später zu Bett gegangen war als an den Werktagen zuvor.

Der von HORNE und ÖSTBERG (1976) entwickelte Morgen- versus Abendtypus-Fragebogen („Morningness-Eveningness Questionnaire“, MEQ) dient der Bestimmung der individuellen circadianen Phasenlage und setzt sich aus 19 Items zusammen, in denen nach Zeitpunkten bzw. Zeiträumen gefragt wird, zu denen bestimmte Verhaltensweisen auftreten oder individuell bevorzugt werden. Eine deutsche Übersetzung liegt von GRIEFAHN et al. (2001) vor. Der Gesamtscore korreliert gut mit den entsprechenden Unterschieden im circadianen Verlaufsmuster von Körpertemperatur, Adaptationsfähigkeit bezüglich Nachtschichtarbeit, Alter (zunehmende Morgentypusausprägung) und Symptomatik der Schlafstörung (Ein- versus Durchschlafstörungen).

### *3.2 Therapie von Schlaf-Wach-Rhythmusstörungen*

Die therapeutischen Interventionen zur Behandlung circadianer Schlaf-Wach-Rhythmus-Störungen lassen sich in drei Kategorien einteilen: (a) Vorgabe festgelegter Zubettgeh- und Aufstehzeiten sowie der Zeiten für Kurzschlafphasen am Tage (*sleep scheduling/chronotherapy*), (b) Phasenverschiebung des circadianen Schlaf-Wach-Rhythmus mit Hilfe von Zeitgebern (Licht und Melatonin) und (c) medikamentöse Interventionen mit schlafanstoßenden und/oder vigilanzsteigernden Wirkstoffen.

#### *3.2.1 Vorgabe festgelegter Zubettgeh- und Aufstehzeiten*

Speziell als „Chronotherapie“ bezeichnet wird ein von CZEISLER et al. (1981) vorgestelltes Verfahren zur Behandlung des verzögerten Schlafphasensyndroms, bei dem der Patient seinen Zubettgehzeitpunkt pro Tag um jeweils drei Stunden so lange verzögert, bis er bei der gewünschten Zubettgehzeit angelangt ist. Inzwischen gibt es allerdings Fallberichte (OREN und WEHR 1992), bei denen es als Folge einer solchen Chronotherapie zur Entwicklung eines freilaufenden Schlaf-Wach-Rhythmus kam. In der Praxis wird die klassische Chronotherapie von den meisten Patienten ohnehin abgelehnt, da sie mit ihren Alltagsverpflichtungen kollidiert. Stattdessen wird häufiger der Weg einer langsamen Vorverlagerung (*phase advance*) der Zubettgeh- und Aufstehzeit bevorzugt. Da dabei entgegen der längeren Periodendauer der „inneren Uhr“ gearbeitet wird, ist eine solche Vorverlagerung in der Regel nur in kleinen Schritten von z. B. 10–15 min/Tag in Kombination mit anderen Maßnahmen (z. B. vorübergehende Gabe von Hypnotika oder Melatonin; zusätzliche Schlafkompression siehe unten) möglich.

Im zweiten Schritt muss nach Erreichung des angestrebten neuen Zubettgehzeitpunktes dieser durch strikte Einhaltung insbesondere fester Aufstehzeiten eingehalten werden. Gerade für Abendmenschen stellt der Verzicht auf das längere Ausschlafen an freien Tagen motivational eine besondere Herausforderung dar, die dazu führt, dass die initialen Therapieerfolge im Langzeitverlauf häufig wieder verloren gehen (ITO et al. 1993, vgl. auch Abb. 3). Umgekehrt muss der Morgentypus dazu angehalten werden, ein vorzeitiges „Einnicken“ am Abend zu vermeiden, da dieses nicht nur zu einer Reduktion des Schlafdrucks, sondern auch zu einer weiteren Phasenvorlagerung führt.



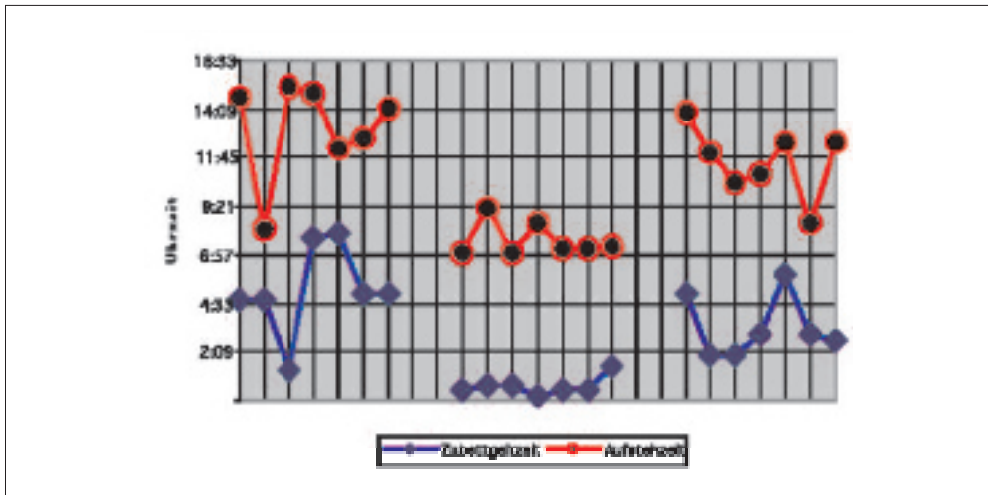


Abb. 3 Zubettgeh- und Aufstehzeit bei einem Patienten mit verzögertem Schlafphasensyndrom vor der Therapie (*links*), während der Therapie (*Mitte*) und drei Monate nach Therapieende (*rechts*)

Die durch eine Chronotherapie angestrebte Phasenverschiebung kann durch eine zusätzliche Schlafkompression/Schlafrestriktion unterstützt werden. Hierbei handelt es sich um ein in der Verhaltenstherapie von chronischen Insomnien bewährtes Verfahren (MÜLLER und PATEROK 2010), bei dem durch eine Verkürzung der Gesamtbettliegezeit systematisch der Schlafdruck erhöht wird, so dass die Wahrscheinlichkeit für Ein- und Durchschlafstörungen sukzessive abnimmt.

### 3.2.2 Phasenverschiebung des circadianen Schlaf-Wach-Rhythmus mit Hilfe von Zeitgebern

Eine gezielte Lichtexposition mit „bright light“ (5000–10000 Lux) über 30–60 min am Morgen oder am Abend kann je nach Symptomatik zu einer Phasenvorverlagerung (Lichttherapie am Morgen, indiziert beim verzögerten Schlafphasensyndrom) oder zu einer Phasenverzögerung (Lichttherapie am Abend, indiziert beim vorverlagerten Schlafphasensyndrom) führen (MORGENTHALER et al. 2007). Neben dem Einsatz spezieller Lichttherapiegeräte bietet sich je nach geographischer Breite und Jahreszeit die Verwendung von Tageslicht (z. B. 30 min Spaziergang am Morgen) als natürlicher Zeitgeber an. Umgekehrt sind beim Abendtypus eine abendliche Lichtexposition und beim Morgentypus eine Lichtexposition in der zweiten Nachthälfte zu vermeiden.

Als Gegenspieler zum natürlichen Zeitgeber Licht kann Melatonin als hormoneller Zeitgeber in einer Dosis von 0,3–5 mg eingesetzt werden. Für die Behandlung des verzögerten Schlafphasensyndroms mit Melatonin gibt es mehrere (teilweise auch kontrollierte Studien), die eine Wirksamkeit im Sinne einer Phasenvorverlagerung nachweisen (Übersicht bei MORGENTHALER et al. 2007). Für den Nachweis der Wirksamkeit einer Melatoningabe zum Zeitpunkt des morgendlichen Erwachens bei Patienten mit vorverlagerten Schlafphasensyndrom fehlt es bislang an ausreichender empirischer Evidenz. Im Falle von Schichtarbeit kann eine morgendliche Melatoningabe nach Nachtschichten die nachfolgende Schlafqualität und Schlafdauer des Tagschlafs verbessern.

### 3.2.3 Medikamentöse Interventionen mit schlafanstoßenden und/oder vigilanzsteigernden Wirkstoffen

Der Einsatz von Hypnotika bei circadianen Schlaf-Wach-Rhythmusstörungen ist wie auch bei anderen Schlafstörungen durch die Gefahr einer Toleranz- und Abhängigkeitsentwicklung eingeschränkt. Vertretbar ist die Hypnotikaeinnahme, wenn der Einnahmezeitraum von vornherein auf eine kurze Zeitdauer begrenzt ist (z. B. zur Behandlung eines Jetlag-Syndroms) oder die Einnahme diskontinuierlich erfolgt und auf wenige Nächte pro Monat – z. B. nur als symptomatische Einschlafhilfe nach Nachtschichten – beschränkt bleibt (HAJAK 2002). Eine erhöhte Schläfrigkeit bzw. tatsächliche Einschlafneigung wird im klinischen Alltag von vielen Diagnostikern und Therapeuten nach wie vor bagatellisiert, obwohl sie z. B. eine der häufigsten Ursachen tödlicher Verkehrsunfälle ist. Eine Behandlungsrelevanz ergibt sich insbesondere bei der erhöhten Schläfrigkeit von Nachtschichtarbeitern während der Nachtschichten (z. B. Polizeibeamte im Wechseldienst, die nachts Streife fahren müssen). Als klassisches Stimulans wird von vielen Betroffenen Koffein eingesetzt, das sich auch in Studien als effektiv die Vigilanz steigernder Wirkstoff erwiesen hat (KER et al. 2010). 2005 wurde in Deutschland außerdem Modafinil (Vigil®) zur Behandlung des chronischen Schichtarbeiter-Syndroms mit exzessiver Schläfrigkeit zugelassen. Modafinil kann ähnlich wie Koffein Schläfrigkeit reduzieren (CZEISLER et al. 2005). Es ersetzt jedoch nicht eine angemessene Schlafdauer, sondern kann im Gegenteil bei zu später Einnahme individuell den nachfolgenden Schlaf beeinträchtigen. Inzwischen wurde dem Medikament außerdem die Zulassung für die Indikation „chronisches Schichtarbeitersyndrom mit exzessiver Schläfrigkeit“ wieder entzogen.

## 4. Chronobiologische Aspekte in der Behandlung chronischer Insomnien

Im Gegensatz zu den relativ selten diagnostizierten circadianen Schlaf-Wach-Rhythmusstörungen gehört die chronische nichtorganische Insomnie (ICD-10: F51.0) zu den häufigsten Diagnosen in der Schlafmedizin. Epidemiologische Studien zeigen, dass in Europa 4–22 % der erwachsenen Bevölkerung unter klinisch bedeutsamen Ein- oder Durchschlafstörungen mit konsekutiver Tagesbeeinträchtigung leiden (HAJAK et al. 2001). Die Störung gilt als ausgesprochen hartnäckig: Nur ca. 30 % der Patienten werden wieder symptomfrei.

Interessanterweise wird weder in der diagnostischen Einordnung noch in der Therapie differenziert, ob es sich vorrangig um Einschlaf- oder um Durchschlafstörungen mit Früherwachen oder beides kombiniert handelt (LACK und WRIGHT 2007b). Unabhängig vom klinischen Erscheinungsbild wird in aller Regel nach ICSD die Diagnose einer psychophysiologischen Insomnie gestellt. Therapeutisch zählt die Empfehlung der sogenannten Stimulus-Kontroll-Technik (BOOTZIN und NICASSIO 1978) zu den Behandlungsstandards. Die Daten unserer eigenen Schlafambulanz zeigen aber, dass bei mehr als 40 % dieser Patienten Ein- oder Durchschlafstörungen das klinische Bild dominieren und die Patienten eine entsprechende, damit korrelierende, Disposition in Richtung Abend- oder Morgentypus aufweisen. Gängige Therapieprogramme wie die Stimulus-Kontrolle berücksichtigen nicht diese chronobiologische Dimension der Störung und tragen dadurch möglicherweise zu der geringen Therapieeffektivität bei. So dürfte die gängige Empfehlung im Rahmen der sogenannten Stimulus-Kontrolle, das Bett erst bei ausgeprägter Schläfrigkeit aufzusuchen, bei Abendtypen eine weitere Phasenverzögerung durch noch späteres Zubettgehen und durch eine zusätzliche verlängerte Lichtexposition in den Abendstunden be-

wirken. Umgekehrt dürfte die weitere Empfehlung der Stimulus-Kontrolle, bei auftretender Schlaflosigkeit das Bett wieder zu verlassen, bei Morgenmenschen zu einer ungünstigen Lichtexposition in der zweiten Nachthälfte und damit zu einer weiteren Phasenvorverlagerung führen. Bislang gibt es jedoch keine einzige kontrollierte Therapiestudie, die solche chronobiologischen Nebenwirkungen der gängigen Therapieprogramme hinreichend überprüft hätte.

Die Ignoranz gegenüber chronobiologischen Aspekten in der Behandlung der Insomnie zeigt sich auch in neueren medikamentösen Behandlungsansätzen. Melatonin, ein genuines Chronotherapeutikum, wird seit 2008 unter dem Handelsnamen Circadin® als Hypnotikum vermarktet (WADE et al. 2007). Es handelt sich um ein retardiertes Präparat mit einer Halbwertszeit von 4 h. Von einem Abendtypus zu später Stunde eingenommen (die offizielle Empfehlung lautet, es 90 min vor dem Zubettgehen einzunehmen) dürfte zu erhöhten Melatoninspiegeln in der zweiten Nachthälfte führen. Dies kann entsprechend der Phasen-Response-Kurve für Melatonin jedoch eine weitere Phasenverzögerung bewirken. Umgekehrt könnte der 2009 als Antidepressivum mit schlafregulierender Wirkung (QUERA-SALVA et al. 2010) zugelassene, unspezifische Melatoninagonist Agomelatin (Valdoxan®; Halbwertszeit: 1–2 h) bei Morgenmenschen zu einer erhöhten melatonergen Exposition in der ersten Nachthälfte führen. Dies hätte entsprechend eine weitere Phasenvorverlagerung zur Folge, die bei einem Morgentypus das Früherwachen verstärken könnte. Auch hier wurde in den Zulassungsstudien versäumt, mögliche Therapienebeneffekte unter chronobiologischen Gesichtspunkten näher zu differenzieren. Ebenso mangelt es mit wenigen Ausnahmen an Studien, die überprüft haben, ob eine gezielte Lichttherapie zur Behandlung von Ein- oder Durchschlafstörungen effektiv ist (LACK und WRIGHT 1993, PALMER et al. 2003, LACK et al. 2005).

## 5. Fazit

Entgegen der weitreichenden chronobiologischen Grundlagenkenntnisse findet die Anwendung dieser Erkenntnisse in der medikamentösen und nichtmedikamentösen Behandlung insbesondere von chronischen Insomnien eine unzureichende Beachtung. Für die Zukunft sind einerseits Therapiestudien notwendig, in denen die Anwendung chronobiologischer Maßnahmen (melatonerge Wirkstoffe, Lichttherapie) in ihrer Wirksamkeit bei chronischer Insomnie genauer evaluiert wird. Andererseits sollten bisher etablierte Therapiemaßnahmen in ihrer Effektivität abhängig von der Morgen-/Abendtypusdisposition erneut auf den Prüfstand kommen.

## Literatur

- AKERSTEDT, T.: Shift work and disturbed sleep/wakefulness. *Occup. Med.* 53/2, 89–94 (2003)
- AKERSTEDT, T., and GILLBERG, M.: The circadian variation of experimentally displaced sleep. *Sleep* 4, 159–169 (1981)
- American Academy of Sleep Medicine: The International Classification of Sleep Disorders. 2<sup>nd</sup> ed.: Diagnostic and Coding Manual.* Westchester (IL): American Academy of Sleep Medicine 2005
- ANCOLI-ISRAEL, S., COLE, R., ALESSI, C., CHAMBERS, M., MOORCROFT, W., and POLLAK, C.: The role of actigraphy in the study of sleep and circadian rhythms. *Sleep* 26/3, 342–392 (2003)
- ASCHOFF, J.: Human circadian rhythms in activity, body temperature and other functions. *Life Sci. Space Res.* 5, 159–173 (1967)
- BERSON, D. M.: Strange vision: ganglion cells as circadian photoreceptors. *Trends Neurosci.* 26/6, 314–320 (2003)
- BOIVIN, D. B., and CZEISLER, C. A.: Resetting of circadian melatonin and cortisol rhythms in humans by ordinary room light. *Neuroreport* 9/5, 779–782 (1998)

- BOOTZIN, R. R., and NICASSIO, P. M.: Behavioral treatments for insomnia. *Progr. Behav. Modification* 6, 1–41 (1978)
- BORBÉLY, A. A.: A two-process model of sleep. *Human Neurobiol.* 1, 195–204 (1982)
- CAJOCHEN, C., FREY, S., ANDERS, D., CHELLAPA, S., SPÄT, J., BUES, M., and STEFANI, Q.: Macht Licht helle? Wirkung von Licht auf Melatonin, EEG und Kognition am Arbeitsplatz. *Somnologie* 14/1, 7 (2010)
- CARSKADON, M. A., DEMENT, W. C., MITLER, M. M., GUILLEMINAULT, C., ZARCONI, V. P., and SPIEGEL, R.: Self reports versus laboratory findings in 122 drug free subjects with complaints of chronic insomnia. *Amer. J. Psychiatry* 133/12, 1382–1388 (1976)
- COATES, T. J., KILLEN, J. D., GEORGE, J., MARCHINI, E., SILVERMAN, S., and THORESEN, C. E.: Estimation of sleep parameters. A multitrait-multimethod analysis. *J. Consulting Clin. Psychology* 50, 345–352 (1982)
- CZEISLER, C. A., RICHARDSON, G. S., COLEMAN, R. M., ZIMMERMAN, J. C., MOORE-EDE, M. C., DEMENT, W. C., and WEITZMAN, E. D.: Chronotherapy: resetting the circadian clocks of patients with delayed sleep phase insomnia. *Sleep* 4/1, 1–21 (1981)
- CZEISLER, C. A., WALSH, J. K., ROTH, T., HUGHES, R. J., WRIGHT, K. P., KINGSBURY, L., ARORA, S., SCHWARTZ, J. R., NIEBLER, G. E., and DINGES, D. F.; U.S. Modafinil in Shift Work Sleep Disorder Study Group: Modafinil for excessive sleepiness associated with shift-work sleep disorder. *New Engl. J. Med.* 353/5, 476–486 (2005)
- DAGAN, Y., and EISENSTEIN, M.: Circadian rhythm sleep disorders: toward a more precise definition and diagnosis. *Chronobiol. Int.* 16/2, 213–222 (1999)
- DRAKE, C. L., ROEHR, T., RICHARDSON, G., WALSH, J. K., and ROTH, T.: Shift work sleep disorder: prevalence and consequences beyond that of symptomatic day workers. *Sleep* 27, 1453–1462 (2004)
- GRIEFAHN, B., KÜNEMUND, C., BRÖDE, P., und MEHNERT, P.: Zur Validität der deutschen Übersetzung des Morningness-Eveningness-Fragenbogens von Horne und Östberg. *Somnologie* 5/2, 71–80 (2001)
- HAIMOV, I., and ARENDT, J.: The prevention and treatment of jet lag. *Sleep Med. Rev.* 3/3, 229–240 (1999)
- HAJAK, G.: Zolpidem “as needed” versus continuous administration: Pan-European study results. *Sleep Med. Rev.* 6/1, 21–28 (2002)
- HAJAK, G.: New paradigms in the pharmacological treatment of insomnia. *Sleep Medicine* 7/1, 20–26 (2006)
- HAJAK, G., and on behalf of the SINE Study Group: Study of Insomnia in Europe. Epidemiology of severe insomnia and its consequences in Germany. *Eur. Arch. Psychiatry Clin. Neurosci.* 251/2, 49–56 (2001)
- HANSEN, J.: Increased breast cancer risk among women who work predominantly at night. *Epidemiology* 12/1, 74–77 (2001)
- HOFFMANN, R. M., MÜLLER, T., HAJAK, G., und CASSEL, W.: Abend-Morgenprotokolle in Schlafforschung und Schlafmedizin. Ein Standardinstrument für den deutschsprachigen Raum. *Somnologie* 3/1, 103–109 (1997)
- HORNE, J. A., and ÖSTBERG, O.: A self-assessment questionnaire to determine morningness – eveningness in human circadian rhythms. *Internat. J. Chronobiology* 4, 97–110 (1976)
- ITO, A., ANDO, K., HAYAKAWA, T., IWATA, T., KAYUKAWA, Y., OHTA, T., and KASAHARA, Y.: Long-term course of adult patients with delayed sleep phase syndrome. *Jpn. J. Psychiatry Neurol.* 47/3, 563–567 (1993)
- KER, K., EDWARDS, P. J., FELIX, L. M., BLACKHALL, K., and ROBERTS, I.: Caffeine for the prevention of injuries and errors in shift workers. *Cochrane Database Syst. Rev.* 5, CD008508 (2010)
- KERCKHOFF, G. A.: Inter-individual differences in the human circadian system: A review. *Biol. Psychology* 20, 83–112 (1985)
- KHALSA, S. B., JEWETT, M. E., CAJOCHEN, C., and CZEISLER, C. A.: A phase response curve to single bright light pulses in human subjects. *J. Physiol.* 549, 945–952 (2003)
- KLEIN, D. C., MOORE, R. Y., and REPPERT, S. M.: *Suprachiasmatic Nucleus: the Mind’s Clock*. Oxford: Oxford University Press 1991
- KNAUTH, P., and HORNBERGER, S.: Continuous shift systems (Kontinuierliche Schichtsysteme). *Bulletin of European Studies on Time* 11. Dublin: Europäische Stiftung zur Verbesserung der Lebens- und Arbeitsbedingungen. 1995
- KNUTSSON, A.: Health disorders of shift workers. *Occup. Med.* 53/2, 103–108 (2003)
- LACK, L., and WRIGHT, H.: The effect of evening bright light in delaying the circadian rhythms and lengthening the sleep of early morning awakening insomniacs. *Sleep* 16/5, 436–443 (1993)
- LACK, L., and WRIGHT, H.: Clinical Management of Delayed Sleep Phase Disorder. *Behav. Sleep Med.* 5/1, 57–76 (2007a)
- LACK, L., and WRIGHT, H.: Treating chronobiological components of chronic insomnia. *Sleep Med.* 8/6, 637–644 (2007b)
- LACK, L., WRIGHT, H., KEMP, K., and GIBBON, S.: The treatment of early-morning awakening insomnia with 2 evenings of bright light. *Sleep* 28/5, 616–623 (2005)
- LEWY, A. J., SACK, R. L., and SINGER, C. M.: Immediate and delayed effects of bright light on human melatonin production: Shifting ‘dawn’ and ‘dusk’ shifts the dim light melatonin onset (DLMO). *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 453,

- 253–259 (1985)
- LITTNER, M., KUSHIDA, C. A., ANDERSON, W. M., BAILEY, D., BERRY, R. B., DAVILA, D. G., HIRSHKOWITZ, M., KAPEN, S., KRAMER, M., LOUBE, D., WISE, M., and JOHNSON, S. F.: Standards of Practice Committee of the American Academy of Sleep Medicine: Practice parameters for the role of actigraphy in the study of sleep and circadian rhythms: an update for 2002. *Sleep* 26/3, 337–341 (2003)
- MORGENTHALER, T. I., LEE-CHIONG, T., ALESSI, C., FRIEDMAN, L., AURORA, R. N., BOEHLECKE, B., BROWN, T., CHESON, A. L. Jr., KAPUR, V., MAGANTI, R., OWENS, J., PANCER, J., SWICK, T. J., and ZAK, R.: Standards of Practice Committee of the American Academy of Sleep Medicine: Practice parameters for the clinical evaluation and treatment of circadian rhythm sleep disorders. An American Academy of Sleep Medicine report. *Sleep* 30/11, 1445–1459 (2007)
- MÜLLER, T., und PATEROK, B.: *Schlaftraining – Ein Therapiemanual zur Behandlung von Schlafstörungen*. Göttingen: Hogrefe 2010
- NAKAGAWA, H., SACK, R. L., and LEWY, A. J.: Sleep propensity free-runs with the temperature, melatonin and cortisol rhythms in a totally blind person. *Sleep* 15/4, 330–336 (1992)
- OREN, D. A., and WEHR, T. A.: Hypnomyctohemeral syndrome after chronotherapy for delayed sleep phase syndrome. *New Engl. J. Med.* 327/24, 1762 (1992)
- PALMER, C. R., KRIPKE, D. F., SAVAGE, H. C. Jr., CINDRICH, L. A., LOVING, R. T., and ELLIOTT, J. A.: Efficacy of enhanced evening light for advanced sleep phase syndrome. *Behav. Sleep Med.* 1/4, 213–226 (2003)
- QUERA-SALVA, M. A., LEMOINE, P., and GUILLEMINAULT, C.: Impact of the novel antidepressant agomelatine on disturbed sleep-wake cycles in depressed patients. *Hum. Psychopharmacol.* 25/3, 222–229 (2010)
- SACK, R. L., AUCKLEY, D., AUGER, R. R., CARSKADON, M. A., WRIGHT, K. P. Jr., VITIELLO, M. V., and ZHDANOVA, I. V.: American Academy of Sleep Medicine: Circadian rhythm sleep disorders: part I, basic principles, shift work and jet lag disorders. An American Academy of Sleep Medicine review. *Sleep* 30/11, 1460–1483 (2007)
- SACK, R. L., AUCKLEY, D., AUGER, R. R., CARSKADON, M. A., WRIGHT, K. P. Jr., VITIELLO, M. V., and ZHDANOVA, I. V.: American Academy of Sleep Medicine: Circadian rhythm sleep disorders: part II, advanced sleep phase disorder, delayed sleep phase disorder, free-running disorder, and irregular sleep-wake rhythm. An American Academy of Sleep Medicine review. *Sleep* 30/11, 1484–1501 (2007)
- STOLL, C., RODENBECK, A., and KUNZ, D.: Licht am Abend stört. *Somnologie* 14/1, 7 (2010)
- TOH, K. L., JONES, C. R., HE, Y., EIDE, E. J., HINZ, W. A., VIRSHUP, D. M., PTÁČEK, L. J., and FU, Y. H.: An hPer2 phosphorylation site mutation in familial advanced sleep phase syndrome. *Science* 291/5506, 1040–1043 (2001)
- WADE, A. G., FORD, I., CRAWFORD, G., MCMAHON, A. D., NIR, T., LAUDON, M., and ZISAPEL, N.: Efficacy of prolonged release melatonin in insomnia patients aged 55–80 years: quality of sleep and next-day alertness outcomes. *Curr. Med. Res. Opin.* 23/10, 2597–2605 (2007)
- WEVER, R. A.: *The circadian system of man: Results of experiments under temporal isolation*. New York, Heidelberg, Berlin: Springer 1979
- WEVER, R. A.: Properties of human sleep-wake-cycles. Parameters of internally synchronized freerunning rhythms. *Sleep* 7, 27–51 (1984)
- World Health Organization*: Tenth revision of the international classification of diseases, Chapter V (F). Mental and behavioural disorders (including disorders of the psychological development). Clinical descriptions and diagnostic guidelines. Geneva, 1991
- WRIGHT, H. R., and LACK, L. C.: Effect of light wavelength on suppression and phase delay of the melatonin rhythm. *Chronobiol. Int.* 18/5, 801–808 (2001)
- ZEITZER, J. M., DIJK, D. J., KRONAUER, R., BROWN, E., and CZEISLER, C.: Sensitivity of the human circadian pacemaker to nocturnal light: melatonin phase resetting and suppression. *J. Physiol.* 526, 695–702 (2000)

Dr. Tilmann MÜLLER  
Klinik und Poliklinik für Neurologie  
Sektion Schlafmedizin  
Universitätsklinikum Münster  
Albert-Schweitzer-Straße 33  
48149 Münster  
Bundesrepublik Deutschland  
Tel.: +49 251 8345351  
Fax: +49 251 8348336  
E-Mail: info@schlafgestoert.de

## **Posterbeiträge**



## **Einfluss des humanen MT2-Rezeptors auf die Insulinsekretion der pankreatischen $\beta$ -Zelle**

Elke ALBRECHT (Halle/Saale), Eckhard MÜHLBAUER (Leipzig),  
Ivonne BAZWINSKY-WUTSCHKE, Kathleen HOFMANN und Elmar PESCHKE ML  
(Halle/Saale)

Mit 3 Abbildungen

### **1. Einleitung**

In jüngerer Zeit wurde die Bedeutung von Melatonin für die Diabetogenese intensiv diskutiert. Mehrere Studien belegten Zusammenhänge zwischen bestimmten genetischen Varianten des humanen MT2-Rezeptors (hMT2) und erhöhter Nüchternblutglukose sowie einem erhöhten Risiko, an Typ-2-Diabetes zu erkranken. Durch funktionelle Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass einige dieser Rezeptor-Varianten nur noch eingeschränkt funktionsfähig sind. Bislang blieb ungeklärt, wie über den hMT2-Rezeptor die Insulinsekretion reguliert wird und ob ein Funktionsverlust die Diabetesentstehung beeinflusst. Im vorliegenden Versuch sollte durch Expression des humanen MT2-Rezeptors in der Glukose-responsiven, Insulin-produzierenden Ratten-Insulinoma-Zelllinie INS1 gezeigt werden, ob über den hMT2-Rezeptor die Insulinfreisetzung beeinflusst wird und über welche Signaltransduktionskaskade ein Insulinsekretionsmodulierender Effekt vermittelt wird.

### **2. Material und Methoden**

Zur funktionellen Expression des hMT2 wurde das Plasmidkonstrukt pTRexDest30 (Invitrogen GmbH, Darmstadt, Deutschland) durch cDNA des hMT2-Rezeptors mittels Transfektionsreagenz Fugene<sup>®</sup> (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland) in die INS1-Zellen transfiziert. Die Selektion der Klone, die stabil den hMT2-Rezeptor exprimieren, erfolgte mit dem Antibiotikum G418. Das hMT2-mRNA-Expressionsniveau der selektierten hMT2-INS1-Klone wurde mittels *Real-time*-RT-PCR bestimmt. Außerdem wurde die Expression immunzytochemisch überprüft. Dazu wurden ein MT2-Rezeptor-Antikörper (Gene Tex Inc., San Antonio, TX, USA) und der entsprechende Cy3-konjugierte Sekundärintikörper genutzt. Darüber hinaus wurden Inkubationsexperimente durchgeführt und die Insulinsekretion mittels Radioimmunoassay (Coat-A-Count, DPC Biermann GmbH, Bad Nauheim, Deutschland) und das intrazelluläre cAMP mittels Enzymimmunoassay (Biotrak, GE Healthcare, Little Chalfont, UK) bestimmt.

### **3. Ergebnisse**

Durch die vorliegenden molekularbiologischen Untersuchungen konnte nachgewiesen werden, dass die transfizierten Zellen (hMT2-INS1) den humanen MT2-Rezeptor exprimieren



(Abb. 1A). Ebenso deutete eine verstärkte Immunreaktivität auf eine größere Anzahl an MT2-Rezeptoren bei den hMT2-INS1-Klonen hin (Abb. 1B). In diesen Zellen konnte im Folgenden eine deutlich höhere MT2-mRNA-Expression im Vergleich zu INS1-Zellen nachgewiesen werden (Abb. 1C). Die Expression des MT1-Rezeptors blieb davon unbeeinflusst (Abb. 1D).

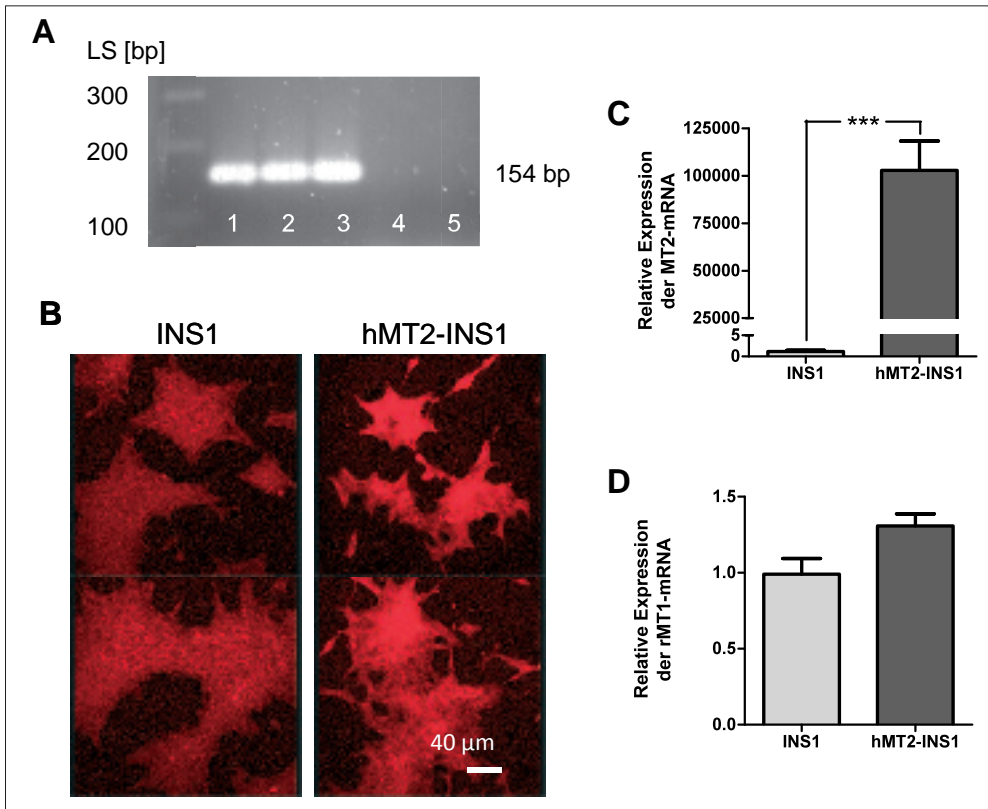


Abb. 1 Kontrolle der Expression des humanen MT2-Rezeptors: (A) Nach RT-PCR und anschließender Gelelektrophorese konnte das Amplicon des humanen MT2-Rezeptors nur in den mit dem humanen MT2-Rezeptor transfizierten INS1-Insulinomazellen der Ratte (hMT2-INS1; 1–3) nachgewiesen werden und nicht in den INS1-Ausgangszellen (4) und der Wasserkontrolle (5). (B) Immunzytochemische Darstellung des MT2-Rezeptors an INS1 und hMT2-INS1: Verglichen mit den INS1-Kontrollen (*links*) zeigte sich bei den hMT2-INS1-Zellen (*rechts*) eine verstärkte Immunreaktivität. (C) Vergleich der Expression des MT2-Rezeptors in INS1-Zellen und hMT2-INS1-Zellen: Die transfizierten Zellen wiesen eine signifikant erhöhte MT2-Rezeptor-Expression im Vergleich zu den Ausgangszellen auf. (D) Vergleich der Expression des MT1-Rezeptors von INS1-Zellen und den hMT2-INS1-Zellen: Die Expression des MT1-Rezeptors änderte sich durch die Expression des hMT2-Rezeptors nicht. Die Balken repräsentieren Mittelwerte  $\pm$  SEM (n = 5 – 8). \*\*\* P < 0,001, Mann-Whitney-U-Test. LS, Molekulargewichtsstandard. Verändert nach MÜHLBAUER et al. 2011 (Fig. 1 und 2). Mit freundlicher Genehmigung von John Wiley & Sons.

