

Das circadiane System der Säugetiere – integraler Bestandteil des neuroendokrinen Systems

Einleitung

Wenn wir über die Leistungen des menschlichen Gehirns nachdenken, so kommt uns in erster Linie in den Sinn, dass wir durch dieses Organ in die Lage versetzt werden, zu denken und zu sprechen, unsere Umwelt und uns selbst zu erkennen, an Vergangenes zu erinnern und Gedanken über unsere Zukunft zu fassen. Vor diesen, für den Menschen besonders charakteristischen, kognitiven Fähigkeiten treten andere, durchaus lebensnotwendige Funktionen des Gehirns häufig in den Hintergrund, weil wir sie nicht bewusst wahrnehmen. Dennoch bleibt festzuhalten, dass das Gehirn die größte und bedeutendste Hormon bildende Drüse des menschlichen Körpers ist, die zahlreiche Stoffwechselfunktionen und fast alle endokrinen Drüsen in der Peripherie steuert, wie z. B. Schilddrüse, Nebennieren, Eierstöcke und Hoden. Das Fundament für diese Erkenntnis wurde im letzten Jahrhundert durch Ernst und Berta Scharer und Wolfgang Bargmann gelegt. Ernst und Berta Scharer, die von 1933 bis zu ihrer Emigration in die Vereinigten Staaten 1937 am von Ludwig Edinger gegründeten Neurologischen Institut in Frankfurt gearbeitet haben, stellten erstmals im Jahre 1937 ein weit gespanntes, in großen Teilen noch heute gültiges Konzept zur Entstehung, Lage und Funktion der Hormon bildenden Abschnitte im Gehirn vor (Scharer und Scharer, 1937; Bargmann, 1954; siehe Oksche, 1987, 1997; Korf, 1995). Diese Teile des Gehirns werden unter dem Begriff „Neuroendokrine Systeme“ zusammengefasst; die Disziplin, die sich der Erforschung dieser Systeme widmet, wird als „Neuroendokrinologie“ bezeichnet (Scharer und Scharer, 1963; Korf und Usadel, 1997).

Im vorliegenden Aufsatz soll eines dieser neuroendokrinen Systeme genauer beleuchtet werden, das circadiane System. Dieses System baut unsere „innere“ oder „biologische“ Uhr auf und stellt sicher, dass unser Leben einem sinnvollen und optimal an die Umwelt angepassten Zeitablauf folgt. Das richtige Ticken der inneren Uhr ist eine entscheidende Voraussetzung für unser Wohlbefinden und unsere Gesundheit.

Phänomenologie biologischer Rhythmen

Unter natürlichen Bedingungen folgen zahlreiche Körperfunktionen einem Rhythmus, der alle 24 Stunden wiederkehrt, also eine Periodenlänge von 24 Stunden hat.

Beispielhaft seien hier Puls und Blutdruck, die Körpertemperatur und die Sekretionsraten von Kortisol aus der Nebennierenrinde, vom Schilddrüsen-stimulierenden Hormon TSH aus dem Hypophysenvorderlappen und von Melatonin aus der Epiphysis cerebri genannt (Abb. 1). Körpertemperatur, Puls und Blutdruck zeigen beim Menschen ein Tief in der zweiten Nachthälfte, zu diesem Zeitpunkt erreicht die Melatonin-Konzentration im Blut ihr Maximum. Der Kortisolspiegel sinkt auf ein Minimum nach Mitternacht, während die TSH-Konzentration zu dieser Zeit ihr Maximum zeigt. Interessanterweise ist auch die Wirkung von Medikamenten sehr stark von der Tageszeit abhängig, zu der sie gegeben werden. Dieses von der gegenwärtigen Medizin viel zu wenig beachtete Phänomen ist Gegenstand der Chronopharmakologie, die sich zum Ziel gesetzt hat, den optimalen Zeitpunkt für die Gabe von bestimmten Medikamenten, z. B. von Zytostatika bei Krebspatienten, zu ermitteln. Besonders augenfällig und ohne jegliche Hilfsmittel messbar ist der biologische Rhythmus in unserem Schlaf/Wach-Verhalten; als tagaktive Primaten haben wir unsere Schlaf- und Ruhephase in der Nacht und sind während der Hellphase des Tages aktiv. Während der Schlafphasen wird unser deklaratives Gedächtnis konsolidiert (Gais und Born, 2004).

Für das Verständnis von Aufbau und Funktion der inneren Uhr sind folgende Beobachtungen wichtig. Halten sich Mensch oder Tier in einer Umwelt mit natürlichem Tag/Nacht-Wechsel auf, so wiederholt sich der Rhythmus aller ihrer Körperfunktionen Tag für Tag, d. h., er hat eine Periodenlänge von genau 24 Stunden und folgt somit exakt der Länge des astrophysikalischen Tages. Entzieht man nun Mensch oder Tier den täglichen Wechsel von Helligkeit und Dunkelheit, indem man z. B. Menschen in einen fensterlosen unterirdischen Bunker verbringt oder Versuchstiere unter Dauerdunkelheit hält, so geht der Rhythmus in den verschiedenen Körperfunktionen keinesfalls verloren, aber seine Periodenlänge verändert sich und weicht geringfügig von der Länge des astrophysikalischen Tages ab. Lebewesen sind also in der Lage, ohne jegliche Zeitsignale aus der Umwelt, endogen, d. h. aus sich selbst heraus, durch eine innere Uhr einen Rhythmus zu erzeugen. Die Länge dieses von der Uhr endogen erzeugten Rhythmus entspricht nicht genau, sondern nur ungefähr (circa) den 24 Stunden eines natürlichen Tages und wird deshalb als circadianer Rhythmus bezeichnet. Ähnlich wie beim natürlichen Tag/Nacht-Rhythmus las-

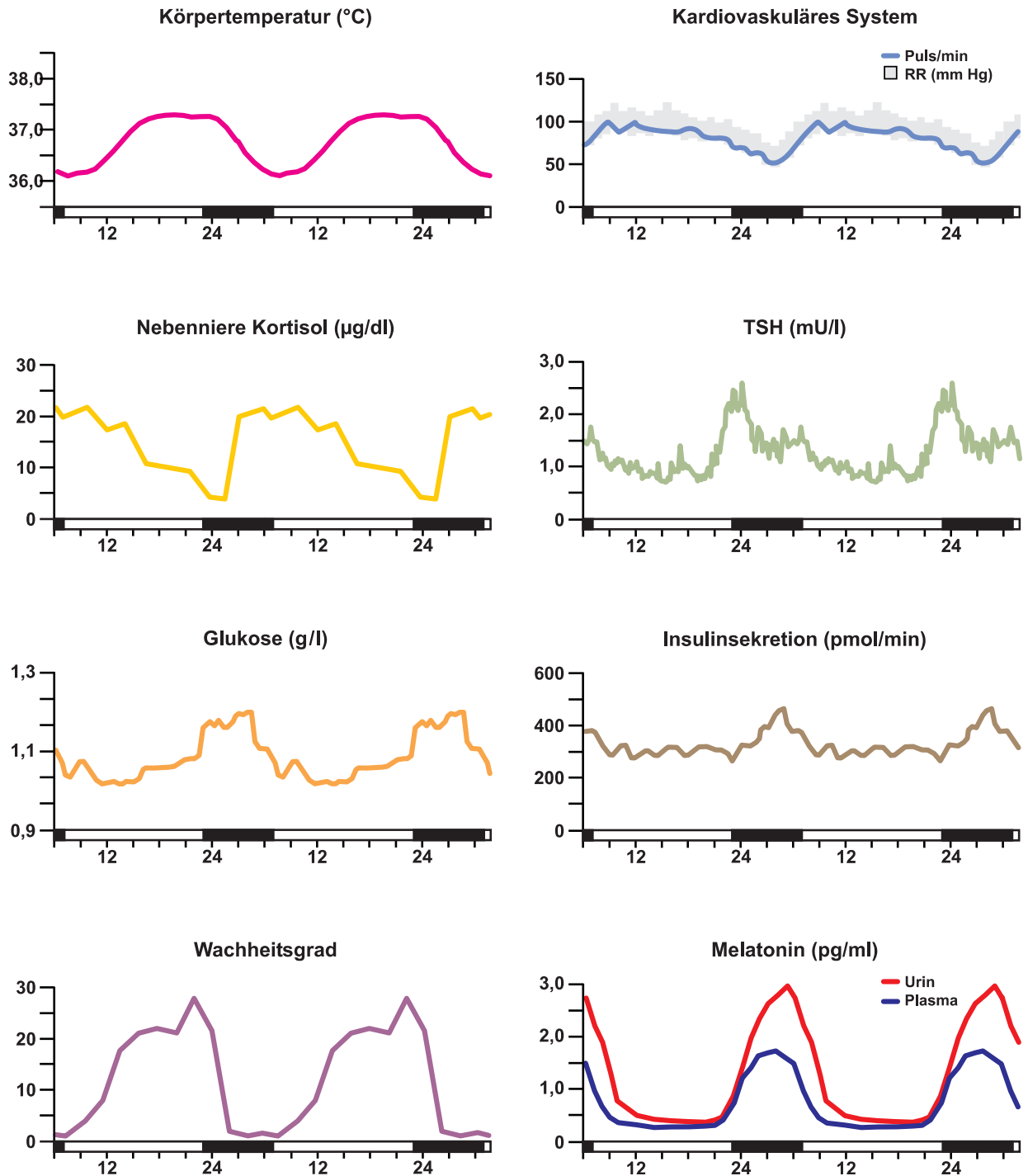


Abb. 1: Tag/Nacht-Rhythmen der Körpertemperatur und Pulsfrequenz, des Blutdrucks (RR), Wachheitsgrads und Blutzuckerspiegels sowie der Sekretion von Kortisol (aus der Nebennierenrinde), TSH (aus dem Hypophysenvorderlappen), Insulin (aus den B-Zellen der LANGERHANSschen Inseln im Pankreas) und Melatonin (aus der Zirbeldrüse des Gehirns). Gezeigt sind die Profile für zwei aufeinander folgende Tage. Die Schlafphase (Dunkelperiode) ist auf der Abszisse mit einem schwarzen Balken, die Wachphase mit einem weißen Balken gekennzeichnet. Modifiziert nach Dunlap, Loros, DeCoursey, 2004

sen sich auch beim circadianen Rhythmus Tag- und Nachtphasen unterscheiden, die als „subjektiver“ Tag und „subjektive“ Nacht bezeichnet werden (im Gegensatz

zur objektiven Nacht und zum objektiven Tag des astro-physikalischen Tages). Bei den nachtaktiven Tieren (also bei Mäusen, Ratten oder Hamstern) sind der Beginn der

subjektiven Nacht durch den Beginn der lokomotorischen Aktivität und der Beginn des subjektiven Tages durch das Ende der lokomotorischen Aktivität determiniert. Interessanterweise ist die Periodenlänge der circadianen Rhythmen bei unterschiedlichen Tierarten verschieden: Beim Menschen liegt sie in aller Regel bei 25 Stunden (Aschoff, 1965); bei bestimmten Hamsterarten beträgt sie nur 22,5 Stunden (Ralph und Menaker, 1988). Bei Individuen derselben Art ist die Länge des circadianen Rhythmus jedoch konstant. Diese Beobachtungen belegen bereits, dass die Länge des circadianen Rhythmus genetisch festgelegt ist. Gedanklich und sprachlich sind also zwei verschiedene Typen von Rhythmen strikt zu unterscheiden: der Tag/Nacht-Rhythmus, dessen Länge genau 24 Stunden beträgt, und der circadiane Rhythmus, dessen Periodenlänge geringfügig von der des Tag/Nacht-Rhythmus abweicht. Um den circadianen Rhythmus aufzuzeichnen und zu erfassen, ist es notwendig, den Menschen oder die Tiere von den natürlichen Umweltbedingungen zu isolieren. Den Tag/Nacht-Rhythmus beobachten wir immer dann, wenn Menschen oder Tiere unter den natürlichen Lichtverhältnissen der Umgebung mit dem charakteristischen Hell-Dunkel-Wechsel leben.

Dieses soll am Beispiel klassischer, weltberühmter Experimente verdeutlicht werden, die Jürgen Aschoff in den 60iger Jahren des letzten Jahrhunderts am Max-Planck-Institut für Verhaltensphysiologie in Erling-Andechs durchgeführt hat (Aschoff, 1965). Freiwillige Versuchspersonen lebten für einen Zeitraum von mehreren Wochen in einem unterirdischen Bunker ohne jegliche Informationen über die Uhrzeit; der natürliche Tag/Nacht-Wechsel war für die Versuchspersonen nicht zu erkennen, da die Bunker fensterlos waren. Während der ersten Tage des Aufenthaltes wurde den Versuchspersonen ein Tag/Nacht-Rhythmus mit einer Länge von 24 Stunden vor-

gegeben, indem das künstliche Licht im Bunker von außen automatisch an- und ausgeschaltet wurde; anschließend konnten die Versuchspersonen die Beleuchtungsverhältnisse selbst an- und ausschalten: Die Periodenlänge ihres Aktivitätsrhythmus verlängerte sich auf ca. 25 Stunden. Fehlt also ein von außen vorgegebener Licht-Dunkel-Wechsel, so folgt der Körper dem endogenen, circadianen Rhythmus der inneren Uhr mit einer Periodenlänge von 25 Stunden. Es ist also festzuhalten, dass die innere Uhr des Menschen verglichen mit dem astrophysikalischen Tag um eine Stunde nachgeht. Wenn wir im natürlichen Tag/Nacht-Rhythmus leben, wird unsere innere Uhr mit dem 24-Stunden-Rhythmus der Umwelt synchronisiert. Reize aus der Umwelt, die unseren circadianen Rhythmus mit dem Rhythmus eines astrophysikalischen Tages synchronisieren, werden nach Jürgen Aschoff Zeitgeber genannt. Der wichtigste Zeitgeber für die Synchronisation von Umweltrhythmen und circadianen Rhythmen ist bei allen Lebewesen der natürliche Tag/Nacht-(Hell-Dunkel-)Wechsel.

Grundbausteine der inneren Uhr

Aus dieser Phänomenologie lassen sich die Grundbausteine der inneren Uhr ableiten (Abb. 2): Die Schlüsselkomponente des Systems ist ein endogener, autonom arbeitender Schrittmacher, der den circadianen Rhythmus generiert. Dieser Schrittmacher muss verbunden sein mit Sinneszellen, die ihm die synchronisierenden Reize aus der Umwelt, also die Zeitgeber, vermitteln. Der wichtigste Zeitgeber ist der Licht-Dunkel-Wechsel, es ist deshalb vorauszusagen, dass der endogene Schrittmacher Signale von Lichtsinneszellen erhält. Weiterhin ist für komplexe vielzellige Lebewesen wie die Säugetiere zu postulieren,

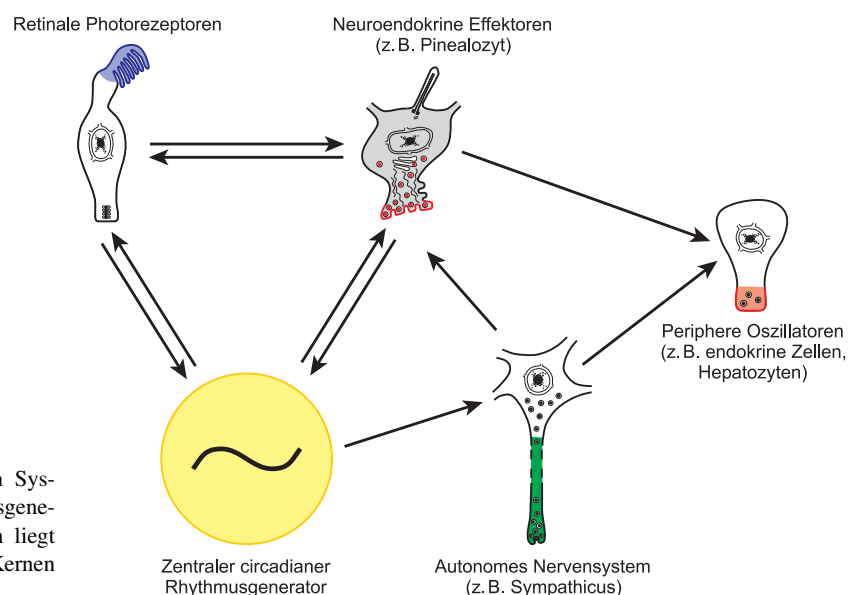


Abb. 2: Grundbausteine des circadianen Systems. Der zentrale circadiane Rhythmusgenerator der Säugetiere und des Menschen liegt in den paarigen suprachiasmatischen Kernen des Hypothalamus.

dass der circadiane Schrittmacher mit Elementen verbunden ist, die seine Signale über neuronale, neuroendokrine und endokrine Mechanismen an den restlichen Organismus vermitteln. Interessanterweise ist die Mehrzahl dieser Elemente im Gehirn untergebracht: Bei Nichtsäugetieren sind sie in einem einzigen Hirnteil, der Zirbeldrüse oder Epiphysis cerebri, konzentriert, bei Säugetieren liegen sie räumlich getrennt, aber noch immer im gleichen Hirnabschnitt, dem Zwischenhirn (Diencephalon). Dieser Aufsatz wird sich ausschließlich mit dem circadianen System der Säugetiere befassen. Aspekte des circadianen Systems der Nichtsäugetiere finden sich bei Korf und Stehle (2002).

Für die weitere Beschreibung werden Ratten und Mäuse als Versuchstiere herangezogen, da hier die notwendigen experimentellen Eingriffe vorgenommen werden können, um zelluläre und molekulare Mechanismen zu studieren, die die Uhr aufbauen. Die Grundprinzipien dieser Mechanismen sind bei Menschen und Nagetieren gleich, so dass wir aus den Untersuchungen an Versuchstieren Erkenntnisse gewinnen können, die auf den Menschen übertragbar sind. Dieses belegt einmal mehr den hohen Stellenwert von Tierversuchen in der biomedizinischen Forschung.

Der zentrale circadiane Schrittmacher in den Nuclei suprachiasmatici

Der zentrale circadiane Schrittmacher der Säugetiere ist in paarigen, bilateral angeordneten Ansammlungen von Nervenzellen in der untersten Etage des Zwischenhirns, dem Hypothalamus, über der Sehnervenkreuzung lokalisiert, die als Nuclei suprachiasmatici (SCN) bezeichnet werden (Abb. 3). Die Lichtinformation für die innere Uhr der Säugetiere kommt aus der Netzhaut der Augen. Ein wichtiges Ausgangssignal der Uhr, das gewissermaßen als deren Zeiger fungiert, liefert die Zirbeldrüse in Form ihres Hormons Melatonin.

