

## Adrenerge und cholinerge Signalverarbeitung im Pinealorgan von Säugetieren

### Einleitung

Der regelmäßige Wechsel von Tag und Nacht hat tiefgreifende Auswirkungen auf alle Bereiche des Lebens. Infolgedessen laufen zahlreiche physiologische Vorgänge in einer Vielzahl unterschiedlichster Lebewesen mit einem Rhythmus ab, der an unsere 24-stündige Photoperiode angelehnt ist (Hastings et al., 2003). Einige dieser Prozesse sind rein reaktiv, d. h. die Rhythmen verschwinden unter konstanten Lichtbedingungen ohne Licht/Dunkel-Wechsel; solche Rhythmen bezeichnet man auch als diurnale Rhythmen. Andere Prozesse unterliegen einer Rhythmik, die durch einen endogenen Oszillator – eine „Innere Uhr“ – im Organismus selbst erzeugt wird und die den täglichen Licht/Dunkel-Wechsel antizipiert; solche Rhythmen, die unter konstanten Lichtbedingungen bestehen bleiben und weiterhin eine Periodenlänge von ungefähr 24 Stunden aufweisen, bezeichnet man als circadiane Rhythmen.

Die Innere Uhr ist allerdings nur ein Teil eines komplexen neuronalen Netzwerkes, dessen Umriss erstmals von Ernst Scharer erkannt und als photoneuroendokrines System bezeichnet wurden (Scharer, 1964). Seine Aufgabe ist es, die Körperfunktionen an die herrschende Photoperiode anzupassen. Neben dem endogenen Oszillator besteht das photoneuroendokrine System aus zwei weiteren Komponenten, die mit dem Rhythmusgenerator eng verbunden sind. Erstens sind das Photorezeptoren, die Lichtinformationen wahrnehmen und an die „Innere Uhr“ weiterleiten, um den circadianen Rhythmus mit dem Licht/Dunkel-Rhythmus unserer Umwelt zu synchronisieren. Und zweitens sind das Elemente, die das „Ticken“ der „Inneren Uhr“ in ein Ausgangssignal übersetzen, das im Körper erkannt werden kann. Die Verbreitung dieses Ausgangssignals kann auf neuronalem Wege oder auf endokrinem Wege geschehen.

In nicht-säugenden Wirbeltieren – wie in Fischen, Reptilien, Vögeln – finden wir alle drei Komponenten des photoneuroendokrinen Systems an derselben Stelle – nämlich im Pinealorgan. Und nicht nur das: man findet sie sogar in ein- und derselben Zelle, nämlich im Pinealozyten. Jeder einzelne Pinealozyt von Fischen oder von Vögeln (i) ist direkt lichtempfindlich, (ii) kann eigenständig einen endogenen Rhythmus erzeugen und (iii) kann das endokrine Ausgangssignal Melatonin produzieren, das Rhythmus und Phasenlage der Uhr im ganzen Körper verbreitet. Alle drei

Schlüsselfunktionen des photoneuroendokrinen Systems sind also in einer „photoneuroendokrinen Zelle“ vereint. Die Organisation des photoneuroendokrinen Systems und die Regulation der Melatonin-Biosynthese in nicht-säugenden Wirbeltieren werden an anderer Stelle detailliert behandelt (Korf et al., 1998; Cahill, 2002; Natesan et al., 2002; Brandstätter und Abraham, 2003; Falcon et al., 2003).