Die anschließend durchgeführten Inkubationsexperimente zeigten, dass Melatonin die durch den unspezifischen Phosphodiesterasehemmer IBMX-stimulierte Insulinsekretion der hMT2-INS1-Zellen stärker senkt als die der INS1-Zellen (Abb. 2A). Nach vorheriger Pertussistoxin-

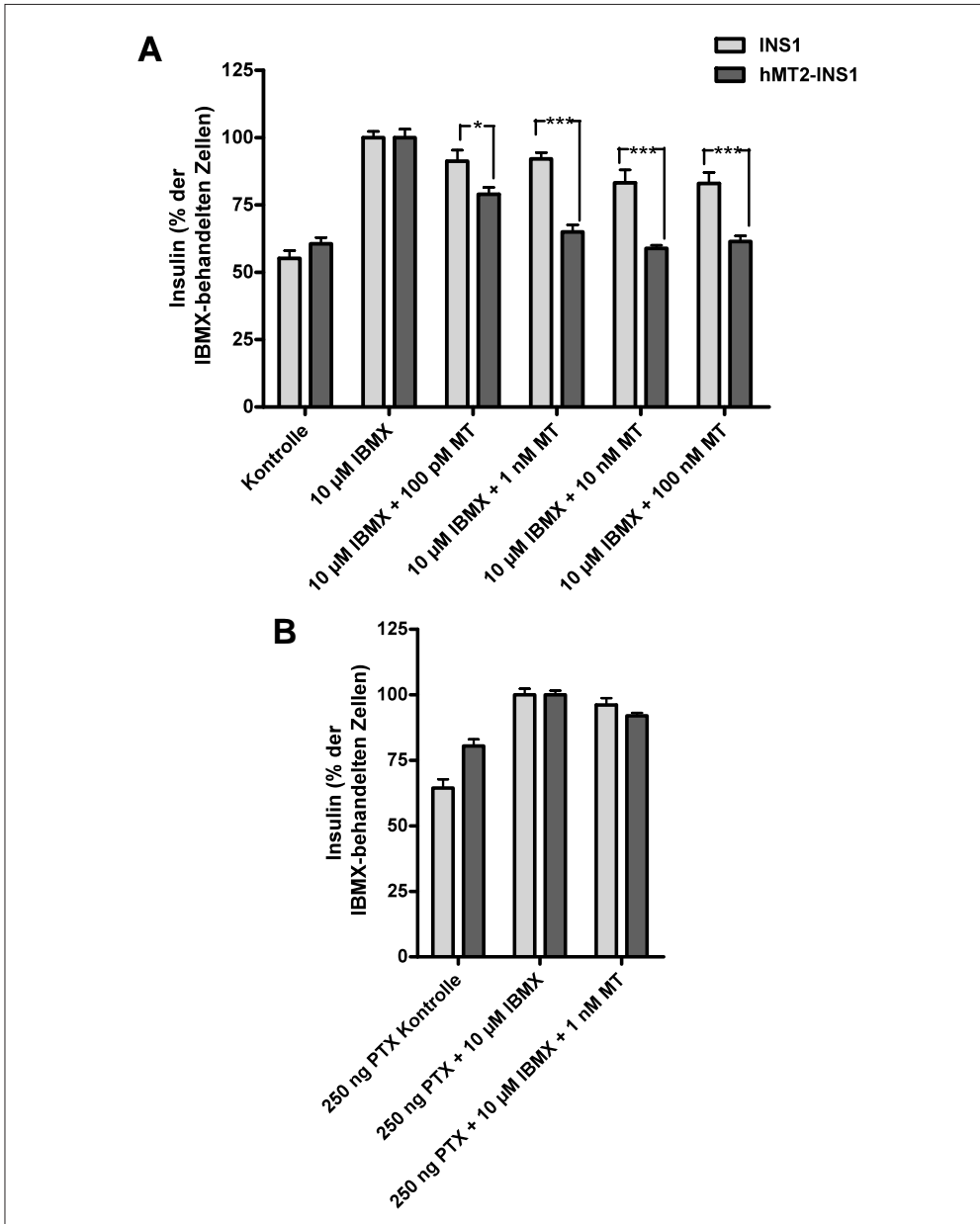


Abb. 2 Wirkung von Melatonin (MT) auf die IBMX-stimulierte Insulinsekretion: (A) Melatoninbehandlung (6 h) führte in den mit dem humanen MT2-Rezeptor transfizierten Zellen (hMT2-INS1) zu einer stärkeren Senkung der IBMX-stimulierten Insulinsekretion als bei den INS1-Kontrollzellen sowohl bei physiologischen als auch bei pharmakologischen Melatoninkonzentrationen. (B) Hemmung von Melatonin durch Pertussistoxin (PTX): Eine 24-stündige Vorinkubation mit PTX hob die Senkung der Insulinsekretion durch eine 6-stündige Melatonininkubation weitgehend auf. Die Balken repräsentieren Mittelwerte  $\pm$  SEM (3 unabhängige Versuche mit je  $n = 3 - 4$  batches). \*  $P < 0,05$ ; \*\*\*  $P < 0,001$ , Mann-Whitney-U-Test. Verändert nach MÜHLBAUER et al. 2011 (Fig. 6). Mit freundlicher Genehmigung von John Wiley & Sons.

Inkubation, welche inhibitorische G-Proteine blockiert, entfiel die Hemmung der Insulinfreisetzung durch Melatonin bei beiden Zelllinien (Abb. 2B).

Des Weiteren zeigte sich bei den transfizierten Zellen eine verstärkte Senkung des intrazellulären *Second messengers* cAMP durch Melatonin (Abb. 3A). Dabei wurde die Insulinsekretion der hMT2-INS1-Zellen schon durch kurze Melatonininkubation gehemmt, während die Insulinausschüttung der INS1-Zellen unbeeinflusst blieb (Abb. 3B).

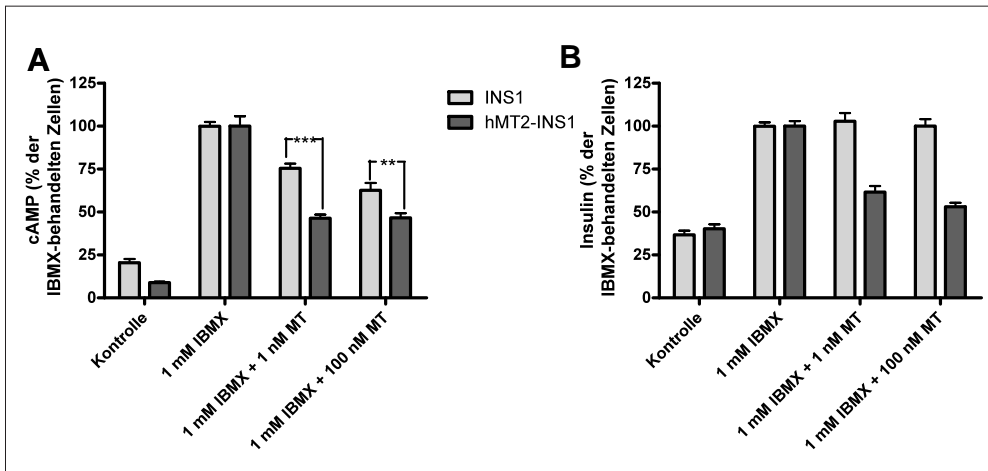


Abb. 3 Wirkung von Melatonin (MT) auf das IBMX-stimulierte intrazelluläre cAMP-Niveau (A) und die IBMX-stimulierte Insulinsekretion (B). Melatoninbehandlung (1 h) führte in den mit dem humanen MT2-Rezeptor transfizierten Zellen (hMT2-INS1) zu einer stärkeren Senkung des IBMX-stimulierten intrazellulären cAMPs als bei den INS1-Kontrollzellen (A). Die hMT2-INS1-Zellen zeigten auch nach dieser kurzen Melatonininkubation eine herabgesetzte Insulinfreisetzung, während die Insulinsekretion der INS1-Zellen durch diese Behandlung unverändert blieb (B). Die Balken repräsentieren Mittelwerte  $\pm$  SEM (3 unabhängige Versuche mit je  $n = 3-4$  batches). \*\*  $P < 0,01$ ; \*\*\*  $P < 0,001$ , Mann-Whitney-U-Test. Verändert nach MÜHLBAUER et al. 2011 (Fig. 5). Mit freundlicher Genehmigung von John Wiley & Sons.

#### 4. Diskussion

Im Rahmen dieser Studie konnte gezeigt werden, dass die Insulinsekretion der  $\beta$ -Zelle über den hMT2-Rezeptor gesenkt werden kann. Es konnte gesichert werden, dass der hMT2-Rezeptor diesen Effekt vermittelt, indem er an inhibitorische G-Proteine koppelt, die dann durch Hemmung der Adenylatzyklase zur Senkung des intrazellulären cAMPs führen. Die direkte Kopplung von cAMP-Gehalt und Insulinfreisetzung ist bekannt. Weiterführende Untersuchungen sollen zeigen, ob der Einfluss des hMT2-Rezeptors auf die Insulinfreisetzung auch über andere Signaltransduktionskaskaden vermittelt wird und ob über den MT2-Rezeptor, wie auch in anderen Geweben beschrieben, ein synchronisierender Effekt auf circadiane Prozesse der  $\beta$ -Zelle ausgeübt werden kann.

## *Literatur*

MÜHLBAUER, E., ALBRECHT, E., HOFMANN, K., BAZWINSKY-WUTSCHKE, I., and PESCHKE, E.: Melatonin inhibits insulin secretion in rat insulinoma beta-cells (INS-1) heterologously expressing the human melatonin receptor isoform MT2. *J. Pineal Res.* doi: 10.1111/j.1600-079X.2011.00898.x (2011)

Elke ALBRECHT  
Institut für Anatomie und Zellbiologie  
Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg  
Große Steinstraße 52  
06097 Halle (Saale)  
Bundesrepublik Deutschland  
Tel.: +49 345 5571813  
Fax: +49 345 5571700  
E-Mail: elke.albrecht@medizin.uni-halle.de

## Human Rights and Science

Leopoldina-Symposium

vom 6. bis 7. Oktober 2010 in Berlin

Nova Acta Leopoldina N. F. Bd. 113, Nr. 387

Herausgegeben von Johannes ECKERT (Zürich) und Hans-Peter ZENNER (Tübingen)  
(2011, 96 Seiten, 3 Abbildungen, 20,50 Euro, ISBN: 978-3-8047-2941-4)

Viele Organisationen und Institutionen beschäftigen sich mit den Menschenrechten, zu denen das Recht auf Entwicklung, auf eine saubere und gesunde Umwelt sowie Frieden gehören. Gerade für Wissenschaftler und ihre Institutionen ist die Freiheit von Lehre und Forschung ein hohes Gut. Der Band berichtet über ein Symposium, organisiert vom *Human Rights Committee* (HRC) der Deutschen Akademie der Naturforscher Leopoldina – Nationale Akademie der Wissenschaften, das dem wichtigen und aktuellen Thema *Menschenrechte und Wissenschaft* gewidmet war. Es vereinte Repräsentanten von Akademien und Universitäten aus 12 europäischen Ländern. In den Beiträgen wird die Bedeutung der Menschenrechte u. a. in der Gesetzgebung, im alltäglichen Wissenschaftsbetrieb, in der Forschung am Menschen sowie in der internationalen Kooperation in Wissenschaft und Entwicklungshilfe aufgezeigt. Die akademische Gemeinschaft sollte nicht nur Menschenrechtsverletzungen anklagen, sondern Menschenrechtsaspekte auch in nationalen und internationalen Forschungsprojekten beachten. Um die Bedürfnisse von bedrohten und marginalisierten Bevölkerungsgruppen zu berücksichtigen, ist eine Neuausrichtung der Forschung erforderlich. Die Beiträge berichten über die Menschenrechtssituation in verschiedenen Ländern und die vom *International Human Rights Network of Academies and Scholarly Societies* (IHRN) koordinierten weltweiten Aktionen zugunsten von Personen aus dem akademischen Bereich, die Menschenrechtsverletzungen ausgesetzt sind. Große Besorgnisse werden über Verletzungen der Menschenrechte in verschiedenen Teilen der Welt, inklusive Europa, geäußert, vor allem auch über Folter, die noch in vielen Ländern praktiziert wird. Alle Beiträge sind in englischer Sprache verfasst.

## **Einfluss von Melatonin auf die Glukagon-produzierende $\alpha$ -Zelle des endokrinen Pankreas**

Ina BÄHR (Halle/Saale), Eckhard MÜHLBAUER (Leipzig) und Elmar PESCHKE ML (Halle/Saale)

Mit 3 Abbildungen

### **1. Einleitung**

Störungen circadianer Abläufe werden in Zusammenhang mit der Entstehung von Glukosestoffwechselstörungen und Diabetogenese gebracht. Zahlreiche Untersuchungen belegen, dass Melatonin die Insulinsekretion pankreatischer  $\beta$ -Zellen Rezeptor-mediert und dosisabhängig senkt. Zudem konnte durch tierexperimentelle Studien sowie die Einbeziehung von Patientendaten ein Antagonismus zwischen dem synchronisierenden Hormon Melatonin und der Insulinsekretion nachgewiesen werden. Neben Insulin gehört Glukagon zu den wichtigsten Hormonen der Blutglukoseregulation. Im Rahmen vorzustellender Experimente sollte erstmals untersucht werden, ob Melatonin auch über die Regulierung der pankreatischen, Glukagonproduzierenden  $\alpha$ -Zelle Einfluss auf den Glukosestoffwechsel nimmt.

### **2. Material und Methoden**

Für die Untersuchungen wurde die Glukagon-produzierende-Zelllinie der Maus  $\alpha$ TC1 *clone* 9 ( $\alpha$ TC1.9) verwendet. Der Nachweis der Melatoninrezeptor-mRNA erfolgte mittels RT-PCR, Restriktionsanalysen und Gelelektrophorese. Für funktionelle Untersuchungen wurden  $\alpha$ TC1.9-Zellen unter normo- oder hyperglykämischen Bedingungen für 12 h mit Melatonin behandelt. Stoffwechselgesunde Wistar(WR)- und Typ-2-diabetische Goto-Kakizaki(GK)-Ratten wurden bei einem Lichtregime von L:D = 12:12 für 9 Wochen nachts über das Trinkwasser mit Melatonin oder einer Kontrolllösung behandelt. Am Ende der Behandlung wurden in der Mitte der Dunkelzeit das Plasma der Tiere mittels Herzventrikelpunktion gewonnen und die Organe entnommen. Der Glukagongehalt in Zellkulturüberstand und Plasma wurde mittels Radioimmunoassay bestimmt. Die Quantifizierung der mRNA von  $\alpha$ TC1.9-Zellen und Lebergewebe erfolgte nach Aufarbeitung der Proben mittels *Real-time*-RT-PCR-Technik.

### **3. Ergebnisse**

Durch die beschriebenen molekularbiologischen Untersuchungen konnte die Expression der Melatoninrezeptoren MT1 und MT2 an Langerhansschen Inseln und  $\alpha$ TC1.9-Zellen nachgewiesen werden (Abb. 1). Die Inkubation von  $\alpha$ TC1.9-Zellen mit Melatonin für 12 h führte zu einer signifikanten Erhöhung der Glukagonexpression (Abb. 2A) sowie der Glukagonsekretion

(Abb. 2B). Die Glukagon-erhöhenden Effekte von Melatonin treten unter hyperglykämischen Bedingungen verstärkt auf. Auch durch *In-vivo*-Versuche konnte gezeigt werden, dass Melatoninsubstitution bei stoffwechselgesunden WR-Ratten zu signifikant erhöhten Plasma-Glukagon-Konzentrationen führt (Abb. 3A). Dies geht einher mit signifikant verminderten Glukagonrezeptor-mRNA-Konzentrationen in der Leber (Abb. 3B). Im Gegensatz dazu be-

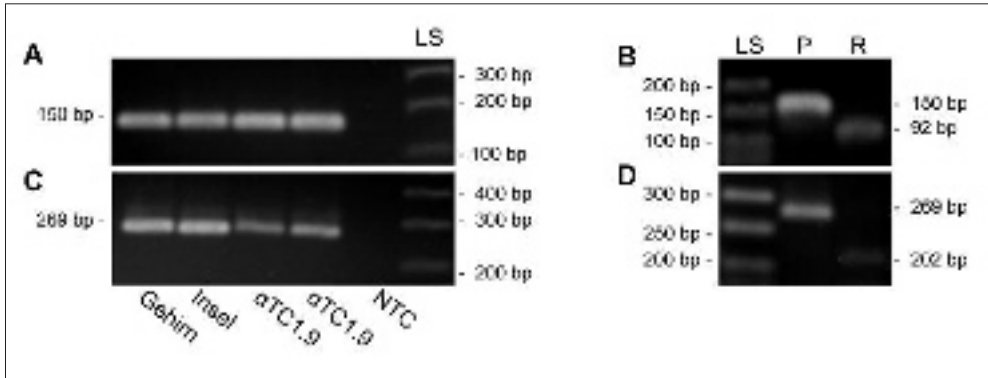


Abb. 1 Expression von Melatoninrezeptoren in Gehirn, Langerhansscher Insel und  $\alpha$ TC1.9-Zellen der Maus. (A) Nachweis der MT1-Rezeptor-mRNA (150 bp) mittels RT-PCR und Gelelektrophorese. (B) Restriktionsanalyse des MT1-Rezeptor-Transkriptes (P): Inkubation mit dem Restriktionsenzym BsrI führte zum Nachweis der erwarteten Fragmente mit 92 bp (R: 47 bp und 11 bp nicht dargestellt). (C) Nachweis der MT2-Rezeptor-mRNA (269 bp) mittels RT-PCR und Gelelektrophorese. (D) Restriktion des MT2-Rezeptor-Produktes (P) durch Inkubation mit dem Restriktionsenzym BsrI führte zum Nachweis der erwarteten Fragmente mit 202 bp (R: 67 bp nicht dargestellt). NTC, *non template control*; LS, Molekulargewichtsstandard. Verändert nach BÄHR et al. 2011 (Fig. 1). Mit freundlicher Genehmigung von John Wiley & Sons.

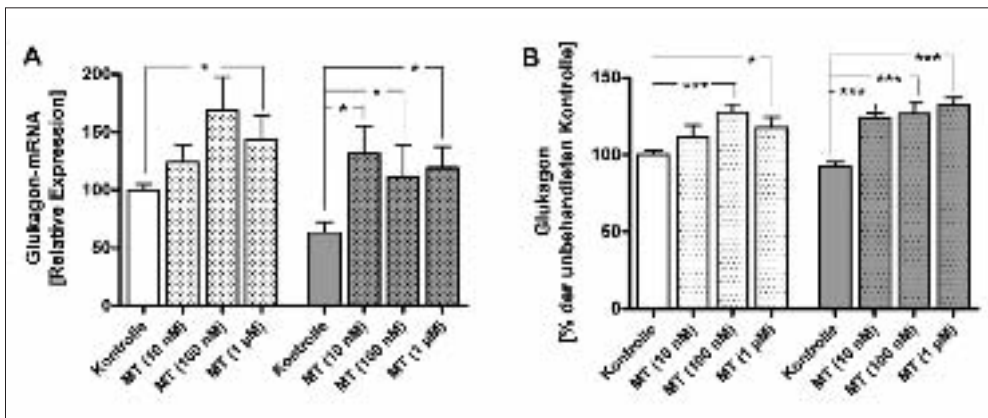


Abb. 2 Einfluss von Melatonin auf die mRNA-Expression (A) und Sekretion (B) von Glukagon in  $\alpha$ TC1.9-Zellen unter normo- und hyperglykämischen Bedingungen (5,6 mM oder 16,7 mM Glukose). Inkubation mit Melatonin (MT; 10 nM, 100 nM, 1  $\mu$ M) für 12 h führte zu einer signifikanten Erhöhung der Expression und Sekretion von Glukagon. Diese Effekte treten verstärkt unter hyperglykämischen Bedingungen auf. Die Daten repräsentieren den Mittelwert  $\pm$  SEM von 3 Einzelexperimenten mit je n = 4 (\* P < 0,05; \*\*\* P < 0,001). Verändert nach BÄHR et al. 2011 (Fig. 3). Mit freundlicher Genehmigung von John Wiley & Sons.

wirkte Melatonin bei Typ-2-diabetischen GK-Ratten eine leichte Senkung des Plasma-Glukagons sowie eine Erhöhung der Expression der hepatischen Glukagonrezeptor-mRNA (Abb. 3A, B).

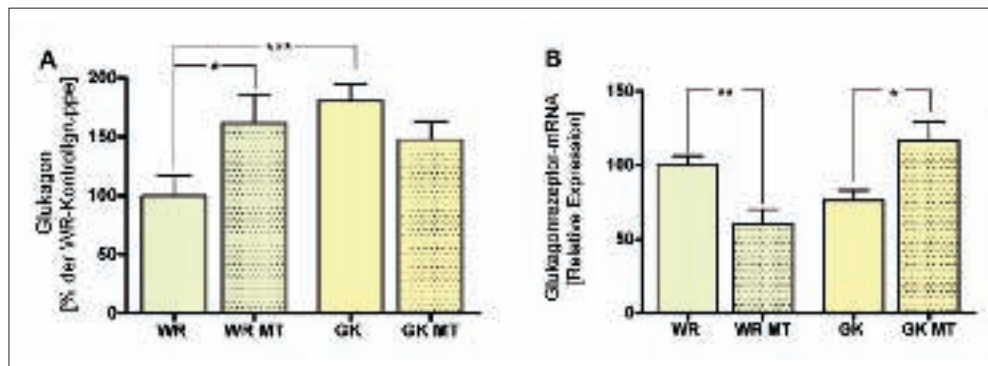


Abb. 3 (A) Plasma-Glukagon-Konzentrationen bei stoffwechselgesunden Wistar(WR)-Ratten und Typ-2-diabetischen Goto-Kakizaki(GK)-Ratten nach nächtlicher Administration von Melatonin (MT) über das Trinkwasser für 9 Wochen. Unbehandelte Typ-2-diabetische GK-Ratten weisen gegenüber WR-Ratten signifikant erhöhte Plasma-Glukagon-Konzentrationen auf. Melatoninsubstitution führte bei WR-Ratten zu einer signifikanten Erhöhung des Plasma-Glukagons. Im Gegensatz dazu zeigte sich bei GK-Ratten eine leichte Senkung des Plasma-Glukagons durch Melatoninbehandlung. (B) Relative Expression der Glukagonrezeptor-mRNA in der Leber Melatonin-substituierter WR- und GK-Ratten. Melatonin-behandelte WR-Ratten weisen gegenüber der unbehandelten Kontrollgruppe signifikant verringerte mRNA-Konzentrationen des Glukagonrezeptors auf, während die Glukagonrezeptor-mRNA bei GK-Tieren durch Melatonin signifikant erhöht wurde. Die Daten repräsentieren den Mittelwert  $\pm$  SEM mit je  $n = 9 - 16$  Tieren pro Gruppe. (\*  $P < 0,05$ , \*\*  $P < 0,01$ , \*\*\*  $P < 0,001$ ). Verändert nach BÄHR et al. 2011 (Fig. 5 und 6). Mit freundlicher Genehmigung von John Wiley & Sons.

#### 4. Diskussion

Im Rahmen der vorgestellten Untersuchungen und Befunde konnte der Nachweis erbracht werden, dass Melatonin sowohl *in vitro* als auch *in vivo* Einfluss auf die Expression und Sekretion von Glukagon nimmt. Wie auch durch seine hemmende Wirkung auf die Insulinsekretion führt Melatonin damit zu einer Steigerung der Blutglukosekonzentration. Zudem deuten die Daten darauf hin, dass Melatonin auch über eine Regulierung der Glukagonwirkung an der Leber die Blutglukose beeinflusst. Die Unterschiede der Ergebnisse zwischen stoffwechselgesunden und Typ-2-diabetischen Tieren geben Hinweise auf die Bedeutung von Melatonin für die Diabetogenese und liefern Erklärungsansätze für den Zusammenhang zwischen Desynchronisation circadianer Rhythmen und Stoffwechsellentgleisungen.



## *Literatur*

BÄHR, I., MÜHLBAUER, E., SCHUCHT, H., and PESCHKE, E.: Melatonin stimulates glucagon secretion in vitro and in vivo. *J. Pineal Res.* 50, 336–344 (2011)

Dr. Ina BÄHR  
Institut für Anatomie und Zellbiologie  
Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg  
Große Steinstraße 52  
06097 Halle (Saale)  
Bundesrepublik Deutschland  
Tel.: +49 345 5571813  
Fax: +49 345 5571700  
E-Mail: ina.baehr@medizin.uni-halle.de

## **Charakterisierung von Melatonin-Rezeptoren (MT1 und MT2) im Pankreas von Ratte und Mensch**

Ina BÄHR (Halle/Saale), Eckhard MÜHLBAUER (Leipzig), Ivonne  
BAZWINSKY-WUTSCHKE und Elmar PESCHKE ML (Halle/Salle)

Mit 3 Abbildungen

### **1. Einleitung**

Zahlreiche zurückliegende Untersuchungen konnten den Einfluss von Melatonin auf die Insulinsekretion und den Glukosestoffwechsel belegen. Perifusionsversuche an Langerhansschen Inseln der Ratte haben den Nachweis erbracht, dass die Insulinsekretion einer circadianen Rhythmik unterliegt, die unabhängig vom zentralen Zeitgeber, dem hypothalamischen Nucleus suprachiasmaticus, besteht und durch Melatoningabe in ihrer Phasenlage verschoben werden kann. *In-vitro*-Untersuchungen konnten zudem zeigen, dass Melatonin die Insulinfreisetzung dosisabhängig senkt. In die Vermittlung der Melatoninwirkung auf die pankreatische  $\beta$ -Zelle sind sowohl der cAMP- und cGMP- als auch der IP3-Signalweg involviert. Weiterhin haben tierexperimentelle Studien den Nachweis für einen Antagonismus zwischen Insulin und Melatonin erbracht. Das Ziel der vorliegenden Untersuchungen bestand im Nachweis von Melatoninrezeptoren als wahrscheinlichen Mediatoren der Melatoninwirkung in pankreatischem Gewebe von Ratte und Mensch sowie in der Charakterisierung der Melatoninrezeptoren bei stoffwechselunauffälligen und Typ-2-diabetischen Patienten.

### **2. Material und Methoden**

Für die Untersuchungen wurden sowohl Glukose-responsive, Insulin-produzierende Ratten-Insulinoma-Zellen (INS1) als Modell der pankreatischen  $\beta$ -Zelle, Pankreata und Langerhanssche Inseln von Wistar-Ratten sowie Pankreata von stoffwechselgesunden und Typ-2-diabetischen Patienten verwendet. Die Gewinnung von Ratteninseln erfolgte mittels Kollagenaseverdauung von 8 Wochen alten Wistarratten-Pankreata. Bei den Proben humaner Pankreata handelte es sich um Operationsmaterial von 25 Patienten, welche pankreatektomiert wurden. Eine Genehmigung der Ethikkommission lag vor. Nach Extraktion und Aufarbeitung der Proben erfolgten *Real-time*-RT-PCR-Untersuchungen sowie Restriktionsanalysen. Funktionelle Tests wurden mithilfe von Inkubations- und Perifusionsversuchen unter Einsatz von Melatoninrezeptor-Antagonisten durchgeführt. Immunhistochemische Versuche erfolgten unter Einsatz von Antikörpern gegen den MT1-Rezeptor (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) oder den MT2-Rezeptor (Gene Tex Inc., San Antonio, TX, USA) sowie den entsprechenden Cy3-konjugierten Sekundäntikörpern.

### 3. Ergebnisse

Molekularbiologische und immunhistochemische Untersuchungen konnten an Pankreasgewebe und Langerhansschen Inseln von Ratte und Mensch sowie an Ratten-INS1-Zellen den Nachweis von Melatoninrezeptoren MT1 und MT2 erbringen (Abb. 1, 2 A, B, C). Es wurde deutlich, dass beide Melatoninrezeptor-Isoformen vorrangig im endokrinen Pankreas lokal-

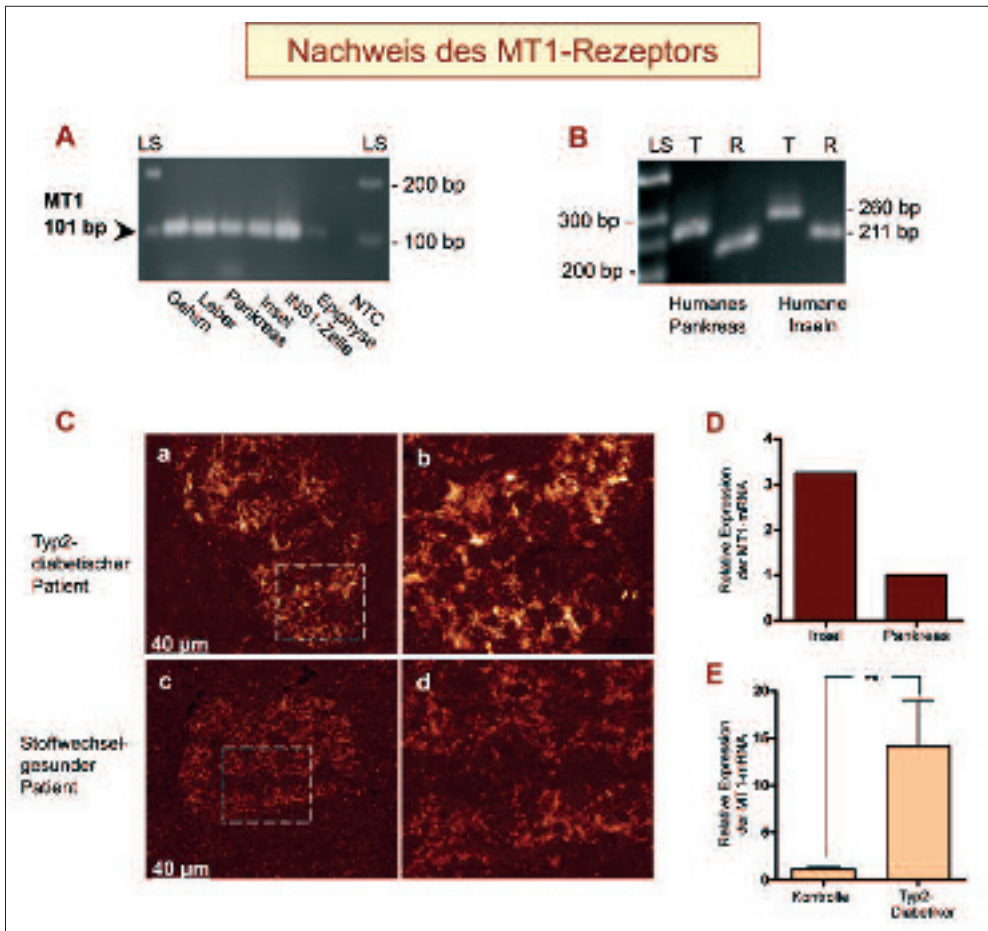


Abb. 1 Charakterisierung des MT1-Rezeptors. (A) Expression der MT1-Rezeptor-mRNA (101 bp) an Pankreas, Langerhansscher Insel und INS1-Zelle der Ratte sowie Gehirn, Leber und Epiphyse als Kontrollorgane. (B) Nachweis des MT1-Rezeptor-Transkripts (T, 260 bp) und Bestätigung der Identität des spezifischen Amplifikationsproduktes durch Restriktionsreaktion mit dem Enzym BclI (R, 211 bp + 49 bp) in Gesamtpankreas und Langerhansscher Insel des Menschen. (C) Immunhistochemische Darstellung des MT1-Rezeptors an humanem Pankreasgewebe. Sowohl molekularbiologische Untersuchungen (D) als auch die konfokalmikroskopischen Aufnahmen (C, a/c) zeigen, dass die Melatoninrezeptoren vorrangig an Langerhansschen Inseln vorkommen. Vergrößerungen der Aufnahmen verdeutlichen die membranständige Lokalisation des MT1-Melatoninrezeptors (C, b/d). Es wurden eine verstärkte MT1-Rezeptor-Markierung (C, a/b) sowie eine signifikant höhere mRNA-Expression (E) des MT1-Rezeptors bei Typ-2-diabetischen Patienten im Vergleich zu stoffwechselgesunden Patienten nachgewiesen. LS, Molekulargewichtsstandard; NTC, non template control. Verändert nach PESCHKE und MÜHLBAUER 2007 (Abb. 1–3). Mit freundlicher Genehmigung des Verlages der Sächsischen Akademie der Wissenschaften zu Leipzig.

siert sind (Abb. 1, 2 C, D). Interessanterweise konnten an Pankreata Typ-2-diabetischer Patienten eine signifikant erhöhte mRNA-Expression sowie eine verstärkte Immunreaktivität der Melatoninrezeptoren festgestellt werden (Abb. 1, 2 C, E). Zusätzliche funktionelle Perifusions- und Inkubationsversuche haben den Nachweis erbracht, dass Melatonin die Forskolin-stimulierte Insulinsekretion an Langerhansschen Inseln und INS1-Zellen der Ratte signifikant senkt. Die Aufhebung dieses Effektes durch Ko-Inkubation mit Melatoninrezeptor-

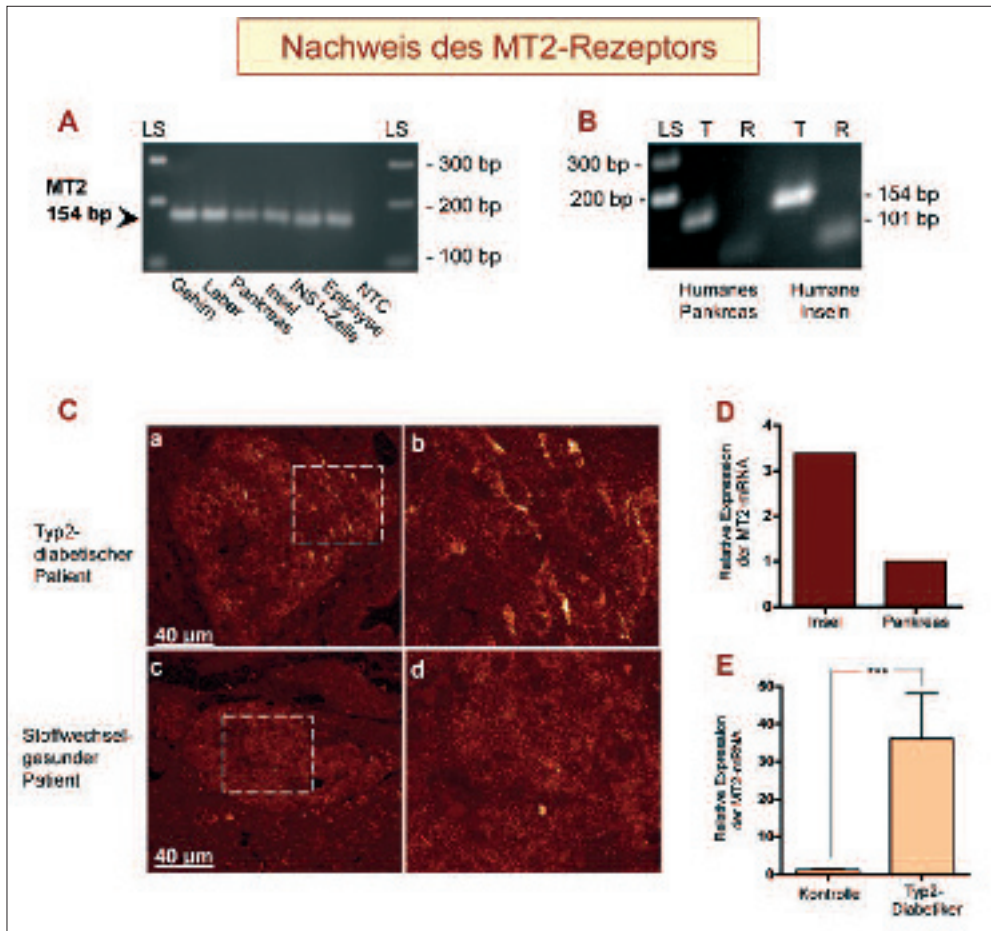


Abb. 2 Charakterisierung des MT2-Rezeptors. (A) Expression der MT2-Rezeptor-mRNA (169 bp) an Pankreas, Langerhanscher Insel und INS1-Zelle der Ratte sowie Gehirn, Leber und Epiphyse als Kontrollorgane. (B) Nachweis des MT2-Rezeptor-Transkriptes (T, 154 bp) und Bestätigung der Identität des spezifischen Amplifikationsproduktes durch Restriktionsreaktion mit dem Enzym AvaII (R, 101 bp + 53 bp) in Gesamtpankreas und Langerhanscher Insel des Menschen. (C) Immunhistochemische Darstellung des MT2-Rezeptors an humanem Pankreasgewebe. Sowohl molekularbiologische Untersuchungen (D) als auch die konfokalmikroskopischen Aufnahmen (C, a/c) zeigen, dass die Melatoninrezeptoren vorrangig an Langerhansschen Inseln vorkommen. Vergrößerungen der Aufnahmen verdeutlichen die membranständige Lokalisation des MT2-Melatoninrezeptors (C, b/d). Es wurden eine verstärkte MT2-Rezeptor-Markierung (C; a/b) sowie eine signifikant höhere mRNA-Expression (E) des MT2-Rezeptors bei Typ-2-diabetischen Patienten im Vergleich zu stoffwechselgesunden Patienten nachgewiesen. LS, Molekulargewichtstandard; NTC, *non template control*. Verändert nach PESCHKE und MÜHLBAUER 2007 (Abb. 1–3). Mit freundlicher Genehmigung des Verlages der Sächsischen Akademie der Wissenschaften zu Leipzig.

