

Uhrengene und ihre Bedeutung für die pankreatische Insel

Einleitung

Alle höheren Lebewesen haben im Laufe der Evolution Mechanismen entwickelt, um den Organismus mit seinen vielfältigen Lebensäußerungen wie Motilität, Schlaf/Wach-Phasen, Fortpflanzung sowie Nahrungsaufnahme in den Ablauf eines durch die Erdrotation vorgegebenen 24-Stunden-Tages einzupassen. Ermöglicht wurde ein solcher Prozess durch die Herausbildung einer „biologischen Uhr“, die näherungsweise im 24-Stunden-Rhythmus, also circadian, schwingt. Beim Säuger befindet sich der zentrale Rhythmusgeber in spezialisierten Neuronen des paarig angelegten hypothalamischen *Nucleus suprachiasmaticus* (SCN). Ein evolutionär erhaltenes Charakteristikum der „zentralen Uhr“ ist die Beeinflussbarkeit der circadianen Schwingung durch den Licht-Dunkel-Wechsel innerhalb einer 24-Stunden-Periode, der als sogenannter Zeitgeber fungiert und die Anpassung der inneren Uhr an den geophysikalischen Tag gewährleistet. Die biologische Uhr oder der Oszillator ist ein integraler Bestandteil eines circadianen Systems, welches zum einen aus dem Zeitgeber, der Uhr selbst und aus einer dritten Komponente besteht, welche die Informationsweitergabe des vorgegebenen Rhythmus, den sogenannten „output“, beinhaltet. Dieser Begriff der Kybernetik beschreibt hier Faktoren/Informationen, die vom Oszillator ausgehend periphere Systeme circadian-rhythmisch ansteuern und beeinflussen.

Es hat sich in den letzten Jahren gezeigt, dass die Rhythmusgenerierung durch rhythmische Aktivierung von Uhrengen bewirkt wird, die als Transkriptionsfaktoren agieren und sich transkriptional/translational gegenseitig aktivieren oder hemmen und im Ergebnis einen circadianen Rhythmus generieren. Zusätzlich zum zentralen Oszillator wurden weitere, periphere Rhythmusgeber in Organen wie Leber, Herz und endokrines Pankreas identifiziert (Abb. 1), die, vermutlich durch den SCN gesteuert, mit einer Phasenverzögerung von 3 bis 6 Stunden (Reppert und Weaver, 2001) zur Zentraluhr schwingen. Diese letztgenannten Schrittmacher nutzen Zeitgeber, die bislang noch weitgehend unbekannt sind. Es existieren inzwischen jedoch Hinweise, dass die gleichen Uhrengenprodukte, deren Bedeutung zuvor für den SCN beschrieben worden war, den circadianen Rhythmus erzeugen. Die Wahrscheinlichkeit eines direkten Einflusses des SCN auf periphere Systeme wird zur Zeit kontrovers diskutiert. Während Schibler et al. (2003) ihn als eher gering einschätzen, hält Balsalobre (2002) ihn durchaus für wichtig.

Die Bedeutung eines circadianen (endogenen) Oszillators für die Ausschüttung des zentralen Hormons der Glucose-Homöostase, dem Insulin, konnte von Peschke und Peschke (1998) in einer *ex vivo*-Studie an isolierten pankreatischen Inseln der Ratte aufgezeigt werden (Abb. 2a,b). Diese Ergebnisse widerlegten frühere Annahmen, dass für das sekretorische Geschehen der LANGERHANSschen Insel überwiegend neuronale Einflüsse geltend gemacht werden können (Sakaguchi et al., 1988), und führten zu der Erkenntnis, dass das Inselorgan eine weitgehende Autonomie bezüglich der endogenen circadianen Oszillation aufweist. Gleichzeitig bildete die Studie von Peschke und Peschke (1998) die Grundlage für weiterführende Untersuchungen zur Uhrengenexpression am Modell des Rattenpankreas (Mühlbauer et al., 2004). Diese Experimente dienten dem Nachweis, dass der rhythmischen Hormonausschüttung die circadian-rhythmische Expression von Uhrengen zugrunde liegen könnte. Untersuchungen von Delattre et al. (1999) legten nahe, dass Rhythmusstörungen der Insulin-produzierenden β -Zelle auch zu Sekretionsstörungen führen können. Damit lässt sich zum ersten Male ein hypothetischer Zusammenhang zwischen möglicher Arrhythmie der Uhrengenexpression und Entwicklung von Stoffwechselstörungen, wie beispielsweise eines Diabetes, vermuten. Dieser Frage nachzugehen ist eine der Aufgaben des Projektes der Sächsischen Akademie der Wissenschaften zu Leipzig „Zeitstrukturen endokriner Systeme“.

Uhrengenexpression sowie Uhrengen-beeinflusste Gene in peripheren Organen

Über die Bedeutung und Funktion des zentralen circadianen Oszillators liegt inzwischen eine Reihe von schlüssigen Erkenntnissen vor (Übersicht: Cermakian und Sassone-Corsi, 2000; Reppert und Weaver, 2001; Balsalobre, 2002; Stehle et al., 2002). Sie werden vor allem von Befunden an verschiedenen „knockout“-Mausmodellen unterstützt, bei denen das entsprechende Uhrengen inaktiviert wurde. Im Unterschied dazu ist der Kenntnisstand an entsprechenden Systemen peripherer Organe noch weitgehend unbekannt.

Die weitreichende Bedeutung von peripheren Oszillatoren für den Gesamtorganismus wird durch Daten von Storch et al. (2002) verdeutlicht. Mittels Microarray-Ver-

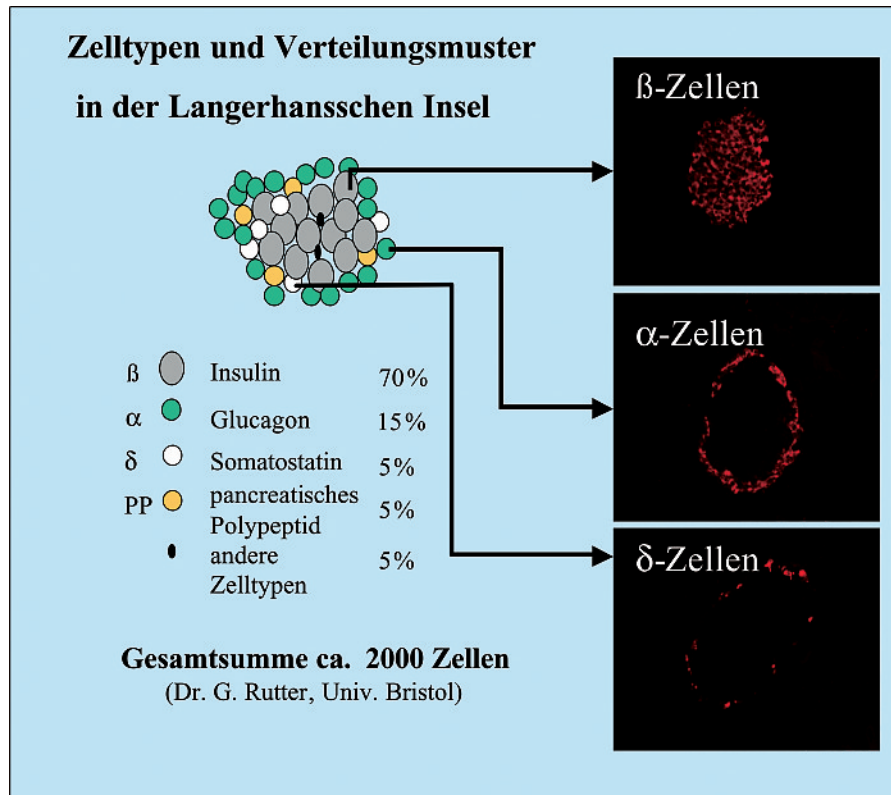


Abb. 1: Schematische Darstellung einer pankreatischen Insel mit den verschiedenen Zelltypen. Immunocytochemische Nachweise von Somatostatin, Glucagon und Insulin mittels fluoreszenzmarkierter Antikörper zeigen das Zellverteilungsmuster bei Inseln einer Wistar ratte.