Bei Mäusen und Ratten enthält ein SCN jeweils ca. 10 000 Nervenzellen, die allesamt als Neurotransmitter GABA (Gamma-Aminobuttersäure) verwenden (Moore et al., 2002). Neben diesem klassischen Neurotransmitter enthalten bestimmte SCN-Nervenzellen noch unterschiedliche Neuropeptide, die in verschiedenen Unterabschnitten des Kerngebiets lokalisiert sind und nach Moore (vgl. Moore et al., 2002) eine Einteilung des SCN in ein Zentrum („core“) und eine Schale („shell“) erlauben. Andere Autoren unterscheiden ein ventrolaterales von einem dorsomedialen Areal des SCN. Die letztere Terminologie ist jedoch nur auf bestimmte Nagetierarten anzuwenden, während die Einteilung in Zentrum und Schale auch auf Primaten und den Menschen angewendet werden kann. Im Zentrum (entspricht bei Ratten und Mäusen dem ventrolateralen Abschnitt) des SCN finden sich viele Neurone, die zusätzlich zu GABA das Neuro-

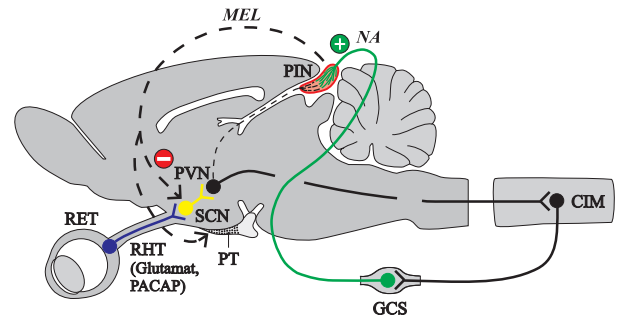


Abb. 3: Schaltkreise des circadianen Systems, projiziert auf einen mediosagittalen Schnitt durch das Gehirn einer Ratte. Der zentrale circadiane Rhythmusgenerator liegt in den bilateral angeordneten suprachiasmatischen Kernen (SCN) im Hypothalamus unmittelbar oberhalb der Sehnervenkreuzung. Bei Nagetieren enthält jeweils ein Kern 10 000 Nervenzellen. Die Informationen über Helligkeit und Dunkelheit werden den SCN über eine spezialisierte Untereinheit des Sehnerven, den retinohypothalamischen Trakt (RHT), vermittelt. Dieser entspringt von einer Unterklasse von retinalen Ganglienzellen, die als Botenstoffe den Neurotransmitter Glutamat und das Neuropeptid PACAP (pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide) verwenden. Die SCN übertragen ihre rhythmischen Signale über neuroendokrine oder neuronale/synaptische Mechanismen. Die Übertragung neuronaler/synaptischer Ausgangssignale erfolgt über recht kurze Nervenbahnen, die überwiegend in benachbarte Kerngebiete im Hypothalamus projizieren. Eine wichtige Schaltstation für die Anbindung des circadianen Rhythmusgenerators an das autonome Nervensystem sind die bilateral angeordneten paraventriculären Kerne des Hypothalamus (PVN). Von hier ziehen lange absteigende Nervenbahnen zu den zentralen sympathischen Neuronen, die als paarige *Columnae intermediolaterales* (CIM) in den oberen thorakalen Segmenten des Rückenmarkes liegen. Diese Neurone innervieren mit sogenannten „präganglionären Fasern“ die *Ganglia cervicalia superiora* (GCS), die unterhalb der Schädelbasis in enger Nachbarschaft zur linken und rechten *Arteria carotis interna* lokalisiert sind und die peripheren sympathischen Ganglienzellen enthalten. Von den GCS entspringen „postganglionäre“ Nervenfasern, die den Neurotransmitter Noradrenalin (NA) enthalten und in Begleitung der Arterien und Kapillaren in alle Bereiche des Kopfes gelangen. Eine für das circadiane System besonders wichtige Nervenverbindung zieht von den GCS zur Zirbeldrüse (Pinealorgan, PIN). Teile dieser Verbindung bilden oberhalb des *Tentorium cerebelli* zwei eigenständige paarige Nerven (*Nervi conarii*). Im Pinealorgan enden die NA-haltigen Nervenfasern als freie Nervenendigungen. Noradrenalin, das zur Nachtzeit auf diesen Nervenendigungen ausgeschüttet wird, stimuliert die Bildung und Freisetzung von Melatonin (MEL), dem spezifischen Neurohormon der Zirbeldrüse. Melatonin wirkt im Sinne einer Rückkopplungsschleife auf den zentralen circadianen Rhythmusgenerator im SCN zurück; der SCN enthält zwei spezifische Melatonin-Rezeptoren (Mel1a [MT1] und Mel1b [MT2]). Melatonin kann zu bestimmten Zeitfenstern die neuronale Aktivität im SCN unterdrücken und die Phasenlage des circadianen Rhythmusgenerators verändern. Ein weiterer Angriffsort für Melatonin ist die Pars tuberalis (PT) der Adenohypophyse, die ebenfalls eine hohe Dichte von Mel1a-Rezeptoren enthält. Die PT beeinflusst über bisher nicht identifizierte Wirkstoffe die Aktivität der Zellen im Hypophysenvorderlappen. Besonders gut untersucht ist der Effekt von Melatonin an der PT auf die Prolactinbildung in den lactotrophen Hypophysenzellen. Ein lang andauerndes Melatonin-Signal, wie es in langen Winternächten vorkommt, hemmt die Prolactinausschüttung. Dieser Mechanismus ist eine wichtige Grundlage für die saisonale Kontrolle des Fortpflanzungsverhaltens bei photoperiodischen Tieren.

peptid VIP (Vasoaktives Intestinales Peptid) enthalten. Diese SCN-Region empfängt die Licht/Dunkel-Signale aus der Netzhaut. Hier enden die Axone des retinohypothalamischen Traktes (s. u.). In der Schale des SCN (entspricht bei Mäusen und Ratten dem dorsomedialen SCN-Abschnitt) liegen Neurone, die neben GABA das Neuropeptid Vasopressin enthalten. Diese Neurone bilden eine wichtige Efferenz für die Uhr. Über kurze axonale Verbindungen werden zahlreiche hypothalamische Kerngebiete innerviert. Darüber hinaus geben diese Neurone das Vasopressin auch auf neuroendokrinen Wege in den Liquor cerebrospinalis ab. Der Vasopressinspiegel im Liquor cerebrospinalis weist einen charakteristischen Tag/Nacht-Rhythmus auf.

Heute können einzelne Nervenzellen aus dem SCN von Ratten oder Mäusen isoliert und in einem Kultursystem für mehrere Monate am Leben erhalten werden. Wie alle Nervenzellen bilden auch die SCN-Zellen elektrische Signale in Form von Aktionspotentialen aus. Mit Multi-elektrodenplatten können die Aktionspotentiale von vielen einzelnen isolierten SCN-Neuronen über einen Zeitraum von mehreren Tagen und Wochen abgeleitet werden (Welsh et al., 1995). Diese Experimente zeigten, dass jede einzelne Nervenzelle des SCN in der Lage ist, einen circadianen Rhythmus aufzubauen. Die Erzeugung eines circadianen Rhythmus ist also primär nicht an einen Verband von Nervenzellen (ein sog. neuronales Netzwerk) gebunden, sondern sie ist eine Eigenschaft von einzelnen Zellen. Die isolierten Nervenzellen schwingen jedoch alle in unterschiedlichen Phasen. Da der im gesamten SCN-Kerngebiet erzeugte circadiane Rhythmus sich jedoch in gleicher Phase befindet, muss also der Verband der 10000 Einzelneuronen synchronisiert werden. Als chemischer Vermittler dieser Synchronisation wurde der Neurotransmitter GABA identifiziert (Liu und Reppert, 2000), der ja von jeder SCN-Nervenzelle gebildet wird (s. o.). Wahrscheinlich kommt auch den gasförmigen Botenstoffen Stickstoffmonoxid (NO) oder Kohlenmonoxid (CO) eine synchronisierende Wirkung zu.

Die Erforschung der molekularen Grundlagen für die Erzeugung eines circadianen Rhythmus hat in der letzten Dekade zur Entdeckung von sogenannten „Uhrengenen“ geführt, deren Translationsprodukte als aktivierende oder hemmende Transkriptionsfaktoren (TF) die Expression von Genen an- oder abschalten können (Abb. 4). Die Tatsache, dass die Uhr in unserem Erbgut (Genom) verankert ist, erklärt, dass die Periodenlänge des circadianen Rhythmus bei einer Tierart so konstant ist. Überraschend war die Erkenntnis, dass viele Uhrengene ein hohes phylogenetisches Alter haben und schon bei einfachsten einzelligen Lebewesen vorkommen (Dunlap et al., 2004).

Nach dem momentan gültigen Verständnis besteht die molekulare Basis der Rhythmusgeneration in den Zellen des SCN aus interagierenden transkriptional/translationalen Rückkopplungsschleifen, in denen Uhrengene und die von ihnen kodierten Transkriptionsfaktoren miteinan-

der agieren (Abb. 4). Der zentrale Mechanismus ist eine Aktivierung der Transkription der Uhrengene aus der *Period(Per1–3)*- und *Cryptochrom(Cry1,2)*-Familie durch die aktivierenden *basic-helix-loop-helix*-Transkriptionsfaktoren CLOCK und BMAL1. CLOCK und BMAL1 lagern sich zu Heterodimeren zusammen, werden in den Zellkern transportiert und induzieren dort die Expression von *Per* und *Cry*, indem sie an eine sogenannte E-Box im Promotorelement dieser Gene binden. PER- und CRY-Dimere wiederum unterdrücken mit einer zeitlichen Verzögerung die aktivierende Wirkung des CLOCK/BMAL1-Heterodimers, vermutlich durch Bildung eines großen negativen Komplexes. Die Konzentration von PER1-Protein wird durch den Grad der Proteinphosphorylierung durch die Caseinkinase 1ε bestimmt; phosphoryliertes PER-Protein wird durch proteasomale Proteolyse abgebaut (Reppert und Weaver, 2002). Die Bedeutung der Phosphorylierung der PER-Proteine für die Aufrechterhaltung des circadianen Rhythmus konnte auch beim Menschen gezeigt werden. Das familiär auftretende FASPS (familial advanced sleep phase syndrome), bei dem die Patienten bereits sehr früh zu Beginn der Nacht in Schlaf verfallen, basiert auf einer Mutation des *Per2*-Gens, die die Phosphorylierung von PER2-Protein verhindert (Toh et al., 2001). Durch die Zusammenlagerung von PER- und CRY-Proteinen scheinen auch die Ubiquitylierung von CRY-Proteinen und der damit verbundene proteasomale Abbau verhindert zu werden (vgl. Okamura et al., 2002). Die transkriptionale/translationale Rückkopplungsschleife zwischen CLOCK/BMAL1 und PER/CRY bildet den zentralen Mechanismus der circadianen Rhythmogenese; dieser wird durch Schleifen auf einer zweiten Ebene ergänzt, an denen sogenannte PAR-(Proline and Acidic amino acid-Rich-)Proteine, z. B. HLF (Hepatic Leucocyte Factor), TEF (Thyrotrophic Embryonic Factor) und DBP (Albumin D-site-binding Protein), beteiligt sind (Okamura et al., 2002). Den molekularen Ausgang der circadianen Rhythmogenese im SCN bilden sogenannte Uhren-kontrollierte Gene (clock-controlled genes, ccg), die ebenfalls eine E-Box in ihrem Promoter besitzen und deren Transkription durch CLOCK/BMAL1 aktiviert und durch PER und CRY inaktiviert wird. Ein solches Uhren-kontrolliertes Gen kodiert die Vorstufe des Vasopressins (Jin et al., 1999), das vom SCN rhythmisch in den Liquor cerebrospinalis abgegeben wird (s. o.). Microarray-Analysen haben gezeigt, dass mehrere hundert Gene in verschiedenen Organen der Peripherie in einem rhythmischen Muster exprimiert werden und als Uhren-kontrollierte Gene aufzufassen sind (Hastings et al., 2003).

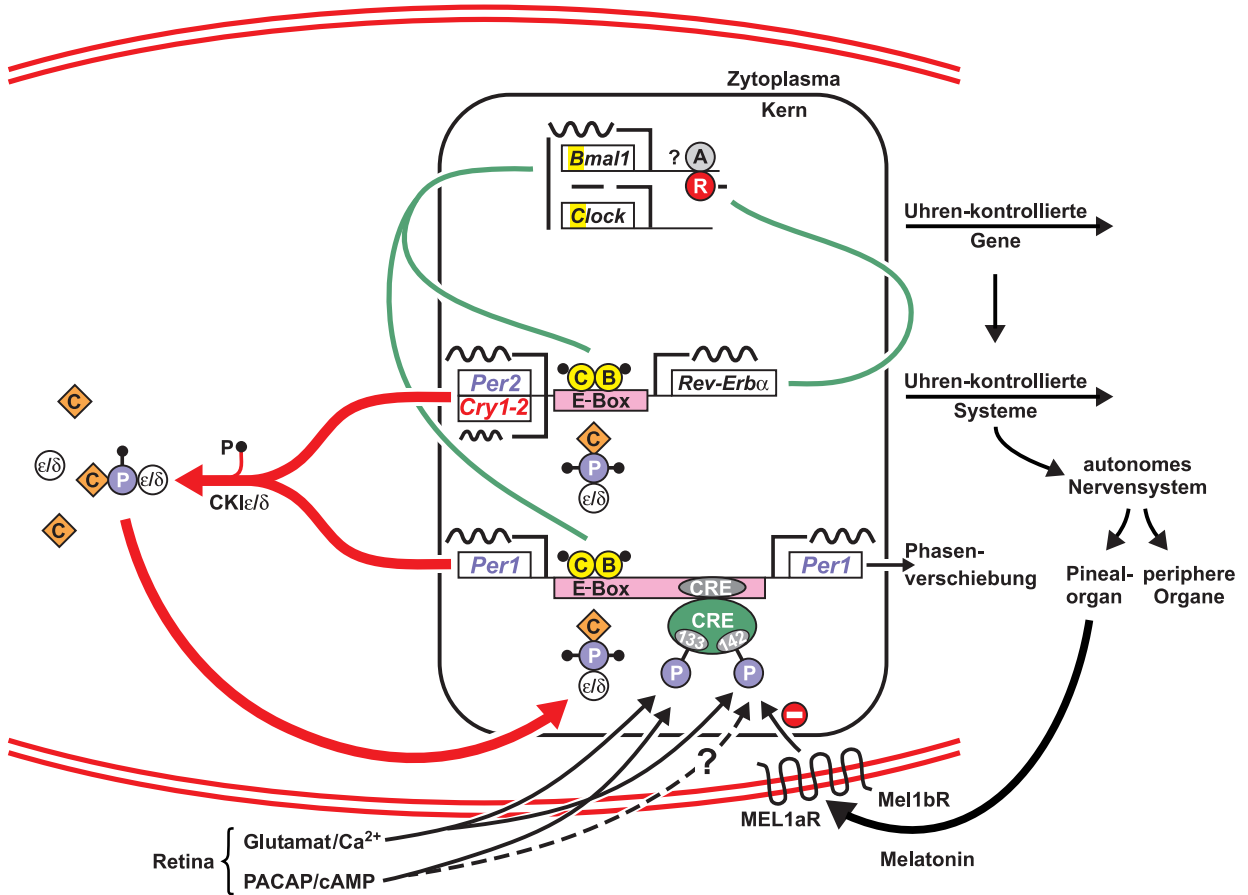


Abb. 4: Molekulare Grundlagen der circadianen Rhythmogenese im SCN. Die Uhrzeitgene *Bmal1* und *Clock* kodieren die aktivierenden bHLH(basic helix loop helix)-Transkriptionsfaktoren BMAL1 (B) und CLOCK (C). *Clock* wird konstant exprimiert, die Expression von *Bmal1* ist rhythmisch. Nach Translation der mRNAs lagern sich jeweils ein CLOCK- und ein BMAL1-Proteinmolekül zu einem Dimer zusammen, das in den Zellkern transloziert wird und an eine sogenannte „E-Box“ bindet, die im Promoter von anderen Uhrzeitgenen oder Uhrzeitkontrollierten Genen vorkommt. Nach Bindung an die E-Box induzieren CLOCK/BMAL1 die Expression der Uhrzeitgene *Per1,2*; *Cry1,2*; *Rev-Erbα*, die hemmende Faktoren kodieren. Auch hier werden Heterodimere, z. B. von PER1/CRY1, gebildet. Ein wichtiger Mechanismus, der die Bildung dieser Heterodimere kontrolliert, ist die Proteinphosphorylierung durch die Caseinkinasen 1 ϵ / δ (CK1 ϵ / δ). So wird z. B. PER1 nach Phosphorylierung (P) durch die CK1 ϵ / δ unmittelbar durch proteosomale Proteolyse abgebaut. Erst nachdem genügend hohe Konzentrationen von nichtphosphoryliertem PER1 zur Verfügung stehen, kann es zur Bildung von PER1/CRY1-Heterodimeren kommen, die in den Kern transloziert werden. Die genauen Mechanismen, über die PER1/CRY1-Heterodimere die aktivierenden Effekte von CLOCK/BMAL1 unterdrücken, sind bisher nicht bekannt. Postuliert wird eine Interaktion zwischen den PER/CRY-Heterodimeren und CLOCK. Der Transkriptionsfaktor REV-ERB α beeinflusst die Transkription von *Bmal1* über einen ROR-Rezeptor. Informationen aus der transkriptional/translationalen Rückkopplungsschleife der circadianen Rhythmogenese werden über sogenannte Uhrzeitkontrollierte Gene exportiert, deren Promoter ebenfalls eine E-Box enthält. Es ist anzunehmen, dass Uhrzeitkontrollierte Gene auch die rhythmische elektrische Aktivität der SCN-Neurone steuern, über die neuronale Signale an Uhrzeitkontrollierte Systeme, z. B. das autonome Nervensystem, Pinealorgan und andere endokrine Organe vermitteln. Für die Synchronisation des circadianen Rhythmus mit dem Tag/Nacht-Rhythmus sind Lichtreize von essentieller Bedeutung. Diese werden über die Neurotransmitter des retinohypothalamischen Traktes, Glutamat und PACAP, vermittelt. Lichtreize verschieben die Phase des circadianen Rhythmus allerdings nur zu bestimmten Zeitfenstern (während der Nacht). Solche phasenverschiebenden Reize gehen stets mit einer Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors CREB (cyclic AMP response element [CRE] binding protein) einher. Phosphoryliertes CREB lagert sich zu Homodimeren zusammen, die an ein CRE binden. Für die Synchronisation des circadianen Rhythmus spielt die CRE-abhängige Induktion von *Per1* eine entscheidende Rolle. Die Applikation von Lichtreizen bzw. Glutamat während der Nacht induziert die Phosphorylierung von CREB an den Serinresten 133 und 142; erst durch diese doppelte Phosphorylierung erreicht CREB seine volle transkriptionale Aktivierungskapazität. Transgene Mäuse, bei denen die CREB-Ser142-Phosphorylierungsstelle durch Punktmutation ausgeschaltet wurde, zeigen nach nächtlichen Lichtreizen eine wesentlich schwächere Induktion von *Per1* und auch geringere Phasenverschiebung ihres circadianen Rhythmus in der Lokomotion. PACAP induziert Phasenverschiebungen und CREB Phosphorylierung an Ser133 am Ende des Tages. Diese Effekte von PACAP werden durch Melatonin aufgehoben, das seine Signale an den SCN über zwei verschiedene Melatonin-Rezeptoren (Mel1a und Mel1b) vermitteln kann.