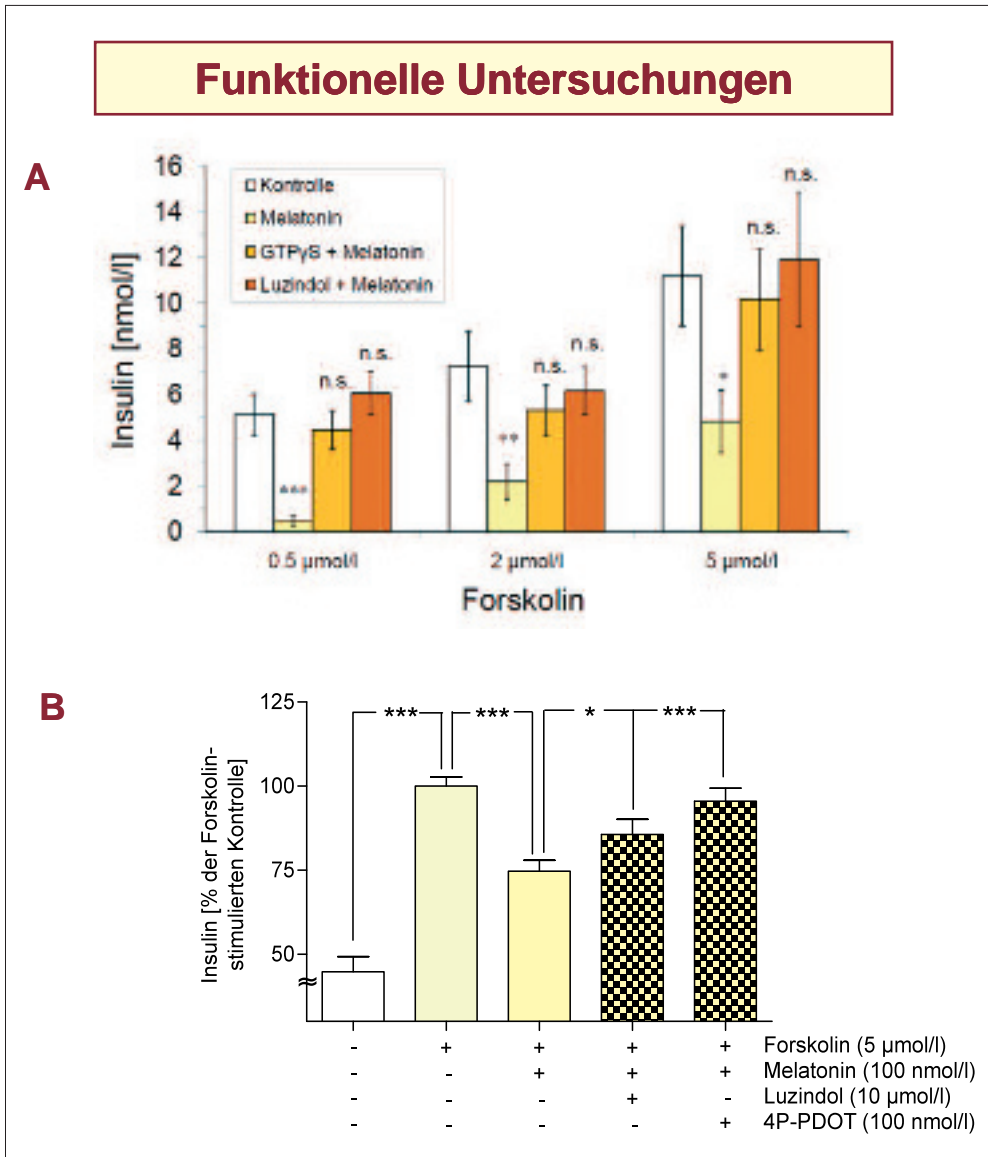


Abb. 3 (A) Perifusionsversuche unter 3-minütigen Stimulationen mit Forskolin (0,5 µmol/l, 2 µmol/l und 5 µmol/l) an Langerhansschen Inseln der Ratte. Melatonin (100 nmol/l) senkte die Forskolin-stimulierte Insulinsekretion signifikant. Dieser Effekt wurde sowohl durch den G-Protein-Aktivator Guanosin-5'-O-(3-thio)triphosphat (GTPγS, 30 µmol/l) als auch durch den unspezifischen Melatoninrezeptor-Antagonisten Luzindol (10 µmol/l) aufgehoben. Die Säulen zeigen Mittelwerte ± S.E.M. mit je n = 6 – 12. (B) Inkubationsversuche an Ratten-Insulinoma-Zellen (INS1) zur Wirkung von Melatonin und Melatoninrezeptor-Antagonisten auf die Insulinsekretion. Die Behandlung von INS1-Zellen mit Melatonin (100 nmol/l) für 6 h reduzierte die Forskolin-stimulierte (5 µmol/l) Insulinsekretion signifikant. Die Vorinkubation mit Luzindol (10 µmol/l) oder dem MT2-Rezeptor-spezifischen Antagonisten 4P-PDOT (100 nmol/l) für 30 min hob diesen Effekt auf. Die Daten repräsentieren den Mittelwert ± SEM (3 unabhängige Versuche mit je n = 8). \* P < 0,05; \*\* P < 0,01; \*\*\* P < 0,001. Verändert nach PESCHKE et al. 2000 (Fig. 1) und STUMPF et al. 2008 (Fig. 3). Mit freundlicher Genehmigung von John Wiley & Sons.

Antagonisten zeigt, dass Melatonin seine Insulin-senkende Wirkung über Melatoninrezeptoren vermittelt (Abb. 3).

#### **4. Diskussion**

Im Rahmen der vorliegenden Experimente konnte durch molekularbiologische und immunhistochemische Untersuchungen erstmals eindeutig belegt werden, dass sowohl in Pankreata, Langerhansschen Inseln und INS1-Zellen der Ratte als auch in Pankreata und Inseln des Menschen Melatoninrezeptoren MT1 und MT2 nachweisbar sind. Funktionelle Untersuchungen haben ferner den Nachweis erbracht, dass Melatonin seine Insulin-senkende Wirkung auf die pankreatische  $\beta$ -Zelle über Melatoninrezeptoren vermittelt. Die Ergebnisse zur Melatoninrezeptor-Expression bei stoffwechselgesunden und Typ-2-diabetischen Patienten stellen in Ergänzung zu Studien zum Melatonin-Insulin-Antagonismus sowie genomweiten Assoziationsstudien den Brückenschlag zwischen experimentellen und klinischen Befunden dar.

#### *Literatur*

- PESCHKE, E., und MÜHLBAUER, E.: Funktionelle Beziehungen zwischen Melatonin und Insulin – Untersuchungsergebnisse an stoffwechselgesunden und diabetischen Versuchstieren und Patienten. In: PESCHKE, E. (Hrsg.): Endokrinologie III, Vorträge im Rahmen des Projekts „Zeitstrukturen endokriner Systeme“. Abh. Sächs. Akad. Wiss., Math.-nat. Kl., Band 64, Heft 4, S. 103–118. Stuttgart, Leipzig: S. Hirzel 2007
- PESCHKE, E., FAUTECK, J. D., MUSSHOF, U., SCHMIDT, F., BECKMANN, A., and PESCHKE, D.: Evidence for a melatonin receptor within pancreatic islets of neonate rats: functional, autoradiographic, and molecular investigations. *J. Pineal Res.* 28, 156–164 (2000)
- STUMPF, I., MÜHLBAUER, E., and PESCHKE, E.: Involvement of the cGMP pathway in mediating the insulin-inhibitory effect of melatonin in pancreatic beta-cells. *J. Pineal Res.* 45, 318–327 (2008)

Dr. Ina BÄHR  
Institut für Anatomie und Zellbiologie  
Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg  
Große Steinstraße 52  
06097 Halle (Saale)  
Bundesrepublik Deutschland  
Tel.: +49 345 5571813  
Fax: +49 345 5571700  
E-Mail: ina.baehr@medizin.uni-halle.de

# **Developmental Origins of Health and Disease: Exposures, Outcome, Mechanisms and Interventions**

International Symposium

Deutsche Akademie der Naturforscher Leopoldina  
in Zusammenarbeit mit dem Alfred Krupp Wissenschaftskolleg Greifswald

Alfred Krupp Wissenschaftskolleg Greifswald  
4. bis 6. September 2009

Nova Acta Leopoldina N. F. Bd. 112, Nr. 382  
Herausgegeben von Marek ZYGMUNT (Greifswald), Hans Georg BENDER  
(Düsseldorf) und Wolfgang KÜNZEL (Gießen)  
(2011, 119 Seiten, 4 Abbildungen, 6 Tabellen, 21,50 Euro, ISBN: 978-3-8047-2887-5)

Die Beiträge zur internationalen Fachtagung „Developmental Origins of Health and Disease“ (DOHaD) liefern Informationen über den Stellenwert einer gesunden Schwangerschaft, die Notwendigkeit der Prävention von Risikoschwangerschaften und die Auswirkungen einer chronischen Plazentainsuffizienz und der daraus folgenden intrauterinen Wachstumsretardierung. Die DOHaD-Forschung basiert auf epidemiologischen Daten, aus denen klinische, experimentelle und auch epigenetische Studien folgten. Sie zeigen, dass perinatale Ereignisse einen großen Einfluss auf die peri- und postnatale Entwicklung sowie auf die Herausbildung von Krankheiten im Kinder-, Jugend- und Erwachsenenalter haben. So sind mit der intrauterinen Wachstumsretardierung vaskuläre und metabolische Veränderungen im adulten Organismus verbunden. Chronische Plazentainsuffizienz und deren Folgen können zu einer Prädisposition für koronare Herzerkrankung, Diabetes mellitus, Schlaganfall, arterielle Hypertonie und Niereninsuffizienz führen, aber auch eine veränderte Knochenentwicklung und ein erhöhtes Risiko für Karzinome werden als Folgeschäden diskutiert. Im Mittelpunkt der Betrachtungen steht die sogenannte „fetale Programmierung“ in kritischen Phasen des intrauterinen Wachstums. Negative Einflüsse während dieser Wachstumsphasen können zu Langzeitschäden und strukturellen Veränderungen führen. Die resultierenden Kompensationsmechanismen werden bis in die nächste Generation epigenetisch weiter vererbt. Alle Beiträge sind in englischer Sprache verfasst.

*Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft Stuttgart*

## Calciumsignalkomponenten der pankreatischen Insel unter dem Einfluss von Melatonin

Ivonne BAZWINSKY-WUTSCHKE (Halle/Saale), Eckhard MÜHLBAUER, Liudmila LITVAK (Leipzig) und Elmar PESCHKE (Halle/Saale)

Mit 4 Abbildungen

### 1. Einleitung

Die pankreatische  $\beta$ -Zelle der Langerhansschen Insel verfügt über ein Netzwerk von Calciumsignalwegen, die entscheidend für die Insulinausschüttung und Insulinbiosynthese sind. Die Signaltransduktion und Wirksamkeit von intrazellulären Calciumsignalen hängt maßgeblich von Calciumsignalkomponenten wie den folgenden Calcium-bindenden Proteinen (CaBPs) ab: Calbindin-D28k (CALB), Secretagogen (SCGN), Calmodulin (CALM) und Calreticulin (CALR). CALM im Besonderen vermittelt seine Effekte auf die Insulinsekretion und Insulinbiosynthese über die Bindung an Calcium/Calmodulin-abhängige Kinasen (CAMKs). CaBPs und CAMKs im pankreatischen Gewebe und in Insulinoma-Zellen (INS1) der Ratte nachzuweisen, war das erste Ziel der vorliegenden Studie. Untersuchungen aus der eigenen Arbeitsgruppe dokumentierten erstmalig einen Melatonin-vermittelten Einfluss auf die Insulinausschüttung. Rezeptor-mediiert führt Melatonin in Abhängigkeit des genutzten Signalweges vor allem zu einer Absenkung der Insulinausschüttung. Die Klärung der Frage, ob Calciumsignalkomponenten, mit Fokussierung auf Isoformen der CAMKs (CamkIV, Camk2d), an der Vermittlung dieses Effektes beteiligt sind, ist Inhalt des zweiten Teils der Studie.

### 2. Material und Methoden

Es wurden Pankreata von 6 und 24 Wochen alten Wistar-Ratten ( $n = 4$ ) gewonnen. An histologischen Schnitten der Pankreata sowie an INS1-Zellen erfolgten Immunfluoreszenzmarkierungen, die mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie ausgewertet wurden. Zusätzlich kamen an Ultramikrotom-Schnitten von Rattenpankreatia Immunogoldmarkierungen zum Einsatz. Für die funktionellen Untersuchungen wurden INS1-Zellen aus Inkubationsversuchen verwendet, bei denen neben Melatonin die Insulin-sekretionsfördernden Substanzen Forskolin (Fsk) und 3-Isobutyl-1-methylxanthin (IBMX) sowie der Melatoninrezeptor-Antagonist Luzindol (Luz) zum Einsatz kamen. Anschließend wurden die INS1-Zellen für *Real-time*-RT-PCR-Untersuchungen aufgearbeitet.



### **3. Ergebnisse**

Die immunhistochemischen Ergebnisse zeigen, dass Calciumsignalkomponenten wie die Calcium-bindenden Proteine CALB, CALM, CALR und SCGN vorwiegend in den pankreatischen Inseln lokalisiert sind (Abb. 1), wobei das exokrine Gewebe eine abgeschwächte oder keine Markierung aufweist. Alle vier CaBPs waren auch immunhistochemisch in den INS1-Zellen nachweisbar (Abb. 1). Anhand der Immunogoldmarkierung konnte das spezifische Vorkommen einzelner CaBPs in Zellorganellen und dem Zytosol der  $\beta$ -Zelle dargestellt werden (Abb. 2).

Eine inselspezifische Lokalisation erbrachte der immunhistochemische Nachweis der CAMK-Isoformen CAMKIV und CAMK2D (Abb. 3 und 4). Die INS1-Zellinkubationsversuche belegen, dass eine akute Melatoninbehandlung über 6 h in Anwesenheit von Fsk oder IBMX eine signifikante Abnahme der Insulinausschüttung verursacht und eine signifikante Minderung der Transkripte von CamkIV und Camk2d induziert (Abb. 3 und 4). Dieser Effekt wird durch den Melatoninrezeptor-Antagonisten Luzindol weitgehend aufgehoben.

### **4. Diskussion**

Die funktionelle Bedeutung der hier untersuchten Calciumsignalkomponenten für die pankreatische  $\beta$ -Zelle wurde durch die vorwiegende Lokalisation der CaBPs und CAMK in den pankreatischen Inseln und INS1-Zellen nachgewiesen, aber auch, wie die Immunogoldmarkierung beispielhaft zeigte, in spezifischen Zellkompartimenten der  $\beta$ -Zelle selbst. Die Zellinkubationsexperimente an INS1-Zellen erbrachten darüber hinaus erstmals den Nachweis, dass quantitative Transkriptveränderungen von Calciumsignalkomponenten (Camk2d und CamkIV) mit dem Insulin-senkenden Effekt des Melatonins assoziiert sind. Melatonin beeinflusst demnach die Genexpression von Komponenten der Calciumsignalwege, von denen bekannt ist, dass sie in die Insulinsekretion und Insulinbiosynthese involviert sind.

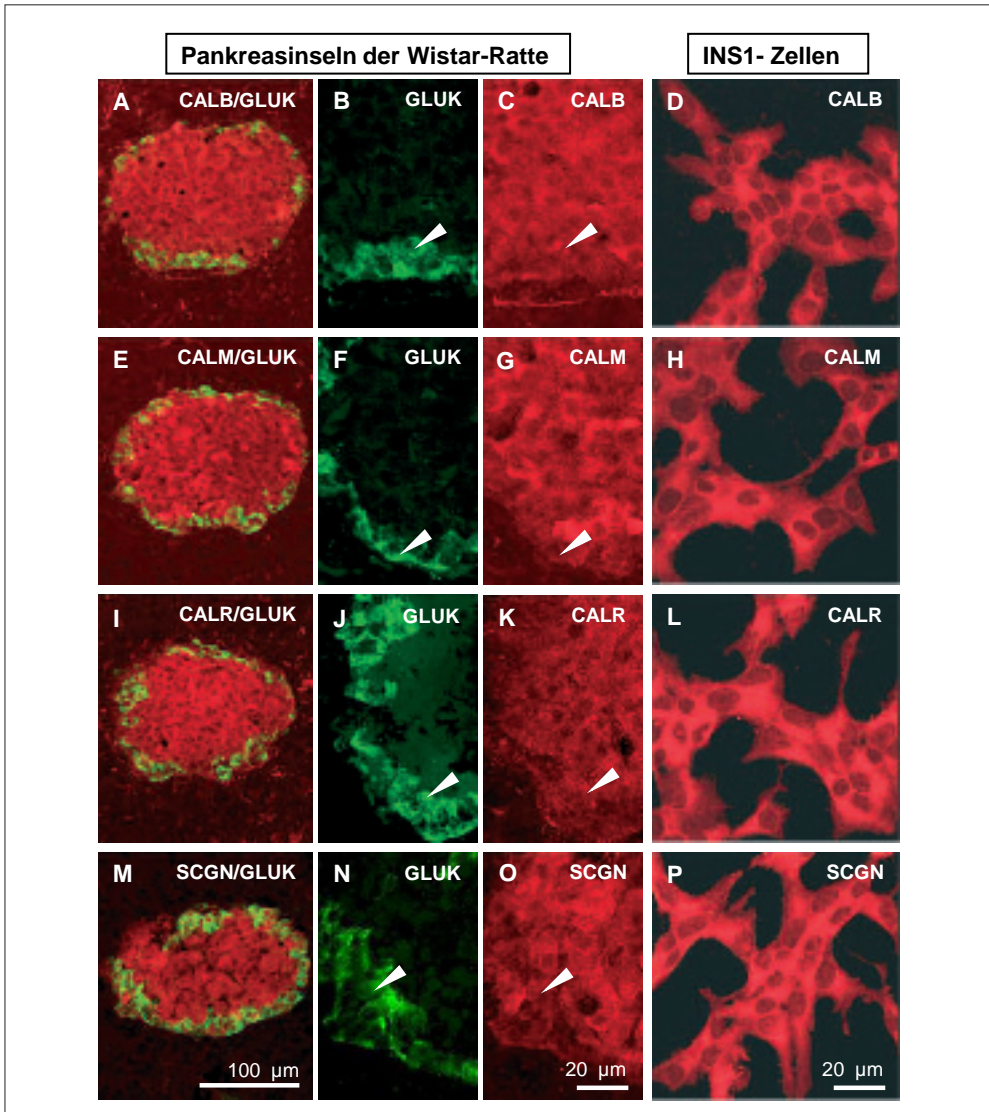


Abb. 1 Immunhistochemische Darstellung der Verteilungsmuster der Calcium-bindenden Proteine (CaBPs) Calbindin-D28k (CALB), Calmodulin (CALM), Calreticulin (CALR) und Secretagogen (SCGN) in pankreatischen Inseln der Wistar-Ratte und INS1-Zellen. (A, E, I, M) Über den Nachweis der einzelnen CaBPs (rot) werden spezifisch die pankreatischen Inseln dargestellt. (C, G, K, O) CALB verteilt sich relativ einheitlich innerhalb der Insel. CALM-SCGN- und CALR-immunreaktive Inseln sind demgegenüber durch eine ungleichmäßigere Immunreaktivität charakterisiert, wobei besonders die CALM-Immunmarkierung durch Ansammlungen stark positiver Zellen auffällt. (A–C, E–G, I–K, M–O) Die  $\alpha$ -Zellen, die in der Peripherie der pankreatischen Ratteninsel lokalisiert sind, werden durch die Glukagon-Immunmarkierung visualisiert (grün, GLUK). Die Doppelmarkierung mit Antikörpern gegen Glukagon (grün) und gegen das jeweilige CaBP (rot) zeigt das Vorkommen aller CaBPs in  $\alpha$ - und  $\beta$ -Zellen. (B, C, F, G, J, K, N, O) Die Pfeilspitzen in der Vergrößerung einer Insel deuten beispielhaft auf Zellen, in denen Glukagon mit einem CaBP ko-lokalisiert ist. (D, H, L, P) Die Abbildungen zeigen die immunpositive Markierung von CaBPs in INS1-Zellen. Die Immunreaktion beschränkt sich im Wesentlichen auf das Zytoplasma, die Kerne weisen eine schwächere Immunmarkierung auf.

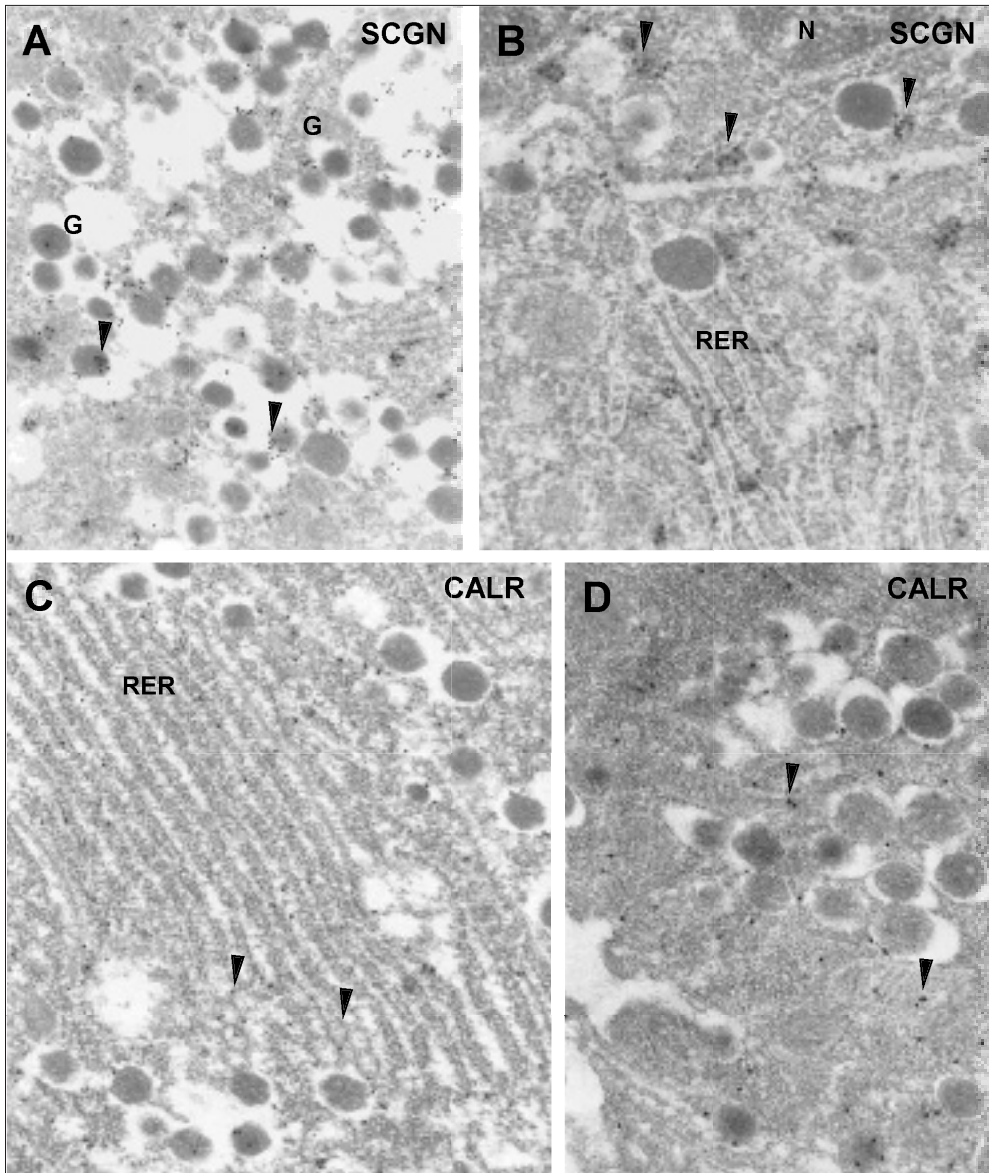


Abb. 2 Immunogoldmarkierung von Secretogin (SCGN) und Calreticulin (CALR) in  $\beta$ -Zellen der Wistar-Ratte. (A) Die SCGN-Immunogoldmarkierung beschränkt sich hauptsächlich auf die Region der Sekretgranula (G). Zahlreiche Goldpartikel sind im Kern- und Hofbereich der Granula verteilt (Pfeilköpfe; Vergrößerung  $\times 36740$ ). (B) Goldpartikel gegen SCGN finden sich auch gehäuft im rauen Endoplasmatischen Retikulum (RER) und in der Peripherie der Sekretvesikel (Pfeilköpfe, Vergrößerung  $\times 68000$ ). (C) Die Immunogoldpartikel gegen CALR sind vorwiegend mit dem RER und, im Vergleich zu SCGN, mit wenigen Granula assoziiert. Die Pfeilköpfe deuten auf Ansammlungen von Goldpartikeln im lateralen Bereich des RER, bestehend aus kleinen Vesikeln ohne einen dichten Kern (Vergrößerung  $\times 44470$ ). (D) Die Goldmarkierung ist mit den Konturen von Vesikeln und Mitochondrien assoziiert (Pfeilköpfe, Vergrößerung  $\times 49000$ ).

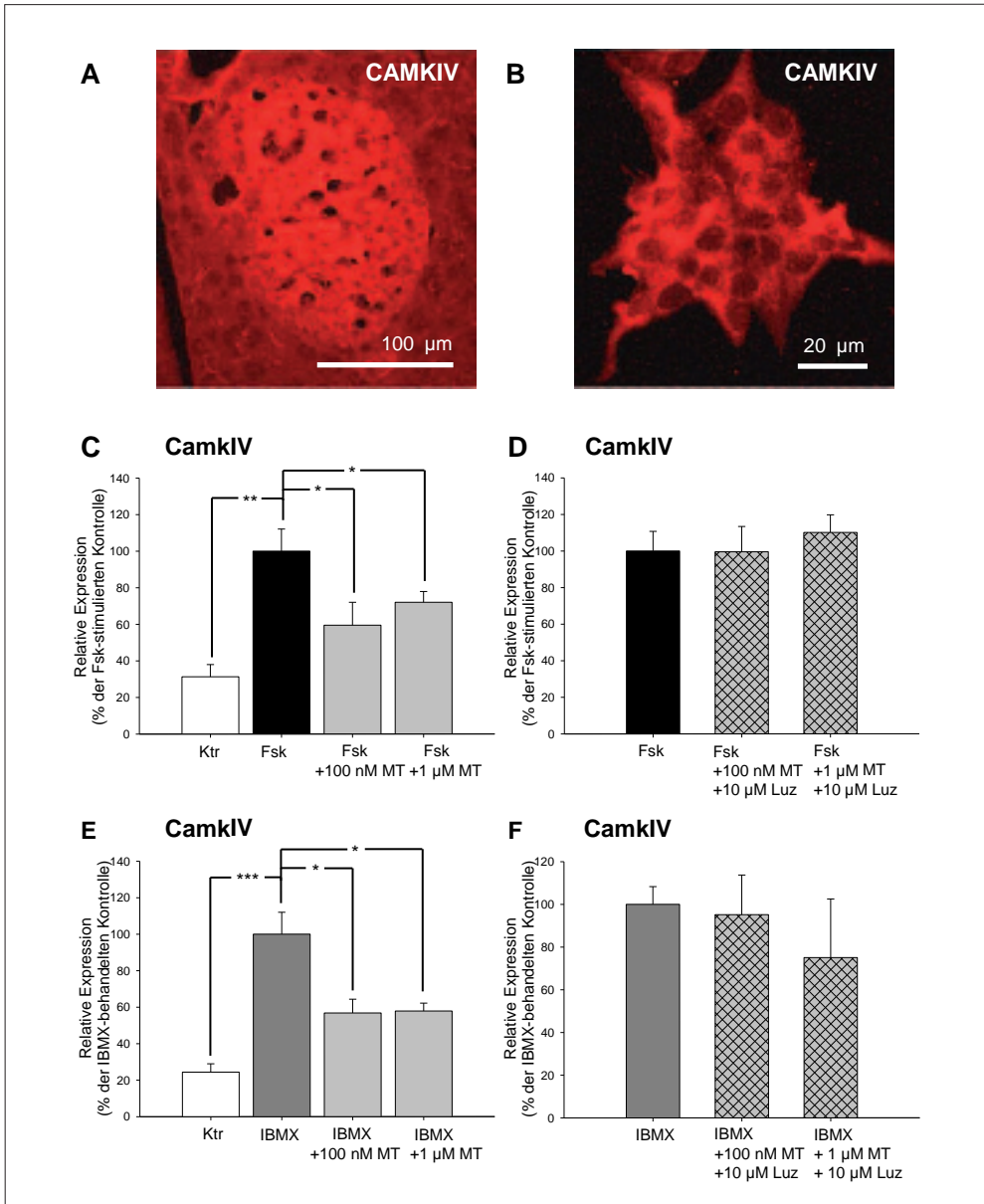


Abb. 3 (A, B) Die CAMKIV ist in der pankreatischen Insel der Wistar-Ratte und in INS1-Zellen lokalisiert. (C–F) Real-time-RT-PCR-Analyse der Calcium/Calmodulin-abhängigen Kinase IV (CamkIV)-mRNA in INS1-Zellen. (C, E) Die Behandlung mit 1 µM Forskolin (Fsk) oder 10 µM 3-Isobutyl-1-methylxanthin (IBMX) über 6 h führt zu einer Erhöhung der Transkriptmenge von CamkIV verglichen mit der Transkripthöhe der unbehandelten INS1-Zellen (Ktr). Die Melatoninbehandlung (MT) während der Fsk- oder IBMX-Applikation verursacht eine signifikante Abnahme des CamkIV-Transkripts. (D, F) Die zusätzliche Behandlung mit Luzindol (Luz) hebt den Melatonin-reduzierenden Effekt auf die CamkIV-mRNA fast vollständig auf. Die Daten repräsentieren den Mittelwert ± SEM aus 8 unabhängigen Zellinkubationsversuchen. \* P < 0,05; \*\* P < 0,01; \*\*\* P < 0,001; Mann-Whitney-U-Test. Verändert nach BAZWINSKY-WUTSCHKE et al. 2009 (Fig. 3). Mit freundlicher Genehmigung des Georg Thieme Verlages, Stuttgart.

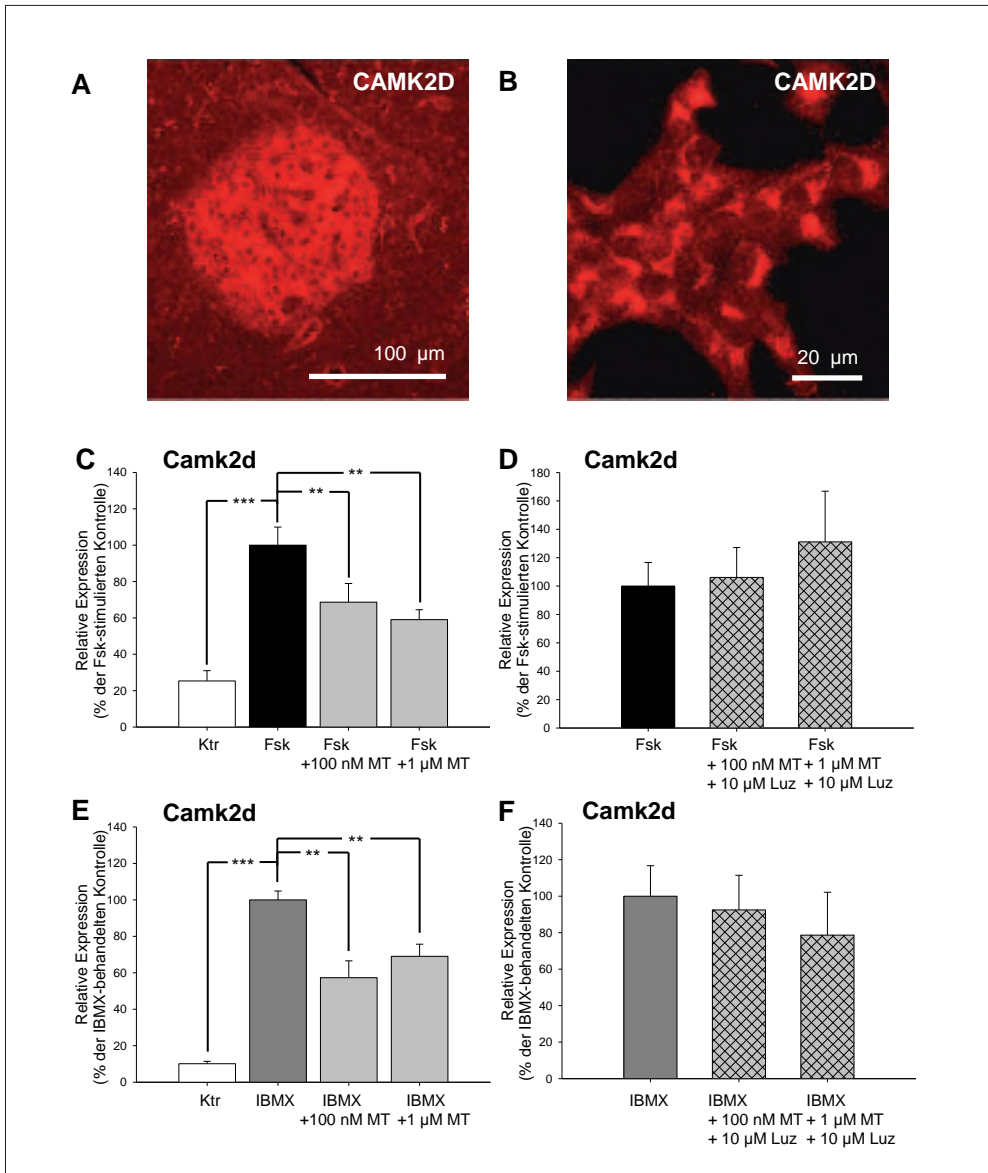


Abb. 4 (A, B) Die CAMK2D ist in der pankreatischen Insel der Wistar-Ratte und in INS1-Zellen lokalisiert. (C–F) *Real-time*-RT-PCR-Analyse der Calcium/Calmodulin-abhängigen Kinase 2d (Camk2d) mRNA in INS1-Zellen. (C, E) Die 1 µM Forskolin(Fsk)- oder 10 µM 3-Isobutyl-1-methylxanthin(IBMX)-Behandlung allein über 6 h verursachen eine signifikante Hochregulation der Camk2d-mRNA verglichen zu den Kontrollzellen (Ktr). Die Ko-Applikation mit verschiedenen Konzentrationen von Melatonin (MT) resultiert in einer signifikanten Abnahme der Camk2d-mRNA verglichen mit den Einzelapplikationen von Fsk oder IBMX auf INS1-Zellen. (D, F) Der reduktive Effekt von Melatonin auf die Camk2d-mRNA in Fsk- oder IBMX behandelten INS1-Zellen ist nicht mehr sichtbar nach zusätzlicher Gabe von Luzindol. Die Daten repräsentieren den Mittelwert ± SEM aus 8 unabhängigen Zellinkubationsversuchen. \* P < 0,05; \*\* P < 0,01; \*\*\* P < 0,001; Mann-Whitney-U-Test. Verändert nach BAZWINSKY-WUTSCHKE et al. 2009 (Fig. 4). Mit freundlicher Genehmigung des Georg Thieme Verlages, Stuttgart.