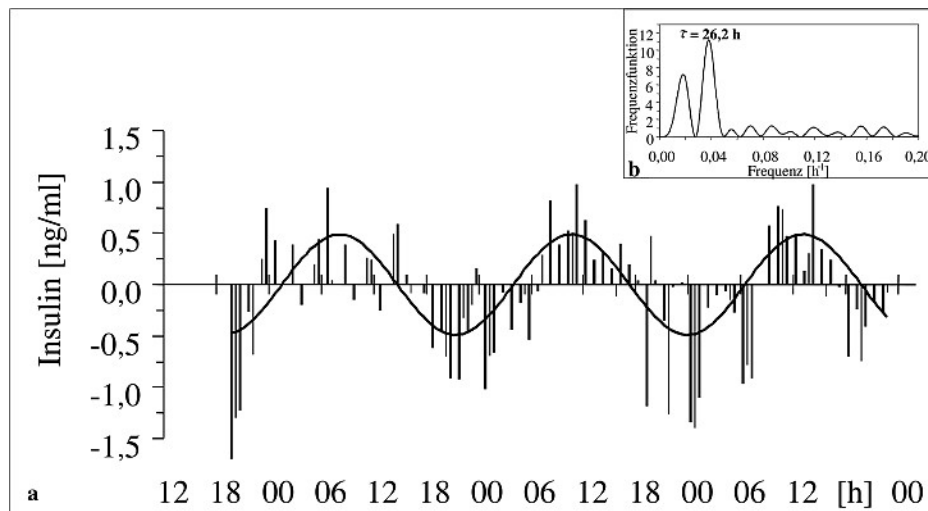


Abb. 2: Nachweis circadianer Rhythmik der Insulinausschüttung an isolierten Ratteninseln in einem Superfusionsexperiment. Dargestellt ist ein Profil der Insulinsekretion im Tagesgang (2a). Die Schwingung hat eine Periodenlänge (τ) von 26,2 Stunden (2b). Nach Peschke und Peschke (1998).

fahren, mit dem der Aktivitätsstatus nahezu aller exprimierter Gene eines Gewebes zu einem Tageszeitpunkt mit dem eines anderen Tageszeitpunktes verglichen wurde (ca. 12500 verschiedene Gene), ließ sich abschätzen, dass etwa 8 bis 10 % aller Gene der untersuchten Organe Herz und Leber circadian-rhythmische Expressionsschwankungen aufweisen. Nach dieser Studie sind etwa

37 Gene den eigentlichen Uhrengenen in diesen Organen zuzuordnen, die als Teile eines circadianen Oszillators fungieren. Der überwiegende Anteil der circadian exprimierten Gene gehört jedoch zu den „clock-controlled output“-Genen. Letztere Gruppe umfasst Gene, die als Rezipienten des circadianen „outputs“ des Oszillators anzusehen sind und damit auch circadianer Expressions-

rhythmik unterliegen. Insgesamt wurden dieser Gruppe ca. 540 Gene in der Leber und 420 Gene im Herzen zugeordnet. Damit wird deutlich, dass praktisch kaum ein Vorgang in einem der Glucose-Homöostase dienenden Gewebe wie der Leber von circadianen Veränderungen unberührt bleibt. Damiola und Mitarbeiter (2000) hatten bereits Expressionsdaten gewonnen, die die Annahme erhärteten, dass auch das Pankreas einem circadianen Rhythmus unterworfen ist. Daraus resultiert die Hypothese, dass die numerischen Verhältnisse bezüglich circadian exprimierter Gene in Herz und Leber möglicherweise auch auf das Pankreas zu übertragen sind. Es sei an dieser Stelle allerdings darauf hingewiesen, dass eine Studie von Storch et al. (2002) zu dem Ergebnis kam, dass, außer den Uhrgenen im engeren Sinne, die Palette circadian exprimierter Gene beider untersuchter Organe kaum übereinstimmte. Damit können sich zukünftige Untersuchungen an anderen peripheren Systemen nicht automatisch auf die bisher gemachten Erkenntnisse an Herz und Leber stützen.

Die bislang bekannten Uhrgene des Säugers lassen sich der Familie der *period*-Gene (*Per1*: Sun et al., 1997; *Per2*: Shearman et al., 1997; *Per3*: Shearman et al., 2000a), der „brain- and muscle aryl hydrocarbon-receptor nuclear translocator-like“-Proteinfamilie (*Bmal1*, *Bmal2*: Ikeda und Nomura, 1997; Ikeda et al., 2000) sowie der Familie der Cryptochrome (*Cry1*, *Cry2*: van der Horst et al., 1999; Kume et al., 1999) zuordnen. Darüber hinaus

wurde das Drosophila-homologe *Clock*-Gen (*Clock*: King et al., 1997) als essentielles Gen des biologischen Rhythmusgenerators erkannt. Inaktivierung jedes dieser Gene im „knockout“-Modell der Maus führt zu mehr oder minder großen Veränderungen der circadianen Rhythmik bzw. zu deren Verlust (Zheng et al., 1999 [*Per2*]; Oishi et al., 2000 [*Clk*]; Shearman et al., 2000a,b [*Per3*, *Clk*]; Cermakian et al., 2001 [*Per1*]) mit unterschiedlichen Auswirkungen auf zentraler und peripher Ebene (Cermakian et al., 2001). Nach klassischer allgemein akzeptierter Auffassung zur prinzipiellen Wirkung der vorgenannten Uhrgene können *Per1*, *Per2*, *Per3*, *Cry1* und *Cry2* einer Gruppe von Proteinen mit vorwiegend negativer transkriptional regulatorischer Wirkung zugeordnet werden. Demgegenüber bilden *Bmal1* und *Bmal2* sowie *Clock* eine Gruppe mit überwiegend positiver Wirkung. CLOCK/BMAL1-Heterodimere bewirken transkriptionale Aktivierung von PER- und CRY-Proteinen, die wiederum die CLOCK/BMAL1-Expression und damit die eigene Aktivierung am Ende einer negativen Rückkopplungsschleife aufheben (Übersicht: Hastings und Maywood, 2000; Reppert und Weaver, 2001). Neuere Erkenntnisse deuten allerdings darauf hin, dass *Per2* die positiv regulatorische Funktion erfüllt, die reprimierte Expression von *Bmal1* am Ende des Rückkopplungszyklus wieder zu aktivieren (Shearman et al., 2000b; siehe Abb. 3). Der transkriptionale Einfluss von Uhrgenen, die für Transkriptionsfak-

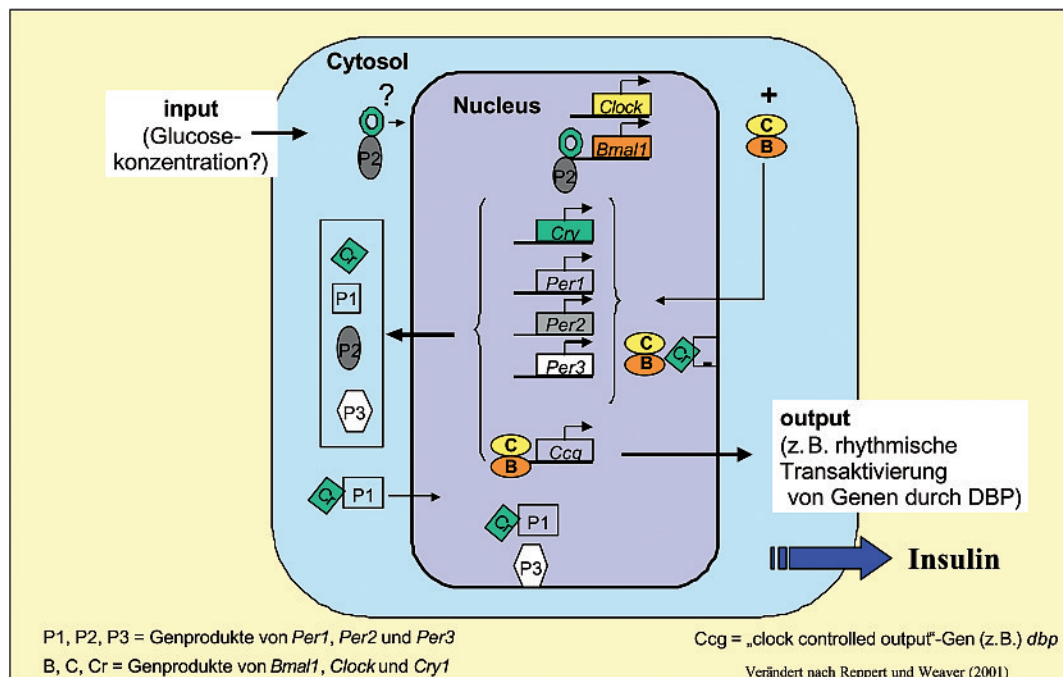


Abb. 3: Modell einer pankreatischen circadianen Uhr mit den hypothetischen Mechanismen transkriptional/translatationaler Regelkreise. Die Uhrgene *Per1*, *Per2*, *Per3* und *Cry1* werden durch die positiven Faktoren CLOCK (C) und BMAL1 (B) nach nukleärer Translokation circadian-rhythmisch aktiviert. CRY1 (Cr, grünes Rechteck) bewirkt über eine negative Rückkopplungsschleife eine Blockierung der transaktivierenden CLOCK/BMAL1. PER2 (P2, graues Oval) ist als Heterodimer mit einem hypothetischen weiteren Faktor für die transkriptionelle Aktivierung von *Clock* und *Bmal1* verantwortlich. Das CLOCK/BMAL1-Heterodimer treibt außerdem die Transkription von „output“-Genen (*Ccg*). Das Insulingen könnte ein solches *Ccg* sein. Zeitgeber („input“) für eine circadiane Uhr des Pankreas ist in diesem Modell ein humoraler Faktor wie z. B. die Glucose.

toren codieren, wird über eine strukturelle *cis*-aktive Sequenz, das sogenannte E-Box-Element, vermittelt, welches im Promotorbereich von *Per1*, aber auch im „albumin-D-element binding protein“ (*Dbp*: Müller et al., 1990), im Vasopressin (Uhl und Reppert, 1986) und in der *Arylalkylamin-N-Acetyl-Transferase (Aanat)*, dem Schlüsselenzym der Melatoninbiosynthese, gefunden wird (Chong et al., 2000). BMAL1/CLOCK können mit ihrer basischen Helix-Loop-Helix-(bHLH-)Domäne an das E-Box-Element binden und transkriptionale Aktivierung ermöglichen (Munoz et al., 2002). In mehreren Fällen wurde das „cAMP response element binding protein“ (CREB) als co-regulatorisches Element identifiziert, gezeigt am Beispiel des *Renin*-Gens (Pan et al., 2001) und des *Per1*-Gens (Travnickova-Bendova et al., 2002). Damit konnte eine enge Beziehung zwischen cAMP-gekoppelten Signaltransduktionswegen und „entrainment“ hergestellt werden.