Neuronale Eingangswege in die Nuclei suprachiasmatici

Die „circadianen“ Photorezeptoren

Wie oben bereits erwähnt, ist der wichtigste Zeitgeber zur Synchronisation des endogenen Oszillators im SCN der tägliche Hell-Dunkel-Wechsel. Alle bisher erhobenen Befunde belegen eindeutig, dass die hierfür verantwortlichen Photorezeptoren bei Säugetieren – zumindest im Erwachsenenalter – ausschließlich in der Netzhaut lokalisiert sind. Unsere Augen dienen also nicht nur der Orientierung im Raum, sondern auch der Orientierung in der Zeit. Alle Berichte über extraretinale Photorezeptoren bei Mensch und Säugetier (z. B. Campbell und Murphy, 1998) haben sich experimentell nicht bestätigen lassen. Solche extraretinalen Photorezeptoren spielen allerdings bei Nichtsäugetieren (z. B. Fischen, Fröschen, Echsen und Vögeln) sehr wohl eine bedeutende Rolle für die Anpassung ihrer circadianen Rhythmen an den Tag/Nacht-Wechsel. Sie finden sich im Pinealorgan (Oksche, 1983; Korf, 1994) oder in tiefer gelegenen Hirnarealen (sog. tiefe oder enkephale Photorezeptoren). Eine gegenwärtig intensiv beforschte Frage ist, welche Lichtsinneszellen der Säugernetzhaut die Tageszeit an die innere Uhr vermitteln. Zum einen konnte eindeutig belegt werden, dass die Wahrnehmung von photischen Reizen, die für das circadiane System von Bedeutung sind, über die klassischen visuellen Photorezeptoren, die Zapfen und Stäbchen, erfolgt (Aggelopoulos und Meissl, 2000), die ja auch für die räumliche Orientierung entscheidend sind. Andererseits wurde in den letzten Jahren der eindeutige Nachweis erbracht, dass die Säugernetzhaut spezielle Lichtsinneszellen enthält, die ausschließlich der Zeitwahrnehmung dienen (siehe Bellingham und Foster, 2002). Diese liegen nicht wie die Stäbchen und Zapfen in der äußeren Netzhautschicht, sondern in tieferen Lagen und sie besitzen auch andere Photopigmente als die Stäbchen und Zapfen (Abb. 5). Als möglicher Kandidat wird das Melanopsin diskutiert, das aus den direkt lichtempfindlichen dermalen Melanophoren der Schwanzflosse von *Xenopus laevis*-Kaulquappen kloniert wurde und molekulare Ähnlichkeiten mit Proteinen von Photopigmenten bei Invertebraten aufweist (Provencio et al., 1998). Melanopsin kommt in einer Subpopulation von retinalen Ganglienzellen vor, die direkt lichtempfindlich sind, über synaptische Übertragungsmechanismen Eingangssignale von Stäbchen und Zapfen erhalten (Berson et al., 2002), als Neurotransmitter Glutamat und PACAP (pituitary adenylate cyclase activating polypeptide) enthalten und mit ihren Axonen in den SCN projizieren (Hannibal, 2002). Aus diesen Befunden, die zu einer Revision des Lehrbuchwissens über Aufbau und Funktion der Säugernetzhaut führen, lässt sich das Konzept formulieren, dass die Licht/Dunkel-Information für den SCN durch mehrere miteinander interagierende Photorezeptortypen sichergestellt wird.

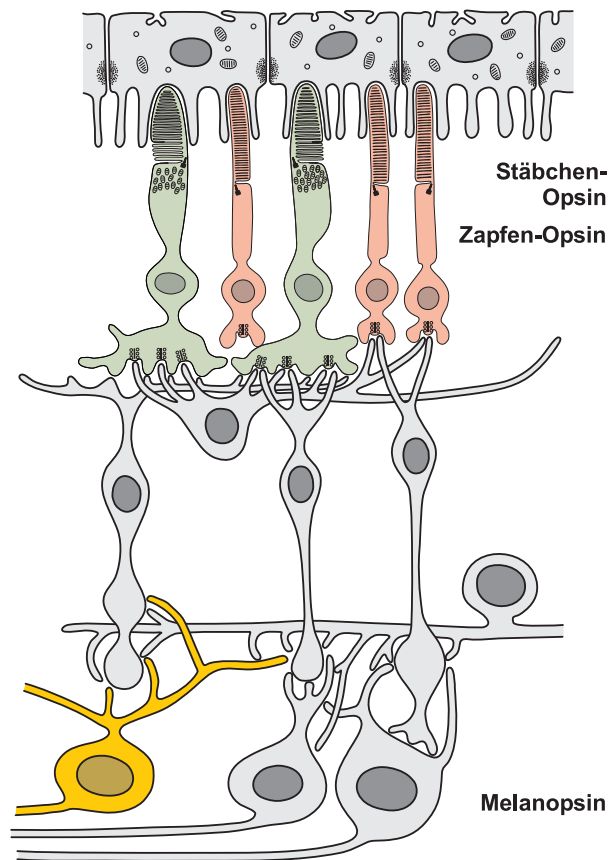


Abb. 5: Schematische Darstellung der neuronalen Schichten der Säugetiernetzhaut und der neuentdeckten „circadianen“ Photorezeptoren. Diese liegen in der Ganglienzellschicht der Retina; sie enthalten Melanopsin, ein Protein eines Photopigments, das in den direkt lichtempfindlichen Melanozyten der Schwanzflosse von *Xenopus*-Kaulquappen entdeckt wurde. Die direkte Lichtempfindlichkeit der Melanopsin enthaltenden Ganglienzellen wurde mit neurophysiologischen und verhaltensphysiologischen (in transgenen zapfen- und stäbchenlosen Mäusen) Methoden nachgewiesen. Die Zellen erhalten über synaptische Mechanismen auch Signale von den klassischen Photorezeptoren, den Stäbchen und Zapfen, die über bipolare Nervenzellen an die Melanopsin enthaltenden, direkt lichtempfindlichen Ganglienzellen vermittelt werden. Der klassische Neurotransmitter der retinalen Ganglienzellen, das Glutamat, wird auch von den Melanopsin-positiven Elementen verwendet; diese enthalten aber – im Gegensatz zu den anderen retinalen Ganglienzellen – auch noch das Neuropeptid PACAP. Durch kombinierte Untersuchungen mit immunzytochemischem Nachweis von PACAP bzw. Melanopsin und Tracerinjektionen in den SCN konnte eindeutig belegt werden, dass die Melanopsin/PACAP-immunreaktiven Elemente mit ihren Axonen den retinohypothalamischen Trakt bilden.

Der retinohypothalamische Trakt

Die Retina vermittelt die Informationen über Tag und Nacht an den SCN über eine Nervenbahn, die im ventrolateralen Gebiet des SCN endet. Diese Bahn ist eine Unterabteilung der Sehnerven und wird nach Ursprung und Ziel retinohypothalamischer Trakt benannt. Dieser Trakt

entspringt von der bereits beschriebenen, direkt lichtempfindlichen Subpopulation von Ganglienzellen im *Stratum ganglionare retinae*, die zwei unterschiedliche Botenstoffe, Glutamat und das Neuropeptid PACAP, enthalten (s. o.). Glutamat überträgt die Information an den SCN über verschiedene Rezeptoren (NMDA, AMPA/Kainat, metabotrope Glutamatrezeptoren). PACAP moduliert die Effekte von Glutamat (Gillette und Mitchell, 2002). In Abhängigkeit von der Zeit wirkt sich diese Modulation entweder als eine Verstärkung/Induktion oder eine Hemmung/Unterdrückung der glutamatergen Signaltransduktion aus (Kopp et al., 2001). Durch diese Interaktionen werden die Signale für „Licht an“ bzw. „Licht aus“ und für Fehlermeldungen kodiert, die letztendlich zur Phasenverschiebung des endogenen Oszillators im SCN führen (Gillette und Mitchell, 2002).

Phasenverschiebung des circadianen Oszillators durch Licht: Phänomenologie und molekulare Grundlagen

Die meisten *in vivo*-Untersuchungen an Nagetieren zur phasenverschiebenden Potenz von Lichtreizen nehmen als Messgröße die lokomotorische Aktivität von Tieren, die vor Gabe des Lichtreizes für mindestens einige Tage im Dauerdunkel gehalten wurden und somit einen circadianen Rhythmus aufweisen. Dieser circadiane Rhythmus lässt die Phase des subjektiven Tages und die Phase der subjektiven Nacht unterscheiden. Bei den nachtaktiven Tieren (also bei Mäusen, Ratten oder Hamstern) sind der Beginn der subjektiven Nacht durch den Beginn der lokomotorischen Aktivität und der Beginn des subjektiven Tages durch das Ende der lokomotorischen Aktivität determiniert. Bei im Dauerdunkel gehaltenen Mäusen und Ratten rufen Lichtreize nur zu ganz bestimmten Zeitpunkten des circadianen Rhythmus eine Phasenverschiebung des circadianen Oszillators hervor, d. h., sie werden von der inneren Uhr nur zu bestimmten Zeiten als „Fehlermeldung“ erkannt. So hat ein Lichtpuls, der den Tieren während des subjektiven Tages appliziert wird, keinen Einfluss auf die Phasenlage des circadianen Rhythmus (Gillette und Mitchell, 2002). Hingegen rufen Lichtreize, die während der subjektiven Nacht gegeben werden, eine Phasenverschiebung des circadianen Rhythmus hervor. Interessanterweise beeinflussen die nachts applizierten Lichtreize die Phase des circadianen Rhythmus zu verschiedenen Zeitpunkten in unterschiedlicher Weise: Lichtreize, die zu Beginn der subjektiven Nacht gegeben werden, rufen eine Phasenverzögerung (also im Prinzip eine Verlängerung des subjektiven Tages) hervor, während Lichtreize, die gegen Ende der Nacht appliziert werden, eine Phasenbeschleunigung (also eine Verkürzung der subjektiven Nacht) induzieren.

In vivo- und *in vitro*-Untersuchungen haben gezeigt, dass Glutamat und glutamaterge Agonisten die Licht-in-

duzierte Phasenverschiebung nachahmen, während glutamaterge Antagonisten die Licht-induzierten Phasenverschiebungen blockieren. Die Phasenverschiebungen, die durch Glutamat hervorgerufen werden, werden letztlich über NMDA-Rezeptoren vermittelt und führen zu einem Anstieg der intrazellulären Calciumionen-Konzentration. Glutamat kann aber auch über AMPA/Kainat-Rezeptoren und metabotrope Glutamatrezeptoren auf den SCN einwirken (Gillette und Mitchell, 2002; Kopp et al., 2001). PACAP scheint in höheren Konzentrationen der chemische Kode für „Licht aus“ zu sein und verschiebt die Phase des circadianen Rhythmus, wenn es in höheren Konzentration während des späten subjektiven Tages gegeben wird. PACAP wirkt über PACAP-Typ-1-Rezeptoren und führt zur Aktivierung der Adenylatzyklase (AC) und zum Anstieg der intrazellulären cAMP-Konzentration in den SCN-Neuronen. PACAP führt aber auch zu einer Erhöhung der intrazellulären Calciumionen-Konzentration (Kopp et al., 1999). Diese ist unabhängig vom cAMP-Signalweg; sie wird durch die Aktivierung eines G-Proteins, die Phospholipase-C-(PLC-)vermittelte Calciumionen-Freisetzung aus Inositoltrisphosphat-empfindlichen Speichern und einen nachfolgenden PKC-abhängigen Calciumeinstrom hervorgerufen. Eine Synopse dieser Befunde belegt, dass an der Verarbeitung PACAP-erger Informationen im SCN sowohl der cAMP/AC/Proteinkinase-A-(PKA-)Signalweg als auch die PLC und die PKC beteiligt sind.

Die durch „Fehlermeldungen“ induzierte Phasenjustierung des circadianen Oszillators im SCN geht mit einer sehr raschen Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors CREB (cyclic AMP response element binding protein) am Serinrest 133 (CREB-Ser133) einher (Abb. 4), die innerhalb von Minuten nach Gabe von Licht oder Glutamat nachgewiesen werden kann (Ginty et al., 1993; von Gall et al., 1998) und der nach ca. 10 min die Induktion der Uhrgene *Per1* und *Per2* folgt (Albrecht, 2002). Bereits diese Korrelation legt die Annahme nahe, dass die Synchronisation des circadianen Rhythmus im SCN molekular über eine Phosphorylierung von CREB-Ser133 angestoßen wird. Die Befunde, dass die Phosphorylierung von CREB-Ser133 genau zu den Zeitpunkten beobachtet wird, zu denen Lichtreize oder Glutamat auch ihre phasenverschiebende Wirkung entfalten, liefern weitere Hinweise für die Hypothese, dass die CREB-Phosphorylierung ursächlich mit der Phasenverschiebung in Verbindung steht. In Untersuchungen an verschiedenen transgenen Mäusestämmen konnte die fundamentale Rolle des Transkriptionsfaktors CREB für die Phasenverschiebung auf der Ebene der Uhrgenexpression und des lokomotorischen Verhaltens kausal belegt werden (Gau et al., 2002). Lichtreize bzw. glutamaterge Stimulation während der subjektiven oder objektiven Nacht induzieren die Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors CREB nicht nur am Serinrest 133, sondern auch am Serinrest 142. Die funktionelle Bedeutung der Ser142-CREB-Phosphorylie-

ung wurde durch Untersuchungen an Mausmutanten nachgewiesen, denen diese Phosphorylierungsstelle fehlt, da der Serinrest 142 durch Alanin ersetzt wurde. Bei diesen transgenen Mäusen induzieren Lichtreize oder glutamaterge Stimulationen die neuronale Genexpression (z. B. Expression des Uhrgens *Per1*) deutlich schwächer als im Wildtyp. Auch die Verhaltensantwort dieser Tiere (Phasenverschiebung der lokomotorischen Aktivität) ist stark abgeschwächt. CREB ist also ein essentielles molekulares Bindeglied zwischen synaptischer Aktivierung und verhaltensrelevanter neuronaler Genexpression und muss an beiden Serinresten phosphoryliert werden, um seine volle transkriptionale Aktivität zu entfalten.

Wie oben bereits erwähnt, ruft das Neuropeptid PACAP in hohen Konzentrationen während des späten Tages (CT 10) eine Phasenverschiebung im SCN hervor: Diese geht ebenfalls mit einer CREB-Phosphorylierung am Serinrest 133 einher (Kopp et al., 1997; von Gall et al., 1998). Bis jetzt ist allerdings noch ungeklärt, ob die PACAP-induzierte Phasenverschiebung auch mit einer Phosphorylierung von CREB am Serinrest 142 einhergeht. Interessanterweise wird die PACAP-induzierte, nicht aber die Glutamat-induzierte CREB-Ser133-Phosphorylierung durch Vorbehandlung mit Melatonin vollständig unterdrückt (Kopp et al., 1997; von Gall et al., 1998). Diese Befunde lieferten erstmals den Nachweis, dass Melatonin bei der Steuerung der neuronalen Genexpression im SCN mit peptidergen Eingangssignalen interagiert. Die Interaktion zwischen Melatonin und PACAP wird u. a. heute als Parameter verwendet, um die für die Phasenverschiebung verantwortlichen Melatoninrezeptor-Subtypen zu identifizieren (Jin et al., 2003) und die Wirkung von Melatonin-Analogen zu überprüfen, die als Chronobioticum verwendet werden können. Melatonin unterdrückt die PACAP-induzierte CREB-Phosphorylierung durch seine hemmende Wirkung auf die AC, übt aber keinen unmittelbaren Einfluss auf die intrazelluläre Calciumionen-Konzentration aus. Melatonin hat auch keine hemmende Wirkung auf die PACAP-induzierte Aktivierung der PLC und PKC (Kopp et al., 1999).

Ausgangssignale des SCN

Der Säuger-SCN benutzt neuronale und neuroendokrine Mechanismen, um circadiane Zeitinformation zu vermitteln. Ein wichtiges neuroendokrines Ausgangssignal ist die rhythmische Freisetzung von Vasopressin in den Liquor cerebrospinalis (Reppert et al., 1987). Das Vasopressin wird in dem dorsomedialen Anteil des SCN exprimiert, besitzt eine E-Box im Promoter als potentielle Bindungsstelle für das CLOCK/BMAL1-Heterodimer und ist somit als Uhren-kontrolliertes Gen zu klassifizieren. Neueste Untersuchungen von Tousson und Meissl (2004) an hypothalamischen Schnittpräparationen von Mäusen mit Hilfe der Multielektroden-Ableitungsmetho-

de haben gezeigt, dass der SCN die elektrische Aktivität anderer hypothalamischer Kerngebiete, insbesondere des *Nucleus paraventricularis*, synchronisiert. Bei intaktem SCN feuern die Neurone in diesen Kerngebieten synchron mit den SCN-Neuronen. Wird der SCN in den Schnittpräparationen bilateral ausgeschaltet, kommt der Rhythmus der elektrischen Aktivität in den hypothalamischen Kernen zum Erliegen. Wird ein SCN von einem Donortier in den Schnitt transplantiert, wird der synchrone Aktivitätsrhythmus in den benachbarten Kernen unmittelbar nach Transplantation (also bevor Axone aus dem transplantierten SCN auswachsen können) wiederhergestellt. Bereits dieser Zeitverlauf belegt, dass der SCN die Aktivität benachbarter hypothalamischer Kerne über neuroendokrine Mechanismen steuert. In der Tat konnte die rhythmische Applikation von Vasopressin an Schnittpräparationen mit SCN-Läsion den Aktivitätsrhythmus der anderen hypothalamischen Kerngebiete wieder synchronisieren.