In Säugetieren hat das photoneuroendokrine System im Laufe der Evolution eine umfangreiche morphologische Umformung erfahren, indem seine drei Schlüsselfunktionen räumlich getrennt wurden. Pinealozyten von Säugetieren haben die direkte Lichtempfindlichkeit verloren. Die Photorezeptoren, die den circadianen Rhythmus mit dem Tag-Nacht-Rhythmus synchronisieren, liegen bei Säugetieren in der Netzhaut des Auges. Interessanterweise sind es nicht die Stäbchen und Zapfen, die diese Aufgabe übernehmen, sondern ein spezieller nicht-visueller Photorezeptor. Dieser Photorezeptor liegt in der Ganglienzellschicht (Berson et al., 2002; Sekaran et al., 2003) und benutzt zur Photorezeption ein eigenes Photopigment, das Melanopsin (Provencio et al., 2000; Peirson und Foster, 2006). Von den Photorezeptoren wird Lichtinformation über einen speziellen Teil des Sehnerven, den retinohypothalamischen Trakt, zur „Inneren Uhr“ übertragen (Hannibal und Fahrenkrug, 2006). In Säugetieren liegt der endogene Oszillator nicht im Pinealorgan, sondern in einem umschriebenen Kerngebiet des Hypothalamus, im *Nucleus suprachiasmaticus* (SCN; Weaver, 1998; Reppert und Weaver, 2002; Panda und Hogenesch, 2004). Der SCN ist polysynaptisch mit dem Pinealorgan verbunden (Moore, 1996). Die letzte Wegstrecke beginnt am obersten Grenzstrangganglion, dem *Ganglion cervicale superius*. Von hier ziehen postganglionäre sympathische Nervenfasern zum Pinealorgan und entlassen in der Nacht den Neurotransmitter Noradrenalin (NA; Drijfhout et al., 1996). Es ist unbestritten, dass die sympathische Innervation des Pinealorgans in allen untersuchten Tierarten vorkommt und NA die rhythmische Bildung von Melatonin entscheidend und maßgeblich bestimmt. Daneben gibt es aber auch neuroanatomische Befunde, die eine Innervation aus parasympathischen Ganglien oder dem *Ganglion trigeminale* und/oder eine zentrale Innervation des Pinealorgans dokumentieren (Møller und Baeres, 2002). Hinsichtlich der Ausprägung und des Neurotransmittergehaltes dieser nicht-sympathischen pinealopetalen

Innervation gibt es große tierartliche Unterschiede. Außer den neuroanatomischen Daten deuten aber auch verschiedene funktionelle Studien darauf hin, dass die NA-gesteuerte Bildung von Melatonin durch eine Reihe von neuroaktiven Substanzen (z. B. Neuropeptide, Acetylcholin, Glutamat) moduliert werden kann. Der vorliegende Übersichtsartikel beschränkt sich auf die noradrenerge und die cholinerge Signalverarbeitung im Pinealorgan (zur peptidergen Innervation und Signalübertragung im Pinealorgan; Simonneaux und Ribelayga, 2003).

### Noradrenerge Signalverarbeitung im Pinealorgan von Säugetieren

Die Freisetzung von NA im Pinealorgan von Säugetieren bewirkt dort allnächtlich die Bildung von Melatonin (Klein, 1985; Klein et al., 1997; Korf et al., 1998). Melatonin kann als neuroendokrines Signal für die Nacht angesehen werden, weil es die Beleuchtungsbedingungen in allen bisher untersuchten Tieren (und auch beim Menschen) verlässlich widerspiegelt. Dieses einheitliche Muster ist unabhängig vom Verhalten, denn sowohl in tagaktiven als auch in nachtaktiven Tieren ist die Melatonin-Konzentration im Blut am Tage niedrig und in der Nacht hoch. Interessanterweise schlagen sich nicht nur die täglichen, sondern auch die jahreszeitlichen Veränderungen in den Lichtbedingungen im Melatonin-Signal nieder. Saisonale Veränderungen der Länge der Nacht führen zu Veränderungen bezüglich Dauer und Amplitude des Melatonin-Anstiegs im Blut (Lincoln et al., 2003).