*Literatur*

BAZWINSKY-WUTSCHKE, I., MÜHLBAUER, E., WOLGAST, S., and PESCHKE, E.: Transcripts of calcium/calmodulin-dependent kinases are changed after forskolin- or IBMX-induced insulin secretion due to melatonin treatment of rat insulinoma beta-cells (INS-1). *Horm. Metab. Res.* 41, 805–813 (2009)

Dr. Ivonne BAZWINSKY-WUTSCHKE  
Institut für Anatomie und Zellbiologie  
Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg  
Große Steinstraße 52  
06097 Halle (Saale)  
Bundesrepublik Deutschland  
Tel.: +49 345 5571710  
Fax: +49 345 5571700  
E-Mail: [ivonne.bazwinsky@medizin.uni-halle.de](mailto:ivonne.bazwinsky@medizin.uni-halle.de)

# **Climate Change and Infectious Diseases**

## **International Conference**

Deutsche Akademie der Naturforscher Leopoldina  
in Zusammenarbeit mit der Indian National Science Academy, dem Alfred Krupp Wissenschaftskolleg Greifswald und dem Friedrich-Loeffler-Institut, Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit

Alfred Krupp Wissenschaftskolleg Greifswald  
26. bis 28. Mai 2009

Nova Acta Leopoldina N. F. Bd. *III*, Nr. 381  
Herausgegeben von Bärbel FRIEDRICH (Berlin/Greifswald), Jörg HACKER (Berlin),  
Seyed E. HASNAIN (Hyderabad), Thomas C. METTENLEITER (Greifswald/Insel  
Riems) und Jens SCHELL (Greifswald/ Insel Riems)

(2010, 120 Seiten, 22 Abbildungen, 12 Tabellen, 21,50 Euro,  
ISBN: 978-3-8047-2806-6)

Krankheitserreger können sich heute binnen kurzer Zeit weltweit verbreiten und so sowohl gesundheitliche als auch wirtschaftliche Schäden verursachen, wenn sie auf geeignete Umweltbedingungen treffen. Zoonosen, vom Tier auf den Menschen übertragbare Krankheiten, gewinnen dabei zunehmend an Bedeutung. Der Band enthält die Beiträge eines Symposiums, das die neuesten Erkenntnisse zum Klimawandel und zum Einfluss klimatischer Faktoren auf Infektionskrankheiten von Experten der Klimaforschung, der Biologie und der Infektionsmedizin zusammenführte. Erörtert werden auch Einflüsse von klimatischen Veränderungen auf die Evolution und die Biodiversität. Die Bedeutung des Klimawandels für das Auftreten von Infektionskrankheiten wird anerkannt, auch wenn konkrete Auswirkungen bisher nur schwer zu dokumentieren sind. Insbesondere der Überwachung von Vektor- und Reservoirpopulationen sowie der entsprechenden Erreger kommt daher eine große Bedeutung zu, wobei die Untersuchungen langfristig angelegt sein müssen, um Dynamiken in längeren Zeiträumen zu erfassen. Die Beiträge sind in englischer Sprache verfasst.

## **Morphologie der Tanyzyten und die Expression zellulärer Adhäsionsmoleküle wird durch die Photoperiode reguliert**

Matei BOLBOREA (Aberdeen), Stephan STEINLECHNER (Hannover),  
Paul PÉVET und Paul KLOSEN (Strasbourg)

Mit 5 Abbildungen

### **1. Einleitung**

Säugetiere mit saisonaler Fortpflanzung synchronisieren mit Hilfe der Photoperiode die Physiologie ihrer Reproduktionsorgane über die nächtliche Freisetzung des Pinealhormons Melatonin. Bisher ist jedoch der genaue Wirkort von Melatonin zur Kontrolle der Reproduktion unbekannt. Der Dsungarische Hamster (*Phodopus sungorus*) zeigt durch die Photoperiode regulierte, saisonale Rhythmen u. a. im Körpergewicht, in Fellfarbe sowie Gonadengröße und -aktivität. In kurzer Photoperiode (d. h. im Herbst/Winter) werden die Gonaden klein und inaktiv, was zu einer Reduktion der zirkulierenden Steroidhormone und deren Rückwirkungen auf das Gehirn führt. Das Gehirn ist also saisonalen Schwankungen bezüglich des Melatonins und der Sexualhormone ausgesetzt. Tanyzyten sind spezialisierte Gliazellen in der Wand des 3. Ventrikels. Diese Zellen senden ihre Fortsätze zu den Hirnhäuten und auch zu den Blutgefäßen des posterioren Hypothalamus. Sie kontrollieren dort den Durchtritt zirkulierender Hormone (z. B. Schilddrüsenhormone) aus dem Blut in das Hirn. Darüber hinaus modulieren sie lokal die Freisetzung von GnRH in die Eminentia mediana (Abb. 1). Wir haben nachgewiesen, dass beim Dsungarischen Hamster die Tanyzyten saisonale Änderungen in der Morphologie ihrer Fortsätze zeigen, und postulieren daher, dass diese Änderungen durch Melatonin oder die Rückkopplung durch die Sexualsteroidinduziert werden.

### **2. Methoden**

Mit Hilfe immunhistochemischer Vimentin-Analysen wurden bei männlichen Dsungarischen Hamstern die Einflüsse von Photoperiode, Melatonin und Testosteron auf die Struktur der Tanyzyten untersucht. Da das neuronale Zelladhäsionsmolekül NCAM und seine polysialisierte Form PSA-NCAM bekanntermaßen bei der strukturellen Plastizität eine Rolle spielen, wurde darüber hinaus deren Expression bestimmt.

### **3. Ergebnisse**

Immunhistochemische Vimentin- als auch NCAM-Analysen zeigen, dass die Fortsätze der Tanyzyten in kurzer Photoperiode signifikant reduziert sind (Abb. 2). Diese Reduktion konnte



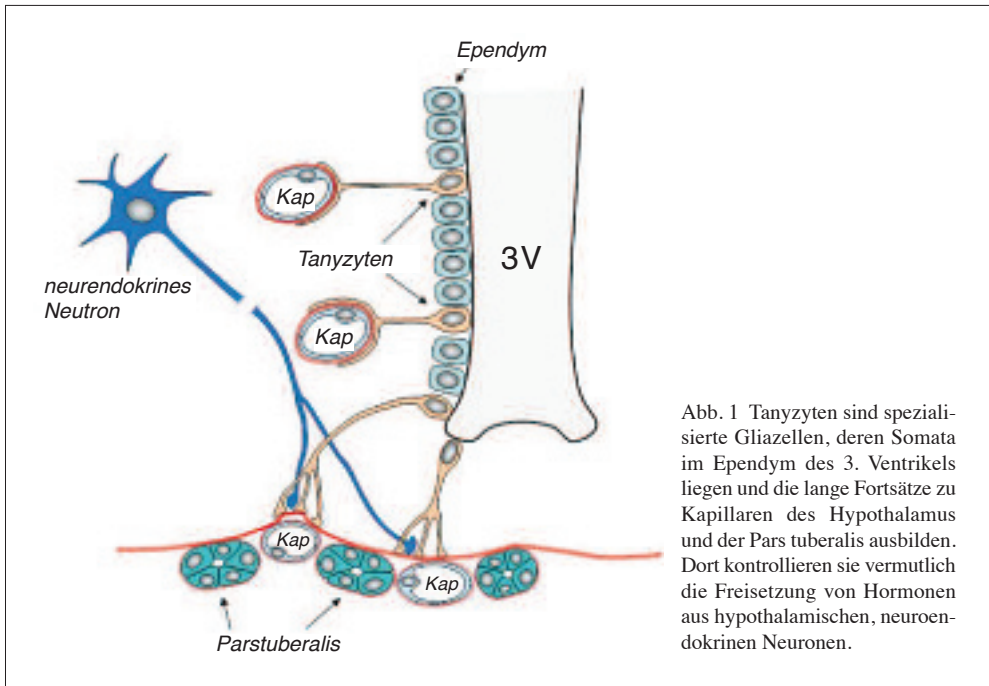


Abb. 1 Tanyzyten sind spezialisierte Gliazellen, deren Somata im Ependym des 3. Ventrikels liegen und die lange Fortsätze zu Kapillaren des Hypothalamus und der Pars tuberalis ausbilden. Dort kontrollieren sie vermutlich die Freisetzung von Hormonen aus hypothalamischen, neuroendokrinen Neuronen.

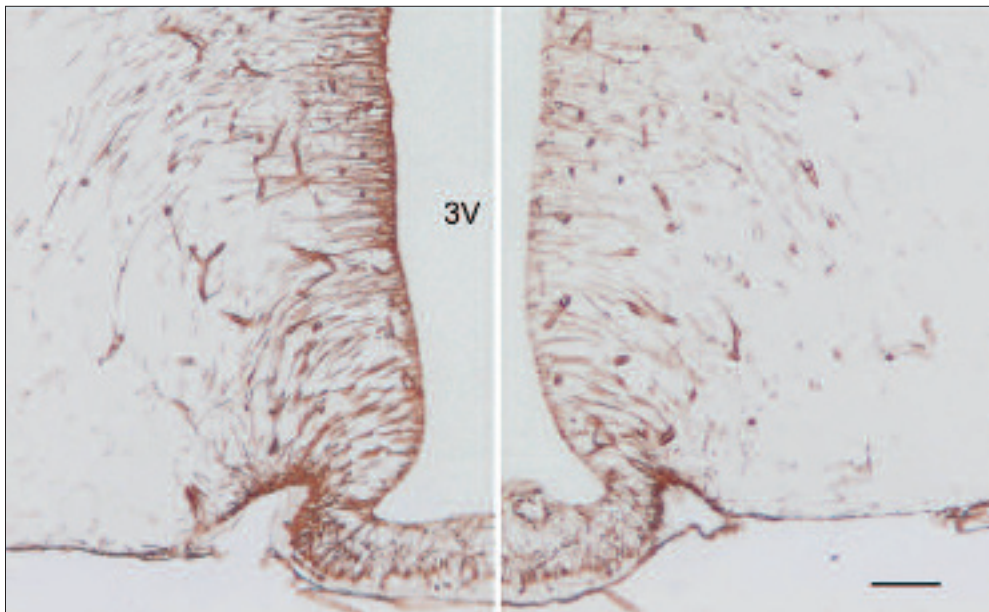


Abb. 2 Immunhistologische Darstellung von Vimentin im Bereich des 3. Ventrikels (3V). Links bei einem Tier in langer Photoperiode, rechts bei einem Tier in kurzer Photoperiode gehalten. Dichte und Länge der Vimentin-positiven Fasern ist im Kurztag signifikant reduziert.

durch exogenes Testosteron nicht rückgängig gemacht werden (ohne Abbildung). Die Tanyzyten und ihre Fortsätze enthalten in langen Photoperioden (Sommer, sexuell aktiv) große Mengen an NCAM, die in kurzer Photoperiode (Winter, sexuell inaktiv) verschwinden. Auch hier konnte eine Testosteron-Supplementierung in kurzer Photoperiode weder die Morphologie der Tanyzyten, noch das immunoreactive NCAM wiederherstellen (Abb. 3, 4). Kastration der Hamster in langer Photoperiode hatte keinen Einfluss auf die Morphologie der Tanyzyten oder die Expression von NCAM (Abb. 3, 4). Allerdings konnte durch tägliche Injektion von Melatonin die Wirkung der kurzen Photoperiode auf die Morphologie der Tanyzyten simuliert werden (Abb. 5).

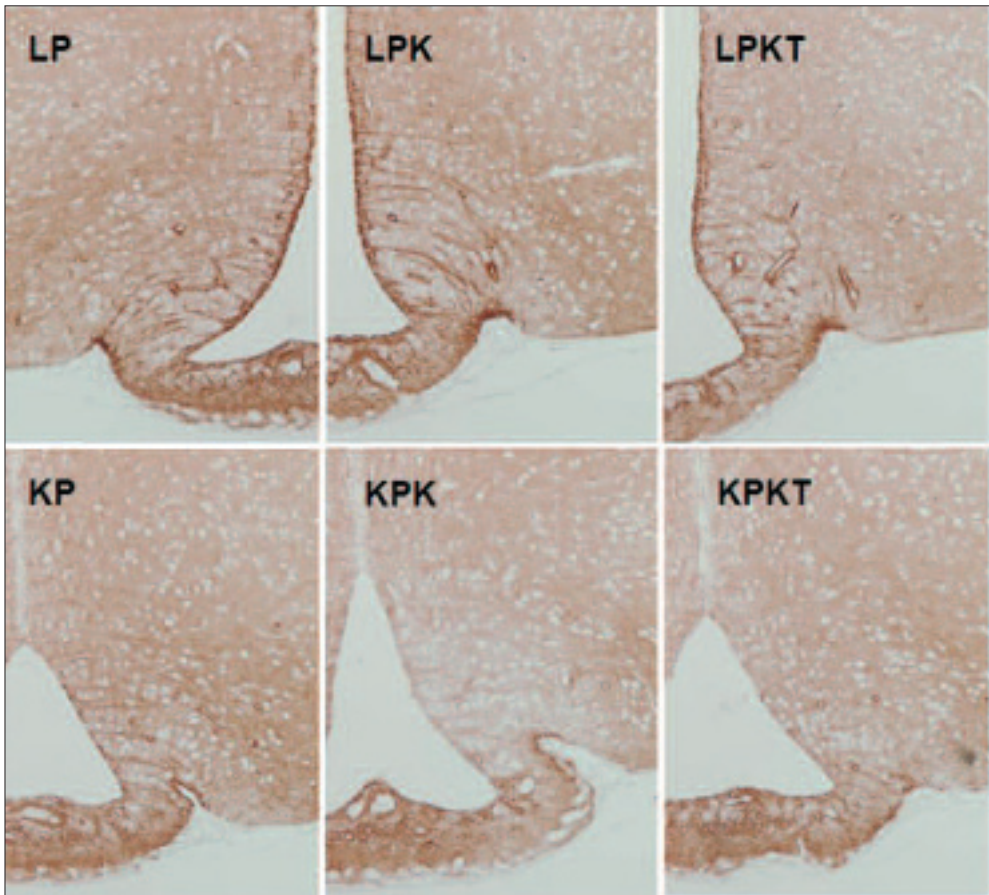


Abb. 3 *Obere Reihe*: Immunhistochemie des neuronalen Adhäsionsmoleküls (NCAM) in den Tanyzyten bei je einem Tier in langer Photoperiode (LP), einem kastrierten Tier in langer Photoperiode (LPK) sowie einem kastrierten Tier mit Testosteronimplantat (LPKT). *Untere Reihe*: Kurze Photoperiode (KP), kurze Photoperiode und kastriert (KPK) sowie kurze Photoperiode, kastriert und mit Testosteronimplantat (KPKT).

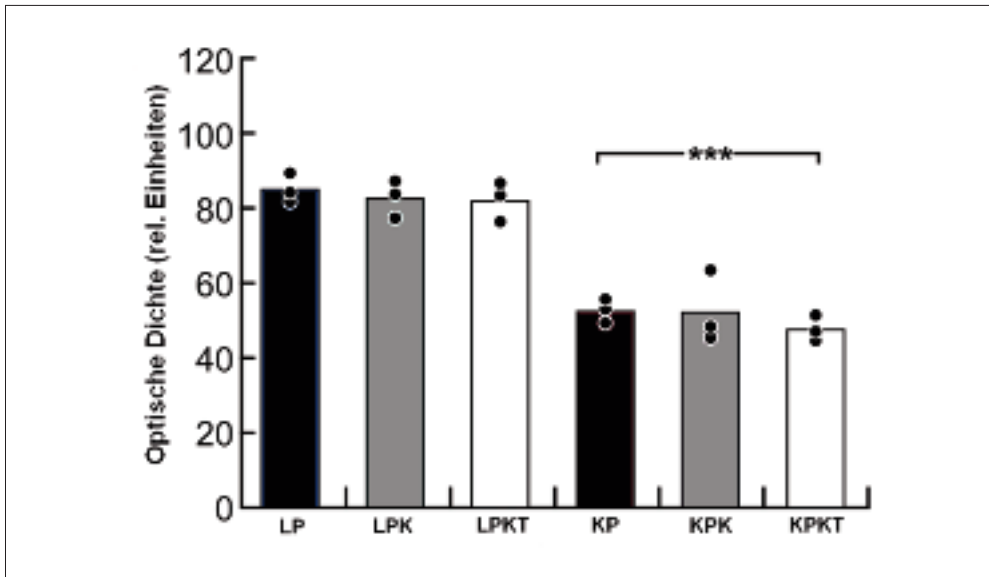


Abb. 4 Densitometrische Quantifizierung der Immunfärbung gegen NCAM bei je drei Tieren aus den in Abb. 3 gezeigten Gruppen. Es ist ausschließlich ein Effekt der Photoperiode sichtbar, während Kastration sowie Einsatz von Testosteron durch Implantate keine Effekte zeigen.

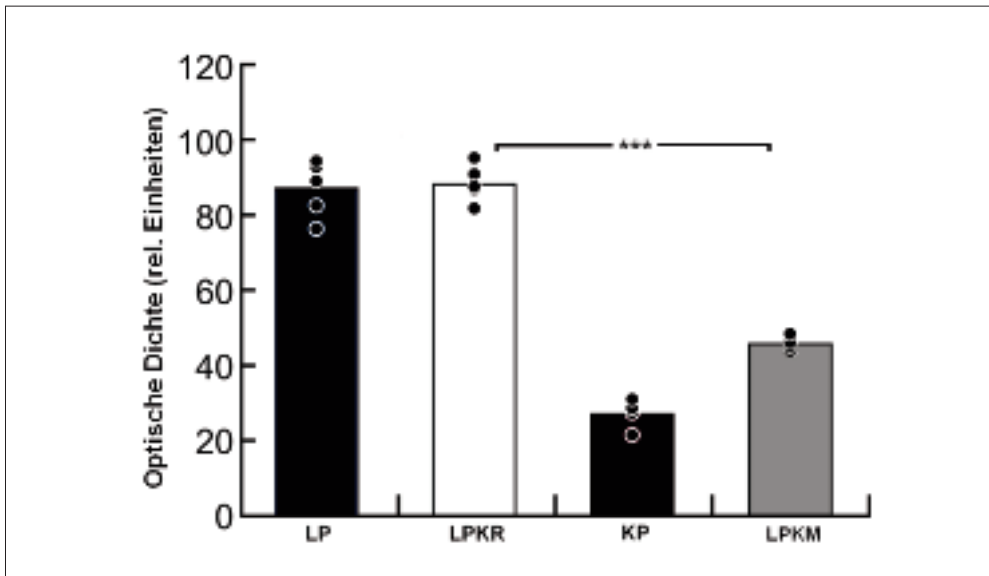


Abb. 5 Bei Haltung von Hamstern in kurzer Photoperiode (KP) sinkt die Immunreaktion gegen NCAM in den Tannzyten signifikant gegenüber Tieren in langer Photoperiode (LP) ab. Kastrierte Tiere in langer Photoperiode, die täglich mit Melatonin behandelt wurden (LPKM), unterscheiden sich signifikant von in langer Photoperiode (LP) gehaltenen Kontrolltieren sowie kastrierten Tieren in langer Photoperiode, die nur Ringerlösung bekommen haben. Auch hier simuliert Melatonin die Wirkung kurzer Photoperioden.

#### **4. Folgerungen**

Die saisonalen Änderungen der Tanyzytenmorphologie sowie der Expression von NCAM scheinen hauptsächlich durch die photoperiodischen Änderungen des Melatoningehaltes gesteuert zu sein. Ob Melatonin dabei direkt oder indirekt auf die Tanyzyten wirkt, bleibt zu untersuchen.

Matei BOLBOREA, Ph.D.  
Molecular Endocrinology Group  
The Rowett Institute of Nutrition and Health  
University of Aberdeen  
Greenburn Road  
Aberdeen AB21 9SB  
Scotland  
UK  
Tel.: +44 1224 712751  
Fax: +44 1224 715349  
E-Mail: [mateibolborea@gmail.com](mailto:mateibolborea@gmail.com)

## **Metabolism Meets Virulence**

### **International Symposium on Metabolism and Bacterial Pathogenesis**

Akademie Schloss Hohenkammer  
4. bis 7. April 2009

Nova Acta Leopoldina N. F. Bd. *III*, Nr. 378

Herausgegeben von Jürgen HEESEMANN (München) und Michael HENSEL (Erlangen)  
(2010, 150 Seiten, 23 Abbildungen, 5 Tabellen, 22,50 Euro, ISBN: 978-3-8047-2803-5)

Das Wissen über mikrobielle Virulenzfaktoren ist mittlerweile sehr detailliert, während das Verständnis, wie sich Bakterien während einer Infektion ernähren und wie sie ihren Stoffwechsel an den eukaryotischen Wirt anpassen, erst am Anfang steht. Wissenschaftler mit den Arbeitsschwerpunkten pathogene Bakterien, bakterielle Physiologie, Regulation, Analyse des Metaboloms und Symbiose von Mikrobe und Wirt berichten in dem vorliegenden Band über Ansätze zur Analyse des Stoffwechsels während Infektionen sowie die *In-silico*-Modellierung von metabolischen Netzwerken. Behandelt werden allgemeine Aspekte des bakteriellen Stoffwechsels, die globale Regulation des Bakterienstoffwechsels, die RNA-Biologie in ihrer Bedeutung für den bakteriellen Stoffwechsel und die Virulenz, die metabolischen Anpassungen von Pathogenen an extrazelluläre oder intrazelluläre Lebensweisen, die Rolle von Biofilmen in der bakteriellen Kommunikation und der Übergang von der parasitischen zur endosymbiontischen Lebensweise. Alle Beiträge sind in englischer Sprache verfasst.

*Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft Stuttgart*

## Melatonin-Insulin-Interaktionen bei Typ-1-diabetischen Ratten

Kathleen HOFMANN, Ina BÄHR, Sebastian STRECK (Halle/Saale), Eckhard MÜHLBAUER (Leipzig), Elke ALBRECHT (Halle/Saale), Sabine WOLGAST (Leipzig), Dirk WEDEKIND (Hannover) und Elmar PESCHKE ML (Halle/Saale)

Mit 4 Abbildungen

### 1. Einleitung

Membranständige Melatoninrezeptoren (MT1 und MT2) sowie intakte Adenylatzyklase/cAMP- und Guanylatzyklase/cGMP-Signalwege der pankreatischen  $\beta$ -Zelle sind das morphologische Substrat für die akzeptierte Suppression der Insulinsekretion infolge Melatoninapplikation. Zurückliegend wurden Glukose, Insulin und Melatonin bei Typ-2-diabetischen Ratten und Patienten sowie Veränderungen der pinealen Expression von Insulinrezeptor(InsR)- und Arylalkylamin-N-acetyltransferase(AANAT)-mRNA bei Typ-2-diabetischen Ratten untersucht. Dabei fanden sich verringerte Plasma-Melatoninspiegel bei Typ-2-diabetischen Goto-Kakizaki(GK)-Ratten sowie Typ-2-diabetischen Patienten. In der vorliegenden Untersuchung wurden nun Glukose, Insulin und Melatonin bei Typ-1-diabetischen Ratten im Plasma sowie die Transkripte von InsR, AANAT, Hydroxyindol-O-methyltransferase (HIOMT) und  $\beta$ 1-Adrenozeptor (AdRb1) in den Epiphysen mittels *Real-time*-RT-PCR bei Typ-1-diabetischen Streptozotocin(STZ)- und IDDM-Ratten untersucht und mit den Ergebnissen Typ-2-diabetischer Ratten und Patienten verglichen.

### 2. Material und Methoden

Zwecks Erfassung von Melatonin-Insulin-Interaktionen bei Typ-1-diabetischen Ratten wurden Blutglukose, Insulin und Melatonin im Plasma von STZ- und IDDM-Ratten mittels Radioimmunoassay bestimmt. Weiterhin wurden die Expression der wichtigen Melatonin synthese-Enzyme AANAT und HIOMT sowie die Expression pinealer InsR- und AdRb1-mRNA im Tagesgang mittels *Real-time*-RT-PCR bestimmt. Zusätzlich wurden den IDDM-Ratten zum Zeitpunkt der Entwicklung des Typ-1-Diabetes, um den 60. Tag, Insulinpellets subkutan implantiert und die oben genannten Merkmale vor und nach Insulin substitution verglichen.

### 3. Ergebnisse

Die statistisch signifikanten Ergebnisse zeigen, dass der Verlust von Insulin, der bei 12 und 51 Wochen alten Ratten mittels STZ herbeigeführt wurde, mit einer signifikanten Zunahme von Melatonin verbunden ist (Abb. 1). Das gleiche Ergebnis wurde bei den IDDM-Ratten

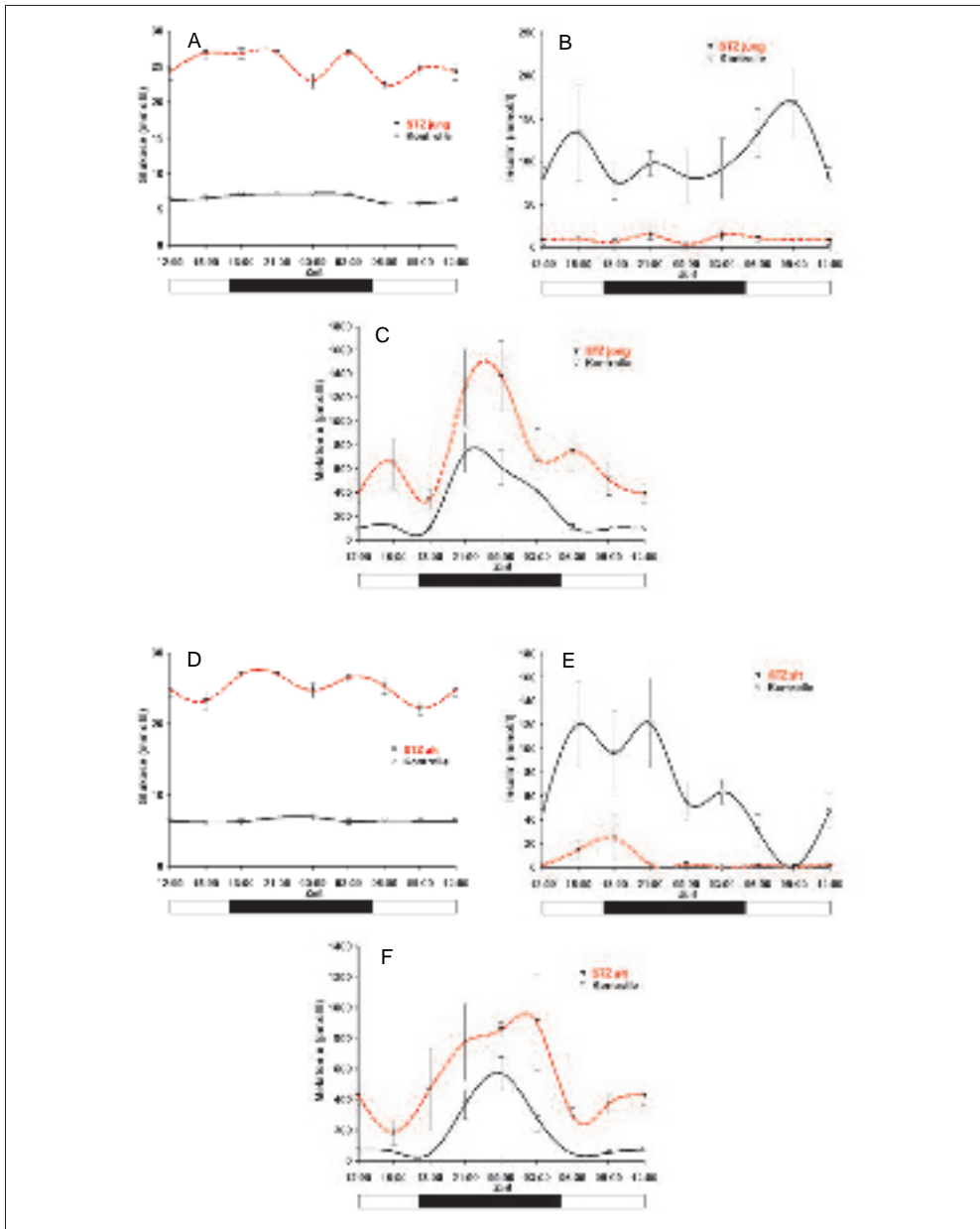


Abb. 1 Tagesprofile von Glukose (A, D), Insulin (B, E) und Melatonin (C, F) im Blutplasma 12 Wochen alter (A, B, C) sowie 51 Wochen alter (D, E, F) Wistar-Kontrollen (schwarz) sowie mit Streptozotocin (STZ) behandelter Wistar-Ratten (rot). Die Behandlung mit STZ führte zu einem statistisch signifikanten Anstieg der Blutglukose im Plasma um das 4- bis 5-fache im Vergleich zu den entsprechenden Kontrollen. Während die Insulinkonzentration im Plasma der mit STZ behandelten Tiere sehr stark erniedrigt war (signifikant), wurde die Melatoninkonzentration im Plasma statistisch signifikant erhöht. Die Daten repräsentieren Mittelwerte  $\pm$  SEM. Die schwarzen Balken unter den Abszissen markieren die Dunkelzeit. Verändert nach PESCHKE et al. 2008 (Fig. 2 und 3). Mit freundlicher Genehmigung von John Wiley & Sons.

zum Zeitpunkt der Manifestation des Typ-1-Diabetes beobachtet (Abb. 3). Interessanterweise wurde bei den IDDM-Ratten eine Normalisierung aller Werte einschließlich der Melatoninspiegel schon bald nach Insulinpellet-Implantation festgestellt (Abb. 3). Erwähnenswert ist ferner die Tatsache, dass die schweren metabolischen Entgleisungen zu keinen Veränderungen diurnaler Rhythmicitäten führten.

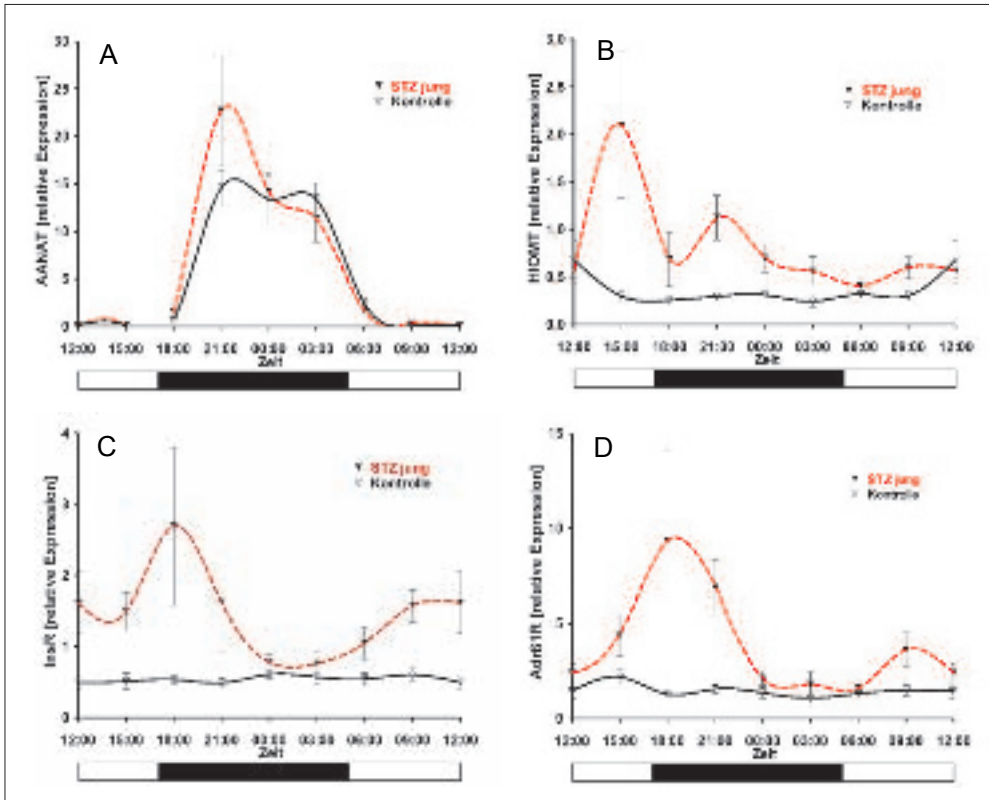


Abb. 2 Tagesprofile der relativen Expression pinealer Arylalkyl-N-acetyltransferase (AANAT; A), Hydroxyindol-O-methyltransferase (HIOMT; B), Insulinrezeptor (InsR; C) sowie  $\beta$ 1-Adrenozeptor (Adr $\beta$ 1R; D) 12 Wochen alter Kontrollen (schwarz) sowie mit Streptozotocin (STZ) behandelter Ratten (rot). STZ-Intoxikation verursachte einen starken Anstieg der relativen Expression genannter Gene im Vergleich zu den entsprechenden Kontrollen. Trotz schwerer metabolischer Entgleisungen blieben die Tagesprofile überwiegend erhalten. Die Daten repräsentieren Mittelwerte  $\pm$  SEM. Die schwarzen Balken unter den Abszissen markieren die Dunkelzeit. Verändert nach PESCHKE et al. 2008 (Fig. 3,4 und 6). Mit freundlicher Genehmigung von John Wiley & Sons.