Untersuchungen mit SCN-Transplantaten in das Ganztier hatten jedoch gezeigt, dass das neuroendokrine Ausgangssignal des SCN nicht ausreicht, um z. B. die Kortisol- oder Melatoninrhythmen wiederherzustellen (Meyer-Bernstein et al., 1999). Diese Rhythmen werden also über neuronale Efferenzen des SCN gesteuert, die allerdings nicht sehr zahlreich sind und vorwiegend innerhalb der Grenzen des Hypothalamus bleiben (Kalsbeek und Buijs, 2002). Die extrahypothalamischen SCN-Projektionen ziehen zum *Nucleus paraventricularis thalami* und zum sogenannten „intergeniculate leaflet“, einer Schaltstation des Sehnerven, die zwischen dem lateralen und medialen *Corpus geniculatum* eingeschoben ist und Neuropeptid-Y-haltige Projektionen in den SCN entsendet. Die Zielgebiete der SCN-Efferenzen im Hypothalamus lassen sich in drei Kategorien einteilen:

1. neuroendokrine Nervenzellen, die Corticotropin-releasing hormone (CRH), Thyrotropin-releasing hormone (TRH) und Gonadotropin-releasing hormone (GnRH) bilden;
2. zentrale autonome Neurone, die lange Projektionen zu den sympathischen und parasympathischen präganglionären Neuronen im Rückenmark und Hirnstamm ausbilden, und
3. sogenannte Intermediärneurone, die Informationen vom circadianen Schrittmacher mit anderen hypothalamischen Signalen integrieren und ihre Informationen dann an die neuroendokrinen und autonomen Neurone weiterleiten.

Besonders interessant erscheinen die Verbindungen zwischen dem SCN und dem autonomen Nervensystem, die es ermöglichen, dass der zentrale Oszillator zahlreiche Funktionen und Organe in der Peripherie steuern kann. Solche Verbindungen vom SCN über prä- und postganglionäre sympathische und parasympathische Neurone konnten in den letzten Jahren für verschiedene periphere

Organe (z. B. das endokrine Pankreas und die Nebennierenrinde) nachgewiesen werden (Kalsbeek und Buijs, 2002).

Die am besten und längsten bekannte Verbindung zwischen dem SCN und dem sympathischen Nervensystem ist der Schaltkreis zum Pinealorgan (Abb. 3), der über synaptische Verschaltungen im hypothalamischen *Nucleus paraventricularis* (dorsale parvozelluläre Untereinheit), *Nucleus intermediolateralis* des oberen Thorakalmarks und *Ganglion cervicale superius* (GCS) die Informationen der Uhr der *Epiphysis cerebri* zuführt. Die neuronale Endstrecke dieses Schaltkreises bilden noradrenerge postganglionäre Nervenfasern aus dem GCS, die das Pinealorgan entweder in Begleitung von Blutgefäßen oder als eigenständige, oberhalb des *Tentorium cerebelli* verlaufende Nerven (sog. *Nervi conarii*) erreichen (vgl. Korf, 1996). Bei den Säugetieren ist dieser Schaltkreis zwischen SCN und Pinealorgan eine zwingend notwendige Voraussetzung für die Steuerung und Aufrechterhaltung der Funktionen des Organs. Die wichtigste Aufgabe des Pinealorgans ist die Synthese des Indolamins Melatonin, das rhythmisch Nacht für Nacht gebildet und von den spezifischen Zellen der Zirbeldrüse, den Pinealozyten, als Neurohormon in die Blutbahn abgegeben wird. Melatonin stellt somit ein wichtiges Zeitsignal für die Körperperipherie dar, es ist der chemische Code für die objektive oder subjektive Nacht (s. u.). Der Rhythmus der Melatoninbiosynthese kommt komplett zum Erliegen, wenn die noradrenerge Innervation der Zirbeldrüse ausgeschaltet wird, z. B. bei Versuchstieren durch bilaterale Exstirpation des GCS oder beim Menschen durch eine hohe Querschnittslähmung infolge Verletzungen des Halsmarkes.

Die Steuerung der Melatoninbiosynthese

Mikrodialyseuntersuchungen konnten für Ratten zeigen, dass der Neurotransmitter Noradrenalin (NA) zu Beginn der objektiven oder subjektiven Nacht in großen Mengen aus den sympathischen Nervenendigungen im Pinealorgan freigesetzt wird (Drijfhout et al., 1996). Noradrenalin stimuliert die Pinealozyten über die Aktivierung von α_1 - und β_1 -adrenergen Rezeptoren in der Zellmembran. Eine entscheidende Voraussetzung der nächtlichen Stimulation der Melatoninbiosynthese ist die Reizung β_1 -adrenerger Rezeptoren, die über eine Aktivierung des G_s -Proteins und der Adenylatzyklase zu einer etwa zehnfachen Erhöhung der intrazellulären cAMP-Konzentration führt. Die Reizung α_1 -adrenerger Rezeptoren ruft eine Erhöhung der intrazellulären Calciumionen-Konzentration hervor (Schomerus et al., 1995); die selektive Stimulation α -adrenerger Rezeptoren hat keinen unmittelbaren Einfluss auf die Melatoninbiosynthese, bei gleichzeitiger Stimulation von α_1 - und β_1 -adrenergen Rezeptoren kommt es allerdings *in vitro* zu einer potenzierten Bil-

dung von cAMP und somit zu einer potenzierten Stimulation der Melatoninbiosynthese.

Die Schritte der Melatoninbiosynthese sind bei allen Wirbeltieren gleich (Abb. 6); sie beginnt mit der Aufnahme der Aminosäure Tryptophan in die Pinealozyten aus der Blutbahn. Tryptophan wird durch die Tryptophanhydroxylase am 5'-Ende hydroxyliert. Aus 5-Hydroxytryptophan entsteht durch Decarboxylierung Serotonin (5-Hydroxytryptamin), welches durch die Arylalkylamin-N-acetyltransferase (AANAT) zu N-Acetylserotonin umgewandelt wird. N-Acetylserotonin wird schließlich durch die Hydroxyindol-O-methyltransferase (HIOMT) in Melatonin umgewandelt. Das geschwindigkeitsbestimmende Enzym (Schlüsselenzym) der Melatoninbiosynthese ist die AANAT. Dieses Enzym bestimmt nicht nur die Bildung, sondern auch die Abgabe von Melatonin in die Blutbahn: Nach allen bisherigen Befunden wird das lipophile Melatonin nicht in den Pinealozyten gespeichert, sondern unmittelbar nach seiner Synthese aus den Pinealozyten freigesetzt. Die AANAT ist auch der molekulare Schalter, an dem alle Reize angreifen, die die Melatoninbiosynthese steuern.

Prinzipiell kann die AANAT auf drei verschiedenen Ebenen kontrolliert werden:

1. Die Expression des *Aanat*-Gens wird durch transkriptionale Steuerungsmechanismen beeinflusst.
2. Der Gehalt an AANAT-Protein wird durch posttranskriptionale Steuerungsmechanismen, z. B. durch kontrollierte proteasomale Proteolyse des Enzymproteins, gesteuert.
3. Die Aktivität des Enzyms wird durch Phosphorylierung und Protein-Protein-Interaktionen, z. B. durch Komplexbildung zwischen AANAT und dem 14-3-3-Protein, beeinflusst.

Alle genannten Steuerungsmechanismen werden durch die NA/ β -ADR/cAMP-Signaltransduktionskaskade reguliert.

Bei Nagetieren, wie Maus und Ratte, ist die Induktion der *Aanat*-Genexpression über transkriptionale Mechanismen eine unabdingbare Voraussetzung für die Ankerbelung der Melatoninbiosynthese. Während der Hellphase lassen sich keine *Aanat*-Transkripte nachweisen (Borjigin et al., 1995; Coon et al., 1995; Roseboom et al., 1996; Maronde et al., 1999a). Nach Aktivierung des NA/cAMP-Signaltransduktionsweges (z. B. bei Beginn der Dunkelheit) steigen die *Aanat*-mRNA-Spiegel innerhalb weniger Stunden sehr stark an. Dieser Anstieg geht mit einem – zeitlich geringfügig verzögerten – starken Anstieg des AANAT-Proteingehaltes und der AANAT-Enzymaktivität einher (Borjigin et al., 1995; Roseboom et al., 1996; Maronde et al., 1999a). Zum Ende der Nacht kommt es zu einem sehr starken Abfall der *Aanat*-mRNA-Spiegel. Diese transkriptionale Steuerung wird durch posttranskriptionale Mechanismen (proteasomale Proteolyse; Protein-Protein-Interaktionen) ergänzt (Gastel et al., 1998;

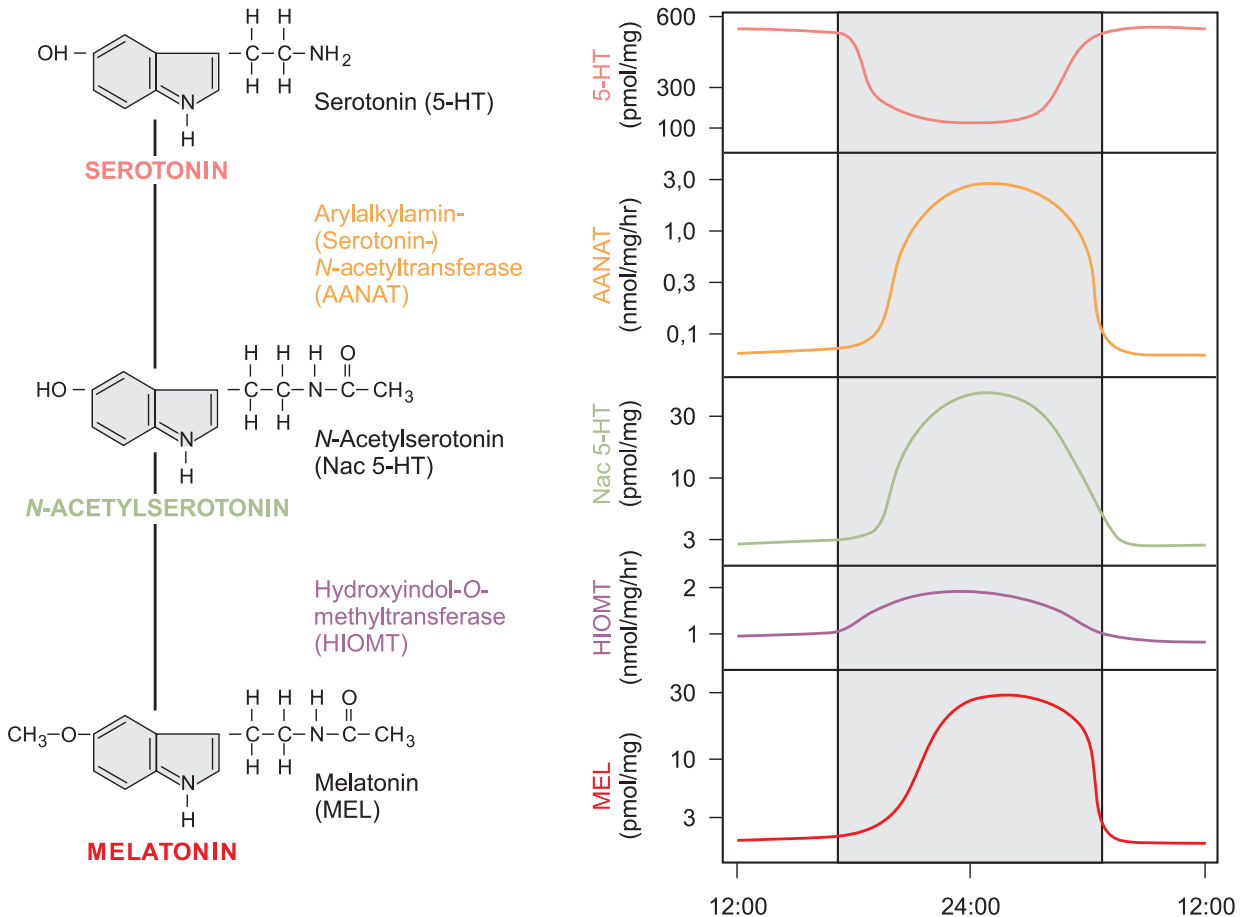


Abb. 6: Die Melatoninbiosynthese und die tageszeitlichen Schwankungen von Enzymaktivitäten und Substratkonzentrationen im Pinealorgan von Ratte und Maus (nach D. C. Klein, s. Ganguly et al., 2002).

Ganguly et al., 2002; s. u.). Bei Schaf, Rind und Primaten spielen transkriptionale Steuerungsmechanismen offensichtlich keine Rolle, bei diesen Arten ist die Expression des *Aanat*-Gens tonisch erhöht, die AANAT-Aktivität wird hier über den AANAT-Proteingehalt durch proteasomale Proteolyse (Schomerus et al., 2000) und durch Protein-Protein-Interaktionen gesteuert (vgl. Stehle et al., 2001a).

Transkriptionale Steuerung

Die transkriptionale Regulation der Melatoninsynthese (Abb. 7) im Nagerpinealorgan ist an die cAMP-abhängige Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors (TF) CREB am Serin 133 gebunden (Roseboom und Klein, 1995; Tamotsu et al., 1995; Maronde et al. 1999a,b, 2000; von Gall et al., 2000). Nach Beginn einer noradrenergen Stimulation ist die Phosphorylierung von CREB innerhalb einer Minute nachweisbar und bleibt in Anwesenheit des Stimulus über viele Stunden bestehen. Auch andere cAMP-erhöhende Signalmoleküle, wie die Neuropeptide VIP und PACAP, die in bestimmten Nervenfasern des

Säugerpinealorgans nachweisbar sind, rufen eine Phosphorylierung von CREB-Ser133 hervor. Im Vergleich mit Noradrenalin beeinflussen diese Neuropeptide allerdings deutlich weniger Zellen und die durch sie induzierte CREB-Ser133-Phosphorylierung ist von kürzerer Dauer. Entsprechend schwächer ist auch die durch VIP und PACAP hervorgerufene Induktion der Melatoninbiosynthese.

Die Noradrenalin-induzierte CREB-Ser133-Phosphorylierung wird durch die Proteinkinase A Typ II (PKA II) vermittelt (Maronde et al. 1999b, 2001). Die katalytische Untereinheit dieses Enzyms wird nach Erhöhung der intrazellulären cAMP-Konzentration von den regulatorischen Untereinheiten abgespalten und in den Zellkern der Pinealocyten transloziert (Maronde et al., 2000). Nach Bildung von Homodimeren aktiviert pCREB unter Einbeziehung des CREB-bindenden Proteins (CBP) solche Gene, deren Promoter pCREB-Bindungsstellen, sogenannte CREs (cyclic AMP response elements), aufweist. Hierzu gehören das *Aanat*-Gen (Baler et al., 1997), das Uhrgen *Per1* und Gene, die den induzierbaren inhibitorischen TF ICER (inducible cAMP early repressor; Stehle et al., 1993; Foulkes et al., 1996; Maronde et al., 1999a;