Die prinzipielle Organisationsstruktur der biologischen Uhr, die zunächst am SCN aufgeklärt wurde, lässt sich nach den bisherigen Erkenntnissen auch auf periphere Oszillatoren übertragen. Auch hier tragen die von der zentralen Uhr bekannten Uhrgene zur Aufrechterhaltung der circadianen Rhythmik bei. Wesentliche Unterschiede zwischen zentralem Oszillator und peripheren Schrittmachern sind in der Art der Beeinflussbarkeit der Systeme zu sehen. Während der SCN vorwiegend durch Licht als Zeitgeber synchronisiert wird, gelten für Organe wie Leber und Herz humorale Faktoren wie Glucose (Hirota et al., 2002) oder Hormone wie Glucocorticoide (Balsalobre et al., 2000a) oder Melatonin (Rutter et al., 2002) als mögliche Zeitgeber. Glucose oder Folgeprodukte des Glucosestoffwechsels wie ein verändertes NAD(H)/NADP(H)-Verhältnis könnten für das endokrine Pankreas Zeitgeberfunktion erfüllen (Rutter et al., 2002). Ein hypothetisches Modell für die Rolle eines pankreatischen Zeitgebers zeigt Abbildung 3. Temperatur (Brown et al., 2002) ließ sich als ein potentieller physiologischer Zeitgeber im Zellkultursystem als auch im Mausmodell nachweisen. Die Gruppe um Ueli Schibler (2003) vermutet ein Zusammenspiel von humoralen Faktoren wie Glucose mit physikalischen Faktoren wie Temperatur für das „entrainment“ peripherer Systeme. Einen direkten, und zwar transkriptional hemmenden, Glucose-vermittelten Einfluss auf die Expression der Zeitgene *Per1* und *Per2* konnten Hirota und Mitarbeiter (2002) an der Glucose-induzierten circadianrhythmisch oszillierenden Fibroblasten-Zelllinie Rat-1 zeigen. Sie postulieren, ausgehend von ihrem Modell, dass Glucose generell als wichtiger Faktor für das „entrainment“ peripherer Organe *in vivo* anzusehen ist. Unter der Voraussetzung einer breiteren Gültigkeit des genannten Zellkulturmodells wird Glucose als Zeitgeber auch für Zeitgene im endokrinen Pankreas mehr als eine ausschließlich hypothetische Fiktion. Störungen des Glucosestoffwechsels hätten damit voraussichtlich Relevanz für die Eigenschwingung eines Insel-spezifischen Oszillators. Dass nachweislich Melatonin Zeitgeberfunktion für

die pankreatische Insel haben kann, zeigten die Superfusions-Experimente von Peschke und Peschke (1998) an isolierten Ratteninseln, die neben der Aussage einer circadian-rhythmischen Insulinausschüttung auch den Einfluss von Melatonin auf die Phasenverschiebung und damit auf den Oszillator selbst belegen. Solche Experimente an *ex vivo*-Material lassen auch die Folgerung einer weitergehenden Autonomie des inselständigen Schrittmachers zu, da sich bis zu 168 Stunden nach Organentnahme noch ein freilaufender circadianer Rhythmus mit wachsender Amplitude nachweisen ließ (Peschke und Peschke, 1998). Im Gegensatz zu diesem Befund wird allgemein angenommen, dass periphere Oszillatoren außerhalb des *in vivo*-Systems einer raschen Schwingungsdämpfung unterliegen (Yamazaki et al., 2000). Der Schrittmacher der pankreatischen Insel hätte damit bezüglich der Autonomie eher Ähnlichkeit mit dem zentralen Rhythmusgeber und dem der Retina (Hastings und Maywood, 2000).

Damiola und Mitarbeiter (2000) konnten durch Untersuchungen an der Maus zeigen, dass sich „periphere Uhren“ von der „Zentraluhr“ unter Hell-Dunkel-Wechsel von der Rhythmusvorgabe durch den SCN abkoppeln lassen. Mittels Beschränkung des Zuganges zum Futter auf Stunden während der Lichtzeit ließ sich die Expressionskinetik von *Per1*, *Per2*, *Per3* und *Cry1* nach einigen Tagen invertieren, allerdings ausschließlich in Leber, Niere und Pankreas, nicht aber im SCN. Auch die Rhythmik des endokrinen Pankreas (Damiola et al., 2000), hier nur gezeigt an der Expression von *Dbp*, einem „output“-Gen (Lopez-Molina et al., 1997), wurde durch Futterrestriktion beeinflusst. Die Befunde zeigen, dass die „peripheren Uhren“ anderen Zeitgebern folgen als die „Zentraluhr“, wobei Futter als Zeitgeber fungieren kann.

Neben der Arbeit von Peschke und Peschke (1998) zur circadianen Rhythmik der Insulinsekretion unter *in vitro*-Bedingungen war es vor allem die Arbeit von Damiola und Mitarbeitern (2000), die zu eigenen, weiterführenden Untersuchungen zur Identifizierung einer circadianen Uhr im Rattenpankreas ermutigten. Die quantitativen real time RT-PCR-Daten für das Gesamtpankreas der Ratte, die in Abbildung 4 dargestellt werden, beschreiben die Expressionskinetik von *Per1* (A) und *Bmal1* (B) auf mRNA-Niveau. Dabei wird ein circadianer Rhythmus mit einem Expressionsmaximum für *Per1* gegen Ende des subjektiven Tages bei einem gleichzeitigen Minimum für *Bmal1* nachweisbar. Das Uhrengesteuerte *Dbp* (Abb. 4C) schwingt im Pankreas parallel zu *Per1*. Diese Daten beziehen sich auf die erfasste Expression an Tieren, die bei einem Lichtregime von L:D = 12:12 gehalten wurden und Futterzugang *ad libitum* hatten. Im Gegensatz zu den vorgenannten Genen *Per1* und *Bmal1* werden *Clock* und *Tim* (*timeless*) offenbar konstitutiv im Rattenpankreas exprimiert. *Per2*- und *Cry1*-Daten zeigen dagegen zeitabhängige Expressionsschwankungen (Abb. 5). Dass diese Uhrgene nicht nur für das Tiermodell von

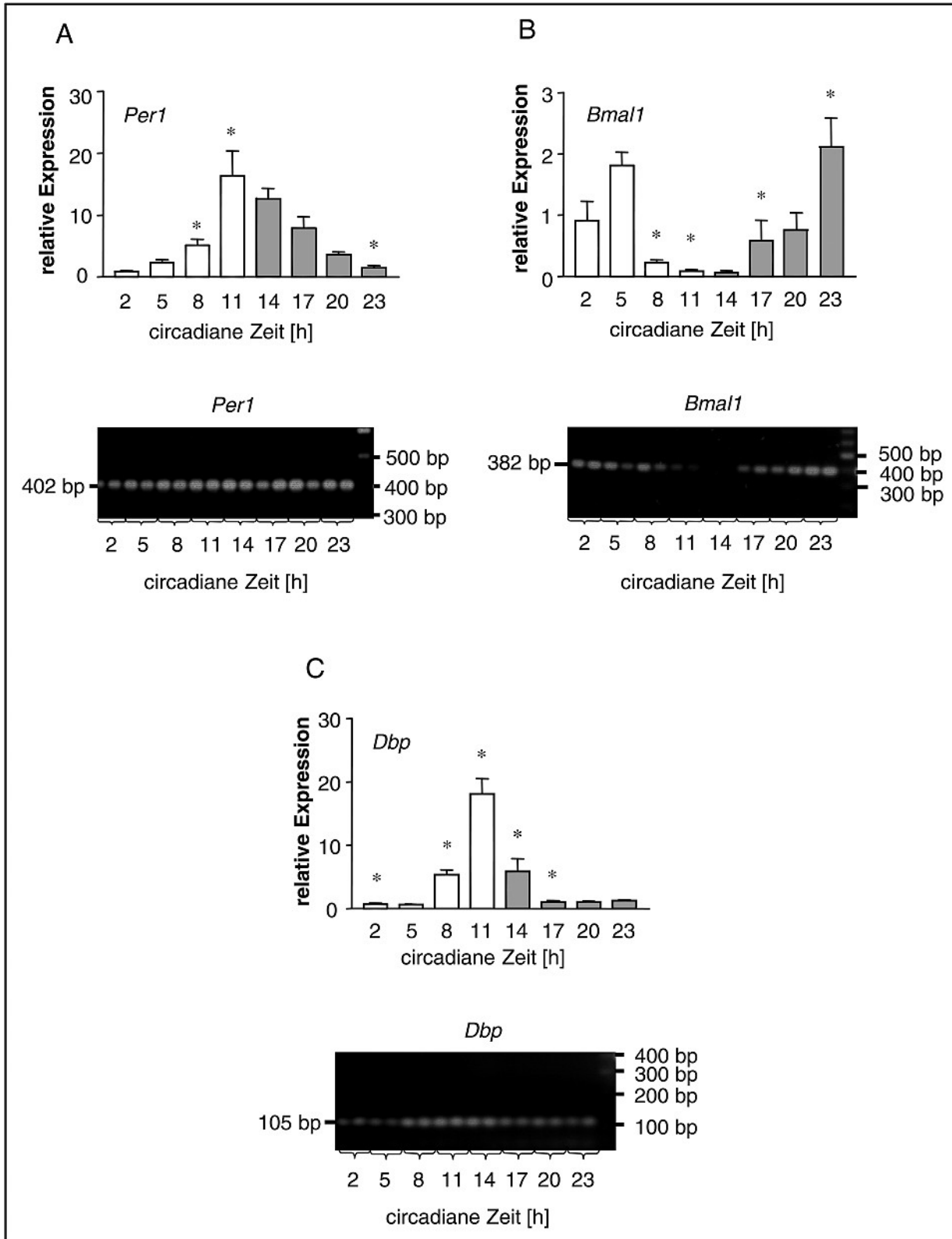


Abb. 4: Nachweis circadianer Expression der Uhrgene *Per1* (A) und *Bmal1* (B) sowie des Uhrgenen-beeinflussten Gens *Dbp* (C) im Rattenpankreas durch quantitative real time RT-PCR. Die Expressionsmittelwerte von $n = 4$ Tieren pro Zeitpunkt sind grafisch dargestellt. Die gelelektrophoretische Trennung der Amplifikationsprodukte belegt die Spezifität der PCR. Die Molekülgröße der PCR-Produkte in Relation zum Molekularstandard ist in Basenpaaren (bp) angegeben. Signifikante Expressionsunterschiede ($p < 0,05$) zwischen den Zeitgruppen wurden mit * gekennzeichnet. (Lichtzeit: helle Säulen, Dunkelzeit: dunkle Säulen)