#### 4. Diskussion

Im Gegensatz zu Typ-2-diabetischen GK-Ratten und Patienten zeigen Typ-1-diabetische STZ- und IDDM-Ratten bei stark verringertem oder fehlendem Insulin erhöhte Plasma-Melatoninspiegel. Die Ergebnisse sind mithin entgegengesetzt zu denen der Typ-2-diabetischen Individuen. Weiterhin wurden die erhöhten Melatoninspiegel durch Insulinsubstitution mittels Implantaten normalisiert. Parallel durchgeführte *In-vitro*-Untersuchungen zeigen, dass mit In-



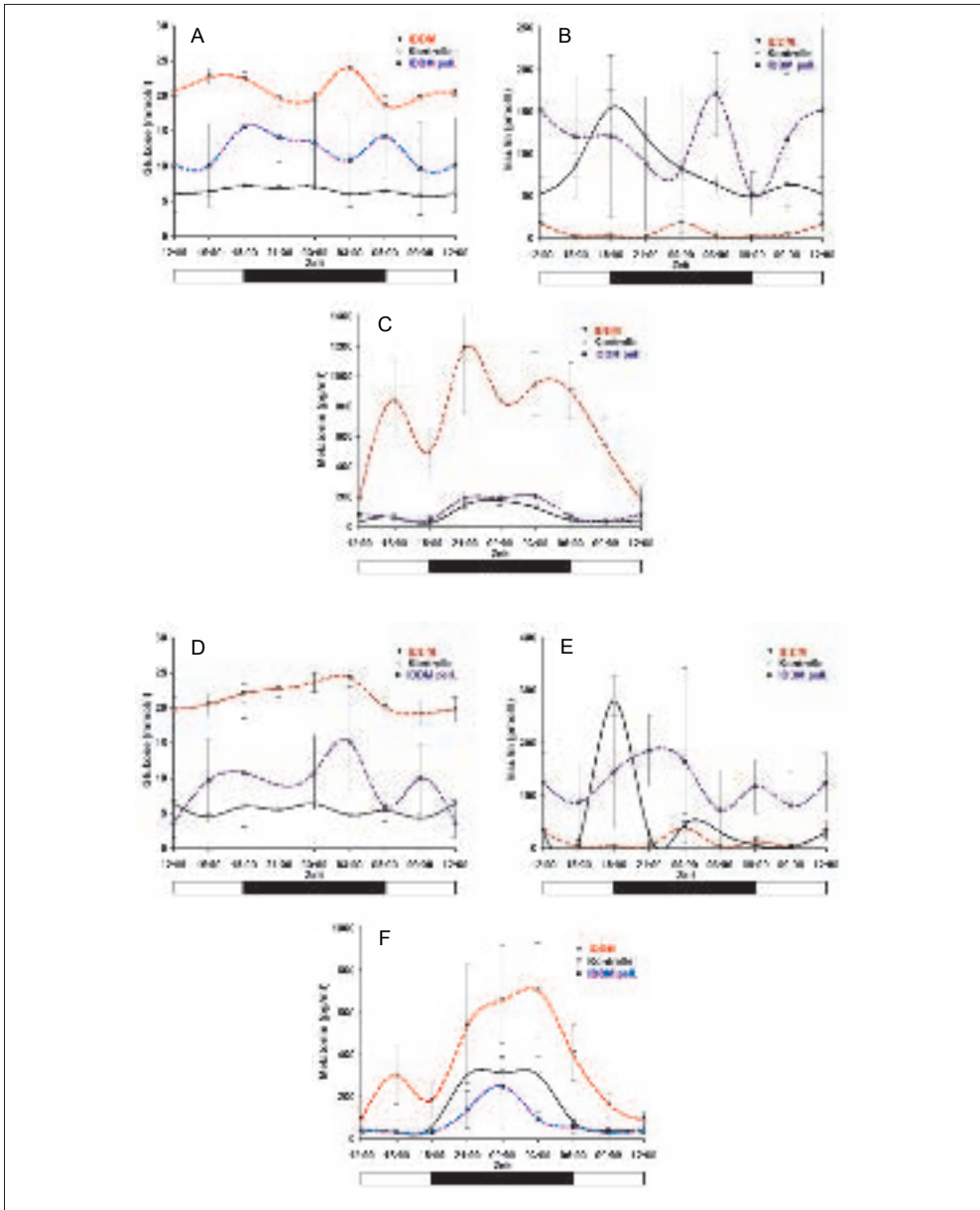


Abb. 3 Tagesprofile von Glukose (A, D), Insulin (B, E) und Melatonin (C, F) im Blutplasma männlicher (A, B, C) und weiblicher (D, E, F) Typ-1-diabetischer LEW.1AR1-*iddm*-Ratten (kurz: IDDM, rot), Insulin-substituierter LEW.1AR1-*iddm*-Ratten (kurz: IDDM pell., blau) sowie LEW.1AR1-Kontrollen (kurz: Kontrolle, schwarz). Die Blutglukosekonzentration der Typ-1-diabetischen IDDM-Ratten war im Vergleich zu den entsprechenden Kontrollen statistisch signifikant erhöht, während der Insulingehalt im Plasma erniedrigt und die Melatoninkonzentration erhöht waren. Durch die Insulinsubstitution wurden alle diabetesbedingten Veränderungen normalisiert, was ebenfalls für die Melatoninkonzentration im Blutplasma zutrif. Die Daten repräsentieren Mittelwerte  $\pm$  SEM. Die schwarzen Balken unter den Abszissen markieren die Dunkelzeit. Verändert nach PESCHKE et al. 2011 (Fig. 1). Mit freundlicher Genehmigung des Springer Verlages.

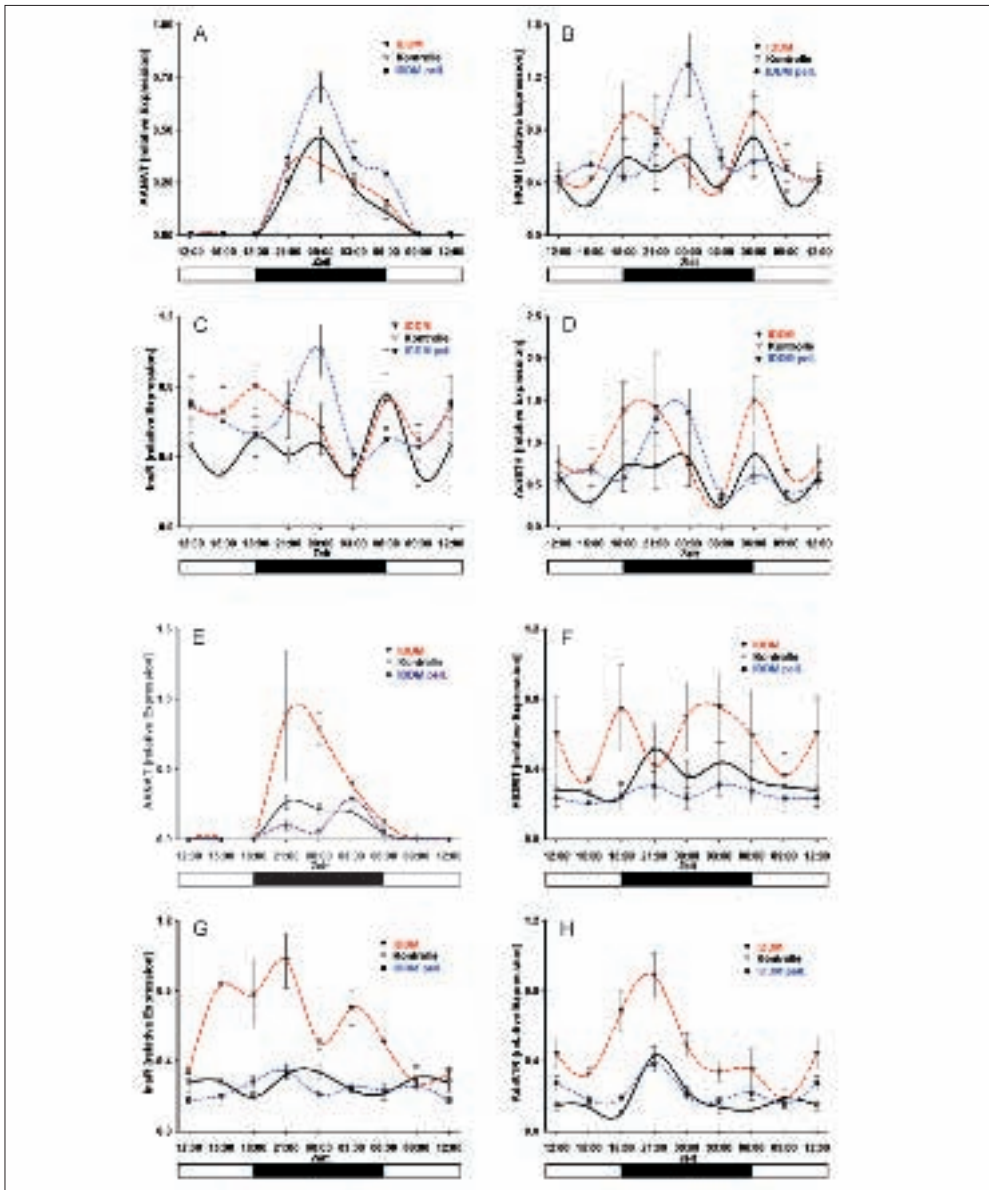


Abb. 4 Tagesprofile der relativen Expression pinealer Arylalkyl-N-acetyltransferase (AANAT; A, E), Hydroxy-indol-O-methyltransferase (HIOMT; B, F), Insulinrezeptor (InsR; C, G) sowie  $\beta$ 1-Adrenozeptor ( $\text{Adr}\beta$ 1R; D, H) männlicher (A, B, C, D) und weiblicher (E, F, G, H) Typ-1-diabetischer LEW.1AR1-*idm*-Ratten (kurz: IDDM, rot), Insulin-substituierter LEW.1AR1-*idm*-Ratten (kurz: IDDM pell., blau) sowie LEW.1AR1-Kontrollen (kurz: Kontrolle, schwarz). Die Daten zeigen statistisch signifikante Erhöhungen der relativen Expression der untersuchten Gene bei weiblichen Typ-1-diabetischen IDDM-Ratten im Vergleich zu den entsprechenden Kontrollen. Insulinsubstitution führte zu einer Normalisierung der Genexpressionen. Im Gegensatz zeigten die Epiphysen der männlichen Tiere keine entsprechenden Veränderungen der Genexpressionen der untersuchten Merkmale. Die Daten repräsentieren Mittelwerte  $\pm$  SEM. Die schwarzen Balken unter den Abszissen markieren die Dunkelzeit. Verändert nach PESCHKE et al. 2011 (Fig. 2 und 3). Mit freundlicher Genehmigung des Springer Verlages.

sulin perfundierte Epiphysen erniedrigte Melatoninsynthese und -sekretion aufwiesen und pankreatische Inseln sowie Ratten-Insulinomazellen, die mit Melatonin perfundiert wurden, erniedrigte Insulinspiegel entwickelten. Schließlich wurde die Expression von pinealem InsR sowie AANAT bei Typ-1-diabetischen Ratten hochreguliert (Abb. 2 und 4).

Unsere Untersuchungen belegen, dass pankreatische  $\beta$ -Zellen mit ihren Melatoninrezeptoren und Pinealozyten mit ihren Insulinrezeptoren sich antagonisieren, also negativ koinzidieren. Dieser funktionelle Gegensatz zwischen Melatonin und Insulin könnte für die Diabetogenese wichtig sein.

### *Literatur*

- PESCHKE, E., HOFMANN, K., BÄHR, I., STRECK, S., ALBRECHT, E., WEDEKIND, D., and MÜHLBAUER, E.: The insulin-melatonin antagonism: studies in the LEW.1AR1-iddm rat (an animal model of human type 1 diabetes mellitus). *Diabetologia* 54, 1831–1840 (2011)
- PESCHKE, E., WOLGAST, S., BAZWINSKY, I., PONICKE, K. and MÜHLBAUER, E.: Increased melatonin synthesis in pineal glands of rats in streptozotocin induced type 1 diabetes. *J. Pineal Res.* 45, 439–448 (2008)

Kathleen HOFMANN  
Institut für Anatomie und Zellbiologie  
Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg  
Große Steinstraße 52  
06097 Halle (Saale)  
Bundesrepublik Deutschland  
Tel.: +49 345 5571813  
Fax: +49 345 5571700  
E-Mail: kathleen.hofmann@medizin.uni-halle.de

# Mögliche Wege der Kommunikation und Synchronisation zwischen Neuronen und Astrozyten im Nucleus suprachiasmaticus von *Phodopus sungorus*

Esther LIPOKATIC-TAKACS und Stephan STEINLECHNER (Hannover)

Mit 3 Abbildungen

## 1. Einleitung

Jedes Neuron im Suprachiasmatischen Nucleus (SCN) stellt einen eigenen autonomen Schrittmacher dar. Daher ist eine Kommunikation zwischen den Neuronen des SCN essentiell für eine einwandfreie Funktion der inneren Uhr. Da bekannt ist, dass Gliazellen eine aktive Rolle bei vielen Gehirnfunktionen spielen, wurde in dieser Studie untersucht, wie Neurone und Astrozyten des SCN kommunizieren und inwieweit die Astrozyten bei der Synchronisation der Neurone eine Rolle spielen.

## 2. Methoden

Es wurden die SCN von postnatalen (P21–P28) Dsugarischen Zwerghamstern (*Phodopus sungorus*) entnommen, das Gewebe für die Zellkultur aufgearbeitet und die Zellen auf Fibronectin beschichteten Deckgläschen kultiviert. Anschließend wurden immunzytochemische Nachweise für GFAP, NeuN, Per1, Connexin43, mGluR5 und IP3R3 durchgeführt und sowohl Einzel- als auch Doppelfärbungen sowie Calcium-Imaging nach Stimulation der Zellen mit Glutamat und zusätzlichem Blockieren des mGluR5 vorgenommen.

## 3. Ergebnisse

Die immunzytochemischen Darstellungen der Neurone zeigten positive Ergebnisse für die Per1-, NeuN-, IP3R3-, mGluR5- und Connexin43-Färbung. In den Astrozyten konnte eine positive Reaktion für GFAP, Per1, IP3R3, mGluR5 und Connexin43 nachgewiesen werden (Abb. 1). Beim Calcium-Imaging konnte nach Stimulation der Zellen mit Glutamat ein Anstieg der intrazellulären Calcium-Konzentration verzeichnet werden. Dieser Anstieg wurde durch die Zugabe des mGluR5-Blockers MPEP inhibiert (Abb. 2).

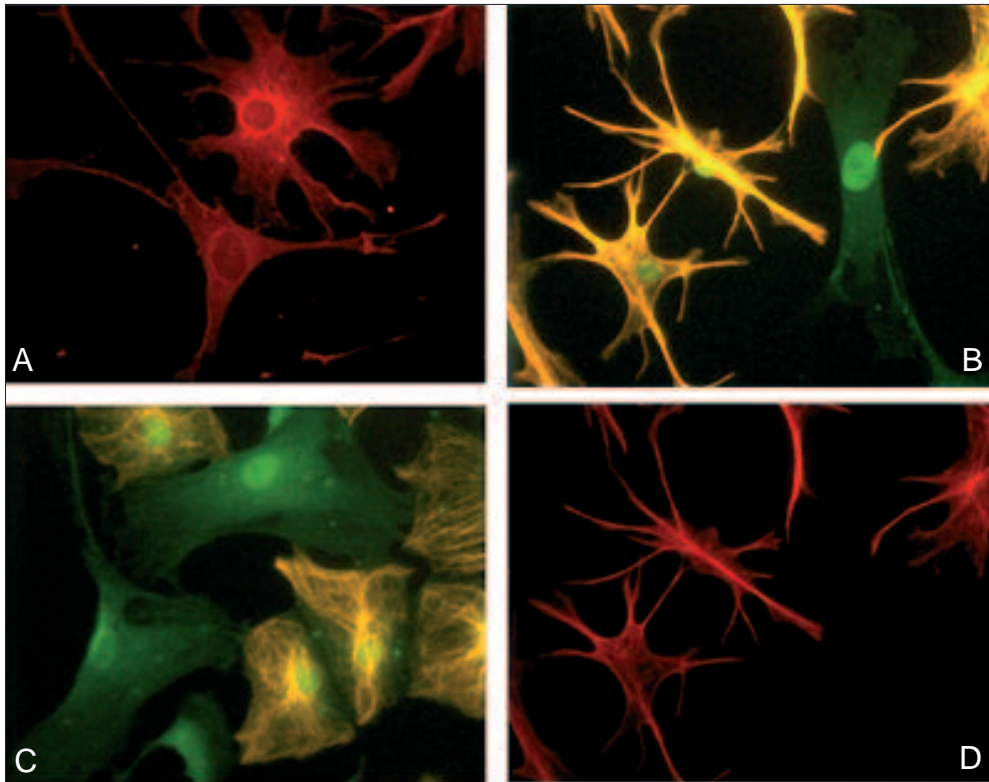


Abb. 1 Immunhistochemische Färbungen von Astrozyten und Neuronen. (A) Cx43-positive Neurone und Astrocyten, (B) Doppelfärbung, GFAP- und mGluR5-positive Astrocyten (gelb), mGluR5 positive Neurone (grün), (C) Doppelfärbung, GFAP- und IP3R3-positive Astrocyten (gelb), IP3R3-positive Neurone (grün), (D) GFAP-positive Astrozyten

#### 4. Diskussion

Im Hinblick auf vorangegangene Studien und die vorliegenden Ergebnisse favorisieren wir folgende Kommunikationsmechanismen zwischen Neuronen und Astrozyten im SCN: Möglicherweise führt die Freisetzung von Glutamat zu einem Anstieg der Calciumkonzentration in Neuronen und Astrozyten durch Aktivierung des metabotropen Glutamat-Rezeptors5, welcher nach Stimulation die Ausschüttung von Inositoltriphosphat (IP3) bewirkt, welches wiederum an den IP3-Rezeptor3 (IP3R3) am Endoplasmatischen Retikulum (ER) bindet und dort zur Calciumfreisetzung aus dem ER führt. Diese Erhöhung des intrazellulären Calciumspiegels führt über die Calmodulin-Kinase und Phosphorylierung von CREB zur Transkription der Uhr-gene im Zellkern. Des Weiteren führt der erhöhte Calciumspiegel zur Freisetzung von Glu-

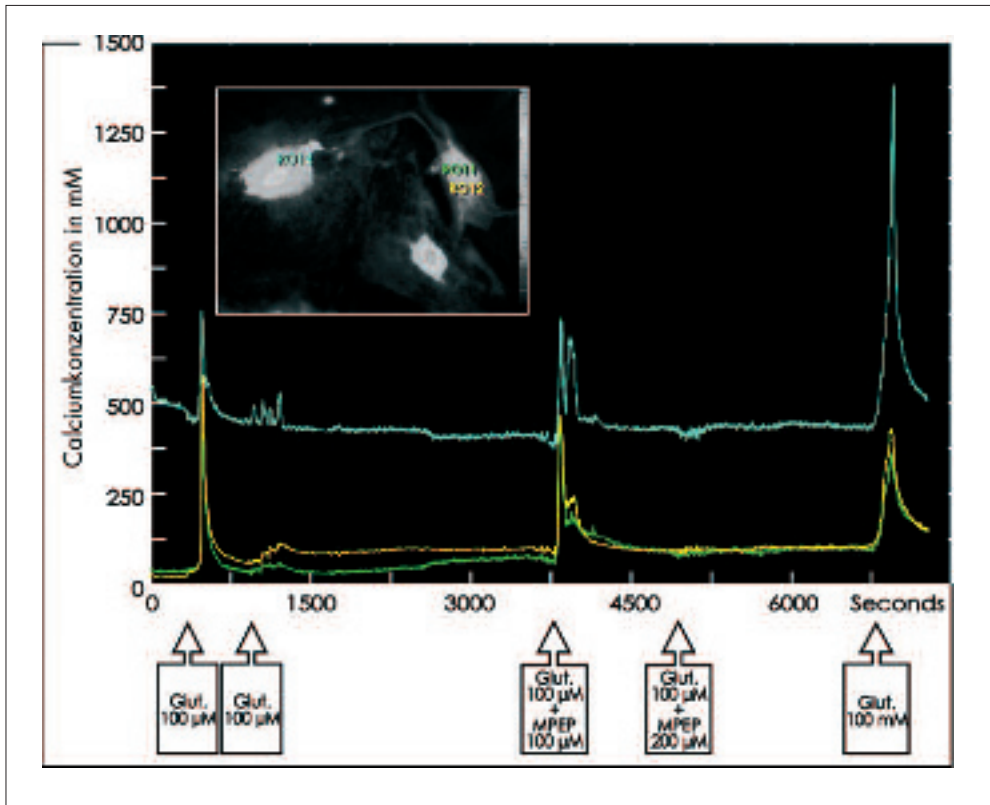


Abb. 2 Calcium-Imaging. Veränderung der intrazellulären Calciumkonzentration in Astrozyten (türkis) und Neuronen (gelb, grün) nach Stimulation mit unterschiedlichen Glutamatkonzentrationen und Blockierung des mGluR5-Rezeptors mittels unterschiedlicher MPEP-Konzentrationen

tamat. Zusätzlich sind Astrozyten und Neurone über *Gap-junctions* miteinander verbunden und können über IP<sub>3</sub>, welches diese Kanäle passiert, miteinander kommunizieren, indem das IP<sub>3</sub> in der Nachbarzelle zu einem Anstieg der Calciumkonzentration führt (Abb. 3). Auf diesem Weg können Neurone und Astrozyten mittels Calciumwellen kommunizieren und die Transkription ihrer Uhrengene synchronisieren. Diese Hypothese wird durch die ersten Ergebnisse des Calcium-Imagings unterstützt.

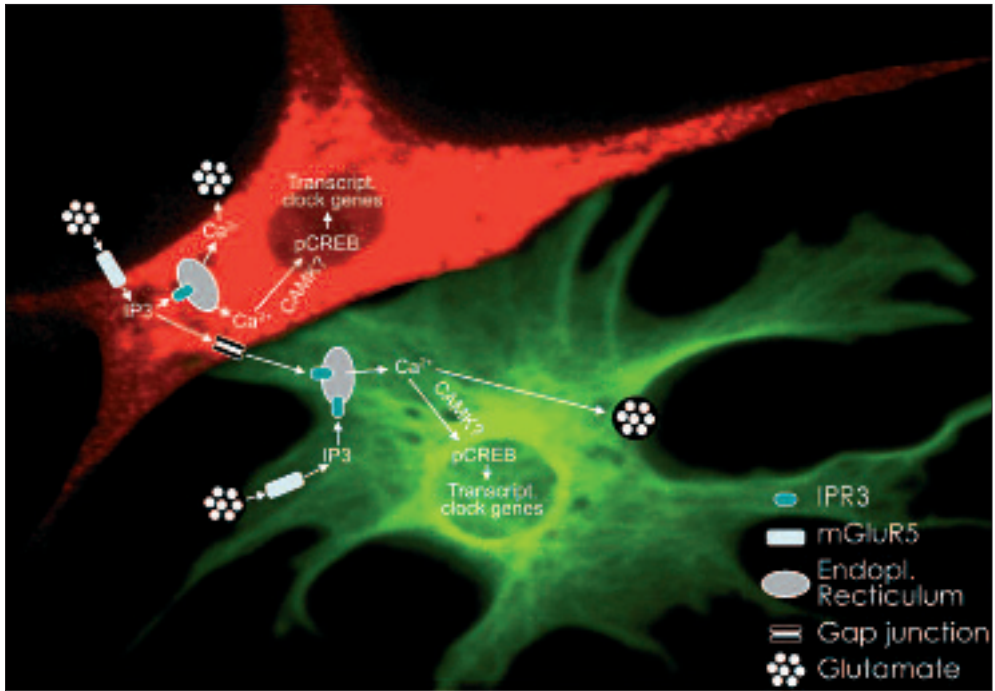


Abb. 3 Möglicher Kommunikationsmechanismus zwischen Astrozyten und Neuronen. Die Kommunikation zwischen Astrozyten (grün) und Neuronen (rot) kann zum einen mittels Glutamat erfolgen, welches bei einer Erhöhung des intrazellulären Calciumspiegels freigesetzt wird. Des Weiteren können die Zellen über *Gap-junctions*, die eine direkte Verbindung zwischen den Zellen bilden, *via* IP3 miteinander kommunizieren. In beiden Zellen führt eine Erhöhung der Calciumkonzentration über einen bisher noch nicht vollständig geklärten Weg zur Transkription der Uhrgene im Zellkern.

Dr. Ester LIPOKATIC-TAKACS  
Institut für Zoologie der Stiftung  
Tierärztliche Hochschule Hannover  
Bünteweg 17  
30559 Hannover  
Bundesrepublik Deutschland  
Tel.: +49 511 9538458  
Fax: +49 511 9538586  
E-Mail: esther.lipokatic-takacs@tiho-hannover.de

## **Expression circadianer Rhythmikgene in dermalen Fibroblasten von Patienten mit idiopathischer Hypersomnie und gesunden Kontrollprobanden**

Julian Peter LIPPERT, Hartmut HALFTER, Nani OSADA und Peter YOUNG  
(Münster)

Mit 2 Abbildungen

### **1. Einleitung**

Zyklische Verläufe spielen bei physiologischen Funktionen von Bakterien bis hin zu höheren Säugetieren eine entscheidende Rolle. Der circadiane Rhythmus umfasst eine Zeitspanne von circa 24 h. Viele physiologische Aspekte zeigen eine circadiane Regulation: Schlaf-Wach-Zyklen, geistige Leistungsfähigkeit, Nieren- und Herzfunktion etc. Die molekulare Grundlage dieser Zyklen wird durch die periodische Auf- und Abregulation der Expression bestimmter Gene gebildet. Insgesamt wird vermutlich die Expression von ca. 10 % aller Gene circadian geregelt. Den Kern der periodischen Oszillation der Genexpressionslevel bildet ein komplexes Netz verschiedener molekularer Mechanismen, bei denen unterschiedliche Gene in einer exakt abgestimmten Abfolge auf- und abreguliert werden. Bei Säugetieren liegt der zentrale Schrittmacher der circadianen Rhythmik im Nucleus suprachiasmaticus. Dieser erhält tageslichtabhängig Informationen über den retinohypothalamischen Trakt und gibt diese an die Peripherie, z. B. durch Hormone oder sympathische Innervation, weiter. Diese Zell- und Gewebeverbände unterliegen auf molekulargenetischer Ebene einem circa 24-h-Rhythmus, welcher nach hierarchischer Organisation vom zentralen Rhythmusgeber, dem Nucleus suprachiasmaticus, synchronisiert wird. Der circadiane Rhythmus ist zellautonom und wird in Säugetierzellen nach jetzigem Kenntnisstand durch ein Netzwerk transkriptioneller Rückkopplungsschleifen gesteuert. Die Genprodukte *Clock* und *Bmal* aktivieren über ein E-Box-Bindungselement die Transkriptionsrate von verschiedenen Zielgenen, während *Cry1-2*, *Rev-Erba*, *Per1-3* die Expression hemmen, u. a. die von *Clock* und *Bmal*. Da die circadianen Abläufe zellautonom sind, können diese molekulargenetischen Regulationen gut in leicht zugänglichen dermalen Fibroblasten nachvollzogen werden. Die hier vorgestellten Ergebnisse der Studie dienen der Etablierung eines Verfahrens zum direkten Vergleich interindividueller Unterschiede in den molekulargenetischen Regelkreisen des circadianen Rhythmus, gemessen in dermalen Fibroblasten. Die Methodik ermöglicht eine Validierung möglicher Aberrationen in der Oszillation circadianer Rhythmikgene bei Patienten mit idiopathischer Hypersomnie im Vergleich zu gesunden Kontrollprobanden.

Ziel der Studie ist die Untersuchung der transkriptionellen Regulation circadianer Rhythmogene in Fibroblasten von Patienten mit idiopathischer Hypersomnie im Vergleich zu gesunden Kontrollen. Bei den gesunden Kontrollprobanden im Alter von 18 bis 65 Jahren wird mittels eines Fragebogens (*Munich Chronotype Questionnaire* – Ludwig-Maximilians-Universität München, Institut für Medizinische Psychologie) deren persönlicher Chronotypus ermit-



telt, der als Grundlage in die Auswertung der Studie mit einfließt. Die an idiopathischer Hypersomnie leidenden Probanden werden aus der Neurologischen Klinik, Sektion Schlafmedizin, des Universitätsklinikums Münsters rekrutiert. Ein MSLT (*Multiple Sleep Latency Test*) bei einer mittleren Einschlafzeit unter 7 min ohne REM-Schlafphasen dient als Einschlusskriterium. Durch polysomnographische Untersuchung wurden zuvor mögliche Komorbiditäten wie RLS (*Restless-Legs-Syndrom*) oder Schlafapnoesyndrom als Ursache einer vermehrten Tagesmüdigkeit ausgeschlossen. Im Fokus der molekulargenetischen Untersuchung dermalen Fibroblastenzelllinien aus den Hautstanzen von gesunden sowie an Hypersomnie leidenden Probanden stehen mögliche Aberrationen der Oszillation circadianer Rhythmusgene in Bezug auf Periodenlänge und Transkriptionsmuster auf mRNA-Ebene. Weitere posttranskriptionelle Modifikationen, wie die Phosphorylierung der Proteine oder ihr Expressionslevel auf Proteinebene, konnten mittels Western-Blot dargestellt werden.

## 2. Material und Methoden

Bei 14 gesunden sowie 12 an Hypersomnie leidenden Probanden wurde eine Hautbiopsie (2 mm) im vorderen Beckenkammbereich durchgeführt. Aus den gewonnenen Hautstanzen wachsen über einen Zeitraum von ca. 4 Wochen die Fibroblasten in ausreichender Anzahl aus dem Biopsat aus. In Kulturschalen werden die Fibroblasten innerhalb von 10 Tagen in einen konfluenten Zustand und anschließend für 24 h in serumfreies Erhaltungsmedium überführt. Der Start des circadianen Rhythmus kann durch verschiedene Substanzen wie Serum oder Dexamethason initiiert werden. Daher wurden nach Ablauf der 24 h die Fibroblasten mit Dexamethason (100 nmol/l) für 1 h behandelt. In den darauf folgenden 72 h wurde zu 13 Zeitpunkten die RNA aus den Fibroblasten mittels TRIZOL-Reagenz isoliert. Nach dem Umschreiben in cDNA erfolgte zur Quantifizierung des Expressionslevels eine quantitative *Real-time-RT-PCR* (qRT-PCR) mit Untersuchung von insgesamt 7 Genen, die bekanntermaßen einer circadianen Rhythmik unterliegen (*Cry1*, *Cry2*, *Clock*, *Per1*, *Per2*, *Bmal*, *Dec2*). Als Expressionsreferenzen diente das Transkript des *Housekeeping*-Gens  $\beta$ -Actin.

## 3. Ergebnisse

Die mRNA-Expressionslevel der circadianen Rhythmusgene ergeben einen sinusartigen oszillierenden Verlauf mit einer annähernden 24,5-stündigen Periodenlänge. Die Oszillationen circadianer Rhythmusgene nach dem Muster von positiven und negativen transkriptionellen Rückkopplungsschleifen sind in den einzelnen humanen Fibroblastenzelllinien stabil und reproduzierbar nachzuvollziehen. Auch auf Proteinebene konnten Konzentrationsschwankungen des circadianen Regelkreislaufs über einen Zeitraum von 3 Tagen gezeigt werden.

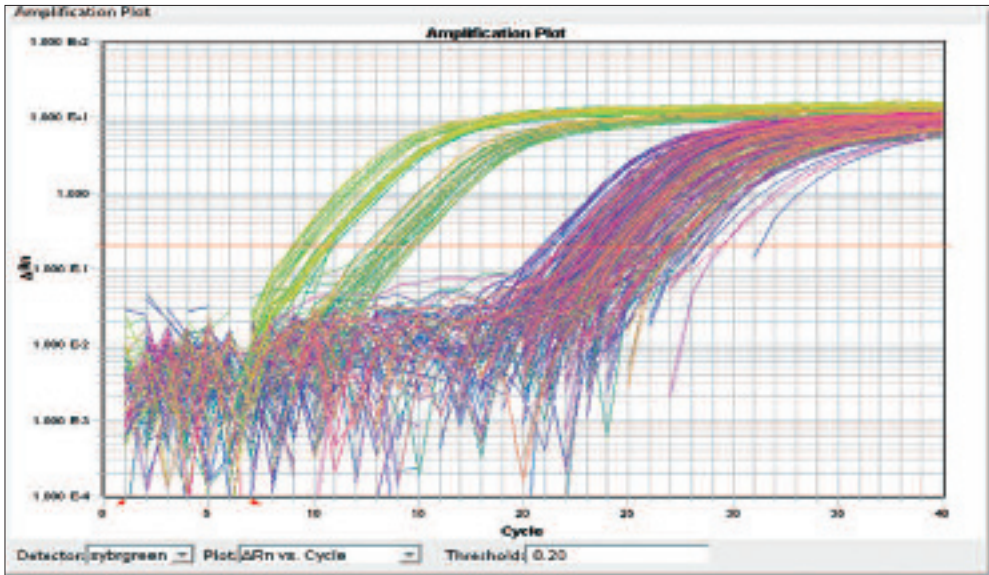


Abb. 1 Real-time-RT-PCR der absoluten Expression circadianer Rhythmikgene sowie nicht-circadian regulierter sogenannter *Housekeeping*-Gene 18 s (erste Bande von links) und  $\beta$ -Aktin (2. Bande von links)

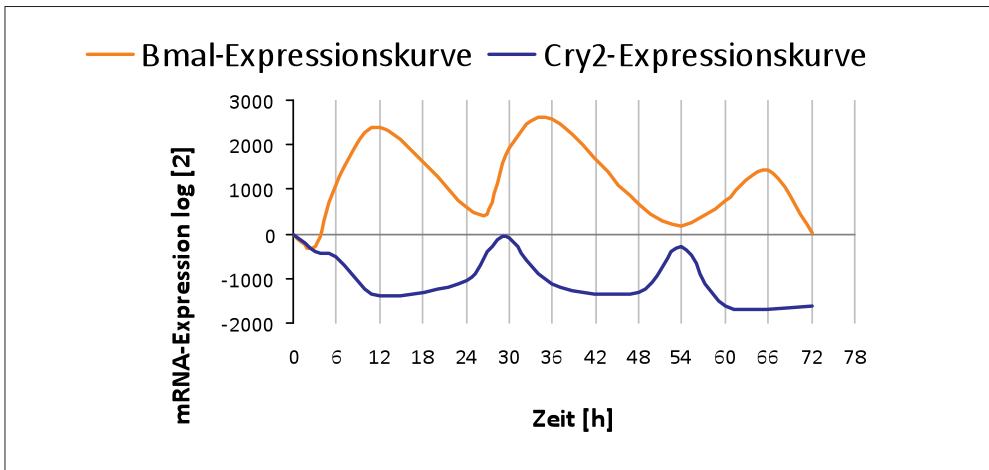


Abb. 2 Graphische Darstellung der Oszillation der mRNA-Expressionslevel circadianer Rhythmusgene am Beispiel von *Bmal* (positive) und *Cry2* (negative Rückkopplungsschleife) über einen Zeitraum von 72 h

#### 4. Diskussion

Der Nachweis einer wechselseitigen Regulation positiver (*Bmal*) und negativer (*Cry2*) transkriptioneller Rückkopplungsschleifen konnte erbracht werden. Sie ermöglicht einen direkten Vergleich interindividueller Unterschiede in der Oszillation der mRNA-Expressionslevel cir-

adianer Rhythmusgene in peripheren Zellverbänden. Da bei dieser Methodik aus dermalen Fibroblasten zunächst die gesamte RNA gewonnen und schließlich cDNA gebildet wird, ermöglicht dieses Vorgehen die Untersuchung einer großen Anzahl transkriptionell aktiver Gene. Nicht nur die Bestimmung der Periodenlänge (z. B. 24-h-Rhythmus), sondern auch der quantitative Nachweis der transkriptionellen Aktivität einzelner Gene wurde so ermöglicht. Somit bietet diese Untersuchungsmethode einen molekularen Ansatz zur Analyse und Beschreibung möglicher Störungen der circadianen Rhythmik sowie molekulargenetischer Regelkreise bei verschiedenen Schlafstörungen. Hierzu zählen Erkrankungen, die mit einer verlängerten (Hypersomnie) oder verkürzten (Insomnie) Schlafphase einhergehen.

Cand. med. Julian Peter LIPPERT  
Klinik und Poliklinik für Neurologie  
Sektion für Schlafmedizin  
(Leitender Arzt: Prof. Dr. Peter YOUNG)  
Albert-Schweitzer-Straße 33  
48149 Münster  
Bundesrepublik Deutschland  
Tel.: +49 251 8348184  
Fax: +49 251 8348181  
E-Mail: julian.lippert@gmx.de

## Der Melatonineinfluss auf die Insulinsekretion pankreatischer $\beta$ -Zellen erfolgt über cAMP-, cGMP- und IP<sub>3</sub>-Signalkaskaden

Eckhard MÜHLBAUER (Leipzig), Ina BÄHR, Andreas BACH und Elmar PESCHKE ML (Halle/Saale)

Mit 3 Abbildungen

### 1. Einleitung

Melatoninrezeptoren gehören zur Gruppe der G-Protein-gekoppelten Membranrezeptoren. Die bisher publizierten Befunde, vor allem gewonnen an Zellsystemen mit überexprimierten Rezeptoren, sprechen dafür, dass der Melatoninrezeptor MT1 an G-Proteine sowohl der Gi- als auch der Gq-Klasse bindet. In ersterem Fall wird eine Signalkaskade aktiviert, die durch Verringerung der Adenylatcyclaseaktivität die intrazelluläre Konzentration des *second messengers* cAMP senkt. Durch alternative Kopplung an Gq-Proteine wird zunächst der *second messenger* IP<sub>3</sub> freigesetzt, der konsekutiv die intrazelluläre Calciumkonzentration erhöht. Der MT2-Rezeptor wird hingegen mit Kopplung an Gi-Proteine, Senkung der intrazellulären Guanylatcyclaseaktivität und konsekutiv einer Erniedrigung der cGMP-Konzentration in Verbindung gebracht. In der vorliegenden Studie wurden die genannten Signalwege am Modell der Ratten-Insulinoma-Zelllinie INS1 untersucht.