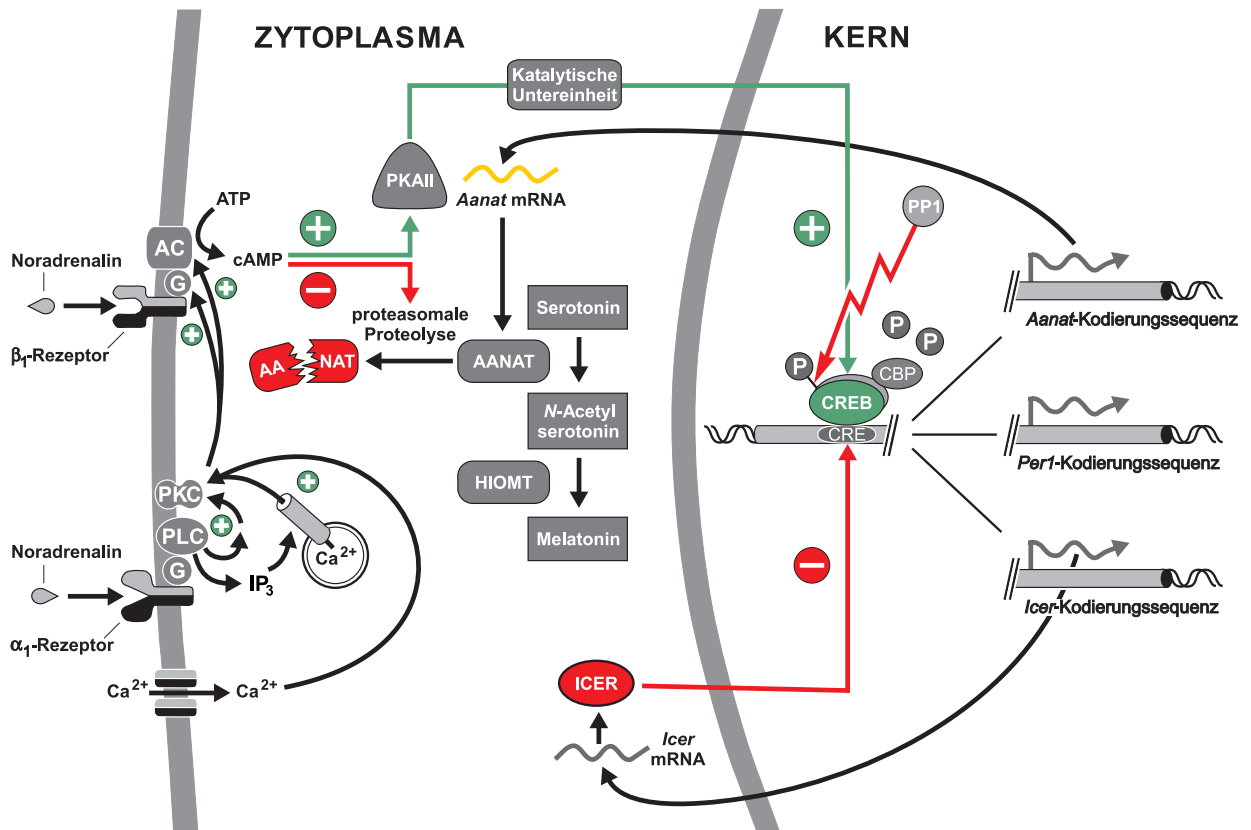


Abb. 7: Molekulare Grundlagen der Melatoninbiosynthese im Pinealorgan der Nagetiere. Die Melatoninbiosynthese wird durch das Schlüsselenzym, die Arylalkylamin-N-acetyltransferase (AANAT), gesteuert, die Serotonin in N-Acetylserotonin umwandelt. Der letzte Schritt der Melatoninbiosynthese, die Umwandlung von N-Acetylserotonin in Melatonin durch die Hydroxyindol-O-methyltransferase (HIOMT), wird offensichtlich nur durch die Konzentration von N-Acetylserotonin gesteuert. Der wichtigste Reiz für die Aktivierung und Inaktivierung der AANAT ist Noradrenalin, das aus den freien sympathischen Nervenendigungen im Pinealorgan zu Beginn der Nacht freigesetzt wird. Essentiell für die Induktion der AANAT ist die Aktivierung β_1 -adrenerger Rezeptoren, die über ein G_s -Protein und die Stimulation der Adenylatzyklase (AC) zur Erhöhung der intrazellulären cAMP-Konzentration führt. Die Reizung α_1 -adrenerger Rezeptoren führt über ein anderes G-Protein zur Aktivierung der Phospholipase C (PLC), Bildung von Inositoltrisphosphat (IP_3), Erhöhung der intrazellulären Calciumionen-Konzentration und Aktivierung der Proteinkinase C (PKC). Die α_1 -adrenerge Kaskade hat keinen eigenen Effekt auf die Induktion der Melatoninbiosynthese, sie verstärkt aber die Wirkung der β_1 -adrenergen Signalkaskade. Hierdurch kommt es *in vitro* zu einer weiteren Erhöhung der intrazellulären cAMP-Konzentration. Die Erhöhung der intrazellulären cAMP-Konzentration aktiviert die Proteinkinase A Typ II (PKA II); die katalytische Untereinheit wird nach Dissoziation von den regulatorischen Untereinheiten in den Zellkern transloziert und führt zur Phosphorylierung von CREB am Serin 133. PhosphoCREB-Homodimere binden an CREs, die im Promoter vieler im Pinealorgan exprimierter Gene (z. B. *Aanat*, *Per1*, *Icer*) vorkommen. Unter Einschaltung eines CREB-bindenden Proteins (CBP) aktiviert phosphoCREB die Transkription dieser Gene. Die Induktion der *Aanat* ist eine absolute Grundvoraussetzung für die Stimulation der Melatoninbiosynthese bei Nagetieren. Ihr folgt in geringem zeitlichen Abstand die Bildung von AANAT-Protein. Die Hemmung der *Aanat*-Expression erfolgt über die Dephosphorylierung von phosphoCREB durch die Protein-Serin/Threonin-Phosphatase 1 (PP1) am Ende der Nacht oder nach Entzug des Noradrenalinstimulus. Darüber hinaus spielt der hemmende Transkriptionsfaktor ICER eine wichtige Rolle. Die Expression von *Icer* wird über den cAMP/phosphoCREB-Weg stimuliert; *Icer*-mRNA-Spiegel steigen gegen Mitte der Nacht dramatisch an, der ICER-Proteingehalt erreicht sein Maximum in der zweiten Hälfte der Nacht. ICER konkurriert mit phosphoCREB um die CREs im *Aanat*-Promoter und verdrängt phosphoCREB mit fortschreitender Nacht vom CRE. Die transkriptionale Steuerung der Melatoninbiosynthese wird durch posttranskriptionale Mechanismen ergänzt. Diese beinhalten die Phosphorylierung des AANAT-Proteins am N-Terminus (und wahrscheinlich auch am C-Terminus) durch die PKA. Die Phosphorylierung der AANAT verhindert die Ubiquitylierung und die proteosomale Proteolyse der AANAT und ermöglicht die Bindung der AANAT an 14-3-3-Proteine. Diese Protein-Protein-Interaktionen scheinen notwendig, um das Enzym zu aktivieren. Bei Ungulaten und Primaten wird die Melatoninbiosynthese nicht transkriptional kontrolliert. Hier sind die *Aanat*-mRNA-Spiegel tonisch erhöht. AANAT-Proteingehalt und -Aktivität werden ausschließlich über posttranskriptionale Mechanismen gesteuert.

Pfeffer et al., 1999; von Gall et al., 2000) und den β_1 -adrenergen Rezeptor (β_1 -ADR) (Pfeffer et al., 1998) kodieren. Festzuhalten ist hier, dass die CREB-Ser133-Phosphorylierung als entscheidende Reaktion für die Anschaltung der *Aanat*-Genexpression und damit für die Stimulation der Melatoninbiosynthese im Nagerpinealorgan identifiziert wurde. Die Mechanismen, die zur Abschaltung der Melatoninbiosynthese zum Ende der Nacht oder nach Lichtreizen während der Nacht führen, erscheinen wesentlich komplexer und vielschichtiger; sie umfassen transkriptionale und posttranskriptionale Steuerungsmechanismen.

Ein entscheidender Schritt für die Herunterregulation der *Aanat*-Genexpression ist die Dephosphorylierung von pCREB (Koch et al., 2003). Diese wird *in vivo* zum Ende der Nacht unmittelbar vor dem Absinken der *Aanat*-mRNA-Spiegel (Maronde et al., 1999a) und *in vitro* 30 min nach Entzug des Noradrenalin-Stimulus beobachtet (Schomerus et al., 1996; Koch et al., 2003). Die CREB-Dephosphorylierung *in vivo* dürfte auf zwei Ursachen beruhen: zum einem auf einem Absinken der Noradrenalin-Konzentration zum Ende der Nacht (Drijfhout et al., 1996) und zum anderen auf einer Desensitivierung der adrenergen Rezeptoren in der Pinealozytenmembran. Umfangreiche *in vitro*-Untersuchungen belegen, dass die CREB-Dephosphorylierung durch Aktivierung der Serin/Threonin-Proteinphosphatase Typ I (PP1) hervorgerufen wird (Koch et al., 2003), deren katalytische Untereinheit ca. 8 Stunden nach Beginn der noradrenergen Stimulation in den Kern der Pinealozyten transloziert wird. Die pharmakologische Hemmung dieses Enzyms hebt die Effekte eines Noradrenalinentzugs fast komplett auf; bei Hemmung der PP1 verbleiben nach Entzug des Noradrenalinstimulus die Konzentrationen an pCREB, *Aanat*-mRNA, AANAT-Protein und Melatonin sowie die AANAT-Aktivität auf fast gleichem Niveau wie unter Stimulationsbedingungen mit Noradrenalin (Koch et al., 2003).

Ein weiterer wichtiger Faktor für die Hemmung der *Aanat*-Gentranskription ist ICER. Unter *in vivo*-Bedingungen steigt der *Icer*-mRNA-Gehalt im Pinealorgan von Ratte und Maus mit Beginn der Dunkelperiode dramatisch an und erreicht Spitzenwerte 4 bis 6 Stunden vor Beginn der nächsten Hellphase (Stehle et al., 1993; Maronde et al., 1999a; von Gall et al., 2000). Die *Icer*-Expression wird durch Noradrenalin und die PKA-Typ-II-abhängige CREB-Ser133-Phosphorylierung induziert: Der *Icer*-Promoter enthält vier CREs als potentielle Bindungsstellen für phosphoCREB. Die rhythmischen Veränderungen im ICER-Proteingehalt sind weit geringer als die im *Icer*-mRNA-Gehalt, im Gegensatz zu *Icer*-mRNA ist ICER-Protein auch in der Hellphase nachweisbar, die ICER-Proteinmenge steigt jedoch um den Wechsel zwischen Dunkel- und Hellphase gegenüber den Tageswerten signifikant um das 3–5fache an. Die Tatsache, dass die circadiane Fluktuation von ICER verhältnismäßig un-

spektakulär ist, heißt nicht zwingend, dass dies auch für die Wirkung gilt: Versuche mit transgenen Mäusen, bei denen das *Crem/Icer*-Gen ausgeschaltet wurde, zeigen eine starke Disinhibition der *Aanat*-Expression (Foulkes et al., 1996). Der hemmende Einfluss von ICER auf *Aanat*-Expression und Melatoninbiosynthese wurde in Pinealozyten der Ratte verifiziert: Die selektive Ausschaltung von *Icer* durch Transfektion mit *Icer*-antisense-Konstrukten führte nach Noradrenalinstimulation zu einer Superinduktion der *Aanat*-Transkription und der Melatoninbiosynthese (Maronde et al., 1999a; Pfeffer et al., 2000) und auch der Transkription des cAMP-sensitiven Gens für den β_1 -*Adr* (Pfeffer et al., 1998). Die Dynamik der CREB-Phosphorylierung war in den mit *Icer*-antisense-Konstrukten transfizierten Pinealozyten unverändert, die erhöhte Transkriptionsrate von Genen mit einem CRE-Element dürfte also unmittelbar auf den Wegfall von ICER, dem nukleären Kompetitor von CREB, zurückzuführen sein. Die Frage, über welche Mechanismen ICER die Transkription hemmt, ist bis jetzt nur teilweise aufgeklärt. ICER fehlen die glutaminreichen Proteindomänen, die charakteristisch für Aktivatoren der CREB/CREM-Familie sind (Stehle et al., 1993; Molina et al., 1993). Aus allen Befunden lässt sich die Hypothese ableiten, dass die Expression cAMP-sensitiver Gene im Nagerpinealorgan durch das Verhältnis von phosphoCREB zu ICER und deren Competition um die Bindung an CREs bestimmt wird; die NA-abhängige, PKA-Typ-II-gesteuerte Zunahme an phosphoCREB zu Beginn der Nacht stimuliert die Expression cAMP-sensitiver Gene; die Abnahme der phosphoCREB-Menge durch Dephosphorylierung und die Zunahme an ICER-Protein gegen Ende der Nacht führen zur Hemmung ihrer Expression. Dieses konnte experimentell nicht nur für *Aanat*, sondern auch für β_1 -*Adr* und *Icer* nachgewiesen werden: Die Konzentration aller drei mRNAs steigt 2 bis 3 Stunden nach Beginn der Dunkelperiode signifikant an (Stehle et al., 1993; Maronde et al., 1999a; Pfeffer et al., 1998). Die Bedeutung von ICER bei der Regulation der Melatoninbiosynthese wird weiter dadurch belegt, dass eine Veränderung der Photoperiode und damit der Dauer der nächtlichen NA-Freisetzung das Profil von *Icer*-Transkription und -Translation entscheidend verändert (Foulkes et al., 1996). Ähnlich einem photoperiodischen Gedächtnis wirkt sich das Profil vergangener Beleuchtungsverhältnisse auf die Induzierbarkeit von *Icer* und damit die Präsenz von ICER aus: Lange Nächte bewirken eine lang andauernde Erhöhung von ICER-Protein. Hierdurch kommt es zu einer verlangsamten Induktion der Transkription cAMP-sensitiver Gene, einschließlich des *Icer*-Gens; lange Tage führen dagegen zu einem supersensitiven, kurz andauernden Anstieg von ICER-Protein und zu einer kurzen Refraktärperiode für die Induzierbarkeit cAMP-sensitiver Gene. Über diese Dynamik von *Icer*/ICER in Nagerpinealozyten kann somit die relativ langsame Anpassung der Melatoninbiosynthese an eine überraschende – artifiziell induzierte –

Veränderung der Photoperiode erklärt werden. Dieser Mechanismus macht gleichzeitig das Profil der Melatoninsynthese unanfällig gegenüber Störgrößen aus der Umwelt. Zusammenfassend lässt sich aus der Analyse der Dynamik von ICER im Nagerpinealorgan schließen, dass dieser TF vor allem am Ende der Dunkelperiode die Induzierbarkeit cAMP-sensitiver Gene drastisch herabsetzt (Foulkes et al., 1996; Pfeffer et al., 1998; Maronde et al., 1999a; von Gall et al., 2000). Die Hypothese, dass ICER Zellen vor Überinduktion cAMP-sensitiver Gene schützt, konnte mittlerweile in einer Vielzahl neuronaler Systeme, in der Hypophyse und in peripheren Geweben gezeigt werden (zur Übersicht siehe: Stehle et al., 2001b, 2003). Die Bedeutung der Veränderungen im Verhältnis zwischen phosphoCREB und ICER für die Induktionsdynamik von *Aanat*, β_1 -*Adr* und *Icer* konnte auch durch entwicklungsbiologische Untersuchungen aufgezeigt werden (Stehle et al., 1995; Pfeffer et al., 1998; Pfeffer und Stehle, 1998), da die rhythmische Transkription aller drei Gene zeitgleich mit dem Einwachsen sympathischer Afferenzen in das Pinealparenchym, d. h. mit dem Beginn einer koordinierten Stimulation des cAMP/PKA/CREB-Signaltransduktionsweges, beobachtet werden kann.

Zu klären bleibt, ob die Expression von *Aanat*, *Icer* und β -*Adr* über weitere Transkriptionsfaktoren kontrolliert wird. Hierzu könnten Mitglieder der Protoonkogenfamilie (IEGs, immediate early genes) gehören, die ein zu phosphoCREB paralleles rhythmisches Expressionsmuster zeigen. Genau wie phosphoCREB sind diese IEGs ein exzellenter Marker für einen aktivierten NA/cAMP-Signaltransduktionsweg. Allerdings konnte unter Verwendung verschiedener transgener Tiermodelle gezeigt werden, dass die IEG-Translationsprodukte höchstens untergeordnete Transkriptionsfaktoren mit einer bis jetzt ungeklärten Rolle darstellen. Insbesondere konnte die Hypothese einer Rolle des IEGs *Fra-2* (Fos-related antigen 2) bei der Melatoninsynthese widerlegt werden, da eine Überexpression dieses TFs keinen Effekt auf die Dynamik oder die Menge der *Aanat*-mRNA hatte (Smith et al., 2001). Auch die Rolle der im Pinealorgan der Nagetiere exprimierten Uhrengene für die Kontrolle der Melatoninbiosynthese bleibt zunächst ungeklärt. Interessanterweise besitzt der *Aanat*-Promoter eine E-Box (Chen und Baler, 2000); das *Aanat*-Gen könnte also ein Zielgen für die Uhrenproteine sein.

Posttranskriptionale Steuerungsmechanismen

Die transkriptionale Steuerung der Melatoninbiosynthese wird durch posttranslationale Mechanismen differenziert und ergänzt, so dass die Translationsprodukte der bisher untersuchten cAMP-sensitiven Gene (*Adrs*, *Icer*, *Aanat*, *Per1*) ihre Maxima zu unterschiedlichen Tageszeiten erreichen. Das Maximum der AANAT-Proteinmenge und der Enzymaktivität folgt dem Maximum der *Aanat*-

mRNA-Spiegel fast unmittelbar (Borjigin et al., 1995; Maronde et al., 1999a), der Anstieg des ICER-Proteins folgt dem Maximum der *Icer*-mRNA-Spiegel mit deutlicher Verzögerung (Maronde et al., 1999a). Das Proteinprodukt des β_1 -*Adr*-Gens bleibt nach Translation für mehrere Stunden sequestriert, bevor es in die Zellmembran der Pinealozyten eingebaut wird (Pfeffer et al., 1998).

Posttranskriptionale Steuerungsprozesse spielen für die Melatoninbiosynthese im Nagerpinealorgan eine herausragende Rolle bei der Herunterregulation der Melatoninbiosynthese durch Lichtreize, die während der objektiven oder subjektiven Nacht appliziert werden. Diese führen zu einer verminderten Ausschüttung von Noradrenalin aus den sympathischen Fasern und zu einem Absinken der cAMP-Konzentration in den Pinealozyten. Hierdurch wird – vermutlich durch Ubiquitylierung des AANAT-Proteins – der Schutz des AANAT-Proteins vor proteasomaler Proteolyse aufgehoben und es kommt zu einem drastischen Abfall von AANAT-Protein, AANAT-Enzymaktivität und Melatonin (Gastel et al., 1998). Die erhöhten *Aanat*-mRNA-Werte bleiben aber davon unberührt (Roseboom et al., 1996). Die durch den cAMP-Weg kontrollierte proteasomale Proteolyse des AANAT-Proteins dürfte auch die transkriptionale Herunterregulation der Melatoninbiosynthese am Ende der Nacht flankieren, da das AANAT-Protein am Ende der Dunkelperiode rascher abfällt als die *Aanat*-mRNA.

Die kontrollierte proteasomale Proteolyse ist von übergeordneter Bedeutung für die Kontrolle der Melatoninbiosynthese bei Ungulaten (Schaf, Rind) und bei Primaten. Bei diesen Arten sind die *Aanat*-mRNA-Spiegel tonisch auf konstantem Niveau (Coon et al., 1996; Klein et al., 1997; Schomerus et al., 2000) und werden durch Stimulation mit Noradrenalin nicht erhöht. Unter unstimulierten Bedingungen sind stets geringe Mengen AANAT-Protein nachweisbar, das aber – vermutlich durch Ubiquitylierung – kontinuierlich durch proteasomale Proteolyse abgebaut wird. Die Noradrenalin-induzierte cAMP-Erhöhung verhindert den Abbau durch proteasomale Proteolyse und führt zur Erhöhung des AANAT-Proteingehaltes und der Enzymaktivität (Schomerus et al., 2000). Hierbei scheint die Phosphorylierung des AANAT-Proteins an PKA-Phosphorylierungsstellen eine entscheidende Rolle zu spielen. Diese Annahme wird durch Untersuchungen zur Struktur des AANAT-Moleküls unterstützt: In unmittelbarer Nachbarschaft der N-terminalen PKA-Bindungsstelle befindet sich eine prolinreiche Domäne, die in anderen Proteinen als das Zielmotiv eines proteasomalen Abbaus identifiziert wurde. Auch enthält die N-terminale Region der AANAT bei Rind, Schaf und Mensch Lysin-Epitope als Bindungsstellen für Ubiquitin. PhosphoAANAT bindet reversibel an 14-3-3-Proteine. Diese Bindung verhindert den proteasomalen Abbau und führt über bisher nicht genau bekannte Prozesse zur Aktivierung des Enzyms (Ganguly et al., 2002).

Aus diesen vergleichenden Untersuchungen lässt sich die Hypothese ableiten, dass ein in der Evolution stark konserviertes neuroendokrines Ausgangssignal der inneren Uhr über sehr unterschiedliche Signaltransduktions-Mechanismen gesteuert wird. Die ausschließlich posttranskriptional induzierte Melatoninbiosynthese der Ungulaten und Primaten führt im Vergleich zur transkriptional induzierten Melatoninbiosynthese der Nager zu einer wesentlich rascheren Bildung von Melatonin. Für die funktionelle Interpretation dieser unterschiedlichen Zeitverläufe bei der Bildung und Freisetzung von Melatonin erscheint die Tatsache interessant, dass langsam arbeitende transkriptionale Mechanismen bei nachtaktiven Nagetieren und schnell wirkende posttranslationale Mechanismen bei tagaktiven Ungulaten und Primaten vorkommen.

Expression von Uhrengenen im Nagerpinealorgan

Im Laufe der Phylogenie ist das Pinealorgan von einem direkt lichtempfindlichen und endogen oszillierenden Effektorsystem in einen neuroendokrinen Umformer umgewandelt worden, dessen rhythmische Aktivität durch extrapineale Photorezeptoren und Schrittmacher bestimmt wird. Dennoch sind Nagerpinealocyten in einem sehr frühen Entwicklungsstadium noch direkt lichtempfindlich (Tosini et al., 2000) und auch im erwachsenen Tier finden sich noch die „molekularen Spuren“ einer Photorezeption/Phototransduktion (Korf et al., 1998).