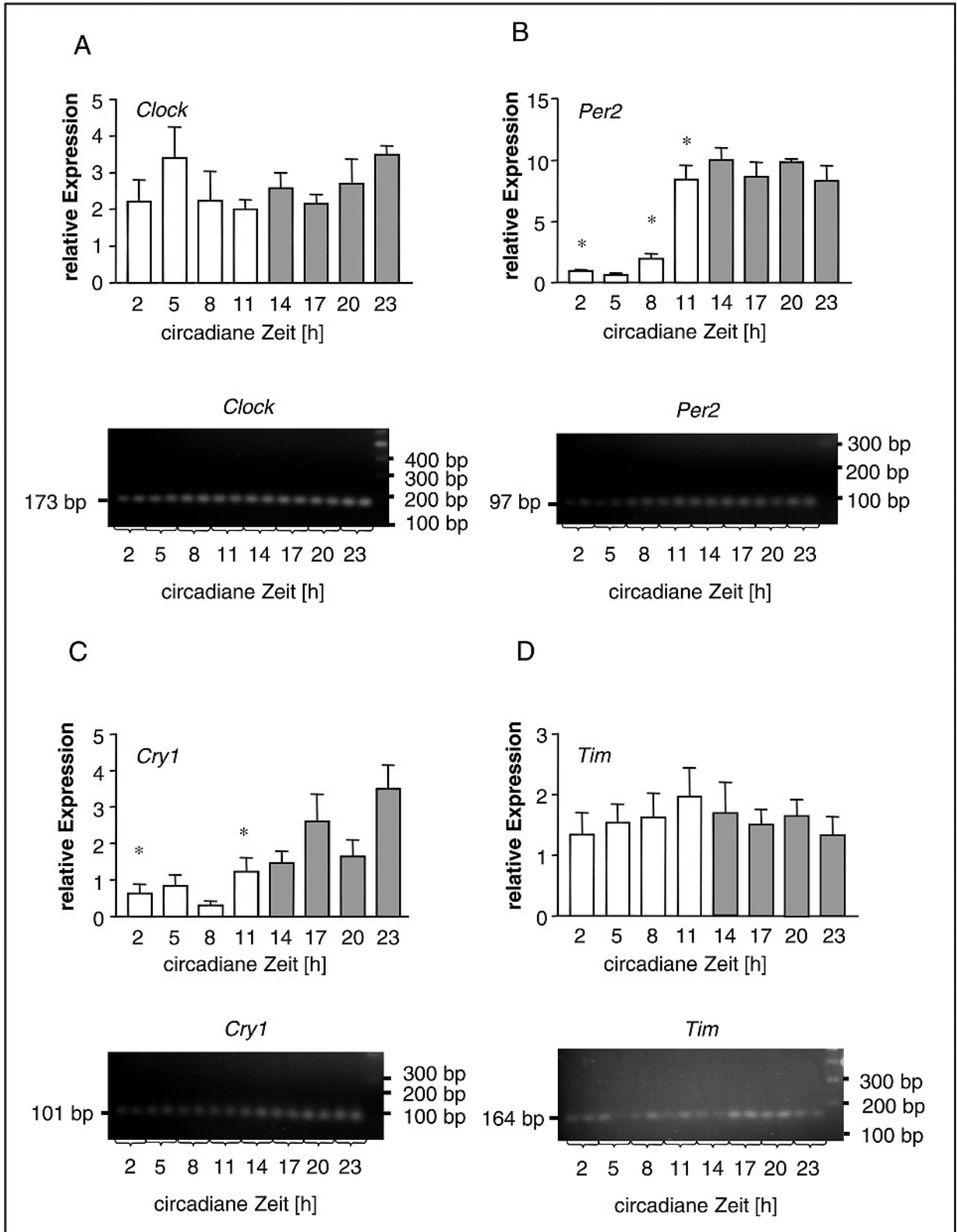


Abb. 5: Nachweis circadianer Expression der Uhrgene *Clock* (A), *Per2* (B), *Cry1* (C) und *Tim* (D) im Rattenpankreas durch quantitative real time RT-PCR. Weitere Angaben wie bei Abb. 4. (Lichtzeit: helle Säulen, Dunkelzeit: dunkle Säulen)

Bedeutung sind, sondern auch im menschlichen Pankreas exprimiert werden, zeigt Abbildung 6 mit der Darstellung von RT-PCR-Produkten der *Per1*- und *Bmal1*-mRNA von Pankreasgewebe des Menschen. Es ließ sich darüber hinaus zeigen, dass PER1-Immunreaktivität im Rattenpankreas überwiegend in der Insel zu finden ist (Abb. 7A). Ein Beweis spezifischer β -Zell-Lokalisation steht noch aus. Allerdings lässt die konfokalmikroskopische Aufnahme erkennen (Abb. 7B), dass überwiegend β -zellhaltige zentrale Partien der Insel immunpositiv sind.

Mittels Western-Blot-Technik konnte das PER1-Protein als ca. 45-kDa-Protein im Gesamtpankreas und als 48-kDa- und 33-kDa-Molekül (Chilov et al., 2001; Mühlbauer et al., 2004) in Ratten-Insulinoma-Zellen (INS1) nachgewiesen werden (Abb. 8).

Die Zelle als kleinste Einheit der biologischen Uhr

Die Ausprägung einer circadianen Rhythmik ist nicht nur Eigenschaft von Organismen, Organen oder Geweben, sondern findet sich auch auf der Ebene einzelner Zellen (Schibler et al., 2003). Untersuchungen von Balsalobre et al. (1998), Yagita und Okamura (2000) sowie Grundschöber et al. (2001) und anderen Autoren konnten zeigen, dass eine circadiane Schwingung in immortalisierten Säugerzellen existiert. Dies ließ sich durch Behandlung von Ratten-Fibroblasten mit hohen Serumkonzentrationen (Balsalobre et al., 1998; Yagita et al., 2000), durch Fors-

kolin (Yagita and Okamura, 2000), durch das vasokonstriktive Endothelin-1 (Yagita et al., 2001), aber auch durch Glucose (Hirota et al., 2002) erreichen. Dabei wurde durch Glucose eine initiale Herabregulation von *Per1*- und *Per2*-mRNA in der Fibroblasten-Zelllinie Rat-1 beobachtet. Es wurde vermutet, dass in diesem Falle ein anderer Synchronisationseffekt zum Tragen kommt als bei der Forskolinsynchronisation, die wahrscheinlich CREB-Aktivierung und den cAMP/PKA-Signaltransduktionsweg einschließt (Yagita und Okamura, 2000). Yagita et al. (2000) machen im Übrigen auch für die Serumchock-synchronisierte circadiane Rhythmik CREB-abhängiges „entrainment“ verantwortlich und konnten beobachten, dass durch Serumchock PER-PER-Homodimerisierung und der nukleäre Transport dieser Proteine nachweisbar wird. Balsalobre et al. (2000b) machen demgegenüber eine Aktivierung multipler Signaltransduktionswege für die circadiane Rhythmik in Rat-1-Fibroblasten verantwortlich. Diese Befunde an Säugerzelllinien verdeutlichen, dass eine circadiane Rhythmik bereits auf zellulärem Niveau existiert.