Melatonin ist eine lipophile Substanz und wird nach heutigem Stand des Wissens nicht im Pinealorgan gespeichert, sondern unmittelbar nach seiner Bildung ins Blut abgegeben. Demzufolge wird der Melatonin-Spiegel im Blut über die Rate bestimmt, mit der das Hormon synthetisiert wird. Die Bildung von Melatonin geht von der Aminosäure Tryptophan aus (Abb. 1). Tryptophan wird zuerst in Serotonin überführt und dann in zwei Schritten in Melatonin umgewandelt, welche durch die Arylalkylamin-N-acetyltransferase (AANAT) und die Hydroxyindol-O-methyltransferase (HIOMT) katalysiert werden. Das erste Enzym N-acetyliert Serotonin, das zweite Enzym O-methyliert das entstehende N-Acetylserotonin zu Melatonin. Die AANAT gilt als das Schlüsselenzym der Melatonin-Biosynthese und ist Zielstruktur einer Reihe von regulatorischen Prozessen.

NA ist für die Kontrolle der AANAT und der Melatonin-Bildung der dominierende Neurotransmitter. In allen untersuchten Säugetieren erzielt er seine Wirkung durch die gleichzeitige Aktivierung zweier Subtypen von adrenergen Rezeptoren. Die Aktivierung  $\beta_1$ -adrenerger Rezeptoren führt zur Aktivierung der Adenylatzyklase und nachfolgend zu einem Anstieg der intrazellulären cAMP-Konzentration. Der erhöhte cAMP-Spiegel bewirkt daraufhin die Aktivierung der cAMP-abhängigen Protein-Kinase A (PKA). Beides – cAMP-Anstieg und PKA-Aktivierung – ist eine Grundvoraussetzung für die Stimulierung von AANAT und Melatonin-Bildung in allen Säugetieren (Klein, 1985; Klein et al., 1997). Die gleichzeitige Aktivierung  $\alpha_1$ -adrenerger Rezeptoren durch NA führt außerdem zu einem Anstieg der intrazellulären Cal-

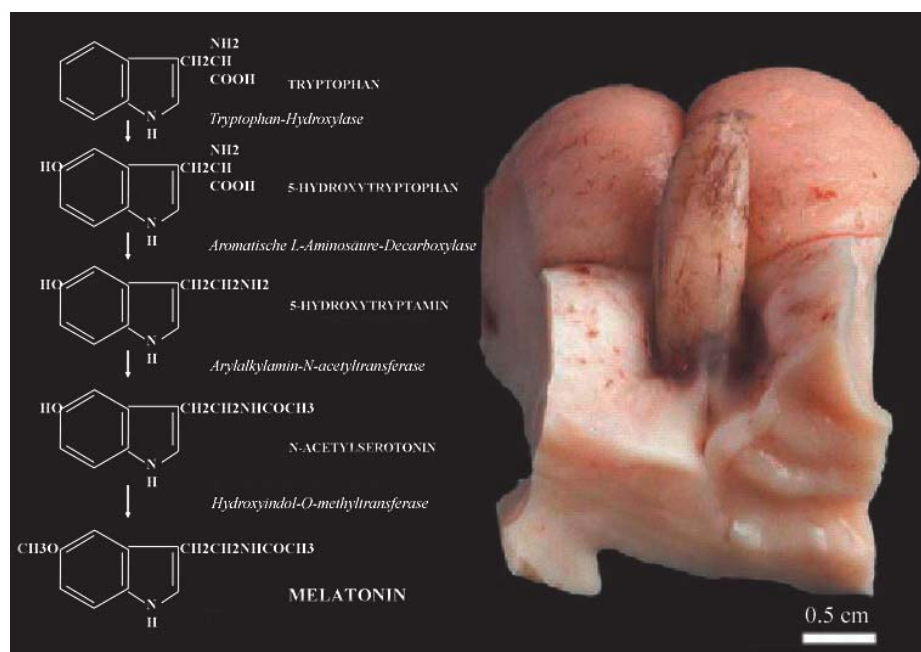


Abb. 1: Das Pinealorgan eines Rindes *in situ* mit Anteilen des Mittelhirns und des Zwischenhirns. Die Synthese von Melatonin geht im Rind wie auch in allen anderen Wirbeltieren von der Aminosäure Tryptophan aus.

cium-Konzentration ( $[Ca^{2+}]_i$ ). Die Erhöhung von  $[Ca^{2+}]_i$  kommt dadurch zustande, dass Calcium-Ionen aus intrazellulären Calcium-Speichern freigesetzt werden und zusätzlich aus dem Extrazellulärraum in den Pinealozyten einströmen (Sugden et al., 1987; Schomerus et al., 1995).