Bemerkenswerterweise werden im Säugerpinealorgan auch Uhrengene exprimiert, obwohl das Organ nicht zur circadianen Rhythmogenese befähigt ist. Im Pinealorgan von Nagetieren fluktuiert die *Per1*- und *Per2*-mRNA-Menge (Takekida et al., 2000; von Gall et al., 2001; Fukuhara et al., 2003; unveröffentlichte eigene Befunde) parallel zu der rhythmischen Akkumulation der *Aanat*-mRNA. Die rhythmische Transkription der Uhrengene ist wie die der *Aanat* ein direkter Zeiger der inneren Uhr im SCN, da er nach Läsion der neuronalen Verbindung zwischen SCN und Pinealorgan (z. B. durch Läsion der sympathischen Innervation der Zirbeldrüse) verschwindet. Dieser Regulationsmechanismus scheint auch für die Uhrengenprodukte zu gelten (eigene unveröffentlichte Befunde). Allerdings bestehen einige grundlegende Unterschiede bei der Regulation von Uhrengenen im SCN und im Pinealorgan.

Im Pinealorgan steigt die *Per1*-mRNA-Konzentration relativ schnell nach Beginn der Dunkelperiode an und das Maximum der PER1-Proteinmenge wird bereits 2 Stunden nach dem Maximum im *Per1*-mRNA-Gehalt erreicht. Im SCN werden hingegen die Spitzenwerte für die *Per1*-mRNA-Konzentration zur Mitte des (subjektiven oder objektiven) Tages beobachtet, die mPER1-Proteinmenge erreicht ihr Maximum allerdings erst 4 bis 6 Stunden nach dem Maximum der *Per1*-mRNA-Konzentration. Die Ursache der Unterschiede in der Dynamik von Tran-

skription und Translation zwischen SCN und Pinealorgan sind bislang nicht genau geklärt. Der *Per1*/PER1-Rhythmus im Pinealorgan ist an die Aktivierung des cAMP-Signaltransduktionsweges gebunden (von Gall et al., 2001), während im SCN die Aktivierung des E-Box-Promotorelementes über CLOCK/BMAL-Heterodimere das zentrale Ereignis für die Induktion der rhythmischen Transkription dieses Uhrengens ist (Shearman et al., 2000). Die Rolle des cAMP-Signaltransduktionsweges für die Stimulierung der *Per1*-Transkription im Nagerpinealorgan wurde dadurch bestätigt, dass Injektionen des β -adrenergen Agonisten Isoproterenol in ganglionektomierte Ratten die *Per1*-Transkription wiederherstellte (Takekida et al., 2000) und die Hemmung der Proteinkinase A sowohl die Phosphorylierung von CREB als auch die Induktion von *Per1*/PER1 unterdrückte (von Gall et al., 2001). Allerdings werden die Veränderungen in der Transkriptionsrate des *Per*-Gens nach phasenverschiebenden Reizen auch im SCN über CRE-Promotorelemente gesteuert (Yamaguchi et al., 2000; von Gall et al., 1998; Shigeyoshi et al., 1997).

Interessanterweise kann die Transkription des *Per2*-Gens im Mauspinealorgan nicht durch eine Aktivierung des cAMP-Weges induziert werden, obwohl sie von einer intakten sympathischen Innervation abhängt (Takekida et al., 2000; unveröffentlichte eigene Befunde). Dies scheint auch für die Transkription weiterer im Pinealorgan nachgewiesener Uhrengene zu gelten. Eine vom cAMP-Signaltransduktionsweg unabhängige Regulation von *Per2* wurde auch in Fibroblasten der Ratte nachgewiesen.

Die bisherigen Ergebnisse der Regulation von Uhrengenen deuten auf ihre archaische Funktion als Transkriptionsfaktoren für die Verarbeitung von Zeitinformation hin. Sie kommen nicht nur in Geweben vor, die zu einer endogenen circadianen Rhythmogenese befähigt sind, sondern auch in zahlreichen getriebenen Oszillatoren im Zentralnervensystem und in peripheren Geweben, deren Rhythmus vom zentralen circadianen Oszillator im SCN über neuronale und/oder neuroendokrine Mechanismen gesteuert wird (siehe: Balsalobre, 2002). Offensichtlich spielen Uhrengene auch eine Rolle für die Kontrolle des Zellzyklus (Matsuo et al., 2003).

Melatonin – neuroendokriner Zeiger der inneren Uhr

Über die nächtliche Melatoninbildung und -freisetzung übermittelt die innere Uhr dem Organismus auf neuroendokrinem Wege das Signal Dunkelheit. Die Länge des Melatoninsignals ist ein Maß für die Länge der Dunkelperiode und bildet somit die sich saisonal verändernden Beleuchtungsverhältnisse ab. Die Fragen nach dem Angriffsort und der Wirkungsweise von Melatonin wurden seit seiner Entdeckung durch Aaron Lerner und Mitarbeiter im Jahr 1958 immer wieder sehr kontrovers diskutiert. Erst nach der Identifizierung hochaffiner spezifischer Melatoninrezeptoren (Ebisawa et al., 1994) konnten diese

Fragen mit wissenschaftlich fundierten Methoden angegangen und beantwortet werden. Heute sind drei verschiedene Typen von Melatoninrezeptoren bekannt, die sich hinsichtlich ihrer chemischen Zusammensetzung geringfügig unterscheiden. Bei Säugetieren kommen zwei dieser Rezeptoren vor, die als Mel1a-(MT1)- und Mel1b-(MT2)-Rezeptor bezeichnet werden und an G_i-Proteine gekoppelt sind. Diese Melatoninrezeptoren kommen in hoher Dichte im SCN, also in der Uhr selbst, in der Retina und einem bestimmten Teil der Hypophyse, der Pars tuberalis (PT), vor (von Gall et al., 2002a); sie sind allerdings auch in peripheren Organen nachweisbar, z. B. im endokrinen Pankreas (Peschke, 2003; Peschke et al., 2000, 2002).

Über die Rezeptoren im SCN bildet Melatonin eine Rückkopplungsschleife im circadianen System. Melatonin kann die elektrische Aktivität der SCN-Neurone unterdrücken und zu bestimmten Zeitpunkten die Phase des circadianen Rhythmus im SCN verschieben. Insofern ergänzt das Melatoninsignal die Informationen, die der retinohypothalamische Trakt dem SCN über die Transmitter Glutamat und PACAP vermittelt. Die funktionelle Bedeutung der synchronisierenden Wirkung von Melatonin wird deshalb auch erst bei fehlenden Informationen aus dem retinohypothalamischen Trakt besonders deutlich, wie bei blinden Tieren und Menschen oder bei Foeten und Neugeborenen, bei denen das retinohypothalamische System noch nicht ausgereift ist. So spielt Melatonin als synchronisierendes Agens eine bedeutende Rolle bei der Koordination von mütterlichem und foetalem Aktivitätsrhythmus *in utero* (Weaver, 1999), bei der Resynchronisation rhythmischer Funktionen von Menschen, die ihre Phasenbeziehung zur Umwelt z. B. durch kongenitale oder erworbene Blindheit, einen gestörten Schlaf/Wach-Rhythmus, rasch wechselnde Zeitpläne bei Schichtarbeit, einem Flug über mehrere Zeitzonen oder bestimmte Formen der Winterdepression (SAD, seasonal affective disorder) verloren haben (Arendt, 1995, 2003; Wehr et al., 2001). Die bedeutende Rolle von Melatonin für die Kontrolle rhythmischer Funktionen von Foeten und Neugeborenen wird auch dadurch untermauert, dass der SCN in dieser Lebensphase eine besonders hohe Dichte von Melatoninrezeptoren aufweist. Das Melatonin, das am SCN von Foeten und Neugeborenen angreift, wird im Pinealorgan der Mutter gebildet und über die Plazenta oder die Muttermilch an die Nachkommen übertragen (Arendt, 1995).

Die Verarbeitung des Melatoninsignals im SCN dient nicht nur der Synchronisation des circadianen Rhythmus, sondern reduziert, wie kürzlich durch Versuche mit Mäusen gezeigt werden konnte, auch die Stressantwort. Mäuse reagieren auf Lichtreize mit einer erhöhten Aktivität des Sympathicus. Diese Antwort wird über den retinohypothalamischen Trakt und den SCN an das sympathische Nervensystem vermittelt, sie ist nach gezielter Läsion des SCN aufgehoben. Infusionen von Melatonin in die Hirnventrikel von Mäusen mit intaktem SCN führen

zu einer deutlichen Reduktion der lichtinduzierten Aktivierung des Sympathicus. Diese Wirkung von Melatonin ist aufgehoben, wenn Melatoninrezeptor-Antagonisten vor der Melatoningabe in das Hirnventrikelsystem infundiert wurden (Mutoh et al., 2003).

Melatonin, das vermutlich auch lokal in der Retina gebildet wird, beeinflusst über spezifische Rezeptoren die Phagozytose apikaler Außengliedmembranen der Photorezeptorzellen (*Disk-Shedding*) sowie die Freisetzung von Dopamin aus amakrinen Zellen (Tosini und Menaker, 1996).

Melatonin greift auch an Zellen der Pars tuberalis an und kann über diesen Weg in die Kontrolle des endokrinen Systems eingreifen und die Freisetzung von Prolactin aus den lactotrophen Zellen des Hypophysenvorderlappens steuern. Obwohl die spezifischen Wirkstoffe der Pars tuberalis, welche die Funktion der Adenohypophyse steuern, noch nicht charakterisiert sind, steht fest, dass Melatonin über seine Wirkung auf die Pars tuberalis eine besonders wichtige Rolle für die saisonale, d. h. photoperiodische Kontrolle des Reproduktionsverhaltens spielt (Ross und Morgan, 2002).

Die Beziehungen zwischen dem zentralen circadianen Rhythmusgenerator im SCN und peripheren Oszillatoren

Die rhythmische Expression von Uhrengenen wird nicht nur im SCN, dem zentralen circadianen Rhythmusgenerator, beobachtet, sondern auch in zahlreichen Geweben außerhalb dieses Kerngebietes, z. B. im Pinealorgan (s. o.), im Hippocampus, in der Nebennierenrinde, im endokrinen Pankreas und in der Pars tuberalis. Diese sind als periphere Oszillatoren zu betrachten, in denen die rhythmische Genexpression – im Gegensatz zum SCN – nicht endogen erzeugt wird, sondern eines immer wiederkehrenden Stimulus vom zentralen Schrittmacher bedarf. Für unser Verständnis der Regulation von rhythmischen Körperfunktionen ist es entscheidend, die Mechanismen zu identifizieren, mit denen der zentrale Schrittmacher die Oszillatoren in der Peripherie synchronisiert.

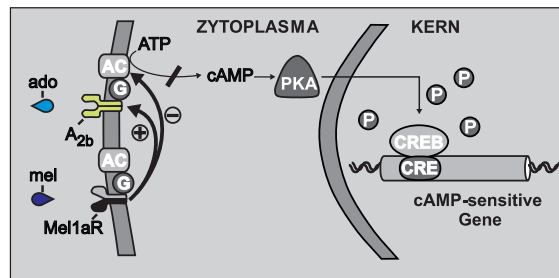
Die Pars tuberalis (PT) hat sich als ein hochinteressantes Modellsystem zur Klärung dieses Problemkreises erwiesen. In der PT werden prototypische Uhrengene rhythmisch exprimiert. Die Expression von *Per1* und anderen Uhrengenen in der Pars tuberalis fehlt allerdings bei Mäusestämmen, die auf Grund eines genetischen Defektes kein oder nur äußerst geringe Mengen Melatonin produzieren (z. B. C57BL) oder bei denen der Mel1a-Rezeptor gentechnisch ausgeschaltet wurde (von Gall et al., 2002b; Stehle et al., 2002; Korf et al., 2003). Bereits diese Befunde legen nahe, dass das Melatoninsignal eine wichtige Bedeutung für die Aufrechterhaltung der rhythmischen Uhrengenenexpression in der Pars tuberalis hat. Diese Annahme wurde durch Untersuchungen an Melatonin-profizienten Mäusen (C3H) untermauert. Die *Per1*-

Expression in der Pars tuberalis verschwindet bei diesen Tieren nach Pinealektomie, also nach experimenteller Entfernung des Melatoninsignals, und wird durch Applikation von exogenem Melatonin zur Nachtzeit wiederhergestellt, unter der Voraussetzung, dass die Behandlung mit Melatonin unmittelbar (d. h. in der ersten Nacht) nach der Pinealektomie beginnt (von Gall et al., 2002b). Die Induktion der *Per1*-Expression erfolgt in der Pars tuberalis ähnlich wie im Pinealorgan (s. o.) durch den cAMP-Signaltransduktionsweg und die Phosphorylierung von CREB (von Gall et al., 2002b).

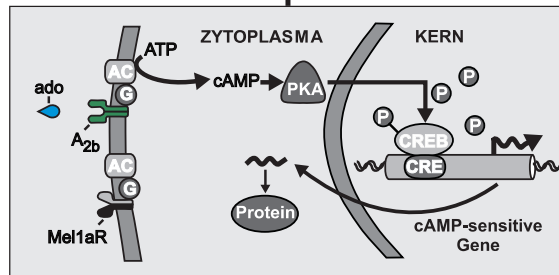
Der Befund, dass Melatonin ein notwendiger Faktor für die Induktion von *Per1* in der Pars tuberalis ist, war zunächst überraschend, da Melatonin über den an ein G_i-Protein gekoppelten MT1-Rezeptor den cAMP-Signalweg und die Phosphorylierung von CREB hemmt (McNulty et al., 1996). Eine Erklärungsmöglichkeit für die Melatonin-bedingte Stimulation der *Per1*-Expression ist, dass Melatonin die Adenylatzyklase zeitabhängig sensitiviert (Hazzlerigg et al., 1993) und hierdurch die Wirkung eines aktivierenden Botenstoffes verstärkt. Als ein solcher Botenstoff konnte kürzlich Adenosin identifiziert werden, das den cAMP-Weg, die CREB-Phosphorylierung am Serinrest 133 und die Induktion von *Per1* durch einen spezifischen Rezeptor, den A_{2b}-Rezeptor, stimuliert (von Gall et al., 2002b), der in der Pars tuberalis selektiv in hoher Dichte vorkommt (Stehle et al., 1992). Auf Grund von umfangreichen *in vitro*- und *in vivo*-Untersuchungen lässt sich folgende Hypothese für die Interaktionen zwischen den Adenosin- und Melatonin-gesteuerten Signalkaskaden in der Pars tuberalis ableiten (Abb. 8): Melatonin hemmt zur Nachtzeit über das G_i-Protein die cAMP-Signaltransduktionskaskade und sensitiviert – über bisher nicht genau bekannte Mechanismen – den A_{2b}-Rezeptor. Zum Ende der Nacht entfällt die Melatonin-bedingte Hemmung des cAMP-Weges, da die Melatonin-Konzentration abfällt; Adenosin stimuliert nun über den sensitivierten A_{2b}-Rezeptor den cAMP-Weg und induziert die Phosphorylierung von CREB und die *Per1*-Expression. Im Verlauf des Tages kommt es zur Desensitivierung des A_{2b}-Rezeptors und der cAMP-Weg wird herunterreguliert. Diese Herunterregulation wird zu Beginn der nächsten Nacht durch ansteigende Melatonin-Konzentrationen verstärkt, die im weiteren Verlauf den A_{2b}-Rezeptor wieder sensitivieren.

Zahlreiche Fragen können und müssen nun auf der Grundlage dieses Modells bearbeitet werden. Ein wichtiges, bisher ungelöstes Problem ist die Herkunft des Adenosins. Eine weitere bedeutende Frage ist, welche Signalkaskaden und welche Funktionskreise in der Pars tuberalis durch die rhythmische Uhrengenenexpression gesteuert werden. In allen Mäusestämmen mit einer defekten Melatonin-Signaltransduktionskaskade kommt es nicht nur zum Erliegen der rhythmischen *Per1*-Expression, sondern auch zu einer deutlichen Heraufregulation der nächtlichen Prolactinsekretion (von Gall et al., 2002b).

NACHT



MORGEN



TAG

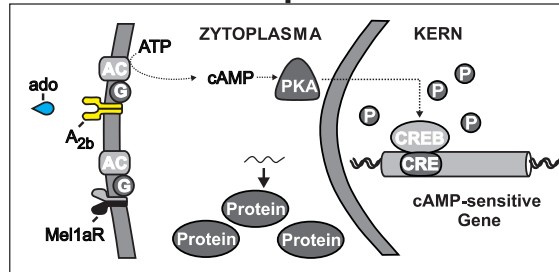


Abb. 8: Hypothetisches Schema der zeitabhängigen Interaktionen von Adenosin und Melatonin in der Pars tuberalis der Nagetiere. Zur Nachtzeit ist Melatonin in hohen Konzentrationen vorhanden und hemmt über Melatoninrezeptoren (Mel1a) und das G_i-Protein die cAMP-Signaltransduktionskaskade und sensitiviert – über bisher nicht genau bekannte Mechanismen – den A_{2b}-Rezeptor. Zum Ende der Nacht entfällt die Melatonin-bedingte Hemmung des cAMP-Weges, da die Melatonin-Konzentration abfällt; Adenosin stimuliert nun über den sensitivierten A_{2b}-Rezeptor den cAMP-Weg und induziert die Phosphorylierung von CREB und die *Per1*-Expression. Im Verlauf des Tages kommt es zur Desensitivierung des A_{2b}-Rezeptors und der cAMP-Weg wird herunterreguliert. Diese Herunterregulation wird zu Beginn der nächsten Nacht durch ansteigende Melatonin-Konzentrationen verstärkt, die im weiteren Verlauf den A_{2b}-Rezeptor sensitivieren.

Dieses könnte darauf hindeuten, dass PER1 in der Pars tuberalis die Bildung von Faktoren kontrolliert, die an der Steuerung der Prolactinsynthese bzw. -sekretion in den lactotrophen Zellen des Hypophysenvorderlappens beteiligt sind und die lange bekannte hemmende Wirkung von Melatonin auf die Prolactinsekretion vermitteln.