Die Bedeutung von Uhregenen auf zellulärer Ebene wird durch kürzlich publizierte Daten von Matsuo et al. (2003) unterstrichen. Diese Autoren finden Hinweise, dass der Zellteilungszyklus, der nachweislich in manchen Geweben des Säugers, so zum Beispiel in intestinale Epithel (Buchi et al., 1991), in der Cornea (Sasaki et al., 1995), im Knochenmark (Smaaland, 1996) und in Keratinozyten (Garcia et al., 2001) ein Tagesmuster zeigt, in

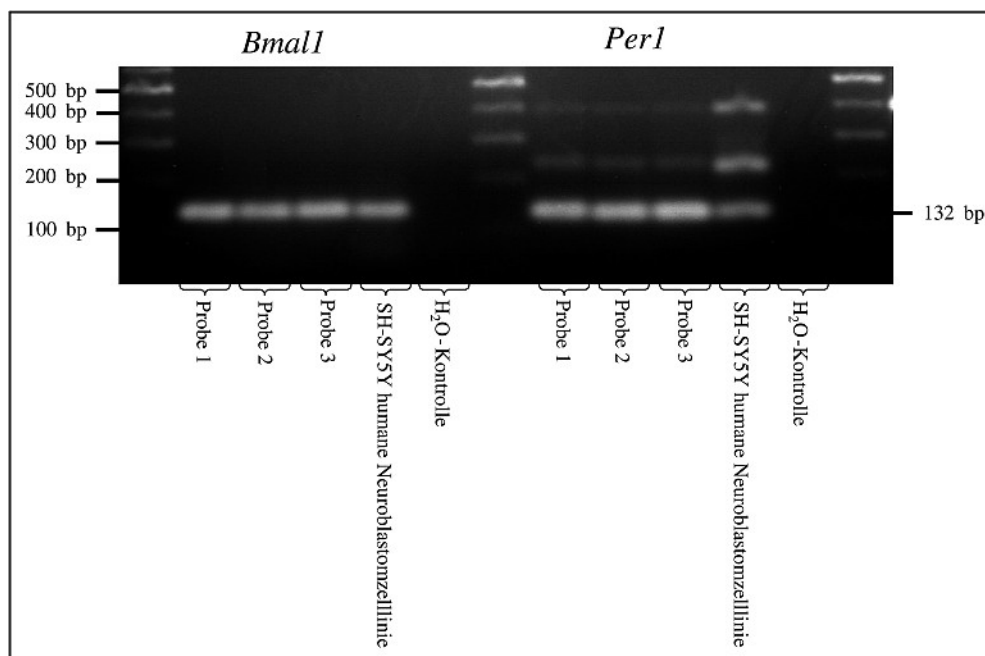


Abb. 6: Nachweis der Expression von Uhregenen *Per1* und *Bmal1* im humanen Pankreas durch RT-PCR. Abgebildet sind PCR-Produkte nach Auftrennung im 3%igen Agarosegel und anschließender Färbung mit dem UV-anregbaren Farbstoff Ethidiumbromid. Die beiden Amplikons weisen eine Molekulargröße von 132 bp auf. RNA der humanen Neuroblastom-Zelllinie SH-SY5Y diente als PCR-Positivkontrolle, destilliertes Wasser anstelle cDNS als Negativkontrolle.

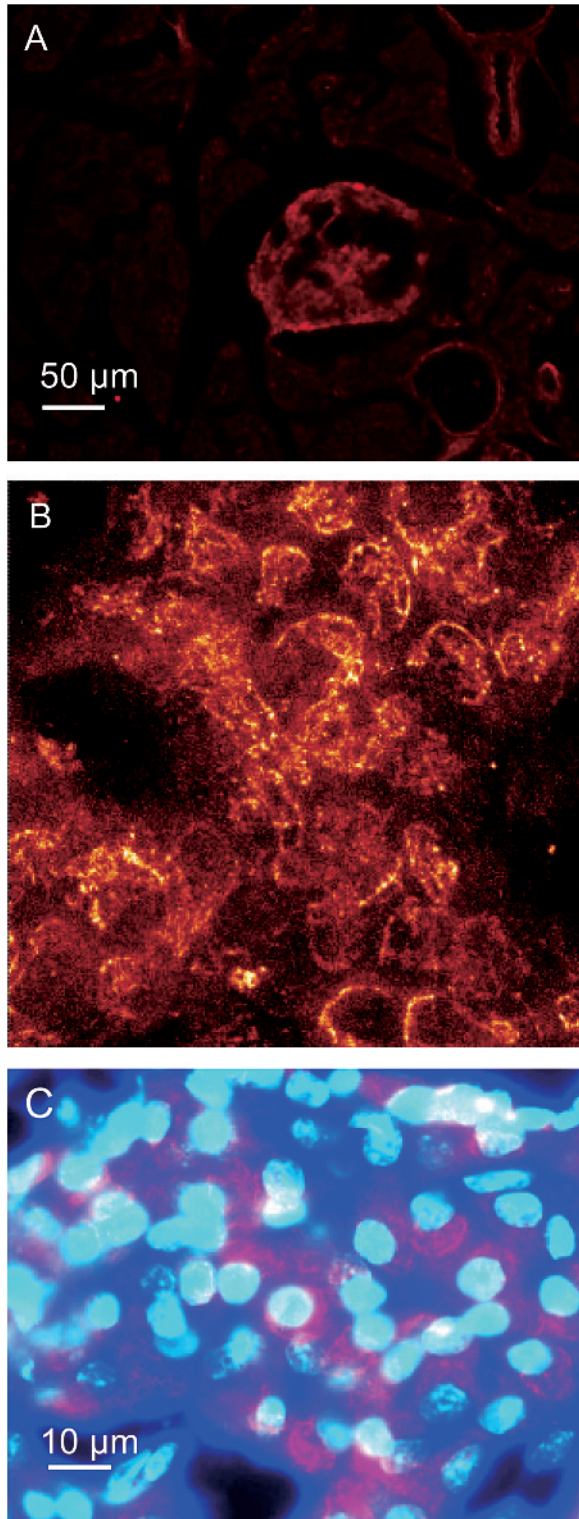


Abb. 7: Immunfluoreszenz-Nachweis von PER1 im Rattenpankreas durch Cyanin-3-konjugierte Antikörper. (A) Verstärkte Immunreaktivität von PER1 in der pankreatischen Insel der Ratte vor dem Hintergrund exokrinen Gewebes. (B) Die konfokalmikroskopische Aufnahme verdeutlicht PER1-Immunfluoreszenz in vorwiegend β -Zellen enthaltenden, zentralen Inselbereichen. Zellkerne werden durch DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindole-dilactat) hervorgehoben. (C) PER1 scheint im perinukleären Bereich konzentriert.

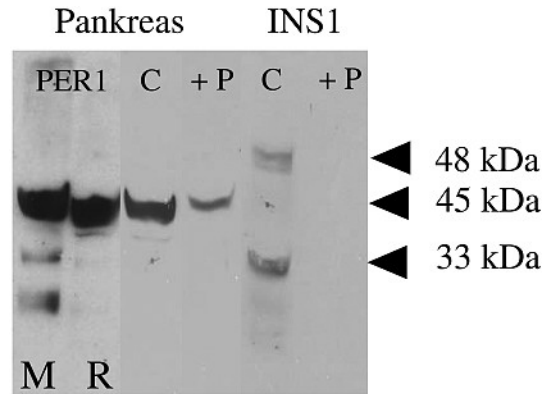


Abb. 8: Nachweis von PER1 im Rattenpankreas und INS1-Insulinoma-Zellen durch Western Blot. Dargestellt sind PER1-spezifische Banden in Maus- (M) und Rattenpankreas (R) von ca. 45 kDa, die sich durch Präinkubation mit dem Epitop supprimieren lassen (C = Kontrolle, +P = Peptidblockierung des Antikörpers). In INS1-Zellen lassen sich Epitop-blockierbare Molekülgrößen von 48 kDa und 33 kDa nachweisen.

Cry1-defizienten „knockout“-Mäusen gestört ist. Nach partieller Hepatektomie ihrer Versuchstiere und Untersuchung des regenerierenden Gewebes kam Smaaland (1996) zu der Überzeugung, dass die Zellzyklusprogression bei *Cry1*-defizienten Mäusen gestört war. Durch Befunde dieser Art wird die Bedeutung von Uhrengenen für die Kontrollfunktion mitotischer Prozesse erweitert.

Eigene Versuche zur Serumschockbehandlung von Insulin-sekretorischen Ratten-Insulinoma-Zellen (INS1) zeigen innerhalb der ersten 24 Stunden nach Serumschock eine starke Erhöhung der mRNA-Konzentration der circadian exprimierten Uhrengene *Per1* und *Bmal1* sowie der Uhrengen-kontrollierten Gene *Rev-Erba* und *Dbp*. Das bestätigt *in vivo*-Befunde am Rattenpankreas, in dem die genannten Gene ebenfalls circadian exprimiert werden (Mühlbauer et al., 2004). Dies ist ein Beweis dafür, dass das Zellkultur-System auf den Serumschock reagiert (Abb. 9B,C,D,E). Interessant ist der Befund einer kontinuierlichen Abnahme der mRNA-Expression von Insulin nach Serumschock über einen 24-stündigen Untersuchungszeitraum (Abb. 9A). Hingegen zeigen unbehandelte Kontrollen keinen vergleichbaren Effekt. Daraus lässt sich ableiten, dass das im Zellkulturüberstand akkumulierte Insulin der „batch“-Kultur nicht Ursache dieses Phänomens sein kann.