Die NA-induzierte Erhöhung der intrazellulären Konzentrationen von cAMP und Calcium-Ionen sind streng konservierte Elemente der Signalübertragung in Pinealorganen aller untersuchten Säugetiere. Demgegenüber zeichnen sich die regulatorischen Mechanismen, die diese beiden Standardantworten auf einen noradrenergen Reiz mit der Stimulierung der AANAT und der Melatonin-Biosynthese verknüpfen, durch auffällige tierartliche Unterschiede aus. Diese Unterschiede werden insbesondere beim Vergleich zwischen Nagetieren und Nicht-Nagern deutlich.

### Nagetiere lieben's transkriptionell

Für lange Zeit wurde die Regulation der Melatonin-Biosynthese fast ausschließlich an der Ratte untersucht. So wie bei anderen Säugetieren ist die Erhöhung der cAMP-Konzentration auch im Pinealozyten der Ratte eine essentielle Voraussetzung für die Bildung von Melatonin. In Pinealozyten der Ratte führt NA zu einem ca. 100fachen Anstieg des cAMP-Spiegels (Vanecek et al., 1985). Diese deutliche Wirkung von NA beruht auf einem kombinatorischen Mechanismus, dem die gleichzeitige Aktivierung  $\beta_1$ - und  $\alpha_1$ -adrenerger Rezeptoren zugrunde liegt (Sugden et al., 1985; Vanecek et al., 1985). Die alleinige Aktivierung  $\beta_1$ -adrenerger Rezeptoren erhöht die intrazelluläre cAMP-Konzentration nur ca. 10fach. Die gleichzeitige Aktivierung  $\alpha_1$ -adrenerger Rezeptoren und der damit verbundene Anstieg von  $[Ca^{2+}]_i$  potenzieren die  $\beta_1$ -adrenerg induzierte cAMP-Erhöhung, so dass die intrazelluläre cAMP-Konzentration einen Wert erreicht, der ca. 100fach über dem Ausgangswert liegt. Bei diesem Mechanismus spielt die Protein-Kinase C (PKC) eine wichtige Rolle, die durch einen erhöhten  $[Ca^{2+}]_i$ -Spiegel aktiviert wird und die Adenylatzyklase gegenüber  $\beta_1$ -adrenerger Stimulation sensitiviert. Ein isolierter  $[Ca^{2+}]_i$ -Anstieg oder eine isolierte Aktivierung der PKC – beispielsweise durch Stimulation mit Phorbolestern – haben in Pinealozyten der Ratte bemerkenswerterweise keine Wirkung: Es kommt zu keinem Anstieg von cAMP oder Melatonin (Sugden et al., 1985; Zatz, 1985). Bei anderen Tierarten konnte die  $\alpha_1/\beta_1$ -adrenerge Potenzierung bisher allerdings nicht gezeigt werden. Diese Befunde belegen die zentrale Bedeutung von cAMP für die Melatonin-Biosynthese; Änderungen von  $[Ca^{2+}]_i$  haben dagegen modulierende Bedeutung.