Synopse und Ausblick

Die Synchronisation verschiedener Körperfunktionen untereinander und mit dem natürlichen Rhythmus der Umwelt ist eine wichtige Voraussetzung für Gesundheit und Wohlbefinden. Forschungen der letzten Jahre haben gezeigt, dass diese Synchronisation durch komplexe Interaktionen zwischen dem zentralen circadianen Rhythmusgenerator, Lichtrezeptoren, neuroendokrinen und endokrinen Zentren und dem autonomen Nervensystem sichergestellt wird. Eine wichtige neue Erkenntnis dieser Forschungen ist, dass der zentrale circadiane Rhythmusgenerator verschiedene periphere Oszillatoren über verschiedene Mechanismen synchronisiert (Abb. 9). Neben Melatonin spielt das Kortisol aus der Nebenniere eine wichtige Rolle bei der Synchronisation von peripheren Oszillatoren, z. B. in der Leber und anderen peripheren Organen (Balsolobre et al., 2000). Kortisol könnte als Gegenspieler zum Melatonin die Rolle eines hormonellen Botenstoffes für Helligkeit übernehmen. Die endokrinen und neuroendokrinen Mechanismen werden komplettiert durch neuronale Signale aus dem autonomen (sympathischen und parasympathischen) Nervensystem. Diese Befunde schaffen eine wesentliche Grundlage, um mögliche Störungen in den biologischen Rhythmen zu verstehen und rationale und wissenschaftlich fundierte Therapieansätze zur Bekämpfung dieser Störungen abzuleiten. Auffällig ist, dass die Rhythmik unserer Körperfunktionen

an den beiden Extrempunkten unserer Lebensspanne, nämlich während der Entwicklung im Mutterleib und in der ersten Phase nach der Geburt bzw. im hohen Greisenalter, nicht besonders gut funktioniert. In der frühen Phase unseres Lebens sind die innere Uhr im SCN, die Lichtsinneszellen in der Netzhaut und die Melatoninproduktion in der Zirbeldrüse noch nicht ausgereift; gegen Ende unseres Lebens altert die Uhr; es kommt z. B. zu einem Nachlassen der nächtlichen Melatoninsekretion und zu Störungen im Schlaf/Wach-Rhythmus. Unter diesen Bedingungen ist die Schlafphase nicht auf die Nacht beschränkt; die Dauer des nächtlichen Schlafes ist im Vergleich mit gesunden Menschen verkürzt und kurze Schlafphasen treten auch während des Tages auf. Für den Zusammenhang zwischen Schlaf/Wach-Rhythmus und innerer Uhr ist festzuhalten, dass der Schaltkreis, der unsere innere Uhr aufbaut, nicht identisch ist mit dem neuronalen Schaltkreis, der den Schlaf- oder Wachzustand unseres Gehirns bestimmt. Beide Kreise liegen parallel nebeneinander, aber die innere Uhr füttert an verschiedenen Stationen Informationen in den Schaltkreis des Schlaf/Wach-Rhythmus, so dass dieser Rhythmus an die Uhr angepasst wird. Störungen in den rhythmischen Körperfunktionen finden sich auch bei blinden Menschen, bei denen der Zeitgeber Hell/Dunkel-Wechsel nicht wahrgenommen werden kann und folglich der endogene Rhythmus mit der Länge von 25 Stunden nicht mit der Tageslänge synchronisiert werden kann. Probleme in der

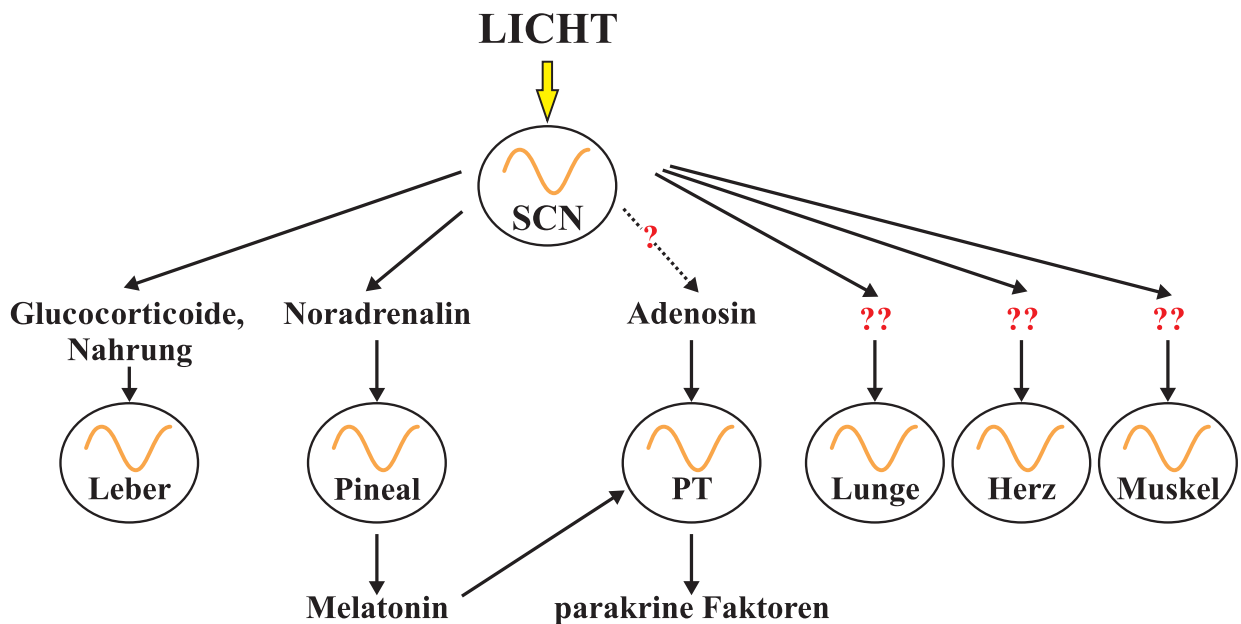


Abb. 9: Beziehungen zwischen dem zentralen circadianen Rhythmusgenerator im SCN und peripheren Oszillatoren. Der circadiane Rhythmus im SCN wird durch Licht synchronisiert. Der SCN synchronisiert die verschiedenen peripheren Oszillatoren über unterschiedliche Mechanismen. Für die Triggerung rhythmischer Funktionen im Pinealorgan spielt Noradrenalin aus dem sympathischen Nervensystem die entscheidende Rolle; die Anpassung des Rhythmus der Leberfunktionen wird durch die rhythmische Freisetzung von Glucocorticoiden und die Nahrungsaufnahme bestimmt; rhythmische Funktionen der *Pars tuberalis* (PT) werden durch eine Interaktion von Melatonin und Adenosin induziert und aufrechterhalten. Über die Übertragungsmechanismen vom SCN an andere periphere Oszillatoren (Lunge, Herz, Muskel) ist bisher wenig bekannt.

Synchronisation von Tag/Nacht-Rhythmus und circadianem Rhythmus treten auch bei Schichtarbeitern auf und bei Flugreisenden, die sich über mehrere Zeitzonen hinweg in westlicher oder östlicher Richtung bewegen. Ein weiteres Krankheitsbild, das mit der inneren Uhr in Zusammenhang zu bringen ist, ist die Winterdepression (seasonal affective disorder, SAD).

Alle Rhythmusstörungen, die auf Unstimmigkeiten zwischen äußerem Tag/Nacht-Rhythmus und innerem circadianem Rhythmus basieren, können durch eine verbesserte Synchronisation gemildert oder sogar behoben werden. Die Aufklärung dieser Mechanismen erscheint daher als eine wichtige Aufgabe künftiger neurobiologischer Forschungen. Diese aus der Grundlagenforschung gewonnenen Erkenntnisse zum circadianen System müssen dann Eingang in pharmakologische und klinische Überlegungen finden.

Zusammenfassung

In diesem Beitrag wurden strukturelle, funktionelle und molekulare Aspekte des circadianen Systems der Säugetiere beleuchtet, das zahlreiche rhythmische Körperfunktionen (z. B. Schlaf/Wach-Verhalten, Puls und Blutdruck) steuert. Das circadiane System besteht aus dem zentralen Rhythmusgenerator in den suprachiasmatischen Kernen (SCN) des Hypothalamus, Photorezeptoren in der Netzhaut sowie zentralen und peripheren neuronalen, neuroendokrinen und endokrinen Effektoren, die als getriebene, periphere Oszillatoren aufzufassen sind. In den SCN wird durch transkriptional/translationale Rückkopplungsschleifen zwischen Uhrengenen und ihren Produkten endogen ein circadianer Rhythmus generiert. Dieser circadiane Rhythmus wird durch den täglichen Hell/Dunkel-Wechsel mit dem astrophysikalischen Tag synchronisiert. Die hierfür verantwortlichen Lichtsinneszellen sind in der Netzhaut lokalisiert: Zum einen sind es die Stäbchen und Zapfen, zum anderen direkt lichtempfindliche Ganglienzellen mit neuartigen Photopigmenten. Die Lichtreize von der Netzhaut werden an die SCN über eine spezialisierte Untereinheit des *Nervus opticus*, den retinohypothalamischen Trakt (RHT), vermittelt. Der RHT entspringt von den direkt lichtempfindlichen Ganglienzellen der Retina und verwendet den Neurotransmitter Glutamat und das Neuropeptid PACAP (pituitary adenylate cyclase activating polypeptide) als Botenstoffe. Die Synchronisation des circadianen Rhythmus im SCN wird durch Aktivierung des Transkriptionsfaktors CREB (cyclic AMP response element binding protein) durch Phosphorylierung vermittelt und geht mit der Induktion von Uhrengenen der Periodfamilie (*Per1*, *Per2*) einher. Der SCN überträgt seinen Rhythmus an die nachgeschalteten peripheren Oszillatoren über neuroendokrine und neuronale Mechanismen. Ein wichtiger neuroendokriner Mechanismus ist die rhythmische Freisetzung von Vasopressin aus dem SCN in den *Liquor cerebrospinalis*. Die Expression des

Genes, das die Vorstufe für Vasopressin kodiert, wird durch Uhrengen-Produkte gesteuert; das Gen wird daher als Uhren-kontrolliertes Gen bezeichnet. Neben dem Vasopressingen sind heute bereits viele andere Uhren-kontrollierte Gene identifiziert, die nicht nur im Gehirn, sondern auch in fast allen peripheren Organen exprimiert werden. Die neuronalen Signale der SCN werden an verschiedene hypothalamische Kerngebiete übertragen. Ein besonders wichtiges Zielgebiet der neuronalen Projektionen des SCN sind die paraventriculären Kerne (PVN) des Hypothalamus, von denen die Information aus dem SCN an das autonome Nervensystem, z. B. den Sympathicus, weitergeleitet werden. Hierdurch werden Signale von den SCN an alle sympathisch innervierten Organe vermittelt. Besonders gut untersucht sind die strukturellen und funktionellen Beziehungen zwischen dem Sympathicus und dem Pinealorgan (Zirbeldrüse). Dieses neuroendokrine Zentrum bildet unter der Kontrolle noradrenalinhaltiger sympathischer Nervenfasern Nacht für Nacht das Neurohormon Melatonin und setzt es in den *Liquor cerebrospinalis* und die Blutbahn frei. Bei den Nagetieren setzt die noradrenalininduzierte Aktivierung der Melatoninbiosynthese die Induktion der Transkription des Genes voraus, das die Arylalkylamin-*N*-acetyltransferase, das Schlüsselenzym der Melatoninbiosynthese, kodiert. Detaillierte Untersuchungen dieses Mechanismus belegen die große Bedeutung von cAMP-gesteuerten Transkriptionsfaktoren (CREB, ICER) für die Kontrolle neuroendokriner und neuronaler Genexpression. Melatonin gilt als neuroendokriner Zeiger des circadianen Systems, das das Signal „Dunkelheit“ vermittelt. Als Hormon für die Helligkeit wird in jüngster Zeit das in der Nebennierenrinde gebildete Kortisol diskutiert. Melatonin beeinflusst seine Ziele über spezifische, membrangebundene Membranrezeptoren (Mel1aR, Mel1bR). Solche Rezeptoren kommen in besonders hoher Dichte in den SCN, in der Pars tuberalis, einem bestimmten Abschnitt der Adenohypophyse, und auch in der Peripherie, z. B. im endokrinen Pankreas, vor. Mittels der Rezeptoren im SCN baut Melatonin eine Rückkopplungsschleife im circadianen System auf, über die es zu bestimmten Zeitfenstern die Phase des circadianen Rhythmus verschieben kann. Über die Rezeptoren in der Pars tuberalis vermittelt Melatonin circadiane Informationen an das Endokrinium. Am Beispiel der Pars tuberalis konnten wichtige Steuerungsprozesse geklärt werden, über die der zentrale Rhythmusgenerator im SCN periphere Oszillatoren synchronisiert: Die Induktion und Aufrechterhaltung der rhythmischen Uhrengenenexpression in der Pars tuberalis erfolgt durch eine Interaktion zwischen Melatonin und Adenosin, das an der Pars tuberalis über einen spezifischen Rezeptortyp (A_{2b} -Rezeptor) angreift. Andere periphere Oszillatoren, z. B. in der Leber, werden über andere Mechanismen, z. B. die rhythmische Glucocorticoid-Synthese und -Freisetzung aus der Nebennierenrinde und die Glucosespiegel im Blut, vom zentralen Rhythmusgenerator im SCN gesteuert. Die

hier dargestellte dynamische Entwicklung unseres Kenntnisstandes über den Aufbau und die Funktion des circadianen Systems muss nun Eingang in die Pharmakologie und die klinische Medizin finden.

Danksagung

Die hier dargestellten Befunde sind durch die Arbeit aller jetziger und vieler ehemaliger Mitglieder des Institutes für Anatomie II zustande gekommen, ihnen danken wir herzlich. Unser besonderer Dank gilt Frau I. Szasz für ihre Mitarbeit an den Abbildungen.

Literatur

- Aggelopoulos, N. C., H. Meissl (2000) Responses of neurons of the suprachiasmatic nucleus to retinal illumination under photopic and scotopic conditions. *J. Physiol.* 523: 211–222.
- Albrecht, U. (2002) Invited review: regulation of mammalian circadian clock genes. *J. Appl. Physiol.* 92: 1348–1355.
- Arendt, J. (1995) Melatonin and the mammalian pineal gland. Chapman and Hall, London, pp. 201–285.
- Arendt, J. (2003) Importance and relevance of melatonin to human biological rhythms. *J. Neuroendocrinol.* 15: 427–431.
- Aschoff, J. (1965) Circadian clocks. Elsevier/North Holland, Amsterdam.
- Baler, R., S. Covington, D. C. Klein (1997) The rat arylalkylamine N-acetyltransferase gene promoter. cAMP activation via a cAMP-responsive element-CCAAT complex. *J. Biol. Chem.* 272: 6979–6985.
- Balsalobre, A. (2002) Clock genes in mammalian peripheral tissues. *Cell Tissue Res.* 309: 193–199.
- Balsalobre, A., L. Marcacci, U. Schibler (2000) Multiple signaling pathways elicit circadian gene expression in cultured Rat-1 fibroblasts. *Curr. Biol.* 10: 1291–1294.
- Bargmann, W. (1954) Neurosekretion und hypothalamisch-hypophysäres System. *Anat. Anz.* 100 (Suppl.): 30–45.
- Bellingham, J., R. G. Foster (2002) Opsins and mammalian photoentrainment. *Cell Tissue Res.* 309: 57–71.
- Berson, D. M., F. A. Dunn, M. Takao (2002) Phototransduction by retinal ganglion cells that set the circadian clock. *Science* 295: 1070–1073.
- Borjigin, J., M. M. Wang, S. H. Snyder (1995) Diurnal variation in mRNA encoding serotonin N-acetyltransferase in pineal gland. *Nature* 378: 783–785.
- Campbell, S. S., P. J. Murphy (1998) Extraocular circadian phototransduction in humans. *Science* 279: 396–399.
- Chen, W., R. Baler (2000) The arylalkylamine N-acetyltransferase E box: differential use in a master vs. a slave oscillator. *Mol. Brain Res.* 81: 43–50.
- Coon, S. L., P. H. Roseboom, R. Baler, J. L. Weller, M. A. A. Nambodiri, E. V. Koonin, D. C. Klein (1995) Pineal serotonin N-acetyltransferase: expression cloning and molecular analysis. *Science* 270: 1681–1683.
- Coon, S. L., K. Mazuruk, M. Bernard, P. H. Roseboom, D. C. Klein, I. R. Rodriguez (1996) The human serotonin N-acetyltransferase (EC 2.3.1.87) gene (AANAT): structure, chromosomal localization, and tissue expression. *Genomics* 34: 76–84.
- Drijfhout, W. J., A. G. van der Linde, S. E. Kooi, C. J. Grol, B. H. C. Westerink (1996) Norepinephrine release in the rat pineal gland: the input from the biological clock measured by in vivo microdialysis. *J. Neurochem.* 66: 748–755.
- Dunlap, J. C., J. J. Loros, P. J. DeCoursey (2004) Chronobiology: Biological Timekeeping. Sinauer Associates, Inc. Publishers. Sunderland, Massachusetts, USA.
- Ebisawa, T., S. Karne, M. R. Lerner, S. M. Reppert (1994) Expression cloning of a high-affinity melatonin receptor from *Xenopus* dermal melanophores. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 6133–6137.
- Foulkes, N. S., J. Borjigin, S. H. Snyder, P. Sassone-Corsi (1996) Transcriptional control of circadian hormone synthesis via the CREM feedback loop. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 14140–14145.
- Fukuhara, C., J. C. Dirden, G. C. Tosini (2003) Analysis of gene expression following norepinephrine stimulation in the rat pineal gland using DNA microarray technique. *J. Pineal Res.* 35: 196–203.
- Gais, S., J. Born (2004) Low acetylcholine during slow-wave sleep is critical for memory consolidation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101: 2140–2144.
- Ganguly, S., S. L. Coon, D. C. Klein (2002) Control of melatonin synthesis in the mammalian pineal gland: the critical role of serotonin acetylation. *Cell Tissue Res.* 309: 127–137.
- Gastel, J. A., P. H. Roseboom, P. A. Rinaldi, J. L. Weller, D. C. Klein (1998) Melatonin production: proteasomal proteolysis in serotonin N-acetyltransferase regulation. *Science* 279: 1358–1360.
- Gau, D., T. Lemberger, C. von Gall, O. Kretz, N. Le Minh, P. Gass, W. Schmid, U. Schibler, H.-W. Korf, G. Schütz (2002) Phosphorylation of CREB Ser142 regulates light-induced phase shifts of the circadian clock. *Neuron* 34: 245–253.
- Gillette, M. U., J. W. Mitchell (2002) Signaling in the suprachiasmatic nucleus: selectively responsive and integrative. *Cell Tissue Res.* 309: 99–107.
- Ginty, D. D., J. M. Kornhauser, M. A. Thompson, H. Bading, K. E. Mayo, J. S. Takahashi, M. E. Greenberg (1993) Regulation of CREB phosphorylation in the suprachiasmatic nucleus by light and a circadian clock. *Science* 260: 238–241.
- Hannibal, J. (2002) Neurotransmitters of the retinohypothalamic tract. *Cell Tissue Res.* 309: 73–88.
- Hastings, M. H., A. B. Reddy, M. Garabette, V. M. King, S. Chad-Ehlers, J. O'Brien, E. S. Maywood (2003) Expression of clock gene products in the suprachiasmatic nucleus in relation to circadian behaviour. *Novartis Found. Symp.* 253: 203–217.
- Hazlerigg, D. G., A. Gonzalez-Brito, W. Lawson, M. H. Hastings, P. J. Morgan (1993) Prolonged exposure to melatonin leads to time-dependent sensitization of adenylate cyclase and down-regulates melatonin receptors in pars tuberalis cells from ovine pituitary. *Endocrinology* 132: 285–292.
- Jin, X., L. P. Shearman, D. R. Weaver, M. J. Zylka, G. J. de Vries, S. M. Reppert (1999) A molecular mechanism regulating rhythmic output from the suprachiasmatic circadian clock. *Cell* 96: 57–68.
- Jin, X., C. von Gall, R. L. Pieschl, V. K. Gribkoff, J. H. Stehle, S. M. Reppert, D. R. Weaver (2003) Targeted disruption of the mouse *Mel_{1b}* melatonin receptor. *Mol. Cell. Biol.* 23: 1054–1060.
- Kalsbeek, A., R. M. Buijs (2002) Output pathways of the mammalian suprachiasmatic nucleus: coding circadian time by transmitter selection and specific targeting. *Cell Tissue Res.* 309: 109–118.