E-Box-Elemente und circadiane Rhythmik: Mögliche Bedeutung für die Expression des Insulingens

Das Insulingen (je ein Allel beim Menschen, zwei bei Ratte und Maus) gehört zu den transkriptional regulierten Genen mit ausschließlicher Aktivierung in der pankreatischen β -Zelle, welches unter anderem durch Glucose di-

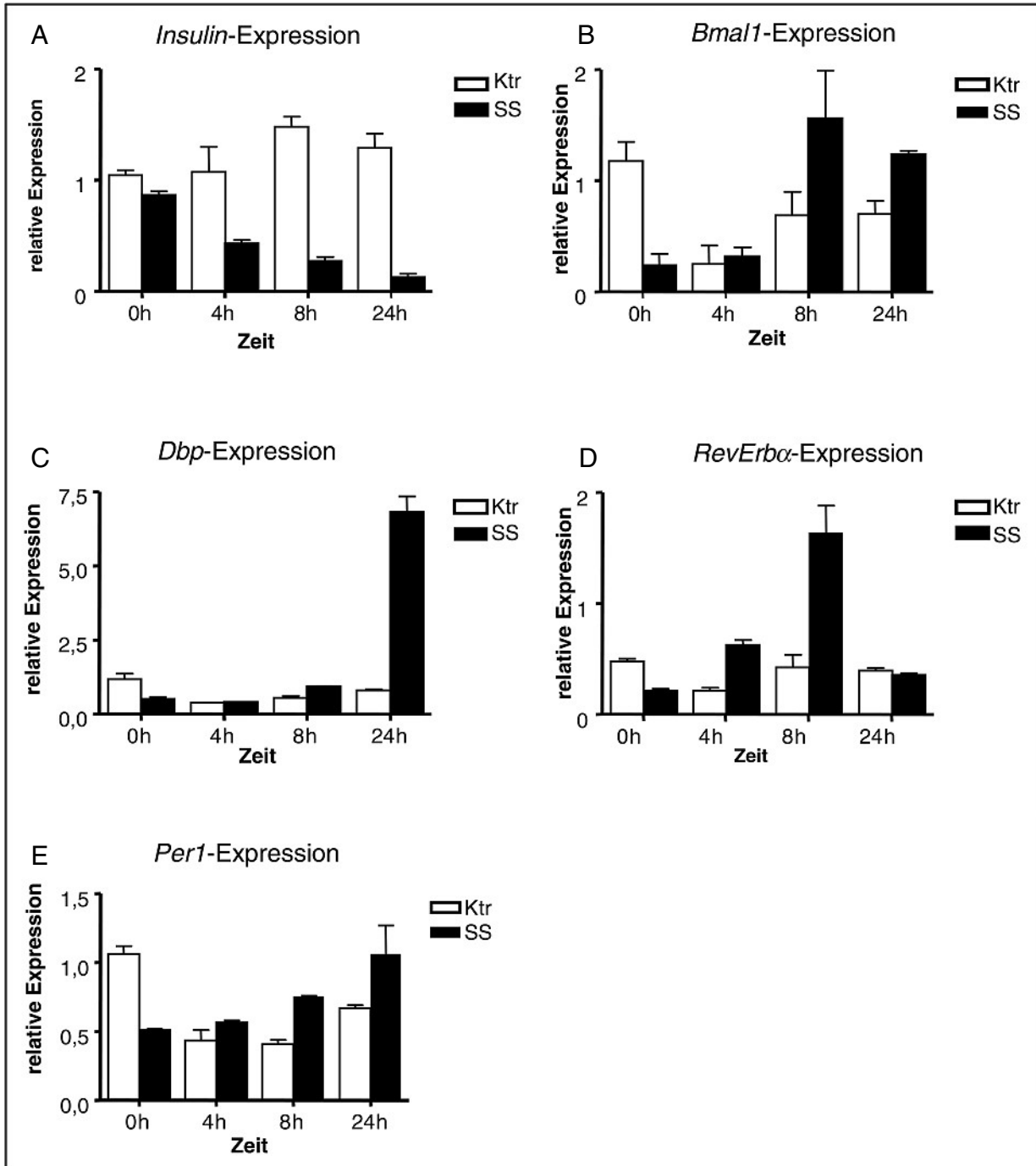


Abb. 9: Nachweis von Expressionsveränderungen über 24 Stunden bei INS1-Ratten-Insulinoma-Zellen nach 2-stündiger Behandlung mit 50 % Pferdeserum im Medium (Serumschock: SS, Kontrolle: Ktr). Relative Expressionsdaten von je zwei Parallelansätzen wurden durch quantitative real time RT-PCR erhoben. Alle Werte sind auf die Expression des „house keeping“ Gens β -Aktin normiert. Zeitgeber-Zeit in Stunden [h].

rekt transkriptional gesteuert wird (Sander et al., 1998). Schon seit längerem kennt man den transkriptional aktivierenden Einfluss von cyclischem Adenosinmonophosphat (cAMP), vermittelt über das CREB-Protein auf den Promotor des Insulingens (Eggers et al., 1998). Darüber hinaus gibt es Hinweise, dass unter anderem die Tran-

skriptionsfaktoren PDX-1, PAX6 und vor allem BETA2 transkriptional aktivierende Funktion im Bereich der Insulinpromotors/Enhancers haben, NKX2.2 dagegen inhibierende Bedeutung (Qiu et al., 2002; Cissell et al., 2003). Es ist allerdings wahrscheinlich, dass kein β -zell-spezifischer Faktor allein, sondern die Kombination meh-

erer Faktoren β -zellspezifische Insulingenaktivierung ermöglicht (Sander und German, 1997). BETA2 (oder NEURO D1) gehört zur Familie der basischen Helix-Loop-Helix-Familie (bHLH), der unter anderem auch die Uhrengeneprodukte BMAL1 und CLOCK zugezählt werden. Vertreter dieser Familie binden im Promotorbereich von Genen über ihre bHLH-Domäne an spezifische Sequenzabschnitte, die E-Box-Elemente genannt werden. Sie können weiterhin über eine PAS-(PER-ARNT-SIM-) Bindungsstelle mit anderen PAS-Proteinen homo- oder heterodimere Komplexe bilden. Moates et al. (2003) konnten zeigen, dass BETA2 wesentlicher Teil des β -zellspezifischen Transkriptionskomplexes ist, der sowohl für die transkriptionelle Aktivierung des Glucokinasegens als auch des Insulins verantwortlich ist. An die Hexanucleotidsequenz CACGTG (die E-Box-„consensus“-Sequenz; Hogenesch et al., 1998) können bHLH-Faktoren des BETA2-Typs oder aber BMAL-Proteine binden. Experimentelle Belege, dass BETA2-Faktoren dem transkriptional aktivierenden Komplex des Insulinpromotors angehören, sind publiziert. Die bekannten E-Box-Elemente E1 und E2 des Ratteninsulinpromotors bieten die Grundvoraussetzung für Bindung und transkriptionelle Aktivierung durch bHLH-Faktoren dieses Typs auf *cis*-Ebene (Sander und German, 1997). Ob Uhrengene *in vivo* direkt oder indirekt mit den anderen genannten, gewebsspezifischen PAS-Faktoren im Promotorbereich des Insulin-Gens interagieren, ist eine bislang ungeklärte Frage. Es gibt Hinweise, dass das co-regulative Zusammenspiel von CREB und bHLH-Transkriptionsfaktoren wie BMAL1 ein typisches Merkmal uhrengenregulierter Gene ist. Dies gilt für die AANAT, das Schlüsselenzym der Melatoninsynthese (Baler et al., 1997; Chen und Baler, 2000), für das *Vasopressin*-Gen (Jin et al., 1999), das *Renin*-Gen (Pan et al., 2001) als auch für *Per1* (von Gall et al., 2001), obwohl das Vorhandensein eines E-Box-*cis*-Elementes allein keine ausreichende Basis für circadiane transkriptionale Aktivierung zu sein scheint (Munoz et al., 2002). Reporter-Gen-Assays mit Elementen des Insulinpromotors in Serumschock-behandelten INS1-Zellen wären eine Möglichkeit, den genannten Fragenkomplex mit molekular-genetischen Methoden zu bearbeiten und die transkriptionalen Einflüsse von Uhrengenen zu erfassen.

Circadiane Rhythmen der Insel

Die Insulinsekretion durch die β -Zelle ist ein regulierter Prozess. Nach der klassischen Vorstellung zur Mechanistik der Sekretion würde Glucose nach Überschreitung eines Schwellenwertes, etwa nach postprandialer Erhöhung, durch aktivierte Glucosetransporter (vor allem GLUT2) in die β -Zelle aufgenommen. Durch die Glucokinase (Hexokinase 4), das pankreatische, geschwindigkeitsbestimmende Enzym der Glucoseverwertung phosphoryliert, wird Glucose mitochondrial metabolisiert.

Der resultierende Anstieg des zellinternen ATP-Spiegels führt zur Schließung von ATP-abhängigen Kaliumkanälen (KIR6.2/SUR1), zur Depolarisation der Zelle mit Ca^{2+} -Einstrom und konsekutiv zur Entleerung der membranahen, hormonhaltigen Vesikel (Wollheim und Pralong, 1990; Cook et al., 1991; Henquin, 2000).