### 2. Material und Methoden

INS1-Zellen wurden in einer Perifusionsapparatur nach Forskolinstimulation einer Melatoninkonzentrationen von 100 nM sowie kompetitiven Rezeptorblockern bzw. dem Ca<sup>2+</sup>-mobilisierenden und zellstimulierenden Carbachol ausgesetzt. Die Insulinkonzentrationen der Perifusatfraktionen sowie deren cAMP-Gehalte wurden durch spezifische Radioimmunoassays ermittelt. Forskolin- oder IBMX-stimulierte INS1-Zellen in *Batch*-Kultur wurden durch einen spezifischen *Enzyme-linked-Immunoassay*“ (ELISA, GE-Healthcare Ltd., Little Chalfont, UK) auf cGMP-Konzentrationen untersucht. Ebenfalls in *Batch*-Kultur erfolgte die Messung der IP<sub>3</sub>-Freisetzung nach Melatonininkubation durch einen radiometrischen IP<sub>3</sub>-Assay (GE-Healthcare Ltd.).

### 3. Ergebnisse

Perifusion von INS1-Zellen mit dem Adenylatcyclase-Stimulator Forskolin führte sowohl zu erhöhter cAMP-Akkumulation als auch zu gesteigerter Insulinsekretion. Ko-Stimulation mit 100 nM Melatonin senkte sowohl die cAMP-Konzentration (Abb. 1A) als auch die Insulinsekretion (Abb. 1B). Dieser Effekt konnte durch den nichtselektiven, kompetitiven Melatonin-

rezeptor-Antagonisten Luzindol reduziert oder aufgehoben werden (Abb. 1A). Inkubation von INS1-Zellen mit Melatonin in *Batch*-Kultur führte hingegen zu einer dosisabhängigen Steigerung der IP3-Freisetzung (Abb. 2A), die durch Luzindol hemmbar war (Abb. 2B) und zu erhöhter Insulinsekretion nach PTX-Blockierung des inhibitorischen Gi/cAMP-Systems (Abb. 2C). Es konnte zudem gezeigt werden, dass Melatonin in INS1-Zellen die durch den Phosphodiesterase-

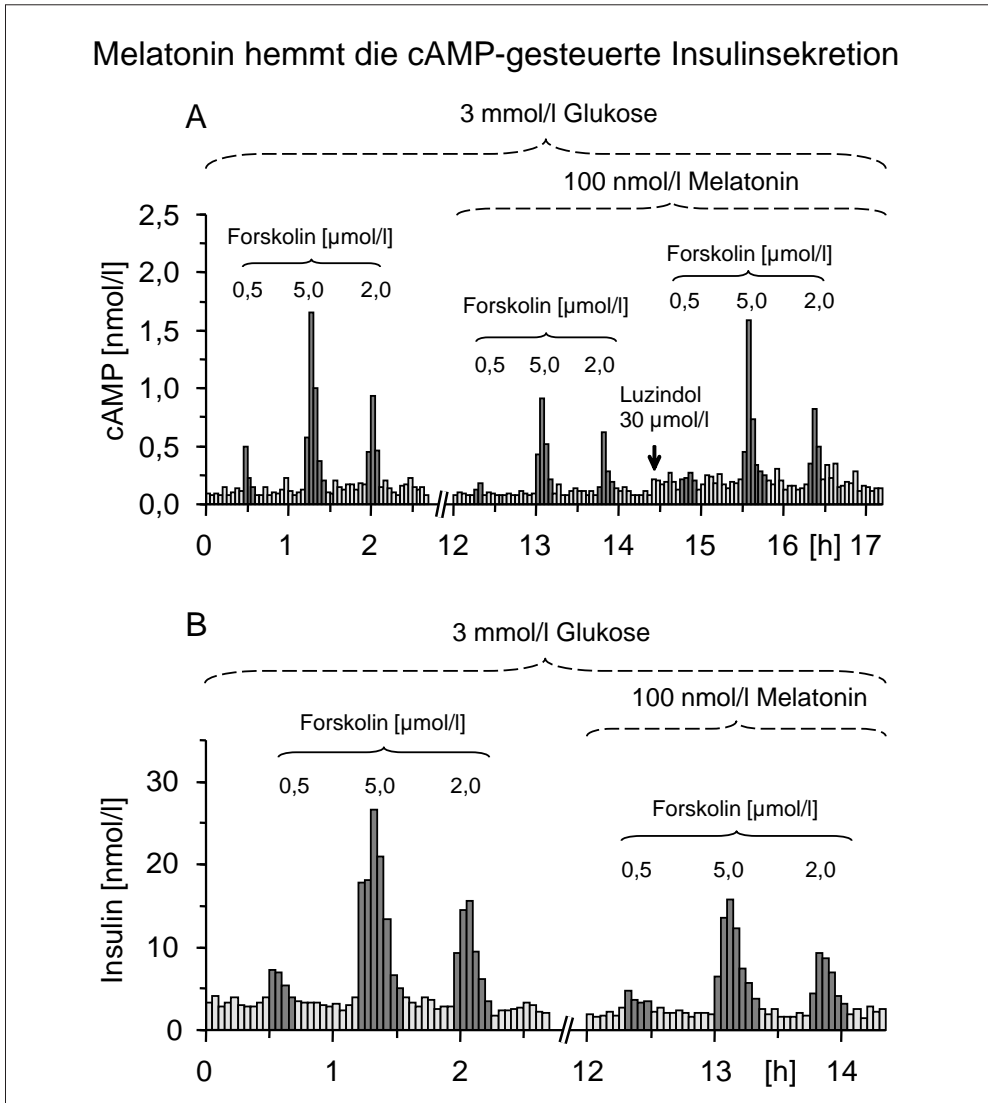


Abb. 1 Perfusionsexperimente an INS1-Ratten-Insulinomazellen: Forskolinstimulation führt zur Erhöhung des cAMP-Spiegels (A, links). Zusatz von 100 nM Melatonin dämpft den Forskolineffekt (A, Mitte). Der kompetitive Melatoninrezeptor-Antagonist Luzindol hebt den Melatonineffekt auf (A, rechts). Forskolinstimulation führt zur Erhöhung der Insulinsekretion (B, links). 100 nM Melatonin senkt den Forskolineffekt (B, rechts). Die Versuche zeigen, dass durch Melatonin ein cAMP-vermittelter, hemmender Einfluss auf die Insulinsekretion der  $\beta$ -Zelle ausgeübt wird. Verändert nach PESCHKE et al. 2002 (Fig. 1 und 2). Mit freundlicher Genehmigung von John Wiley & Sons.

sehemmer IBMX erhöhte Konzentration des *second messengers* cGMP reduziert (Abb. 3A). Das zellpermeable 8-Br-cGMP selbst steigerte dosisabhängig die Insulinsekretion (Abb. 3B). Durch den selektiven, kompetitiven Antagonisten 4P-PDOT des MT2-Rezeptors konnte die Melatonin-induzierte Senkung der stimulierten Insulinsekretion aufgehoben werden (Abb. 3C).

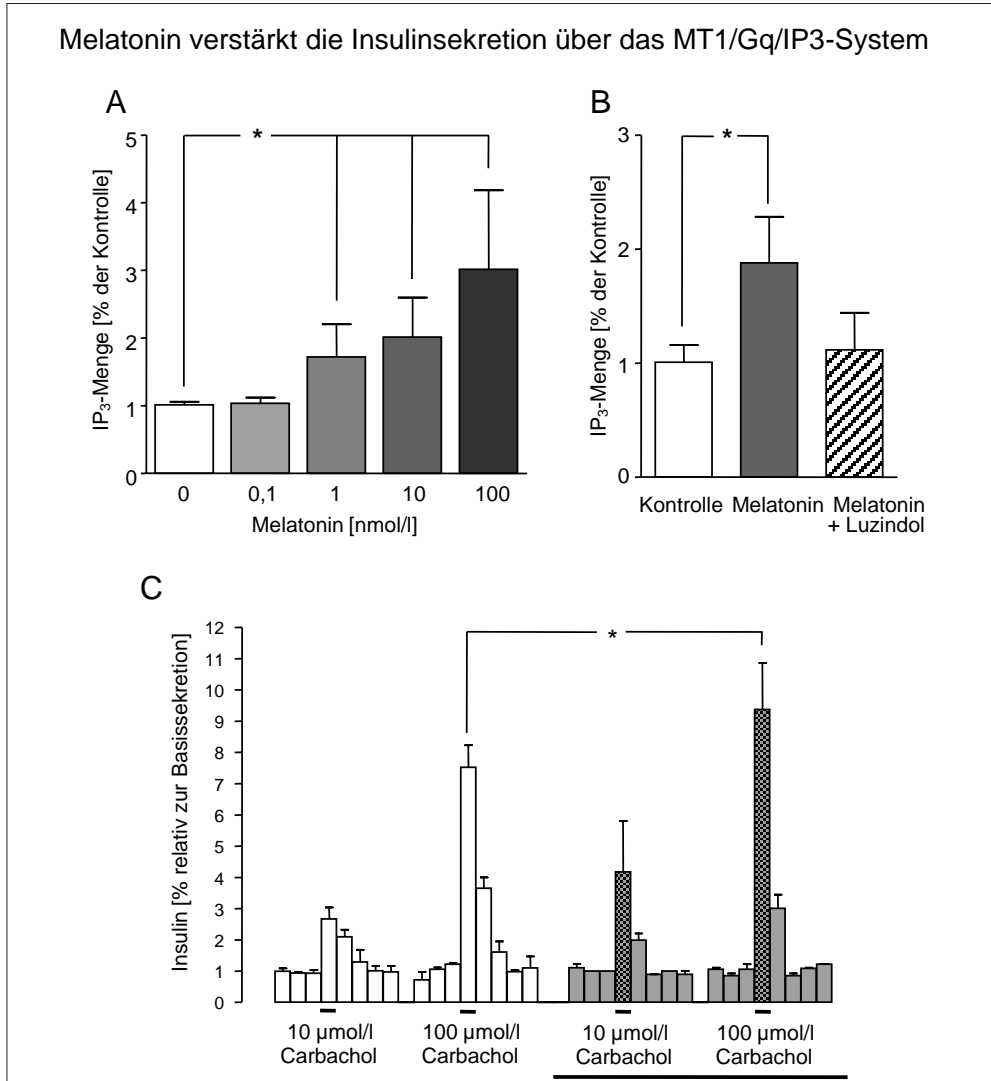


Abb. 2 Inkubation von INS1-Zellen in *Batch*-Kultur mit zunehmenden Mengen von Melatonin führt dosisabhängig zur Freisetzung des *second messengers* IP<sub>3</sub> aus der Zellmembran (A). Der Befund spricht für einen Rezeptor- und Gq-Protein-vermittelten Einfluss. Inkubation von INS1-Zellen in *Batch*-Kultur mit dem nichtselektiven Melatoninrezeptor-Antagonisten Luzindol führt zur Aufhebung des Melatonineffekts (B). In Perifusionsversuchen mit Carbachol-stimulierten INS1-Zellen verstärkt Melatonin die Insulinsekretion nach Pertussistoxin (PTX)-Blockierung des inhibitorischen Gi-Einflusses (C). Das Ergebnis spricht für einen MT<sub>1</sub>-Rezeptor vermittelten Melatonineinfluss auch auf das Gq/IP<sub>3</sub>/Ca<sup>2+</sup>-System. \* P < 0,05. Verändert nach BACH et al. 2005 (Fig. 2 und 4) und PESCHKE et al. 2006 (Fig. 8). Mit freundlicher Genehmigung von John Wiley & Sons.

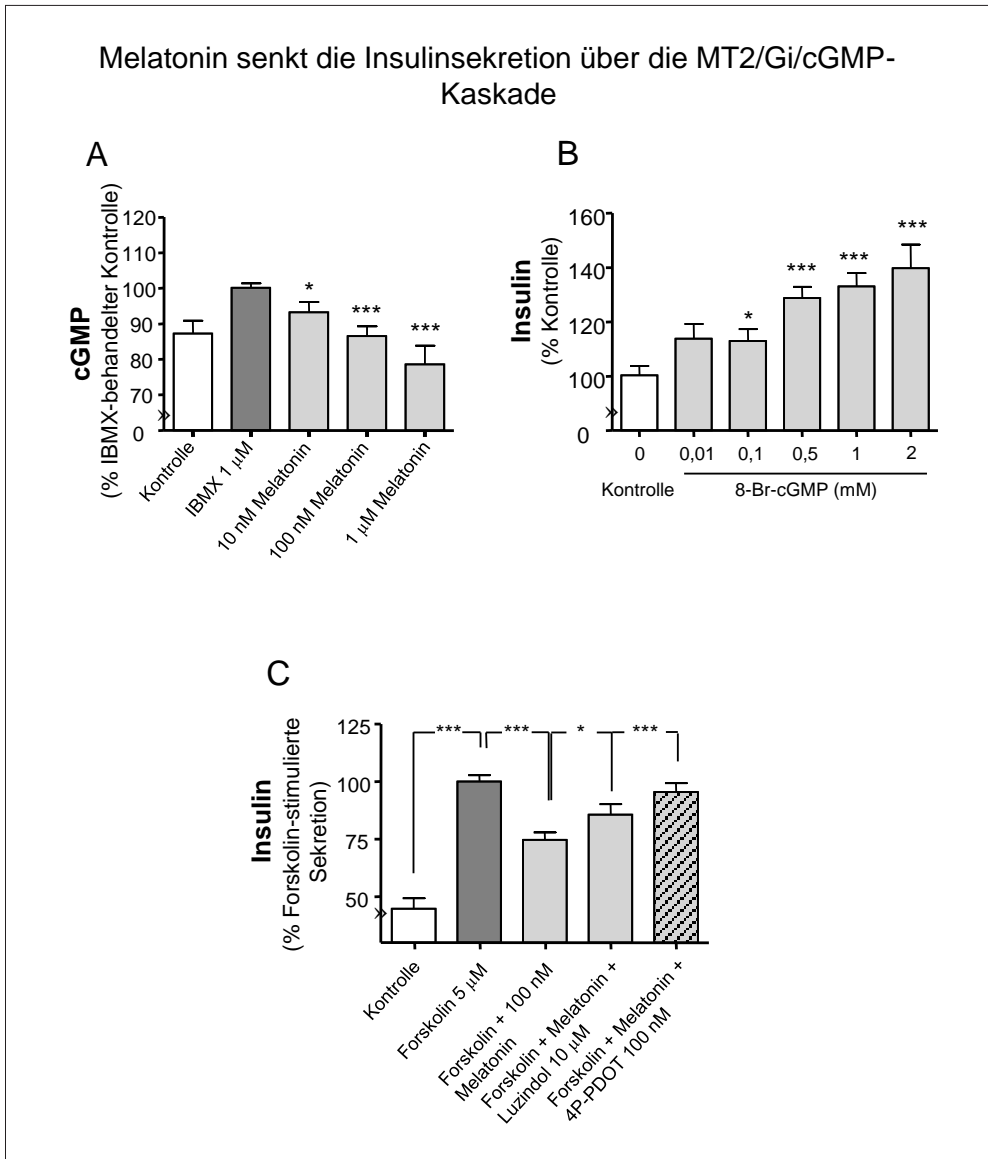


Abb. 3 Inhibitorische Melatoninwirkung auf die Insulinsekretion von INS1-Zellen in *Batch*-Kultur wird auch durch die MT2/Gi/cGMP-Signalkaskade vermittelt. Melatonin führt dosisabhängig zur Verminderung der IBMX-induzierten cGMP-Konzentration (A). Das zellpermeable cGMP-Analogon 8-Br-cGMP steigert dosisabhängig die Insulinsekretion von INS1-Zellen (B). Die forskolinstimulierte Insulinsekretion der INS1-Zellen in *Batch*-Kultur wird durch Melatonin gehemmt. Die Inhibition kann durch den nichtselektiven Rezeptorantagonisten Luzindol oder den MT2-selektiven Antagonisten 4P-PDOT aufgehoben werden, was dafür spricht, dass die Effekte über MT2-Rezeptoren mediiert werden (C). \*  $P < 0,05$ ; \*\*\*  $P < 0,001$ . Verändert nach STUMPF et al. 2008 (Fig. 1, 3 und 4). Mit freundlicher Genehmigung von John Wiley & Sons.

#### **4. Diskussion**

Aus den oben aufgeführten Befunden lässt sich ableiten, dass (a) der Melatonin-vermittelte inhibitorische Effekt auf die stimulierte cAMP-Konzentration bzw. Insulinsekretion in der pankreatischen  $\beta$ -Zelle rezeptorvermittelt ist. Die Resultate sprechen für eine Kopplung des MT1-Rezeptors an inhibitorische Gi-Proteine. Der Befund, dass Melatonin IP3 freisetzen und stimulatorisch die Insulinsekretion beeinflussen kann, spricht außerdem dafür, dass (b) eine Kopplung an Gq-Proteine möglich ist, ohne dass die physiologische Situation für diesen Signalweg bekannt ist. Die Befunde, dass Melatonin (c) auch über MT2-Rezeptoren durch eine Hemmung von cGMP die Insulinsekretion hemmen kann, sprechen für die Vielseitigkeit dieses Hormons. Gegenwärtig wird die funktionelle Bedeutung des MT2-Rezeptors im Zusammenhang mit der Genese des Typ-2-Diabetes intensiv untersucht.

#### *Literatur*

- BACH, A. G., WOLGAST, S., MÜHLBAUER, E., and PESCHKE, E.: Melatonin stimulates inositol-1,4,5-trisphosphate and  $\text{Ca}^{2+}$  release from INS1 insulinoma cells. *J. Pineal Res.* 39, 316–323 (2005)
- PESCHKE, E., Bach, A. G., and MÜHLBAUER, E.: Parallel signaling pathways of melatonin in the pancreatic beta-cells. *J. Pineal Res.* 40, 184–191 (2006)
- PESCHKE, E., MÜHLBAUER, E., MUSSHOF, U., CSERNUS, V. J., CHANKIEWITZ, E., and PESCHKE, D.: Receptor (MT(1)) mediated influence of melatonin on cAMP concentration and insulin secretion of rat insulinoma cells INS-1. *J. Pineal Res.* 33, 63–71 (2002)
- STUMPF, I., MÜHLBAUER, E., and PESCHKE, E.: Involvement of the cGMP pathway in mediating the insulin-inhibitory effect of melatonin in pancreatic beta-cells. *J. Pineal Res.* 45, 318–327 (2008)

Dr. Eckhard MÜHLBAUER  
Sächsische Akademie der Wissenschaften zu Leipzig  
Karl-Tauchnitz-Straße 1  
04107 Leipzig  
Bundesrepublik Deutschland  
Tel.: +49 345 5571711  
Fax: +49 345 5574053  
E-Mail: eckhard.muehlbauer@medizin.uni-halle.de



# **Präkonditionierung und Organprotektion durch Anästhetika**

Leopoldina-Symposium

am 14. November 2008 in Frankfurt am Main

Nova Acta Leopoldina N. F. Bd. 108, Nr. 375

Herausgegeben von Bernhard ZWISSLER (München) und Jens SCHOLZ (Kiel)

(2010, 100 Seiten, 19 Abbildungen, 2 Tabellen, 21,00 Euro, ISBN: 978-3-8047-2794-6)

Patienten, die sich operativen Eingriffen unterziehen müssen, sind entsprechend der demographischen Entwicklung in den Industrieländern zum Zeitpunkt des Eingriffs zunehmend älter und weisen ein immer umfangreicheres Spektrum von Begleiterkrankungen auf. Dem Schutz der Organfunktion und insbesondere der Prävention ischämischer Ereignisse kommt somit im perioperativen Verlauf eine herausragende Bedeutung zu. Daher hat das Verfahren der ischämischen Präkonditionierung in den letzten Jahren sehr großes Interesse hervorgerufen. Unter Präkonditionierung versteht man, dass eine kurz dauernde Ischämie in Zellen Anpassungsprozesse in Gang setzt, die diese Zellen gegen eine nachfolgende, länger dauernde Ischämie widerstandsfähiger machen. Die Beiträge des Bandes zeigen, dass es möglich ist, beispielsweise durch Verabreichung spezifischer Pharmaka, u. a. der sogenannten volatilen Anästhetika, protektive Effekte auf Zell- und Organebene zu erzielen. Mit Blick auf klinische Relevanz und Erarbeitung neuer Therapiestrategien zur Gewebeprotektion ist vor allem die arzneimittelinduzierte Präkonditionierung im Fokus der pharmakologischen Forschung. Molekulare Grundlagen und Anwendungsgebiete des Verfahrens werden diskutiert.

*Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft Stuttgart*

## Untersuchungen zur Expression von Uhrengenen im Pankreas der Ratte

Eckhard MÜHLBAUER (Leipzig), Dorothee PESCHKE und Elmar PESCHKE ML (Halle/Saale)

Mit 2 Abbildungen

### 1. Einleitung

Nahezu alle höheren Lebewesen haben im Verlauf der Evolution Mechanismen entwickelt, um endogene tageszeitliche Abläufe steuern zu können. Von zentraler Bedeutung ist dabei die Ausprägung einer „biologischen Uhr“, die Rhythmusgeneratorfunktion hat. Beim Säuger befindet sich dieser zentrale circadiane Oszillator im paarig angelegten hypothalamischen *Nucleus suprachiasmaticus* (SCN). Da diese biologische Uhr nur *circa-diane*, keine exakt 24-stündigen, Abläufe vorgibt, müssen die Rhythmen synchronisiert werden. Diese Synchronisation erfolgt für den SCN hauptsächlich durch das Tageslicht. Neben der Zentraluhr wurden Uhren 2. Ordnung in Organen wie Leber und Pankreas beschrieben, deren Synchronisation anderen, bislang weitgehend unbekanntem, Zeitgebern unterliegt. Der circadiane Rhythmus selbst wird dabei durch sogenannte Uhrengene mit transkriptionell positiver (*Bmal1*, *Clock*) oder negativer (*Per1*, *Cry1*), also antagonistischer, Funktion generiert, die wiederum die eigene Expression und diejenige von Uhrengen-gesteuerten Genen beeinflussen. Die Funktion und Bedeutung von Uhrengenen im Pankreas und der Langerhansschen Insel waren bisher ungeklärt.

### 2. Material und Methoden

Über eine 24-h-Periode äquidistant verteilt (alle 3 h), wurde 6 Wochen alten Wistar-Ratten in Äthernarkose das Pankreas entnommen und sofort in RNAlater-Konservierungsreagenz (Ambion Inc., Austin, TX, USA) übertragen und asserviert. Die RNA-Extraktion der Gewebe erfolgte mit Trifast™ (peQLab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland). Zur quantitativen mRNA-Erfassung wurde nach der reversen Transkription die cDNA in einem *Real-time*-PCR-Cycler (Corbett Res. Ltd., Mortlake, Australien) durch spezifische Primer unter Standardbedingungen in 40 Zyklen amplifiziert. Als Expressionsreferenzgen diente das Transkript des *Housekeeping*-Gens  $\beta$ -Aktin.

### 3. Ergebnisse

Die quantitative Erfassung der Uhrengentranskripte von *Per1* und *Bmal1* im 24-h-Verlauf zeigte ein charakteristisches antiphasisches Profil mit einem Expressionsmaximum für *Per1* zum Zeitpunkt 17:00 Uhr (Abb. 1A, B). Dieser Zeitpunkt markiert für *Bmal1* hingegen das

Expressionsminimum – ein Indiz für einen funktionellen Oszillator im Pankreas. Weiterhin wurden *Per2* sowie *Cry1*, nicht aber *Clock* und *Tim* circadian exprimiert (hier nicht dargestellt). Untersuchungen zur Expression der Uhrengen-gesteuerten Transkriptionsfaktoren *Dbp* und *RevErb $\alpha$*  zeigten für das Transkript ein circadianes Expressionsmuster mit stark ausgeprägter Amplitude, phasengleich mit demjenigen von *Per1* (Abb. 1C).

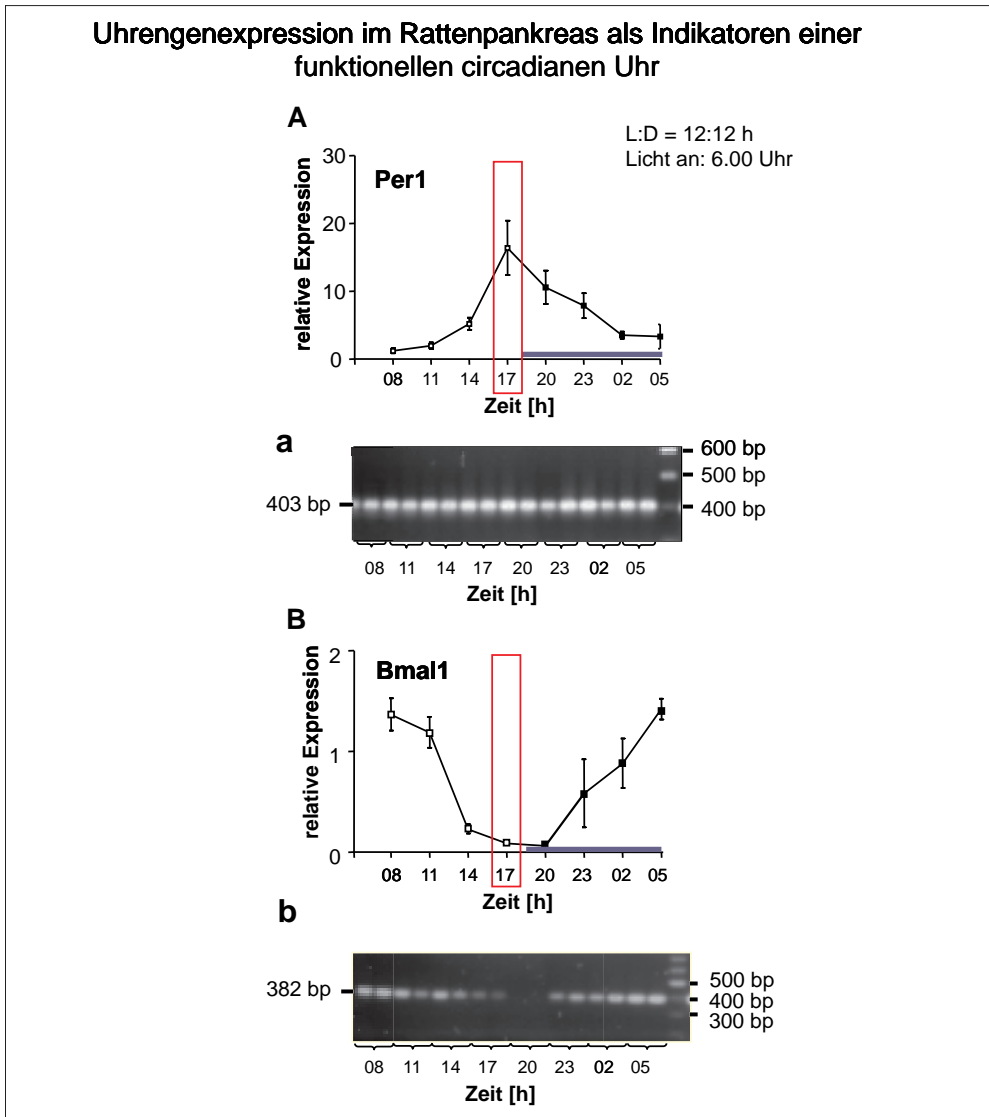


Abb. 1 Die Uhrengene *Per1* und *Bmal1* werden antiphasisch im Rattenpankreas exprimiert (A, B). Der Befund ist Indikator für eine circadiane pankreatische Uhrenfunktion. Dargestellt sind relative mRNA-Messungen über die Tageszeit unter Verwendung der *Real-time*-RT-PCR-Technik. Gel-Bilder belegen spezifische PCR-Produkte von *Per1* (a) bzw. *Bmal1* (b), welche charakteristische Tagesschwankungen aufweisen. Das Expressionsmaximum von *Per1* sowie das Expressionsminimum von *Bmal1* um 17:00 Uhr sind rot markiert. LS, Molekulargewichtsstandard. Die Dunkelzeit ist auf der Abszisse mit einem blauen Balken gekennzeichnet.

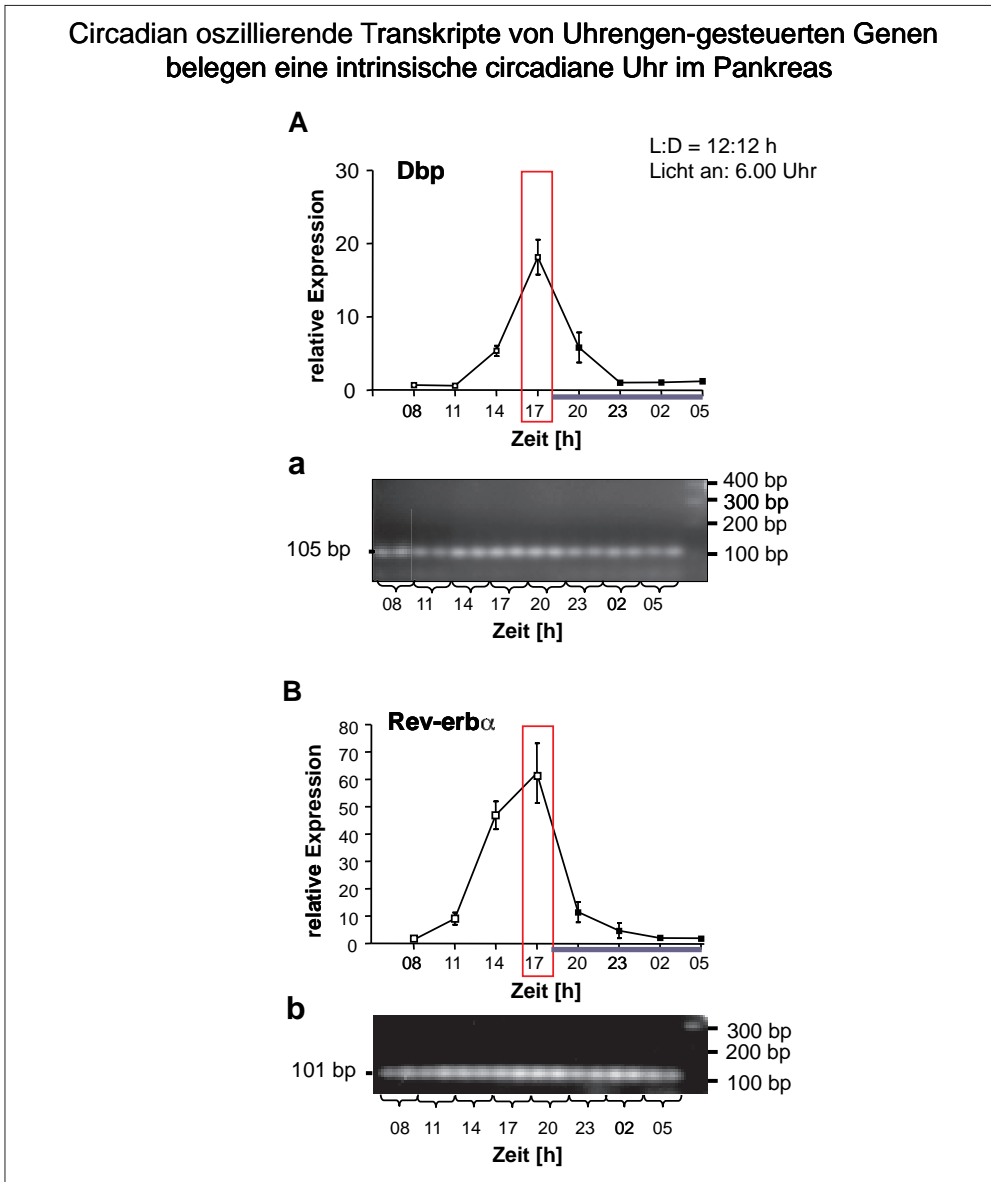


Abb. 2 Die Uhrgenen-gesteuerten (*clock-output*) Gene *Dbp* und *RevErba* werden im Rattenpankreas ebenfalls circadian exprimiert. Dargestellt sind relative *Real-time*-RT-PCR-Messungen der Transkripte von *Dbp* (A) und *RevErba* (B). Das ausgeprägte Circadianprofil der Uhrgenen-gesteuerten Transkriptionsfaktoren *Dbp* und *RevErba* deutet zusätzlich auf eine funktionelle circadiane Uhr im Pankreas hin. Gel-Bilder belegen spezifische PCR-Produkte von *Dbp* (a) bzw. *RevErba* (b), welche Tagesschwankungen demonstrieren. Das Expressionsmaximum beider Gene um 17:00 Uhr ist rot markiert. Die Dunkelzeit ist auf der Abszisse mit einem blauen Balken gekennzeichnet.

#### 4. Diskussion

Der Befund eines deutlichen circadianen antagonistischen Expressionsmusters für die klassischen Uhrengene *Per1* und *Bmal1* ebenso wie die antagonistische circadiane Expression von *Per2* und *Cry1* sprechen für die Annahme, dass im Pankreas der Ratte ein peripherer Oszillator aktiv ist. Da die *Clock-output*-Gene (Uhrengen-gesteuerten Gene) *Dbp* und *RevErba* im Pankreas der Ratte ebenfalls circadianer Expression unterworfen sind, muss angenommen werden, dass das transkriptionell aktive Genprodukt von *Bmal1* und *Clock* (als Heterodimer BMAL1/CLOCK) die Expression von *Dbp* und *RevErba* steuert. Dies geschieht über die bekannten BMAL1/CLOCK-bindenden E-Box-Elemente in den Promotoren der beiden *Output*-Gene. Zusammengefasst lassen diese Befunde erkennen, dass die an isolierten Ratteninseln beobachtete, circadiane Insulinsekretion wahrscheinlich durch einen circadianen Oszillator gesteuert wird. Welche Zeitgeber diesen peripheren Oszillator synchronisieren, ist weitgehend ungeklärt. Diskutiert wird in diesem Zusammenhang das Indolamin Melatonin. Offen ist auch, ob eine, durch die moderne (oft ungesunde) Lebensführung des Menschen verursachte, Dysfunktion des pankreatischen Oszillators Ursache für die Ausprägung eines Typ-2-Diabetes sein kann.

Dr. Eckhard MÜHLBAUER  
Sächsische Akademie der Wissenschaften zu Leipzig  
Karl-Tauchnitz-Straße 1  
04107 Leipzig  
Bundesrepublik Deutschland  
Tel.: +49 345 5571711  
Fax: +49 345 5574053  
E-Mail: eckhard.muehlbauer@medizin.uni-halle.de

## Melatonin-Insulin-Interaktionen bei Typ-2-diabetischen Ratten und Patienten

Elmar PESCHKE ML (Halle/Saale), Thomas FRESE (Leipzig), Ina BÄHR (Halle/Saale), Helena SCHUCHT (Wittenberg), Ivonne BAZWINSKY-WUTSCHKE (Halle/Saale) und Eckhard MÜHLBAUER (Leipzig)

Mit 6 Abbildungen

### 1. Einleitung

Zahlreiche Untersuchungen belegen einen engen funktionellen Zusammenhang zwischen Melatonin und Insulin. Durch morphologische, molekularbiologische und funktionelle Analysen konnte nachgewiesen werden, dass Melatonin die Insulinsekretion *in vitro* beeinflusst. Die Effekte werden durch spezifische, Pertussistoxin-sensitive G-Protein-gekoppelte, membranständige Melatoninrezeptoren (MT1 und MT2) und über den Adenylatcyclase-cAMP- sowie Guanylatcyclase-cGMP-Signalweg (Insulinsenkung) sowie Phospholipase C-IP3-Weg (Insulinerhöhung) vermittelt. Bisher wurden entsprechende Ergebnisse an Pankreasgewebe sowie explantierten Inseln und Insulinomazellen (INS1) von Ratten erhoben.