- Klein, D. C., S. L. Coon, P. H. Roseboom, J. L. Weller, M. Bernard, J. A. Gastel, M. Zatz, P. M. Iuvone, I. R. Rodriguez, V. Begay, J. Falcon, G. M. Cahill, V. M. Cassone, R. Baler (1997) The melatonin rhythm-generating enzyme: molecular regulation of serotonin N-acetyltransferase in the pineal gland. *Recent Prog. Horm. Res.* 52: 307–357.
- Koch, M., V. Mauhin, J. H. Stehle, C. Schomerus, H.-W. Korf (2003) Dephosphorylation of pCREB by protein serine/threonine phosphatases is involved in inactivation of *Aanat* gene transcription in rat pineal gland. *J. Neurochem.* 85: 170–179.
- Kopp, M., H. Meissl, H.-W. Korf (1997) The pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide-induced phosphorylation of the transcription factor CREB (cAMP response element binding protein) in the rat suprachiasmatic nucleus is inhibited by melatonin. *Neurosci. Lett.* 227: 145–148.
- Kopp, M. D. A., C. Schomerus, F. Dehghani, H.-W. Korf, H. Meissl (1999) Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide and melatonin in the suprachiasmatic nucleus: effects on the calcium signal transduction cascade. *J. Neurosci.* 19: 206–219.
- Kopp, M. D., H. Meissl, F. Dehghani, H.-W. Korf (2001) The pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide modulates glutaminergic calcium signaling: investigations on rat suprachiasmatic nucleus neurons. *J. Neurochem.* 79: 161–171.
- Korf, H.-W. (1994) The pineal organ as a component of the biological clock. Phylogenetic and ontogenetic considerations. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 719: 13–42.
- Korf, H.-W. (1995) Gehirn und Hormone. Das Konzept der Neurosekretion von Ernst und Berta Scharrer. In: *Berühmte Ärzte und Forscher in Frankfurt am Main*, H. W. Doerr, H.-W. Korf, eds. Alpha-Verlag, Lampertheim, pp. 62–92.
- Korf, H.-W. (1996) The innervation of the pineal gland. In: *Autonomic-endocrine interactions*, K. Unsicker, ed. Handbook of the autonomic nervous system. Bd. 10, G. Burnstock, ed. Harwood, Amsterdam, pp. 129–180.
- Korf, H.-W., K. H. Usadel (1997) Neuroendocrinology. Retrospect and Perspectives. Springer, Berlin/Heidelberg/New York, pp. 1–444.
- Korf, H.-W., C. Schomerus, J. H. Stehle (1998) The pineal organ, its hormone melatonin, and the photoneuroendocrine system. *Adv. Anat. Embryol. Cell Biol.* 146: 1–100.
- Korf, H.-W., J. H. Stehle (eds.) (2002) The circadian system: circuits – cells – clock genes. *Cell Tissue Res.* 309: 1–199.
- Korf, H.-W., C. von Gall, J. Stehle (2003) The circadian system and melatonin: lessons from rats and mice. *Chronobiol. Int.* 20: 697–710.
- Lerner, A. B., J. D. Case, Y. Takahashi, T. H. Lee, W. Mori (1958) Isolation of melatonin, the pineal gland factor that lightens melanocytes. *J. Am. Chem. Soc.* 80: 2587–2592.
- Liu, C., S. M. Reppert (2000) GABA synchronizes clock cells within the suprachiasmatic circadian clock. *Neuron* 25: 123–128.
- Maronde, E., M. Pfeffer, J. Olcese, C. A. Molina, F. Schlotter, F. Dehghani, H.-W. Korf, J. Stehle (1999a) Transcription factors in neuroendocrine regulation: rhythmic changes in phosphoCREB and ICER levels frame melatonin synthesis. *J. Neurosci.* 19: 3326–3336.
- Maronde, E., H. Wicht, K. Tasken, H. G. Genieser, F. Dehghani, J. Olcese, H.-W. Korf (1999b) CREB phosphorylation and melatonin biosynthesis in the rat pineal gland: involvement of a cyclic AMP dependent protein kinase type II. *J. Pineal Res.* 27: 170–182.
- Maronde, E., M. Pfeffer, C. von Gall, F. Dehghani, C. Schomerus, H. Wicht, S. Kroeber, J. Olcese, J. H. Stehle, H.-W. Korf (2000) Signal transduction in the rodent pineal organ. From the membrane to the nucleus. *Adv. Exp. Med. Biol.* 460: 109–131.
- Maronde, E., H.-W. Korf, P. Niemann, H. G. Genieser (2001) Direct comparison of the potency of three novel cAMP analogs to induce CREB-phosphorylation in rat pinealocytes. *J. Pineal Res.* 31:183–185.
- Matsuo, T., S. Yamaguchi, S. Mitsui, A. Emi, F. Shimoda, H. Okamura (2003) Control mechanism of the circadian clock for timing of cell division in vivo. *Science* 302: 255–259.
- McNulty, S., A. W. Ross, K. Y. Shiu, P. J. Morgan, M. H. Hastings (1996) Phosphorylation of CREB in ovine pars tuberalis is regulated both by cyclic AMP-dependent and cyclic AMP-independent mechanisms. *J. Neuroendocrinol.* 8: 635–645.
- Meyer-Bernstein, E. L., A. E. Jetton, S. I. Matsumoto, J. F. Markuns, M. N. Lehman, E. L. Bittman (1999) Effects of suprachiasmatic transplants on circadian rhythms of neuroendocrine functions in golden hamsters. *Endocrinology* 140: 207–218.
- Molina, C. A., N. S. Foulkes, E. Lalli, P. Sassone-Corsi (1993) Inducibility and negative autoregulation of CREM: an alternative promoter directs the expression of ICER, an early response repressor. *Cell* 75: 875–886.
- Moore, R. Y., J. C. Speh, R. H. Leak (2002) Suprachiasmatic nucleus organization. *Cell Tissue Res.* 309: 89–98.
- Mutoh, T., S. Shibata, H.-W. Korf, H. Okamura (2003) Melatonin modulates the light-induced sympathoexcitation and vagal suppression with participation of the suprachiasmatic nucleus in mice. *J. Physiol.* 547: 317–332.
- Okamura, H., S. Yamaguchi, K. Yagita (2002) Molecular machinery of the circadian clock in mammals. *Cell Tissue Res.* 309: 47–56.
- Oksche, A. (1983) Aspects of evolution of the pineal organ. In: *The pineal gland and its endocrine role*, J. Axelrod, F. Fraschini, G. P. Velo, eds. Plenum Press, New York, pp. 15–35.
- Oksche, A. (1987) Das Gehirn als hormonbildendes Organ – Durchbruch und Irrwege der Konzepte. In: *Irrtümer in der Wissenschaft*, D. Czeschlik, ed. Springer, Berlin/Heidelberg/New York, pp. 29–47.
- Oksche, A. (1997) Ernst and Berta Scharrer – pioneers in neuroendocrinology. In: *Neuroendocrinology. Retrospect and perspectives*, H.-W. Korf, K. H. Usadel, eds. Springer, Berlin/Heidelberg/New York, pp. 1–4.
- Peschke, E. (2003) Zum Einfluss von Melatonin auf Insulinsekretion, Signaltransduktion und Sekretionsrhythmik pankreatischer B-Zellen *in vitro*. In: *Endokrinologie*, E. Peschke, ed. Abh. Sächs. Akad. Wiss., Math.-naturwiss. Klasse, Bd. 60, Heft 1, Hirzel, Stuttgart/Leipzig, pp. 89–119.
- Peschke, E., J.-D. Fauteck, U. Mußhoff, F. Schmidt, A. Beckmann, D. Peschke (2000) Evidence for a melatonin receptor within pancreatic islets of neonate rats: functional, autoradiographic, and molecular investigations. *J. Pineal Res.* 28: 156–164.
- Peschke, E., E. Mühlbauer, U. Mußhoff, V. J. Csernus, E. Chankiewicz, D. Peschke (2002) Receptor (MT₁) mediated influence of melatonin on cAMP concentration and insulin secretion of rat insulinoma cells INS-1. *J. Pineal Res.* 33: 63–71.
- Pfeffer, M., J. H. Stehle (1998) Ontogeny of a diurnal rhythm in arylalkylamine-N-acetyltransferase mRNA in rat pineal gland. *Neurosci. Lett.* 248: 163–166.
- Pfeffer, M., R. Kühn, L. Krug, H.-W. Korf, J. Stehle (1998) Rhythmic variation in β -Adrenergic receptor mRNA levels in

- the rat pineal gland: circadian and developmental regulation. *Eur. J. Neurosci.* 10: 2896–2904.
- Pfeffer, M., E. Maronde, C. A. Molina, H.-W. Korf, J. Stehle (1999) Inducible cyclic AMP early repressor protein in rat pinealocytes: a highly sensitive natural reporter for regulated gene transcription. *Mol. Pharmacol.* 56: 279–289.
- Pfeffer, M., E. Maronde, H.-W. Korf, J. H. Stehle (2000) Antisense experiments reveal molecular details on mechanisms of ICER suppressing cAMP-inducible genes in rat pinealocytes. *J. Pineal Res.* 29: 24–33.
- Provencio, I., G. Jiang, W. J. de Grip, W. P. Hayes, M. D. Rollag (1998) Melanopsin: an opsin in melanophores, brain, and eye. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 340–345.
- Ralph, M. R., M. Menaker (1988) A mutation of the circadian system in golden hamsters. *Science* 241: 1225–1227.
- Reppert, S. M., W. J. Schwartz, G. R. Uhl (1987) Arginine vasopressin: a novel peptide rhythm in cerebrospinal fluid. *Trends Neurosci.* 10: 76–80.
- Reppert, S. M., D. R. Weaver (2002) Coordination of circadian timing in mammals. *Nature* 418: 935–941.
- Roseboom, P. H., D. C. Klein (1995) Norepinephrine stimulation of pineal cyclic AMP response element-binding protein phosphorylation: primary role of a beta-adrenergic receptor/cyclic AMP mechanism. *Mol. Pharmacol.* 47: 439–449.
- Roseboom, P. H., S. L. Coon, R. Baler, S. K. McCune, J. L. Weller, D. C. Klein (1996) Melatonin synthesis: analysis of the more than 150-fold nocturnal increase in serotonin N-acetyltransferase messenger ribonucleic acid in the rat pineal gland. *Endocrinology* 137: 3033–3045.
- Ross, A. W., P. J. Morgan (2002) The pars tuberalis as a target of the central clock. *Cell Tissue Res.* 309: 163–171.
- Scharrer, E., B. Scharrer (1937) Über Drüsen-Nervenzellen und neurosekretorische Organe bei Wirbellosen und Wirbeltieren. *Biol. Rev.* 12: 185–216.
- Scharrer, E., B. Scharrer (1963) *Neuroendocrinology*. Columbia Univ. Press, New York, pp. 1–289.
- Schomerus, C., E. Laedtke, H.-W. Korf (1995) Calcium responses of isolated, immunocytochemically identified rat pinealocytes to noradrenergic, cholinergic and vasopressinergic stimulations. *Neurochem. Int.* 27: 163–175.
- Schomerus, C., E. Maronde, E. Laedtke, H.-W. Korf (1996) Vasoactive intestinal peptide (VIP) and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) induce phosphorylation of the transcription factor CREB in subpopulations of rat pinealocytes: immunocytochemical and immunochemical evidence. *Cell Tissue Res.* 286: 305–313.
- Schomerus, C., H.-W. Korf, E. Laedtke, J. L. Weller, D. C. Klein (2000) Selective adrenergic/cAMP-dependent switch-off of proteasomal proteolysis alone switches on neural signal transduction: an example from the pineal gland. *J. Neurochem.* 75: 2123–2132.
- Shearman, L. P., S. Sriram, D. R. Weaver, E. S. Maywood, I. Chaves, B. Zheng, K. Kume, C. C. Lee, G. T. van der Horst, M. H. Hastings, S. M. Reppert (2000) Interacting molecular loops in the mammalian circadian clock. *Science* 288: 1013–1019.
- Shigeyoshi, Y., K. Taguchi, S. Yamamoto, S. Takekida, L. Yan, H. Tei, T. Moriya, S. Shibata, J. J. Loros, J. C. Dunlap, H. Okamura (1997) Light-induced resetting of a mammalian circadian clock is associated with rapid induction of the mPer1 transcript. *Cell* 91: 1043–1053.
- Smith, M., Z. Burke, A. Humphries, T. Wells, D. Klein, D. Carter, R. Baler (2001) Tissue-specific transgenic knockdown of Fos-related antigen 2 (Fra-2) expression mediated by dominant negative Fra-2. *Mol. Cell. Biol.* 21: 3704–3713.
- Stehle, J. H., S. A. Rivkees, J. J. Lee, D. R. Weaver, J. D. Deeds, S. M. Reppert (1992) Molecular cloning and expression of the cDNA for a novel A2-adenosine receptor subtype. *Mol. Endocrinol.* 6: 384–393.
- Stehle, J. H., N. S. Foulkes, C. A. Molina, V. Simonneaux, P. Pevet, P. Sassone-Corsi (1993) Adrenergic signals direct rhythmic expression of transcriptional repressor CREM in the pineal gland. *Nature* 365: 314–320.
- Stehle, J. H., N. S. Foulkes, P. Pevet, P. Sassone-Corsi (1995) Developmental maturation of pineal gland function: synchronized CREM inducibility and adrenergic stimulation. *Mol. Endocrinol.* 6: 706–716.
- Stehle, J. H., C. von Gall, C. Schomerus, H.-W. Korf (2001a) Of rodents and ungulates and melatonin: creating a uniform code for darkness by different signalling mechanisms. *J. Biol. Rhythms* 16: 312–325.
- Stehle, J. H., C. von Gall, H.-W. Korf (2001b) Analysis of cell signalling in the rodent pineal gland deciphers regulators of dynamic transcription in neural/endocrine cells. *Eur. J. Neurosci.* 14: 1–9.
- Stehle, J. H., C. von Gall, H.-W. Korf (2002) Organisation of the circadian system in melatonin-proficient C3H and melatonin-deficient C57BL mice: a comparative investigation. *Cell Tissue Res.* 309: 173–182.
- Stehle, J. H., C. von Gall, H.-W. Korf (2003) Melatonin: a clock-output, a clock-input. *J. Neuroendocrinol.* 15: 383–389.
- Takekida, S., L. Yan, E. S. Maywood, M. H. Hastings, H. Okamura (2000) Differential adrenergic regulation of the circadian expression of the clock genes *Period1* and *Period2* in the rat pineal gland. *Eur. J. Neurosci.* 12: 4557–4561.
- Tamotsu, S., C. Schomerus, J. H. Stehle, P. H. Roseboom, H.-W. Korf (1995) Norepinephrine-induced phosphorylation of the transcription factor CREB in isolated rat pinealocytes: an immunocytochemical study. *Cell Tissue Res.* 282: 219–226.
- Toh, K. L., C. R. Jones, Y. He, E. J. Eide, W. A. Hinz, D. M. Virshup, L. J. Ptacek, Y.-H. Fu (2001) An hPer2 phosphorylation site mutation in familial advanced sleep phase syndrome. *Science* 291: 1040–1043.
- Tosini, G., M. Menaker (1996) Circadian rhythms in cultured mammalian retina. *Science* 272: 419–421.
- Tosini, G., S. Doyle, M. Geusz, M. Menaker (2000) Induction of photosensitivity in neonatal rat pineal gland. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97: 11540–11544.
- Toussou, E., H. Meissl (2004) Suprachiasmatic nuclei grafts restore the circadian rhythm in the paraventricular nucleus of the hypothalamus. *J. Neurosci.* 24: 2983–2988.
- von Gall, C., G. E. Duffield, M. H. Hastings, M. D. A. Kopp, F. Dehghani, H.-W. Korf, J. H. Stehle (1998) CREB in the mouse SCN: a molecular interface coding the phase-adjusting stimuli light, glutamate, PACAP, and melatonin for clockwork access. *J. Neurosci.* 18: 10389–10397.
- von Gall, C., A. Lewy, C. Schomerus, B. Viviani-Roels, P. Pevet, H.-W. Korf, J. H. Stehle (2000) Transcription factor dynamics and neuroendocrine signalling in the mouse pineal gland: a comparative analysis between melatonin “knockdown” C57BL mice and melatonin-proficient C3H mice. *Eur. J. Neurosci.* 12: 964–972.
- von Gall, C., I. Schneider-Hüther, M. Pfeffer, F. Dehghani, H.-W. Korf, J. H. Stehle (2001) Clock gene protein mPER1 is rhythmically synthesised and under cAMP control in the mouse pineal gland. *J. Neuroendocrinol.* 13: 313–316.

- von Gall, C., J. H. Stehle, D. R. Weaver (2002a) Mammalian melatonin receptors: molecular biology and signal transduction. *Cell Tissue Res.* 309: 151–162.
- von Gall, C., M. L. Garabette, C. A. Kell, S. Frenzel, F. Dehghani, P. M. Schumm-Draeger, D. R. Weaver, H.-W. Korf, M. H. Hastings, J. H. Stehle (2002b) Rhythmic gene expression in pituitary depends heterologous sensitization by the neurohormone melatonin. *Nat. Neurosci.* 5: 234–238.
- Weaver, D. R. (1999) The roles of melatonin in development. *Adv. Exp. Med. Biol.* 460: 199–214.
- Wehr, T. A., W. C. Jr. Duncan, L. Sher, D. Aeschbach, P. J. Schwartz, E. H. Turner, T. T. Postolache, N. E. Rosenthal (2001) A circadian signal of change of season in patients with seasonal affective disorder. *Arch. Gen. Psychiatry* 58: 1108–1114.
- Welsh, D. K., D. E. Logothetis, M. Meister, S. M. Reppert (1995) Individual neurons dissociated from rat suprachiasmatic nucleus express independently phased circadian firing rhythms. *Neuron* 14: 697–706.
- Yamaguchi, S., S. Mitsui, S. Miyake, L. Yan, H. Onishi, K. Yagita, M. Suzuki, S. Shibata, M. Kobayashi, H. Okamura (2000) The 5' upstream region of mPer1 gene contains two promoters and is responsible for circadian oscillation. *Curr. Biol.* 10: 873–876.