Die Bedeutung von Oszillationsstörungen als Ursache für Erkrankungen der pankreatischen Insel, eingeschlossen der β -Zelle, ist vielfach beschrieben worden (Longo et al., 1991; Polonsky et al., 1998; Porksen, 2002). Phänomenologisch ließen sich dabei periodische cytosolische Ca^{2+} -Konzentrations-Schwankungen messen, gekoppelt mit subsequenter Insulinsekretion, deren Ursache in rhythmischer Glycolyse und ATP-Produktion vermutet wird (entsprechend dem Modell der metabolisch getriebenen Sekretion nach Longo et al., 1991). Valdeolillos et al. (1989) hatten einen 1- bis 3-minütigen Rhythmus, Longo et al. (1991) einen 5-minütigen und Bergstrom et al. (1989) einen 15-minütigen Rhythmus der Insulinsekretion an Ratteninseln beobachtet. Hinter diesen basalen ultradianen Rhythmen wird zellkoordinative Bedeutung vermutet („recruitment“ und „entrainment“), die die koordinierte Aktion aller β -Zellen einer Insel und konsekutiv die Gleichschwingung der Insulinausschüttung durch Zell-Zell-Synchronisation gewährleisten soll. Von Longo et al. (1991) wird cAMP als ein solches synchronisierendes Molekül diskutiert, welches in großen Mengen von β -Zellen über einen Probenecid-hemmbarer Prozess ausgeschieden wird (Peschke et al., 2002). Übergeordnet sind circadiane Schwingungen der Insulinsekretion, wie sie *in vivo* an der Ratte von Kalsbeek und Strubbe (1998) und von van Cauter (1990) sowie van Cauter et al. (1991) für den Menschen beschrieben worden sind. Peschke und Peschke (1998) waren die Ersten, die an isolierten Ratteninseln *in vitro* eine circadiane Rhythmik der Insulinausschüttung feststellten, Daten, die später von Picinato et al. (2002) bestätigt wurden. Interessanterweise ergaben sich aus der Arbeit von Peschke und Peschke (1998) Hinweise, dass Melatonin die Phasenlage der circadianen Schwingung der β -Zelle als ein potentieller Zeitgeber verschieben kann. Dies wird durch Melatoninrezeptoren vom MT1-Typ an der Zelloberfläche der β -Zelle ermöglicht, die als klassische, mit sieben Transmembranschleifen in der Membran verankerte und mit einem G-Protein des inhibitorischen Typs (Gi) gekoppelte Rezeptoren das cAMP-Niveau der Zelle beeinflussen (Peschke et al., 2000). Ein solcher circadianer Rhythmus der Insulinausschüttung hat den biologischen Sinn, den Körper antizipatorisch auf Nahrungsverwertung vorzubereiten (La Fleur et al., 2001) und mit anderen circadianen Rhythmen, z. B. dem Schlaf/Wach-Rhythmus, zu koordinieren (Herzog und Schwartz, 2002). Störungen der bekannten ultradianen und circadianen Rhythmen der Inselhormonausschüttung sind nach Auffassung von Delattre et al. (1999) und Porksen (2002) eine Ursache für die Entstehung des Typ-2-Diabetes. Die Beobachtung von Young et al. (2002),

dass bei diabetischen Ratten (Streptozotocin-induziert) der circadiane Rhythmus der Uhrengenenexpression des Herzens verändert war, könnte von genereller Bedeutung für Uhrengen-verursachte, circadiane, zell- und organspezifische Arrhythmie sein und damit auch Bedeutung für die Diabetogenese haben. Das wissenschaftliche Interesse und das Verständnis eines solchen pathogenetischen Ansatzes steht im Zentrum des Fragenkomplexes, der im Rahmen des Forschungsprojektes „Zeitstrukturen endokriner Systeme“ gegenwärtig bearbeitet wird.

Danksagung

Die Arbeit entstand unter Mitwirkung von Ivonne Bazwinsky, Annika Jordan, Liudmila Litvak, Dorothee Peschke, Candy Rothgänger und Sabine Wolgast.

Literatur

- 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., S. A. Brown, L. Marcacci, F. Tronche, C. Kellendonk, H. M. Reichardt, G. Schutz, U. Schibler (2000a) Resetting of circadian time in peripheral tissues by glucocorticoid signaling. *Science* 289: 2344–2347.
- Balsalobre, A., F. Damiola, U. Schibler (1998) A serum shock induces circadian gene expression in mammalian tissue culture cells. *Cell* 93: 929–937.
- Balsalobre, A., L. Marcacci, U. Schibler (2000b) Multiple signaling pathways elicit circadian gene expression in cultured Rat-1 fibroblasts. *Curr. Biol.* 10: 1291–1294.
- Bergstrom, R. W., W. Y. Fujimoto, D. C. Teller, C. de Haen (1989) Oscillatory insulin secretion in perfused isolated rat islets. *Am. J. Physiol.* 257: 479–485.
- Brown, S. A., G. Zumbunn, F. Fleury-Olela, N. Preitner, U. Schibler (2002) Rhythms of mammalian body temperature can sustain peripheral circadian clocks. *Curr. Biol.* 12: 1574–1583.
- Buchi, K. N., J. G. Moore, W. J. Hrushesky, R. B. Sothorn, N. H. Rubin (1991) Circadian rhythm of cellular proliferation in the human rectal mucosa. *Gastroenterology* 101: 410–415.
- Cermakian, N., L. Monaco, M. P. Pando, A. Dierich, P. Sassone-Corsi (2001) Altered behavioral rhythms and clock gene expression in mice with a targeted mutation in the Period1 gene. *EMBO J.* 20: 3967–3974.
- Cermakian, N., P. Sassone-Corsi (2000) Multilevel regulation of the circadian clock. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 1: 59–67.
- Chen, W., R. Baler (2000) The rat arylalkylamine N-acetyltransferase E-box: differential use in a master vs. a slave oscillator. *Mol. Brain Res.* 81: 43–50.
- Chilov, D., T. Hofer, C. Bauer, R. H. Wenger, M. Gassmann (2001) Hypoxia affects expression of circadian genes PER1 and CLOCK in mouse brain. *FASEB J.* 15: 2613–2622.
- Chong, N. W., M. Bernard, D. C. Klein (2000) Characterization of the chicken serotonin N-acetyltransferase gene. Activation via clock gene heterodimer/E box interaction. *J. Biol. Chem.* 275: 32991–32998.
- Cissell, M. A., L. Zhao, L. Sussel, E. Henderson, R. Stein (2003) Transcription factor occupancy of the insulin gene in vivo. Evidence for direct regulation by Nkx2.2. *J. Biol. Chem.* 278: 751–756.
- Cook, D. L., L. S. Satin, W. F. Hopkins (1991) Pancreatic B cells are bursting, but how? *Trends Neurosci.* 14: 411–414.
- Damiola, F., N. Le Minh, N. Preitner, B. Kornmann, F. Fleury-Olela, U. Schibler (2000) Restricted feeding uncouples circadian oscillators in peripheral tissues from the central pacemaker in the suprachiasmatic nucleus. *Genes Dev.* 14: 2950–2961.
- Delattre, E., J. Cipolla-Neto, A. C. Boschero (1999) Diurnal variations in insulin secretion and K⁺ permeability in isolated rat islets. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 26: 505–510.
- Eggers, A., G. Siemann, R. Blume, W. Knepel (1998) Gene-specific transcriptional activity of the insulin cAMP-responsive element is conferred by NF-Y in combination with cAMP response element-binding protein. *J. Biol. Chem.* 273: 18499–18508.
- Garcia, M. N., C. G. Barbeito, L. A. Andriani, A. F. Badran (2001) Circadian rhythm of DNA synthesis and mitotic activity in tongue keratinocytes. *Cell. Biol. Int.* 25: 179–183.
- Grundschober, C., F. Delaunay, A. Puhlhofer, G. Triqueneaux, V. Laudet, T. Bartfai, P. Nef (2001) Circadian regulation of diverse gene products revealed by mRNA expression profiling of synchronized fibroblasts. *J. Biol. Chem.* 276: 46751–46758.
- Hastings, M., E. S. Maywood (2000) Circadian clocks in the mammalian brain. *Bioessays* 22: 23–31.
- Henquin, J. C. (2000) Triggering and amplifying pathways of regulation of insulin secretion by glucose. *Diabetes* 49: 1751–1760.
- Herzog, E. D., W. J. Schwartz (2002) A neural clockwork for encoding circadian time. *J. Appl. Physiol.* 92: 401–408.
- Hirota, T., T. Okano, K. Kokame, H. Shirokane-Ikejima, T. Miyata, Y. Fukada (2002) Glucose down-regulates Per1 and Per2 mRNA levels and induces circadian gene expression in cultured Rat-1 fibroblasts. *J. Biol. Chem.* 277: 44244–44251.
- Hogenesch, J. B., Y. Z. Gu, S. Jain, C. A. Bradfield (1998) The basic-helix-loop-helix-PAS orphan MOP3 forms transcriptionally active complexes with circadian and hypoxia factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 5474–5479.
- Ikeda, M., M. Nomura (1997) cDNA cloning and tissue-specific expression of a novel basic helix-loop-helix/PAS protein (BMAL1) and identification of alternatively spliced variants with alternative translation initiation site usage. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 233: 258–264.
- Ikeda, M., W. Yu, M. Hirai, T. Ebisawa, S. Honma, K. Yoshimura, K. I. Honma, M. Nomura (2000) cDNA cloning of a novel bHLH-PAS transcription factor superfamily gene, BMAL2: its mRNA expression, subcellular distribution, and chromosomal localization. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 275: 493–502.
- 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.
- Kalsbeek, A., J. H. Strubbe (1998) Circadian control of insulin secretion is independent of the temporal distribution of feeding. *Physiol. Behav.* 63: 553–558.
- King, D. P., Y. Zhao, A. M. Sangoram, L. D. Wilsbacher, M. Tanaka, M. P. Antoch, T. D. Steeves, M. H. Vitaterna, J. M. Kornhauser, P. L. Lowrey, F. W. Turek, J. S. Takahashi