### 2. Material und Methoden

Um die bekannten Wechselwirkungen zwischen Melatonin und Insulin *in vivo* zu überprüfen, wurden die vorliegenden Untersuchungen an einem Typ-2-diabetischen Rattenmodell, der Goto-Kakizaki(GK)-Ratte durchgeführt. Bestimmt wurden Glukose, Insulin und Melatonin im Plasma sowie die Expression pankreatischer Melatoninrezeptoren und pinealer Arylalkyl-N-acetyltransferase (AANAT). Ferner wurden die pineale Insulinrezeptor-mRNA mittels RT-PCR sowie radiochemisch deren Enzymaktivität in pinealen Homogenaten bestimmt. Bei Typ-2-diabetischen Patienten wurden Glukose, Insulin und Melatonin im Plasma sowie die mRNA pankreatischer Melatoninrezeptoren analysiert. Zusätzlich wurden Wistar- und GK-Ratten mit Melatonin behandelt und isolierte Epiphysen mit Noradrenalin, Insulin und Glukose einzeln und in Kombination in Perifusionsexperimenten inkubiert.

### 3. Ergebnisse

Typ-2-diabetische GK-Ratten (Abb. 1) als auch Typ-2-diabetische Patienten (Abb. 2) weisen bei erhöhter Glukose und leicht erhöhtem Insulin eine drastische Erniedrigung des Plasma-Melatonins auf. Die Melatoninabnahme im Plasma ist kombiniert mit einer Hochregulierung der Melatoninrezeptor-mRNA (insbesondere des MT1-Rezeptors, der zuvor bei explantierten Inseln und INS1-Zellen nachgewiesen worden war; Abb. 2D). Vergleichbar der Erniedrigung

des Melatoninspiegels war die pineale AANAT-Aktivität bei GK-Ratten vermindert und die Expression pinealer AANAT-mRNA sowohl tags als auch nachts erhöht (Abb. 3).

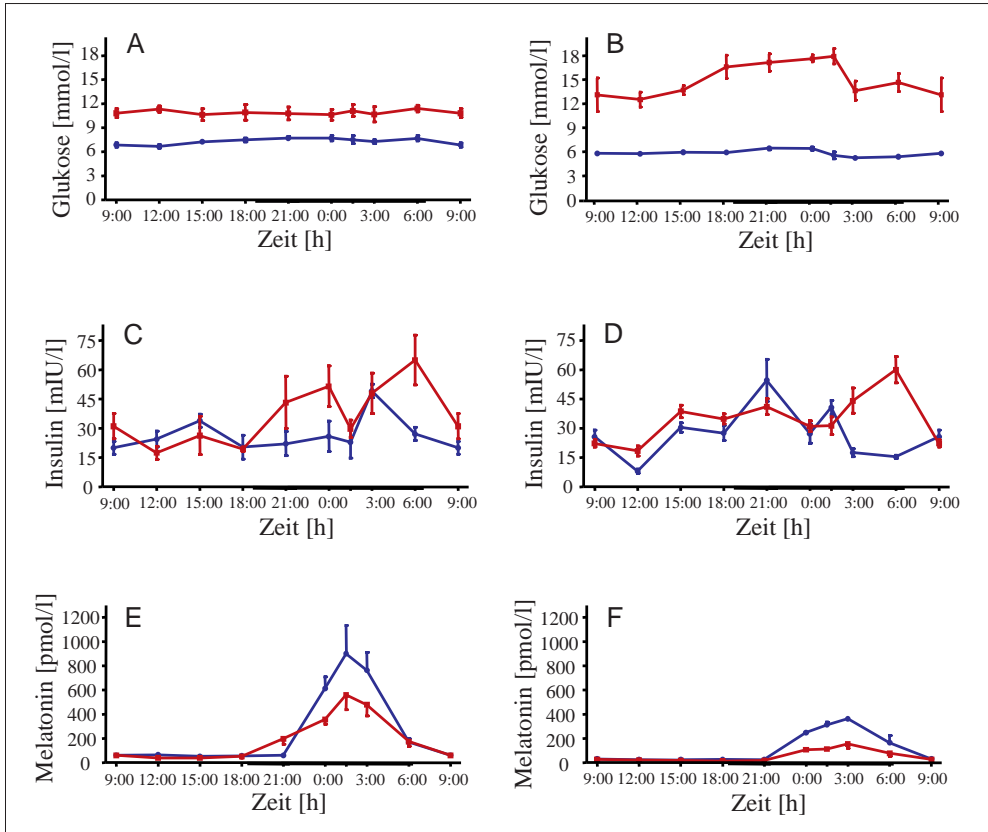


Abb. 1 Tagesprofile von Blutglukose (A, B), Insulin (C, D) und Melatonin (E, F) 6 Wochen alter Wistar(WR)- und Typ-2-diabetischer Goto-Kakizaki(GK)-Ratten (A, C, E) sowie 42 Wochen alter WR- und GK-Ratten (B, D, F). Die dunklen Balken auf der Abszisse geben die Dunkelzeit an, die blauen Kurven repräsentieren die Daten der WR-Kontrolltiere, die roten Kurven die der GK-Ratten. Die Ergebnisse zeigen, dass 6 Wochen alte GK-Ratten bei stark erhöhten Blutglukosekonzentrationen erhöhte Insulinplasmawerte aufweisen. Diese erhöhten Insulinwerte sind mit deutlich erniedrigten Melatoninkonzentrationen im Plasma assoziiert. Diese Beobachtung ist besonders deutlich während der Dunkelzeit. Bei 42 Wochen alten GK-Ratten kommt es zu einer noch stärkeren Erhöhung der Blutglukosekonzentration, während die Melatoninkonzentrationen vor allem in der Dunkelzeit im Vergleich zu denen der Kontrolltiere deutlich verringert werden. Die Melatoninkurven der 42 Wochen alten Tiere weisen gegenüber denen der 6 Wochen alten Tieren generell erniedrigte Werte auf (bekannte Reduktion der Melatoninwerte mit zunehmendem Alter). Verändert nach PESCHKE und MÜHLBAUER 2007 (Abb. 8). Mit freundlicher Genehmigung des Verlages der Sächsischen Akademie der Wissenschaften zu Leipzig.

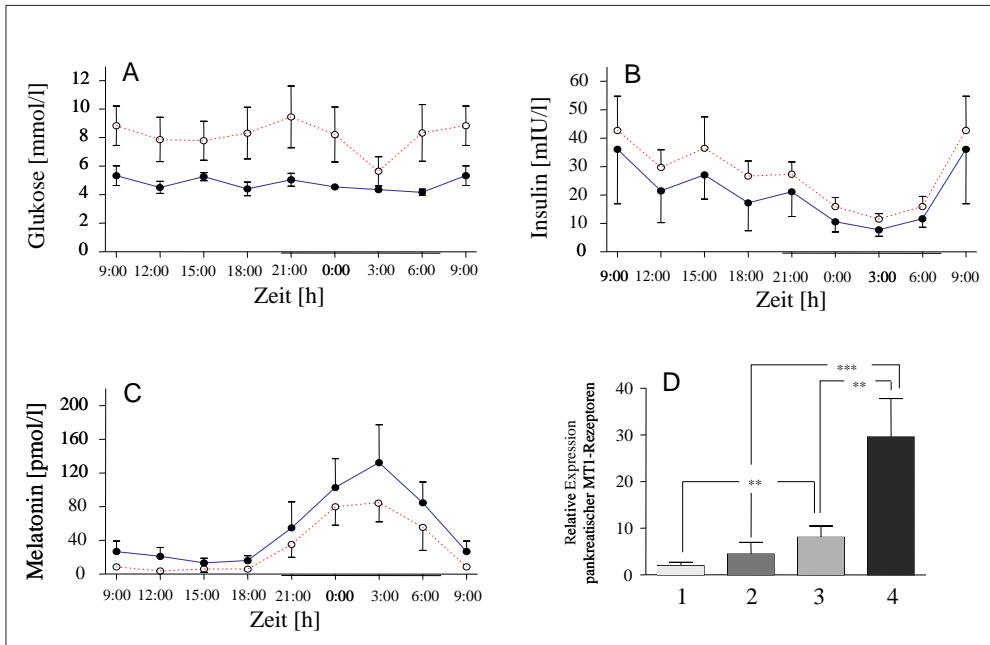


Abb. 2 Tagesprofile von Blutglukose (A), Insulin (B) und Melatonin (C) stoffwechselgesunder und Typ-2-diabetischer Patienten. Die dunklen Balken auf der Abszisse repräsentieren die Dunkelzeit, die blauen Kurven stoffwechselgesunde, die roten Kurven Typ-2-diabetische Patienten. Die Ergebnisse belegen, dass erhöhte Blutglukose- und leicht erhöhte Insulinkonzentrationen mit erniedrigten Melatoninspiegeln im Plasma Typ-2-diabetischer Patienten koinzidieren. Damit entsprechen die an Typ-2-diabetischen Patienten erhobenen Werte denen Typ-2-diabetischer GK-Ratten (siehe Abb. 1). (D) Analyse relativer Expression pankreatischer Melatonin(MT1)-Rezeptoren von Wistar-Ratten (WR) und GK-Ratten (GK) mittels *Real-time*-RT-PCR. Während der Dunkelzeit kommt es zu einer Hochregulation von mRNA des MT1-Rezeptors in beiden Tierlinien, die jedoch bei den GK-Ratten stärker ausfiel. \*\*  $P < 0,01$ ; \*\*\*  $P < 0,001$ . 1: WR, Mitte Lichtzeit, 2: WR, Mitte Dunkelzeit, 3: GK, Mitte Lichtzeit, 4: GK, Mitte Dunkelzeit. Die Daten repräsentieren den Mittelwert  $\pm$  SEM. Verändert nach PESCHKE et al. 2006 (Fig. 2 und 5). Mit freundlicher Genehmigung von John Wiley & Sons.

Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass Melatoninapplikation im Langzeitversuch sowohl bei Wistar- als auch GK-Ratten zu einer Erniedrigung des Plasmainsulins und einer Hochregulierung der Transkripte pinealer Insulinrezeptoren führte (Abb. 4). Schließlich wurden erstmals auch in menschlichen Pankreata die Transkripte von Melatoninrezeptoren nachgewiesen, die bei Typ-2-Diabetikern erhöht waren (Abb. 5). Die Stimulation isolierter Epiphysen mit Noradrenalin, Insulin und Glukose, einzeln und in Kombination, erbrachte den wichtigen Nachweis, dass Synthese und Ausschüttung von Melatonin durch Insulin, nicht aber durch Glukose, gehemmt werden (Abb. 6). Letztgenannte Befunde haben in Einheit mit der Feststellung, dass Typ-2-Diabetiker erhöhte Insulin- und erniedrigte Melatoninspiegel haben, während Typ-1-Diabetiker erniedrigte Insulin- und erhöhte Melatoninspiegel aufweisen, dazu geführt, dass ein Insulin-Melatonin-Antagonismus anzuerkennen ist.



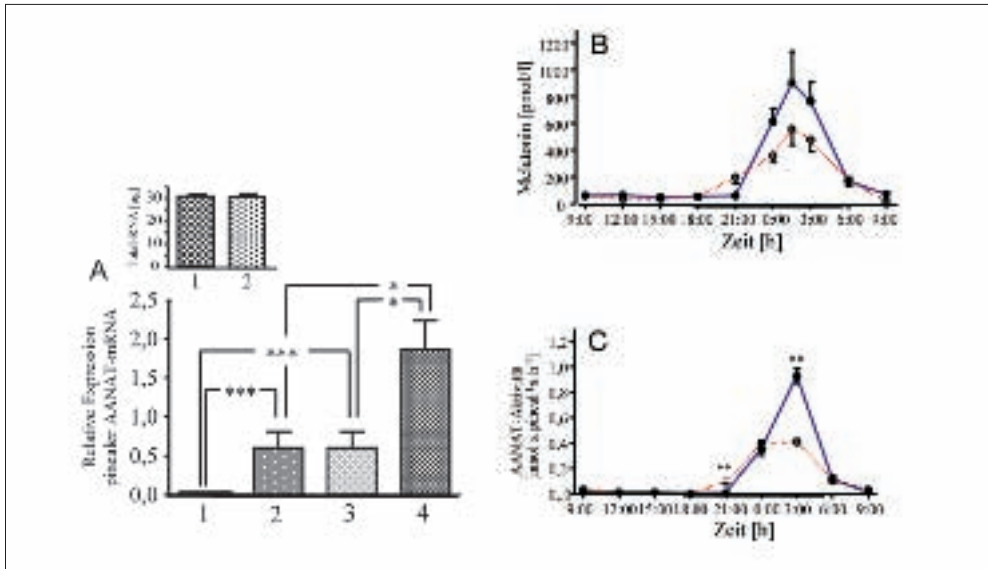


Abb. 3 Die quantitative Analyse der relativen Arylalkyl-N-acetyltransferase(AANAT)-mRNA im Pinealorgan 6 Wochen alter Wistar-Ratten (WR) und Goto-Kakizaki-Ratten (GK) mittels *Real-time*-RT-PCR. (A) zeigt, dass es während der Dunkelzeit (Säulen 2 und 4) zu einem signifikanten Anstieg der relativen AANAT-mRNA-Expression in beiden Tierlinien kommt. Die starke Erhöhung der Säule 4 stellt möglicherweise eine kompensatorische Reaktion auf die erniedrigten Melatoninkonzentrationen im Plasma Typ-2-diabetischer GK-Ratten dar. Die Darstellung der totalen RNA-Menge einzelner Pinealorgane von WR (1) und GK (2) ist als Insert in (A) dargestellt. Beide Linien unterscheiden sich nicht in ihrer Organgröße. 1: WR, Mitte Lichtzeit, 2: WR, Mitte Dunkelzeit, 3: GK, Mitte Lichtzeit, 4: GK, Mitte Dunkelzeit. Die Daten repräsentieren den Mittelwert  $\pm$  SEM. Die Tagesprofile der AANAT-Aktivität im Pineal (C) sowie der Melatoninkonzentration im Plasma (B) 6 Wochen alter WR (blaue Linie) und GK (rote Linie) zeigen erniedrigte Werte der Typ-2-diabetischen GK-Ratten. Die dunklen Balken auf der Abszisse symbolisieren die Dunkelzeit. \*  $P < 0,05$ ; \*\*  $P < 0,01$ ; \*\*\*  $P < 0,001$ . Verändert nach PESCHKE et al. 2006 (Fig. 2, 6 und 7). Mit freundlicher Genehmigung von John Wiley & Sons.

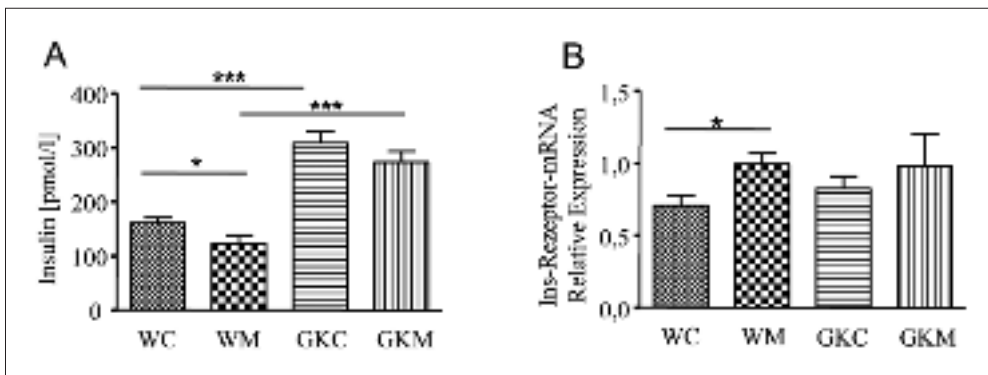


Abb. 4 Insulinkonzentration im Plasma (A) und relative mRNA-Menge des Insulin-Rezeptors im Pinealorgan (B) 8 Wochen alter Wistar-Ratten (WR) und Typ-2-diabetischer Goto-Kakizaki-Ratten (GK), die über einen Zeitraum von 9 Wochen täglich während der Dunkelzeit mit 2,5 mg/kg KG Melatonin substituiert wurden. Die Insulinkonzentrationen im Plasma von GK-Ratten (sowohl behandelt als auch unbehandelt) waren signifikant erhöht im Vergleich zu den entsprechenden Wistar-Kontrollen. Die Melatoninapplikation für 9 Wochen führte zu einem Abfall der Plasmainsulinwerte sowohl bei den Wistar-Ratten als auch GK-Ratten. Gleichzeitig verursachte die Gabe von Melatonin einen

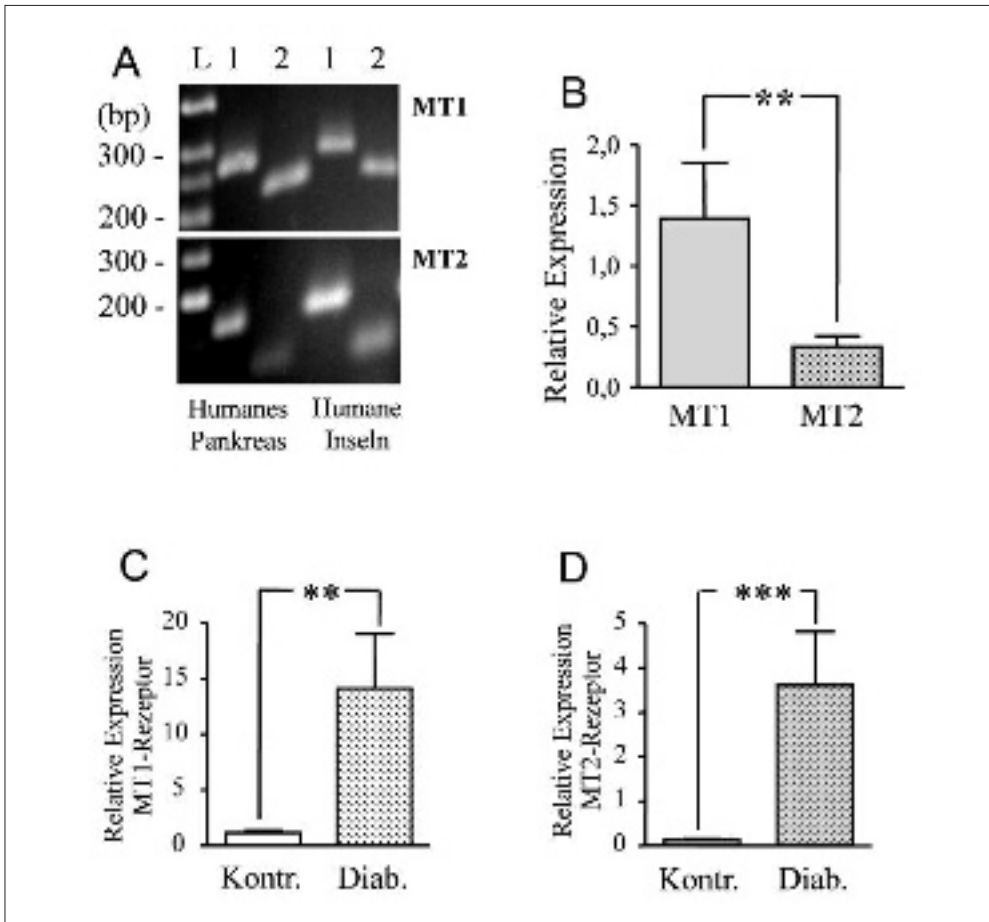


Abb. 5 (A) Expression der Melatoninrezeptor-mRNA (MT1 und MT2) humaner Pankreata sowie humaner Langerhansscher Inseln. 1: Nachweis der MT1- und MT2-Rezeptor-mRNA mittels RT-PCR unter Verwendung Rezeptorspezifischer Primer und Gelelektrophorese. 2: Inkubation mit den Restriktionsenzymen *BclI* für das MT1- und *AvaII* für das MT2-Rezeptor-spezifische Amplifikationsprodukt führte zum Nachweis der erwarteten Fragmente mit 211 bp für den MT1-Rezeptor und 101 bp für den MT2-Rezeptor (kleinere Fragmente sind nicht gezeigt). (B) Relative Expression des MT1- und MT2-Rezeptors in Pankreata stoffwechselgesunder Patienten. Die Expression des MT1-Rezeptors ist im Vergleich zum MT2-Rezeptor um das 4,15-fache erhöht. (C, D) Quantitative Analyse der Expression der Melatoninrezeptor-mRNA in humanen Pankreata stoffwechselgesunder und Typ-2-diabetischer Patienten mittels *Real-time*-RT-PCR. Die Daten zeigen, dass die Pankreata Typ-2-diabetischer Patienten eine signifikant erhöhte relative mRNA-Expression sowohl des MT1(c)- als auch des MT2(d)-Rezeptors im Vergleich zu stoffwechselgesunden Patienten aufweisen. Die Daten repräsentieren den Mittelwert  $\pm$  SEM. \*\*  $P < 0,01$  und \*\*\*  $P < 0,001$ . Verändert nach PESCHKE et al. 2007 (Fig. 1). Mit freundlicher Genehmigung von John Wiley & Sons.

Anstieg der relativen mRNA-Menge des Insulinrezeptors sowohl bei Typ-2-diabetischen GK-Ratten als auch den Wistar-Kontrollen, wobei ein signifikanter Anstieg nur bei den WR zu beobachten war. WC: Wistar-Kontrolle, WM: WR Melatonin-behandelt, GKC: GK-Kontrolle, GKM: GK Melatonin-behandelt. Die Daten repräsentieren den Mittelwert  $\pm$  SEM. \*  $P < 0,05$  und \*\*\*  $P < 0,001$ . Verändert nach PESCHKE et al. 2010 (Fig. 1 und 2). Mit freundlicher Genehmigung von John Wiley & Sons.

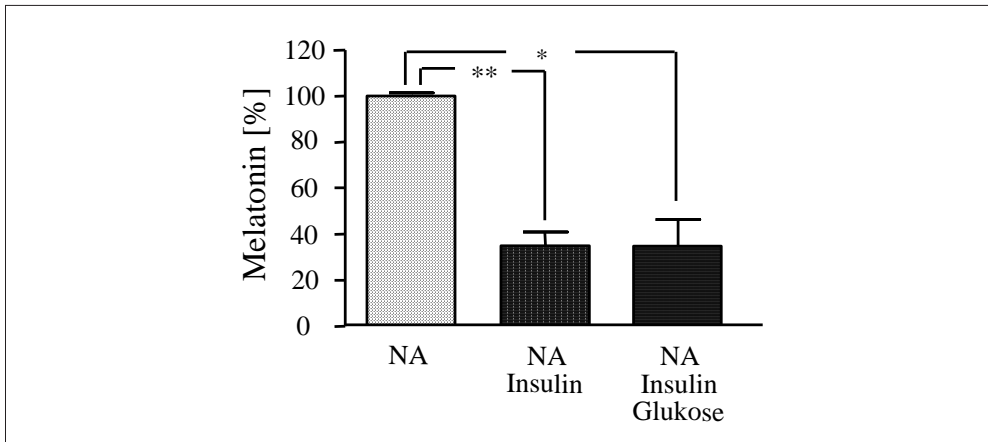


Abb. 6 Einfluss von Noradrenalin (NA), Insulin und Glukose auf die pineale Melatoninsekretion von Wistar-Ratten *in vitro* (Perifusionsergebnisse). Die gewonnenen Daten zeigen, dass sowohl Insulin (Reduktion um 65 %,  $P < 0,01$ ) als auch Insulin und Glukose (Reduktion ebenfalls um 65 %,  $P < 0,05$ ) die Noradrenalin-stimulierte Melatoninsekretion isolierter Epiphysen von Wistar-Ratten signifikant senken. Ferner machen die gezeigten Ergebnisse deutlich, dass Insulin, nicht aber Glukose, die Insulinsekretion senkt. Die Daten repräsentieren die Mittelwerte  $\pm$  SEM. \*  $P < 0,05$ ; \*\*  $P < 0,01$ . Verändert nach PESCHKE et al. 2008 (Fig. 7). Mit freundlicher Genehmigung von John Wiley & Sons.

#### 4. Diskussion

Melatonin senkt Rezeptor-mediert die pankreatische Insulinsekretion. Dieser Befund konnte durch die vorliegenden Untersuchungen an Typ-2-diabetischen GK-Ratten als auch an Typ-2-diabetischen Patienten bestätigt werden. Untersucht wurden im Einzelnen Unterschiede von Glukose, Insulin und Melatonin im Plasma von Ratten und Patienten sowie die Expression tagesrhythmischer Schwankungen von pinealer Insulinrezeptor- und AANAT-mRNA bei Wistar- und GK-Ratten. Die Behandlung von Epiphysen mit Insulin führte in Perifusionsversuchen – ebenso wie bei Typ-2-diabetischen Ratten und Patienten mit leicht erhöhten Insulinplasmaspiegeln – zu erniedrigter Melatoninsynthese, während die enterale Applikation von Melatonin bei Kontroll- als auch GK-Ratten zur Abnahme des Insulins führte. Unsere Resultate zeigen, dass eine regulierte, Insulinrezeptor-medierte, Wechselwirkung zwischen pankreatischer  $\beta$ -Zelle und Pinealozyt besteht. Ferner ist festzustellen, dass ein reduzierter Melatoninplasmaspiegel während der Entwicklung des Typ-2-Diabetes auftritt, was die Annahme der funktionellen Bedeutung von Melatonin für die Diabetogenese impliziert.

*Literatur*

- PESCHKE, E., und MÜHLBAUER, E.: Funktionelle Beziehungen zwischen Melatonin und Insulin – Untersuchungsergebnisse an stoffwechselgesunden und diabetischen Versuchstieren und Patienten. In: PESCHKE, E. (Hrsg.): Endokrinologie III, Vorträge im Rahmen des Projekts „Zeitstrukturen endokriner Systeme“. Abh. Sächs. Akad. Wiss., Math.-nat. Kl., Band 64, Heft 4, S. 103–118. Stuttgart, Leipzig: S. Hirzel 2007
- PESCHKE, E., FRESE, T., CHANKIEWITZ, E., PESCHKE, D., PREISS, U., SCHNEYER, U., SPESSERT, R., and MÜHLBAUER, E.: 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 (2006)
- PESCHKE, E., SCHUCHT, H., and MÜHLBAUER, E.: Long-term enteral administration of melatonin reduces plasma insulin and increases expression of pineal insulin receptors in both Wistar and type 2-diabetic Goto-Kakizaki rats. *J. Pineal Res.* 49, 373–381 (2010)
- PESCHKE, E., STUMPF, I., BAZWINSKY, I., LITVAK, L., DRALLE, H., and MÜHLBAUER, E.: Melatonin and type 2 diabetes – a possible link? *J. Pineal Res.* 42, 350–358 (2007)
- PESCHKE, E., WOLGAST, S., BAZWINSKY, I., PONICKE, K. and MÜHLBAUER, E.: Increased melatonin synthesis in pineal glands of rats in streptozotocin induced type 1 diabetes. *J. Pineal Res.* 45, 439–448(2008)

Prof. Dr. Elmar PESCHKE  
Institut für Anatomie und Zellbiologie  
Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg  
Große Steinstraße 52  
06097 Halle (Saale)  
Bundesrepublik Deutschland  
Tel.: +49 345 5571709/1816  
Fax: +49 345 5574053  
E-Mail: elmar.peschke@medizin.uni-halle.de

## **Medicine at the Interface between Science and Ethics**

*Leopoldina-Symposium*

vom 30. Mai bis 1. Juni 2007 in Weißenburg, Bayern

Nova Acta Leopoldina N. F. Bd. 98, Nr. 361

Herausgegeben von Walter DOERFLER (Erlangen/Köln), Hans-G. ULRICH (Erlangen) und Petra BÖHM (Köln)

(2010, 258 Seiten, 31 Abbildungen, 4 Tabellen, 23,95 Euro,

ISBN: 978-3-8047-2605-5)

Naturwissenschaft und Theologie/Ethik versuchen mit unterschiedlichen Konzepten, ein Weltbild zu erfassen, das die *conditio humana* besser zu verstehen erlaubt. Die Fragen sind weit gefasst; endgültige Antworten wird man nicht leicht finden. Gemeinsame Diskussionen über diese Probleme könnten beiden Gebieten Anregungen geben und der Biomedizin im Umgang mit der sehr kritischen Öffentlichkeit helfen. Voraussetzung ist Offenheit gegenüber der anderen Denkweise. Der vorliegende Band behandelt daher aus der Perspektive von Naturwissenschaftlern und Ethikern so verschiedene Themen wie die neuen Herausforderungen an Moral- und Ethikdiskurse durch die jüngsten Fortschritte der Biowissenschaften, die Grenzen der ethischen Reflexion bei den neueren Entwicklungen der Molekularbiologie, die Geschichte der Auffassungen vom „Gen“ und seiner Bedeutung in der Humanbiologie, aber auch die Missverständnisse zwischen den beiden Kulturen der Naturwissenschaften und der Geisteswissenschaften in der Forschung über Lebensprozesse. Dazu kommen Beiträge zur Stammzellproblematik, der Verwendung von Tiermodellen in der Translationsmedizin, über Würde von Zellen in Kultur, Fragen der Pluripotenz von Zellen und der Reprogrammierung von Zellkernen sowie der Bedeutung von Methylierungsmustern für die Epigenetik. Die Beiträge sind in englischer oder deutscher Sprache verfasst.

*Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft Stuttgart*

## Die Insulinsekretion isolierter pankreatischer Ratten-Inseln erfolgt circadian-rhythmisch

Elmar PESCHKE ML und Dorothee PESCHKE (Halle/Saale)

Mit 3 Abbildungen

### 1. Einleitung

Mit Ausnahme der etablierten Überzeugung, dass circadiane Rhythmen bei Säugetieren im hypothalamischen *Nucleus suprachiasmaticus* und bei Vögeln im *Corpus pineale* generiert werden, sind Arbeiten über circadiane Rhythmen in isolierten Organen oder Zellen eher selten. Circadiane Rhythmen wurden bislang in Geweben von Insekten sowie Dünndarm, Nebennieren, Herz und Leberzellen von Säugetieren in Kultur beschrieben. Obwohl durch zahlreiche Untersuchungen *in vivo* und *in vitro* hochfrequente Oszillationen der Insulinsekretion, wie beispielsweise mit Perioden zwischen 9 und 14 min, nachgewiesen wurden, konnten circadiane Rhythmen der Insulinsekretion bislang nur *in vivo* erfasst werden.

### 2. Material und Methoden

Ob die Insulinsekretion pankreatischer Inseln circadian-rhythmisch erfolgt, wurde mittels eines an Inseln adaptierten Perifusionssystems überprüft. Etwa 300 isolierte pankreatische Ratteninseln wurden, mit Sephadex G-10 vermischt, in Glassäulen verbracht, die mit Medium 199 der Firma Sigma bei einer Flussrate von 1 ml/3 min umspült wurden. Dem Medium wurden 2,22 g/l Hydrogenkarbonat, 80 mg/l Gentamycin und 1,75 g/l BSA beigefügt, und es wurde mit einem Gemisch von 95 % Luft und 5 % CO<sub>2</sub> äquilibriert; die Temperatur betrug 37 °C. Zu Versuchsbeginn und -ende wurden funktionelle Tests mit KCl und Glukose durchgeführt, um Vitalität und Sekretionskapazität zu erfassen und zu standardisieren. Über mehrere Tage wurden kontinuierlich 30-min-Perifusatfraktionen zwecks Erfassung der circadianen Rhythmicität gewonnen. Die Insulinsekretion wurde mittels RIA im Perifusat bestimmt, die Daten von 10 Experimenten mittels MacAnova- und Cosinor-Programm sowie  $\chi^2$ -Periodogramm analysiert.

### 3. Ergebnisse

Die Insulinsekretion *in vitro* erfolgt circadian-rhythmisch mit Periodenlängen zwischen 21,8 und 26,2 h (Abb. 1 und 2). Mittelwert  $\pm$  SEM der Periodenlänge betragen  $23,59 \pm 0,503$  h, der Insulinfreisetzung  $1038 \pm 13$  pmol/l und der Amplitude  $88 \pm 17$  pmol/l. Den Ergebnissen lagen 10 Experimente zugrunde. Die Gabe von 10 nmol/l Melatonin für 2 h während der Ver-

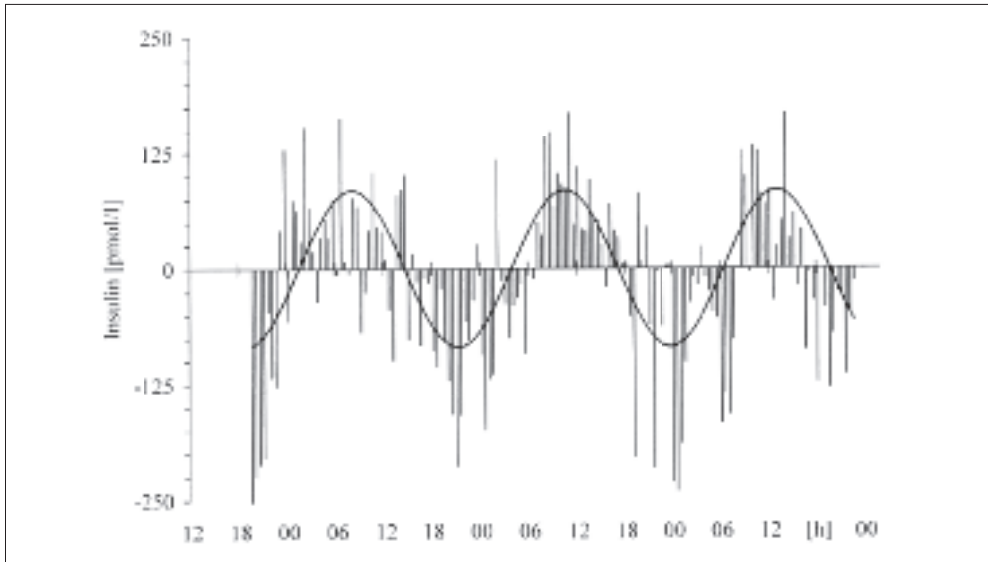


Abb. 1 Beispiel für das Insulinsekretionsmuster Glukose-stimulierter pankreatischer Ratten-Inseln (8,6 mmol/l Glukose) nach Trendbereinigung und Abtragung der positiven und negativen Abweichungen vom Mesor, der hier „0“ gesetzt wurde. Die Periodenlänge ( $\tau$ ) betrug 26,2 h. Beobachtungszeitraum: 76 h, Probenumfang: 152, Mittelwert  $\pm$  SEM:  $4,57 \pm 0,051$  ng/ml, Amplitude  $\pm$  SEM:  $0,56 \pm 0,046$  ng/ml. Unverändert aus PESCHKE und PESCHKE 1998 (Fig. 2). Mit freundlicher Genehmigung des Springer Verlages.