- (1997) Positional cloning of the mouse circadian clock gene. *Cell* 89: 641–653.
- Kume, K., M. J. Zylka, S. Sriram, L. P. Shearman, D. R. Weaver, X. Jin, E. S. Maywood, M. H. Hastings, S. M. Reppert (1999) mCRY1 and mCRY2 are essential components of the negative limb of the circadian clock feedback loop. *Cell* 98: 193–205.
- La Fleur, S. E., A. Kalsbeek, J. Wortel, M. L. Fekkes, R. M. Buijs (2001) A daily rhythm in glucose tolerance: a role for the suprachiasmatic nucleus. *Diabetes* 50: 1237–1243.
- Longo, E. A., K. Tornheim, J. T. Deeney, B. A. Varnum, D. Tillotson, M. Prentki, B. E. Corkey (1991) Oscillations in cytosolic free Ca²⁺, oxygen consumption, and insulin secretion in glucose-stimulated rat pancreatic islets. *J. Biol. Chem.* 266: 9314–9319.
- Lopez-Molina, L., F. Conquet, M. Dubois-Dauphin, U. Schibler (1997) The DBP gene is expressed according to a circadian rhythm in the suprachiasmatic nucleus and influences circadian behavior. *EMBO J.* 16: 6762–6771.
- 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.
- Moates, J. M., S. Nanda, M. A. Cissell, M. J. Tsai, R. Stein (2003) BETA2 activates transcription from the upstream glucokinase gene promoter in islet beta-cells and gut endocrine cells. *Diabetes* 52: 403–408.
- Müller, C. R., P. Maire, U. Schibler (1990) DBP, a liver-enriched transcriptional activator, is expressed late in ontogeny and its tissue specificity is determined posttranscriptionally. *Cell* 61: 279–291.
- Mühlbauer, E., S. Wolgast, U. Finckh, D. Peschke, E. Peschke (2004) Indication of circadian oscillations in the rat pancreas. *FEBS Lett.* 564: 91–96.
- Munoz, E., M. Brewer, R. Baler (2002) Circadian transcription. Thinking outside the E-box. *J. Biol. Chem.* 277: 36009–36017.
- Oishi, K., H. Fukui, N. Ishida (2000) Rhythmic expression of BMAL1 mRNA is altered in Clock mutant mice: differential regulation in the suprachiasmatic nucleus and peripheral tissues. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 268: 164–171.
- Pan, L., T. A. Black, Q. Shi, C. A. Jones, N. Petrovic, J. Loudon, C. Kane, C. D. Sigmund, K. W. Gross (2001) Critical roles of a cyclic AMP responsive element and an E-box in regulation of mouse renin gene expression. *J. Biol. Chem.* 276: 45530–45538.
- 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.
- Peschke, E., D. Peschke (1998) Evidence for a circadian rhythm of insulin release from perfused rat pancreatic islets. *Diabetologia* 41: 1085–1092.
- Picinato, M. C., E. P. Haber, A. R. Carpinelli, J. Cipolla-Neto (2002) Daily rhythm of glucose-induced insulin secretion by isolated islets from intact and pinealectomized rat. *J. Pineal Res.* 33: 172–177.
- Polonsky, K. S., J. Sturis, E. van Cauter (1998) Temporal profiles and clinical significance of pulsatile insulin secretion. *Horm. Res.* 49: 178–184.
- Porksen, N. (2002) The in vivo regulation of pulsatile insulin secretion. *Diabetologia* 45: 3–20.
- Qiu, Y., M. Guo, S. Huang, R. Stein (2002) Insulin gene transcription is mediated by interactions between the p300 coactivator and PDX-1, BETA2, and E47. *Mol. Cell. Biol.* 22: 412–420.
- Reppert, S. M., D. R. Weaver (2001) Molecular analysis of mammalian circadian rhythms. *Annu. Rev. Physiol.* 63: 647–676.
- Rutter, J., M. Reick, S. L. McKnight (2002) Metabolism and the control of circadian rhythms. *Annu. Rev. Biochem.* 71: 307–331.
- Sakaguchi, T., M. Takahashi, G. A. Bray (1988) Diurnal changes in sympathetic activity. Relation to food intake and to insulin injected into the ventromedial or suprachiasmatic nucleus. *J. Clin. Invest.* 82: 282–286.
- Sander, M., M. S. German (1997) The beta cell transcription factors and development of the pancreas. *J. Mol. Med.* 75: 327–340.
- Sander, M., S. C. Griffen, J. Huang, M. S. German (1998) A novel glucose-responsive element in the human insulin gene functions uniquely in primary cultured islets. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 11572–11577.
- Sasaki, M., A. Masuda, T. Oishi (1995) Circadian rhythms of corneal mitotic rate, retinal melatonin and immunoreactive visual pigments, and the effects of melatonin on the rhythms in the Japanese quail. *J. Comp. Physiol. [A]* 176: 465–471.
- Schibler, U., J. Ripperger, S. A. Brown (2003) Peripheral circadian oscillators in mammals: time and food. *J. Biol. Rhythms* 18: 250–260.
- Shearman, L. P., X. Jin, C. Lee, S. M. Reppert, D. R. Weaver (2000a) Targeted disruption of the mPer3 gene: subtle effects on circadian clock function. *Mol. Cell. Biol.* 20: 6269–6275.
- Shearman, L. P., S. Sriram, D. R. Weaver, E. S. Maywood, I. Chaves, B. Zheng, K. Kume, C. C. Lee, G. T. van der Horst, M. H. Hastings, S. M. Reppert (2000b) Interacting molecular loops in the mammalian circadian clock. *Science* 288: 1013–1019.
- Shearman, L. P., M. J. Zylka, D. R. Weaver, L. F. Jr. Kolakowski, S. M. Reppert (1997) Two period homologs: circadian expression and photic regulation in the suprachiasmatic nuclei. *Neuron* 19: 1261–1269.
- Smaaland, R. (1996) Circadian rhythm of cell division. *Prog. Cell Cycle Res.* 2: 241–266.
- 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.
- Storch, K. F., O. Lipan, I. Leykin, N. Viswanathan, F. C. Davis, W. H. Wong, C. J. Weitz (2002) Extensive and divergent circadian gene expression in liver and heart. *Nature* 417: 78–83.
- Sun, Z. S., U. Albrecht, O. Zhuchenko, J. Bailey, G. Eichele, C. C. Lee (1997) RIGUI, a putative mammalian ortholog of the *Drosophila* period gene. *Cell* 90: 1003–1011.
- Travnickova-Bendova, Z., N. Cermakian, S. M. Reppert, P. Sassone-Corsi (2002) Bimodal regulation of mPeriod promoters by CREB-dependent signaling and CLOCK/BMAL1 activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99: 7728–7733.
- Uhl, G. R., S. M. Reppert (1986) Suprachiasmatic nucleus vasopressin messenger RNA: circadian variation in normal and Brattleboro rats. *Science* 232: 390–393.
- Valdeolillos, M., R. M. Santos, D. Contreras, B. Soria, L. M. Rosario (1989) Glucose-induced oscillations of intracellular Ca²⁺ concentration resembling bursting electrical activity in single mouse islets of Langerhans. *FEBS Lett.* 259: 19–23.
- van Cauter, E. (1990) Diurnal and ultradian rhythms in human endocrine function: a minireview. *Horm. Res.* 34: 45–53.
- van Cauter, E., J. D. Blackman, D. Roland, J. P. Spire, S. Refetoff, K. S. Polonsky (1991) Modulation of glucose regulation

- and insulin secretion by circadian rhythmicity and sleep. *J. Clin. Invest.* 88: 934–942.
- van der Horst, G. T., M. Muijtjens, K. Kobayashi, R. Takano, S. Kanno, M. Takao, J. de Wit, A. Verkerk, A. P. Eker, D. van Leenen, R. Buijs, D. Bootsma, J. H. Hoeijmakers, A. Yasui (1999) Mammalian *Cry1* and *Cry2* are essential for maintenance of circadian rhythms. *Nature* 398: 627–630.
- von Gall, C., I. Schneider-Huther, M. Pfeffer, F. Dehghani, H. W. Korf, J. H. Stehle (2001) Clock gene protein mPER1 is rhythmically synthesized and under cAMP control in the mouse pineal organ. *J. Neuroendocrinol.* 13: 313–316.
- Wollheim, C. B., W. F. Pralong (1990) Cytoplasmic calcium ions and other signalling events in insulin secretion. *Biochem. Soc. Trans.* 18: 111–114.
- Yagita, K., H. Okamura (2000) Forskolin induces circadian gene expression of *rPer1*, *rPer2* and *dbp* in mammalian rat-1 fibroblasts. *FEBS Lett.* 465: 79–82.
- Yagita, K., F. Tamanini, G. T. van der Horst, H. Okamura (2001) Molecular mechanisms of the biological clock in cultured fibroblasts. *Science* 292: 278–281.
- Yagita, K., S. Yamaguchi, F. Tamanini, G. T. van der Horst, J. H. Hoeijmakers, A. Yasui, J. J. Loros, J. C. Dunlap, H. Okamura (2000) Dimerization and nuclear entry of mPER proteins in mammalian cells. *Genes Dev.* 14: 1353–1363.
- Yamazaki, S., R. Numano, M. Abe, A. Hida, R. Takahashi, M. Ueda, G. D. Block, Y. Sakaki, M. Menaker, H. Tei (2000) Resetting central and peripheral circadian oscillators in transgenic rats. *Science* 288: 682–685.
- Young, M. E., C. R. Wilson, P. Razeghi, P. H. Guthrie, H. Taegtmeier (2002) Alterations of the circadian clock in the heart by streptozotocin-induced diabetes. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 34: 223–231.
- Zheng, B., D. W. Larkin, U. Albrecht, Z. S. Sun, M. Sage, G. Eichele, C. C. Lee, A. Bradley (1999) The *mPer2* gene encodes a functional component of the mammalian circadian clock. *Nature* 400: 169–173.