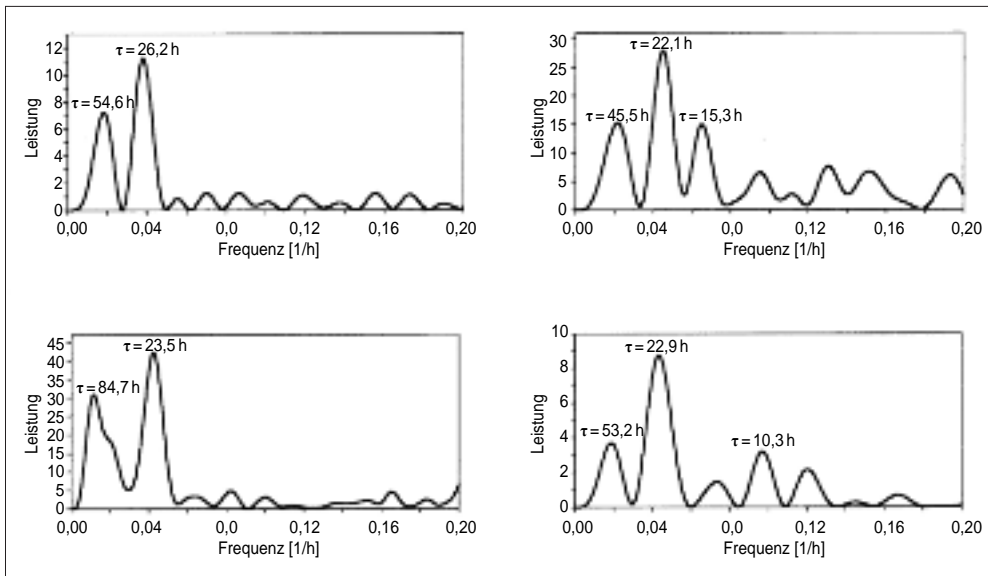


Abb. 2 Beispiele für die biomathematischer Evaluierung von Kraftspektren mittels MacAnova-Programm. Die Spektren zeigten neben stets signifikanten circadianen Perioden der Insulinsekretion (zwischen  $\tau = 22,1$  h und  $\tau = 26,2$  h) auch infra- und ultradiane Oszillationen, deren Leistungsspektren jedoch stets schwächer ausfielen als die der circadianen Schwingungen. Unverändert aus PESCHKE und PESCHKE 1998 (Fig. 3). Mit freundlicher Genehmigung des Springer Verlages. Verändert aus PESCHKE und PESCHKE 1998 (Fig. 3). Mit freundlicher Genehmigung des Springer Verlages.

suche führte zu einem *Phase-shift* (Vorverlagerung um 9 h) unter Erhalt der circadianen Periodenlänge ( $\tau$ ) (Abb. 3).

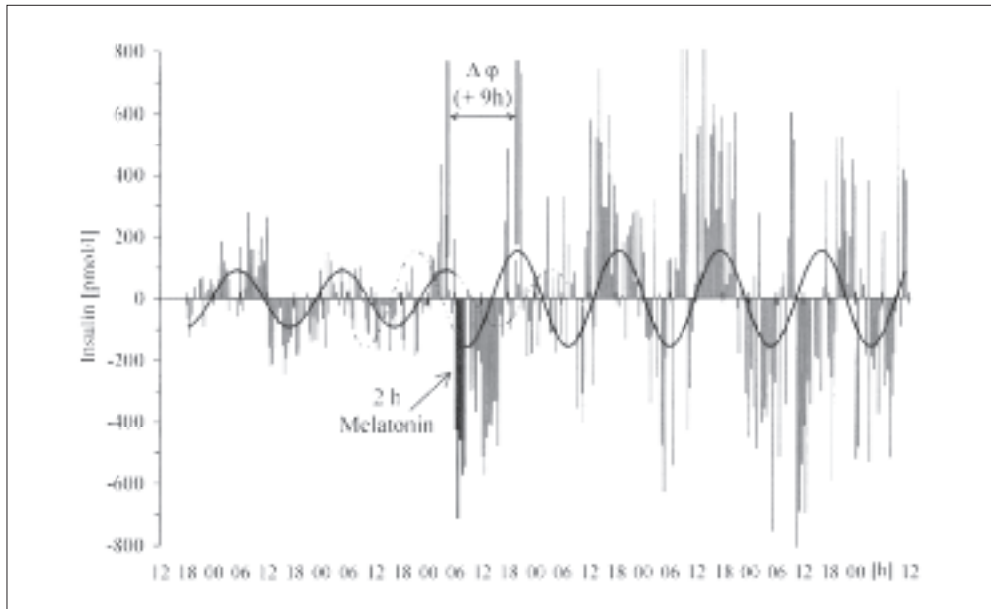


Abb. 3 *Phase-Response*-Untersuchungen Glukose-stimulierter Inseln (8,6 mmol/l) nach Trendbereinigung und Abtragung der positiven und negativen Abweichungen vom Mesor, der hier „0“ gesetzt wurde. Der Versuchszeitraum betrug ca. 7 Tage. Nach 2,5 Tagen wurden für 2 h 10 nmol/l Melatonin als hormoneller Zeitgeber verabreicht (schwarze Säulen). Es zeigte sich, dass nach Melatoningabe die Periodenlänge ( $\tau$ ) von 22,9 h nahezu beibehalten, die Phase jedoch um ca. 9 h vorverlagert wurde. Unverändert aus PESCHKE und PESCHKE 1998 (Fig. 5). Mit freundlicher Genehmigung des Springer Verlages.

#### 4. Diskussion

Auf Grund der erhobenen Perfusionsergebnisse isolierter pankreatischer Inseln kann davon ausgegangen werden, dass die pankreatische  $\beta$ -Zelle über einen endogenen Oszillator verfügt, der die circadiane Insulinsekretion steuert. Die Periodenlänge ( $\tau$ ) der Oszillationen ist stabil und wird nicht durch hormonelle Zeitgeber wie Melatonin verändert oder im Laufe der Zeit abgeschwächt. In Einheit mit dem hemmenden Einfluss von Melatonin auf die Insulinsekretion sowie deren *Phase-Response* ist davon auszugehen, dass die pankreatische  $\beta$ -Zelle ein Target für Melatonin ist. Dafür spricht auch, dass die kompetitive Hemmung von Melatoninrezeptoren mittels Luzindol oder 4P-PDOT die klassischen Insulin-senkenden Effekte des Melatonins minimiert oder löscht. Zusammenfassend ist festzustellen, dass (a) die Insulinsekretion isolierter pankreatischer  $\beta$ -Zellen einem circadianen Rhythmus folgt, der in den Inseln selbst, möglicherweise durch Uhrengene, generiert wird. Weiterhin ist (b) festzustellen, dass Melatonin den intrazellulären Rhythmusgenerator der  $\beta$ -Zelle beeinflusst und einen *Phase-shift* der Insulinsekretion bewirkt (Vorverlagerung der Phase um 9 h).



*Literatur*

PESCHKE, E., and PESCHKE, D.: Evidence for a circadian rhythm of insulin release from perfused rat pancreatic islets. *Diabetologia* 41, 1085–1092 (1998)

Prof. Dr. Elmar PESCHKE  
Institut für Anatomie und Zellbiologie  
Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg  
Große Steinstraße 52  
06097 Halle (Saale)  
Bundesrepublik Deutschland  
Tel.: +49 345 5571709/1816  
Fax: +49 345 5574053  
E-Mail: [elmar.peschke@medizin.uni-halle.de](mailto:elmar.peschke@medizin.uni-halle.de)

## **Photoperiodische Reaktionen werden beim Dsungarischen Zwerghamster (*Phodopus sungorus*) durch freiwilliges Laufen modifiziert**

Ines PETRI, Frank SCHERBARTH, Stephan STEINLECHNER (Hannover)  
und Perry BARRETT (Aberdeen)

Mit 5 Abbildungen

### **1. Einleitung**

Als Antwort auf kurze Tageslängen (Kurztag, KT) reduziert der Dsungarische Zwerghamster (*Phodopus sungorus*) das Körpergewicht, die Größe und Aktivität der Gonaden und er wechselt in ein weißliches Winterfell. In zurückliegenden Studien haben wir über eine Umkehr der saisonalen Körpergewichtsreduktion und Beeinträchtigung der saisonalen Gonadenregression bei Hamstern mit Zugang zu einem Laufrad (LR) im KT berichtet. Der saisonale Fellwechsel vom braunen Sommer- zum weißen Winterfell hingegen war nicht beeinflusst. Das deutet darauf hin, dass das KT-Signal zwar gelesen werden kann, aber durch eine physiologische Reaktion auf die andauernde Laufaktivität überspielt wird. Um zu verstehen, wie Laufaktivität das Auftreten der KT-Physiologie beim Dsungarischen Hamster beeinträchtigt, haben wir den Einfluss auf physiologische Merkmale und die Expression photoperiodisch regulierter Gene, die wichtig für die saisonale Körpergewichts-anpassung von *Phodopus sungorus* sind, untersucht.

### **2. Material und Methoden**

*Experiment 1:* Der Einfluss der Photoperiode auf das Aktivitätsmuster Dsungarischer Hamster mit und ohne Zugang zu einem Laufrad wurde durch Infrarot-Bewegungsmelder unter natürlicher Photoperiode und Umgebungstemperatur aufgezeichnet.

*Experiment 2:* Männliche Dsungarische Hamster wurden 8 Wochen lang in künstlichem Langtag (LT) (L:D=16:8 h) oder KT (L:D=8:16 h) mit (LR) oder ohne (K) Zugang zu einem Laufrad gehalten (jeweils N = 6). Am Ende des Versuchs wurden die Gehirne, Hoden und Lebern der Tiere entnommen. Die Leberproben wurden homogenisiert und der Glukose- und Fettgehalt der Leber durch kolorimetrische Untersuchungen bestimmt. Die mRNA-Expressionen von *Vgf* in der dorsalen Region des medialen posterioren Bereichs des Nucleus arcuatus (dmpARC), Typ-3-Deiodinase (*Dio3*) in der ependymalen Schicht des dritten Ventrikels und Somatotropin-*release-inhibiting*-Hormon (*Srif*) im ARC wurden durch *In-situ*-Hybridisierung quantifiziert. Die Daten wurden mit einer zweifaktoriellen ANOVA, gefolgt vom Student-Newman-Keuls-Post-hoc-Test, analysiert. Die Ergebnisse werden als Mittelwert  $\pm$  SE angegeben und Unterschiede wurden bei  $P < 0,05$  als signifikant gewertet.

### 3. Ergebnisse

**Experiment 1:** Das jährliche Aktivitätsmuster von Hamstern mit einem Laufrad zeigt einen durchgehend mit der Dunkelphase synchronisierten und klar abgegrenzten Rhythmus. Hamster ohne Laufrad hingegen zeigen die Tendenz zu einem undeutlichen Rhythmus während der Herbst- und Wintermonate, wenn sich die Photoperiode verkürzt (Abb. 1).

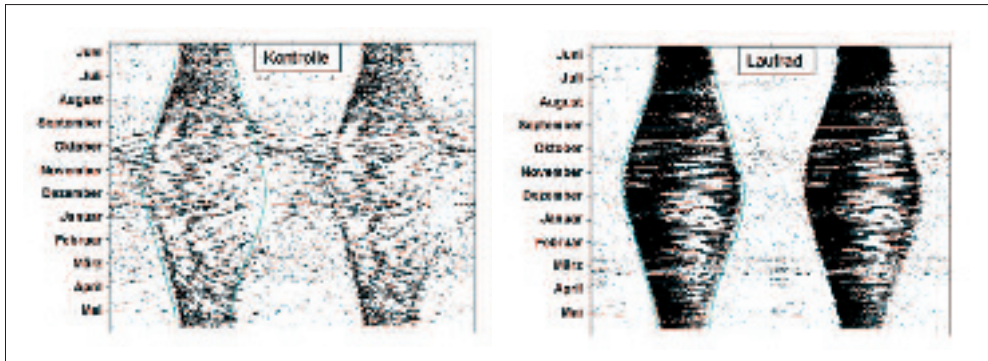


Abb. 1 Aktogramm (Doppelplot) eines Kontrolltiers und eines Hamsters mit Zugang zu einem Laufrad, gemessen während eines Jahres unter natürlicher Photoperiode und Umgebungstemperatur in Hannover (52 °N). Das jährliche Aktivitätsmuster des Hamsters mit Zugang zu einem Laufrad zeigt einen scharf begrenzten Rhythmus, während das Kontrolltier die Tendenz zu einem unregelmäßigen Rhythmus in den Herbst- und Wintermonaten (kurze Photoperiode) zeigt.

**Experiment 2:** Mit Zugang zu einem Laufrad ist die typische Reduktion des Hoden- und Körpergewichts im KT abgeschwächt (Abb. 2), und die Futtermittelaufnahme verdoppelt sich nahezu. Die Genexpression von *Srpf* nimmt ab (Abb. 3), und durch Laufradaktivität im KT steigt die *Vgf*-Genexpression weiter an, während die Genexpression von *Dio3* nicht beeinflusst wird (Abb 4). Der Glukosegehalt in Lebern von Tieren mit Zugang zu einem Laufrad ist im Vergleich zu den jeweiligen Kontrolltieren erhöht (Abb. 5).

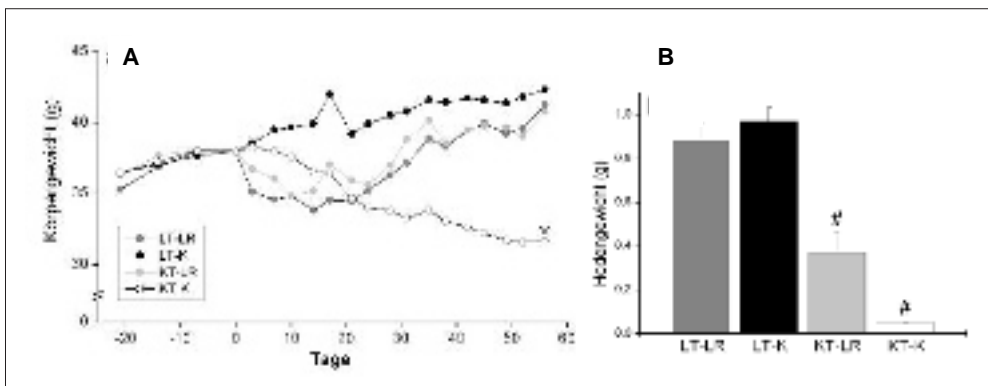


Abb. 2 (A) Körper- und (B) Hodengewicht männlicher Dsungarischer Hamster. Bei Hamstern mit Zugang zu einem Laufrad findet die typische KT-induzierte Reduktion des Körper- und Hodengewichts gar nicht, oder nur abgeschwächt statt. (A) photoperiodischer Effekt ( $F = 8,507$ ;  $P < 0,01$ ) und Aktivitätseffekt ( $F = 4,47$ ;  $P < 0,05$ ) auf das Körpergewicht in Woche 8. \*: signifikanter Unterschied zwischen KT- und KT-Laufrad-Gruppe. (B) photoperiodischer Effekt auf das Hodengewicht ( $F = 110,07$ ;  $P < 0,0001$ ). # signifikanter Unterschied zu den anderen drei Gruppen.

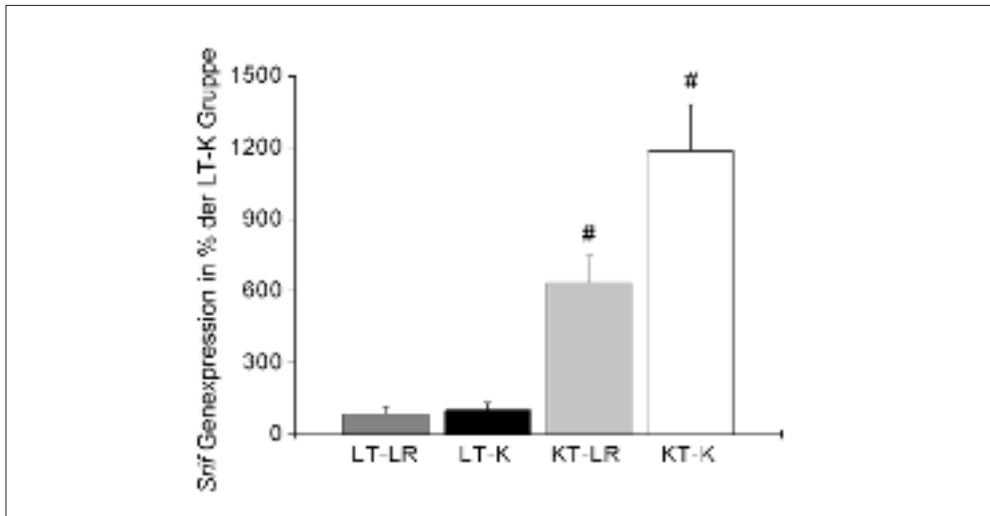


Abb. 3 Genexpression von Somatotropin-*release-inhibiting*-Hormon (*Srif*) im Nucleus arcuatus (ARC) männlicher Dsungarischer Hamster in Experiment 2. Im Vergleich zur KT-Gruppe ist die Expression von *Srif* im KT durch Laufaktivität verringert. Photoperiodischer Effekt ( $F = 50,7$ ;  $P < 0,001$ ) und Aktivitätseffekt ( $F = 6,1$ ;  $P < 0,05$ ) auf die *Srif*-Genexpression. # signifikanter Unterschied zu den anderen drei Gruppen.

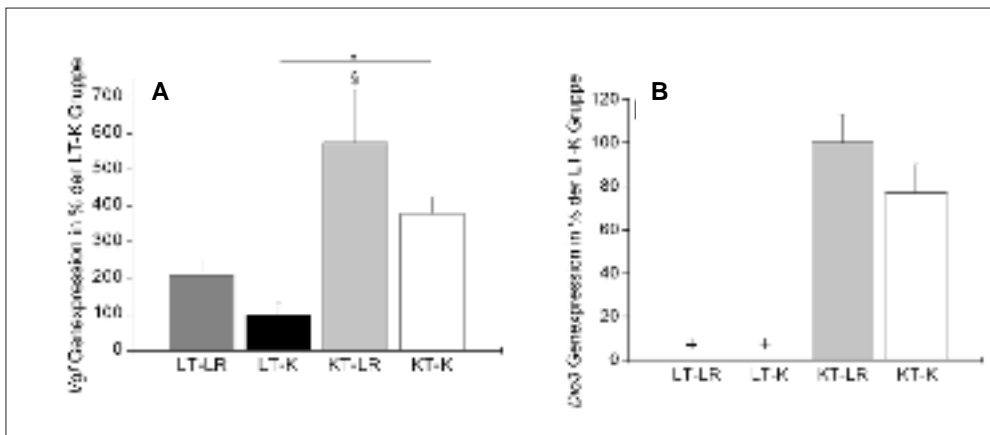


Abb. 4 Expression der photoperiodisch regulierten Gene (A) *Vgf* in der dorsalen Region des medialen posterioren Bereichs des Nucleus arcuatus und (B) Typ-3-Deiodinase (*Dio3*) in der ependymalen Schicht des dritten Ventrikels bei männlichen Dsungarischen Hamstern in Experiment 2. Die Expression von *Vgf* ist durch die Laufaktivität in beiden Photoperioden hochreguliert, während die Expression von *Dio3* nicht beeinflusst wurde. (A) photoperiodischer Effekt ( $F = 20,38$ ;  $P < 0,001$ ) und Aktivitätseffekt ( $F = 4,66$ ;  $P < 0,05$ ) auf die *Vgf*-Genexpression. \* LT-K signifikant verschieden zu KT-K; § signifikanter Unterschied zu beiden LT Gruppen. (B) photoperiodischer Effekt auf die *Dio3* Genexpression ( $F = 94,65$ ;  $P < 0,001$ ). + signifikanter Unterschied zu beiden KT Gruppen.

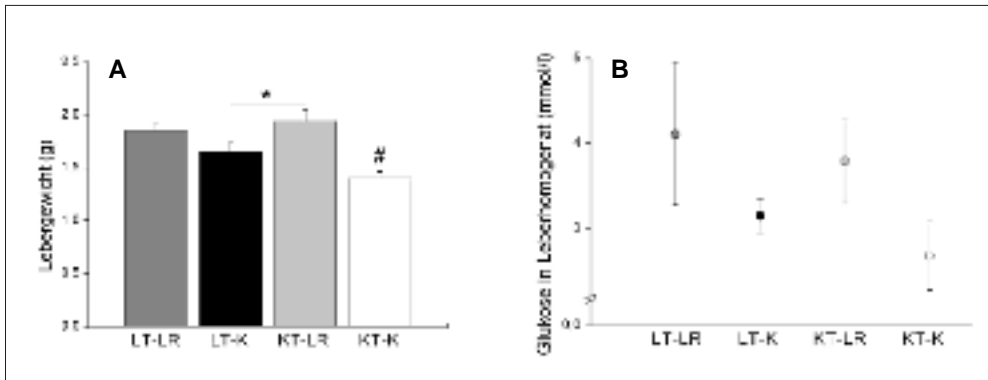


Abb. 5 (A) Lebergewicht und (B) Glukosegehalt der Leber männlicher Dsungarischer Hamster in Experiment 2. Das Lebergewicht und der Glukosegehalt sind durch die Laufaktivität in beiden Photoperioden angestiegen. (A) Aktivitätseffekt auf das Lebergewicht ( $F = 21,49$ ;  $P < 0,001$ ). \*: LT-K signifikant verschieden zu KT-LR; #: signifikanter Unterschied zu den anderen drei Gruppen. (B) Trend zu einem Aktivitätseffekt auf den Glukosegehalt der Leber ( $F = 3,73$ ;  $P = 0,0679$ ).

#### 4. Diskussion

Das jährliche Aktivitätsmuster und die Genexpression von *Dio3* in Hamstern mit Zugang zu einem Laufrad (LR) zeigen, dass das KT-Signal gelesen wird. Allerdings zeigen die Hamster eine veränderte physiologische Reaktion. Der Anstieg der Lebergewichte und des Glukoseanteils in den Lebern von Hamstern mit Zugang zu einem Laufrad deuten auf metabolische Änderungen hin. Die Genexpressionen von *Vgf* und *Srif* wurden durch die Laufaktivität beeinflusst, d. h., beide Gene könnten in die Mechanismen involviert sein, die dem Körpergewichtsanstieg unterliegen. Die reduzierte Expression von *Srif* in der KT-LR-Gruppe, verglichen mit der KT-Kontrolle, könnte zu einer erhöhten Freisetzung des Wachstumshormons führen. Eine erhöhte Freisetzung des Gonadotropin-releasing-Hormons hingegen, hervorgerufen durch eine Störung der KT-induzierten Änderung in der neuroendokrinen Hypothalamus-Hypophysen-Gonaden-Achse, könnte die verzögerte Hodenregression in Hamstern mit Zugang zu einem Laufrad herbeiführen.

Dr. Ines PETRI  
Institut für Zoologie der Stiftung  
Tierärztliche Hochschule Hannover  
Bünteweg 17  
30559 Hannover  
Bundesrepublik Deutschland  
Tel.: +49 511 953 8458  
Fax: +49 511 953 8586  
E-Mail: ines.petri@tiho-hannover.de

# Calcium-Imaging mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie in INS1-Insulinomazellen

Sabine WOLGAST (Leipzig) und Elmar PESCHKE ML (Halle/Saale)

Mit 2 Abbildungen

## 1. Einleitung

Insulin ist das wichtigste Sekretionsprodukt sowohl der pankreatischen  $\beta$ -Zelle als auch der Insulinomazelllinie INS1. Eine Erhöhung der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  ist Voraussetzung für die Insulinsekretion. Es ist bekannt, dass Melatonin die Signaltransduktion in der  $\beta$ -Zelle und die Insulinsekretion beeinflusst. Dieser Einfluss ist zeitabhängig und kann über verschiedene Signalkaskaden, einschließlich cAMP, cGMP und  $\text{IP}_3$ , vermittelt werden. Die direkte kurzzeitige Stimulation von INS1-Zellen mit Melatonin führt über  $\text{MT}_1$ -Rezeptorkopplung an  $\text{G}_q$ -Proteine zu einer Erhöhung der  $\text{IP}_3$ -Konzentration. Die Forskolin-stimulierte Insulinsekretion dagegen wird durch Melatonin über eine inhibitorische  $\text{G}_i$ -Protein/cAMP-gekoppelte Signalkaskade vermindert. Ziel unserer Untersuchungen war es, Änderungen der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration nach Aktivierung der cAMP- und  $\text{IP}_3$ -gekoppelten Signalwege in INS1-Zellen und den Einfluss von Melatonin auf  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  zu messen.

## 2. Material und Methoden

INS1-Zellen wurden für 2 bis 4 Tage auf Glasplättchen kultiviert, mit den  $\text{Ca}^{2+}$ -sensitiven Fluoreszenzfarbstoffen Calcium Green-1 AM sowie Fura Red AM beladen und anschließend in einer geschlossenen Perfusionskammer stimuliert. Änderungen der Fluoreszenzintensitäten wurden mit einem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop (Leica TSC SP) bestimmt. In Zeiterien erfolgte die Messung alle 2 oder 5 s. Die simultane Beladung mit zwei Fluoreszenzfarbstoffen ermöglichte eine ratiometrische Messung, wobei das berechnete Verhältnis der Fluoreszenzintensitäten von Calcium Green-1 zu Fura Red ein Maß für die Änderungen der  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  ist.

## 3. Ergebnisse

Eine kurzzeitige Stimulation der INS1-Zellen mit Carbachol oder Melatonin führte in 50 bzw. 35 % der untersuchten Zellen zu einem transienten Anstieg der  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  oder Calcium-Spikes. Eine transiente Erhöhung der  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  trat nach Carbachol- und nach Melatoninstimulation auch in  $\text{Ca}^{2+}$ -freiem Medium auf (Abb. 1). Bei Stimulation mit Forskolin oder IBMX, einem Phosphodiesterasehemmer, wurden unterschiedliche Effekte beobachtet. 25

bzw. 20 % der Zellen reagierten auf Stimulation mit einer transienten Erhöhung der  $[Ca^{2+}]_i$ , einer Zunahme der Anzahl der Calcium-Spikes und einer Zunahme der Amplitude der Calcium-Spikes (Abb. 2).

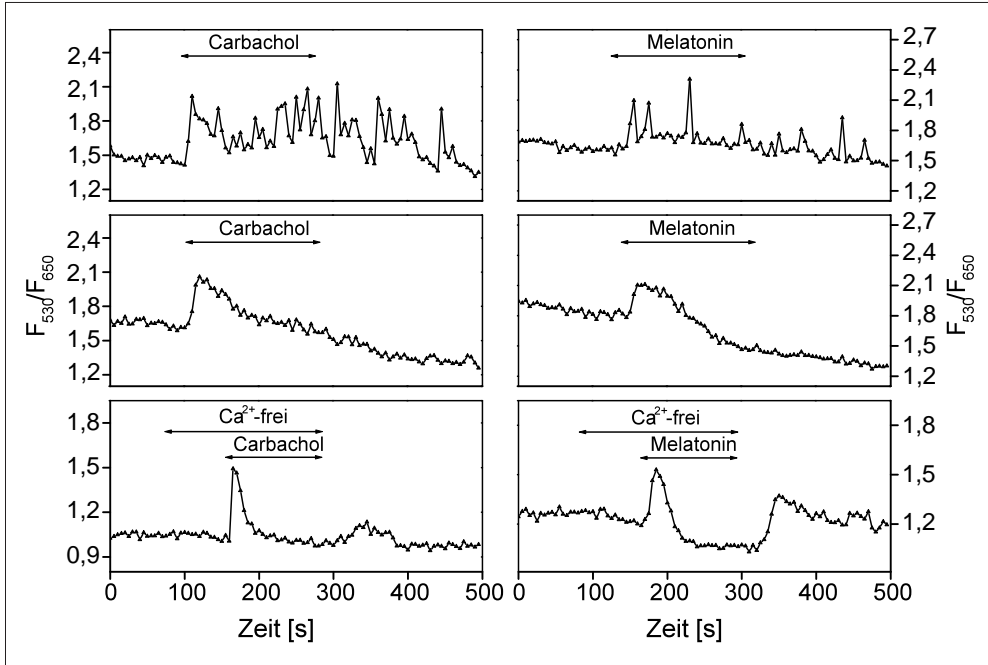


Abb. 1 Änderungen der intrazellulären  $Ca^{2+}$ -Konzentration in INS1-Zellen nach Stimulation mit  $300 \mu M$  Carbachol oder  $1 \mu M$  Melatonin (*oben, Mitte*). Die Stimulation erfolgte wie angegeben für 180 s. Gezeigt werden die Fluoreszenzdaten einzelner Zellen als typische Beispiele für die Reaktionen von 82 (Carbachol) und 194 (Melatonin) untersuchten Zellen. Stimulation von INS1-Zellen in  $Ca^{2+}$ -freiem Medium (*unten*). Die Zellen wurden zunächst für 85 s mit  $Ca^{2+}$ -freiem Medium perfundiert und anschließend für 130 s mit  $300 \mu M$  Carbachol oder  $1 \mu M$  Melatonin stimuliert. Gezeigt werden die Fluoreszenzdaten einzelner Zellen.

#### 4. Diskussion

Carbachol und Forskolin fördern die Insulinsekretion der INS1-Zelle. Carbachol erhöht die IP<sub>3</sub>-Konzentration, während Forskolin die Adenylatzyklase und konsekutiv cAMP stimuliert. Unsere Experimente bestätigen eine Erhöhung der  $[Ca^{2+}]_i$  in INS1-Zellen, sowohl durch Carbachol als auch durch Forskolin. Es konnte gezeigt werden, dass die Erhöhung der  $[Ca^{2+}]_i$  durch Stimulation sowohl mit Melatonin als auch mit Carbachol auf eine Leerung von intrazellulären Speichern (z. B. Endoplasmatisches Retikulum) zurückzuführen ist. Der Einfluss einer Melatoninpräinkubation auf Forskolin-induzierte Änderungen der intrazellulären  $Ca^{2+}$ -Konzentration von INS1 Zellen ist das Ziel weiterer Experimente.

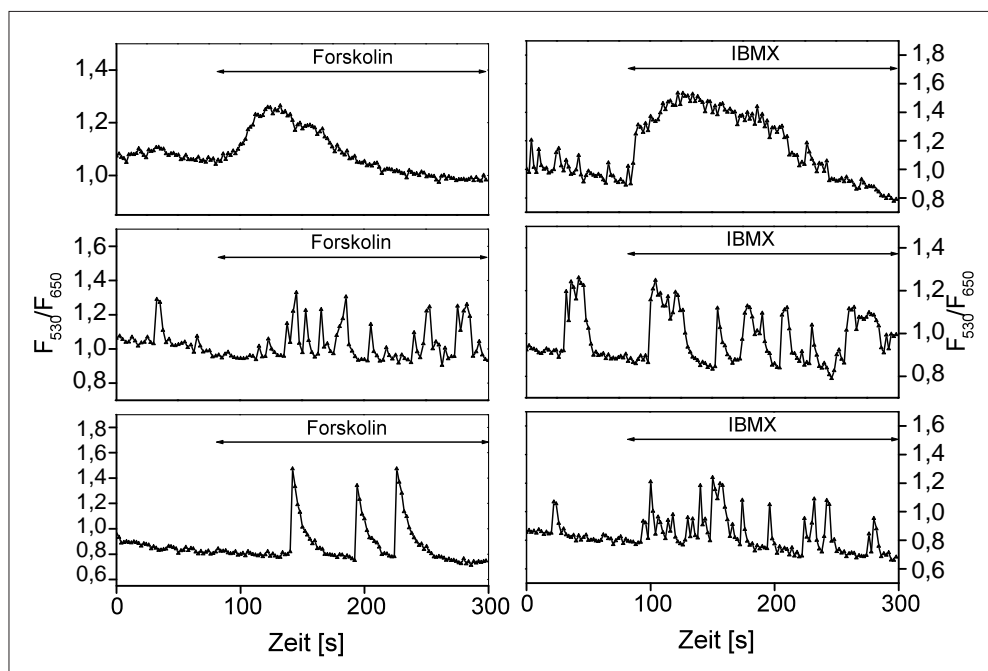


Abb. 2. Änderungen der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration in INS1-Zellen nach Stimulation mit  $1 \mu\text{M}$  Forskolin (*links*) oder  $10 \mu\text{M}$  IBMX (*rechts*). Die Stimulation erfolgte wie angegeben für 220 s. Gezeigt werden die Fluoreszenzdaten einzelner Zellen als typische Beispiele für die Reaktion von 275 (Forskolin) bzw. 332 (Melatonin) untersuchten Zellen.

Dr. Sabine WOLGAST  
 Sächsische Akademie der Wissenschaften zu Leipzig  
 Karl-Tauchnitz-Straße 1  
 04107 Leipzig  
 Bundesrepublik Deutschland  
 Tel.: +49 345 5571711  
 Fax: +49 345 5574053  
 E-Mail: sabine.wolgast@medizin.uni-halle.de



## **Altern in Deutschland**

Die Deutsche Akademie der Naturforscher Leopoldina und die Deutsche Akademie für Technikwissenschaften acatech gründeten im Mai 2005 eine gemeinsame interdisziplinäre Akademiengruppe „Altern in Deutschland“, die auf der Grundlage der besten verfügbaren wissenschaftlichen Evidenz öffentliche Empfehlungen erarbeitete, um die Chancen der im letzten Jahrhundert erheblich gestiegenen Lebenserwartung – die „gewonnenen Jahre“ – vernünftig zu nutzen und mit den Herausforderungen des demographischen Alterns klug umzugehen.

### **Nova Acta Leopoldina N. F.**

Bd. 99, Nr. 363 – Altern in Deutschland Band 1

#### **Bilder des Alterns im Wandel**

Herausgegeben von Josef EHMER und Otfried HÖFFE unter Mitarbeit von Dirk BRANTL und Werner LAUSECKER

(2009, 244 Seiten, 32 Abbildungen, 1 Tabelle, 24,00 Euro, ISBN: 978-3-8047-2542-3)

Bd. 100, Nr. 364 – Altern in Deutschland Band 2

#### **Altern, Bildung und lebenslanges Lernen**

Herausgegeben von Ursula M. STAUDINGER und Heike HEIDEMEIER

(2009, 279 Seiten, 35 Abbildungen, 9 Tabellen, 24,00 Euro, ISBN: 978-3-8047-2543-0)

Bd. 101, Nr. 365 – Altern in Deutschland Band 3

#### **Altern, Arbeit und Betrieb**

Herausgegeben von Uschi BACKES-GELLNER und Stephan VEEN

(2009, 157 Seiten, 29 Abbildungen, 20 Tabellen, 24,00 Euro, ISBN: 978-3-8047-2544-7)

Bd. 102, Nr. 366 – Altern in Deutschland Band 4

#### **Produktivität in alternden Gesellschaften**

Herausgegeben von Axel BÖRSCH-SUPAN, Marcel ERLINGHAGEN, Karsten HANK, Hendrik JÜRGES und Gert G. WAGNER

(2009, 157 Seiten, 28 Abbildungen, 2 Tabellen, 24,00 Euro, ISBN: 978-3-8047-2545-4)

Bd. 103, Nr. 367 – Altern in Deutschland Band 5

#### **Altern in Gemeinde und Region**

Stephan BEETZ, Bernhard MÜLLER, Klaus J. BECKMANN und Reinhard F. HÜTTL

(2009, 210 Seiten, 10 Abbildungen, 11 Tabellen, 24,00 Euro, ISBN: 978-3-8047-2546-1)

Bd. 104, Nr. 368 – Altern in Deutschland Band 6

#### **Altern und Technik**

Herausgegeben von Ulman LINDENBERGER, Jürgen NEHMER, Elisabeth STEINHAGEN-THIESSEN, Julia DELIUS und Michael SCHELLENBACH

(2011, 174 Seiten, 42 Abbildungen, 8 Tabellen, 24,00 Euro, ISBN: 978-3-8047-2547-8)

Bd. 105, Nr. 369 – Altern in Deutschland Band 7

#### **Altern und Gesundheit**

Herausgegeben von Kurt KOCHSIEK

(2009, 302 Seiten, 46 Abbildungen, 18 Tabellen, 24,00 Euro, ISBN: 978-3-8047-2548-5)

Bd. 106, Nr. 370 – Altern in Deutschland Band 8

#### **Altern: Familie, Zivilgesellschaft, Politik**

Herausgegeben von Jürgen KOCKA, Martin KOHLI und Wolfgang STRECK unter Mitarbeit von Kai BRAUER und Anna K. SKARPELIS

(2009, 343 Seiten, 44 Abbildungen, 9 Tabellen, 24,00 Euro, ISBN: 978-3-8047-2549-2)

Bd. 107, Nr. 371 – Altern in Deutschland Band 9

#### **Gewonnene Jahre. Empfehlungen der Akademiengruppe Altern in Deutschland**

(1. Aufl. 2009, 2. Aufl. 2010, 102 Seiten, 1 Abbildung, 12,00 Euro, ISBN: 978-3-8047-2550-8)

*Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft Stuttgart*

ISSN: 0369-5034

ISBN: 978-3-8047-2942-1