In Nagetieren wie der Ratte oder der Maus wird die Melatonin-Synthese in erster Linie über transkriptionelle Mechanismen gesteuert (Klein et al., 1997; Korf et al., 1998). Im Mittelpunkt dieser Mechanismen steht der

Transkriptionsfaktor *cyclic AMP responsive element (CRE)-binding protein* (CREB). Nach  $\beta_1$ -adrenerger Stimulation und nachfolgendem cAMP-Anstieg kommt es zu einer Phosphorylierung von CREB am Serin-Rest 133 in den Zellkernen aller Pinealozyten;  $\alpha_1$ -adrenerge Stimulation hat dagegen keine Wirkung (Roseboom et al., 1995; Tamotsu et al., 1995). Das phosphorylierte (p) CREB fördert die Transkription von Genen, die eine Bindungsstelle (CRE) für CREB in ihrem Promoter aufweisen. Zu diesen Genen zählt auch die AANAT (Baler et al., 1997). In unstimulierten Zellen ist Aanat-mRNA kaum nachweisbar; die vermehrte Transkription des Aanat-Gens infolge noradrenerger Stimulation führt zu einem starken Anstieg des Aanat-mRNA-Spiegels im Pinealozyten (Borjigin et al., 1995; Roseboom et al., 1996). Mit einer zeitlichen Verzögerung von 1 bis 2 Stunden kommt es zu vergleichbaren Anstiegen im AANAT-Proteingehalt, in der AANAT-Proteinaktivität und in der Melatonin-Bildung. Andere Zielgene von pCREB im Pinealorgan sind u. a. die Gene für den  $\beta_1$ -adrenergen Rezeptor (Pfeffer et al., 1999) und den Transkriptionsfaktor ICER (*inducible cAMP early repressor*; Stehle et al., 1993). ICER ist ein inhibitorischer Transkriptionsfaktor, der die Transkription cAMP-kontrollierter Gene blockieren kann. Er ist daran beteiligt, dass der Aanat-mRNA-Anstieg schon vor dem Ende der Nacht beendet wird (Maronde et al., 1999).

An dieser Stelle ist anzumerken, dass nicht nur  $\beta_1$ -adrenerge Agonisten, sondern auch andere Substanzen, die den cAMP-Spiegel erhöhen, eine Phosphorylierung von CREB hervorrufen können. Dazu gehören beispielsweise das Vasoaktive Intestinale Peptid (VIP) und das *Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide* (PACAP), die ebenfalls die Melatonin-Biosynthese aktivieren können (Schomerus et al., 1996). Diese Befunde unterstreichen die große integrative Bedeutung von pCREB für die Kontrolle der Melatonin-Synthese bei Nagetieren.

Es ist heutzutage unbestritten, dass die transkriptionelle Aktivierung der AANAT essentiell und unverzichtbar für die Melatonin-Bildung bei Nagetieren ist. Auf der anderen Seite wird auch klar, dass die transkriptionellen Mechanismen durch Prozesse ergänzt werden, die – ebenfalls durch den cAMP-Spiegel gesteuert – den proteolytischen Abbau der AANAT steuern (Gastel et al., 1998). Diese posttranskriptionelle Kontrolle der AANAT ist besser geeignet als die vergleichsweise träge transkriptionelle Kontrolle, die Bildung von AANAT-Protein und Melatonin schnell und effizient zu blockieren, z.B. bei plötzlichem Licht in der Nacht. Unter solchen Bedingungen kommt es zu einem sofortigen Abfall des cAMP-Spiegels, der umgehend die Proteolyse der AANAT einleitet. Es ist bisher nicht geklärt, ob oder in welchem Ausmaß dieser Mechanismus auch bei der NA-kontrollierten Aktivierung der AANAT in der frühen Nacht eine Rolle spielt, weil die essentielle transkriptionelle Aktivie-

nung der AANAT die Analyse dieser interessanten Frage sehr erschwert.

Ein charakteristischer Aspekt des Melatonin-Rhythmus bei allen Säugetieren ist, dass die Melatonin-Synthese offenbar schon vor dem Ende der Nacht beendet wird. Untersuchungen an der Ratte haben gezeigt, dass die rechtzeitige Abschaltung der Melatonin-Bildung durch eine enge Verzahnung mehrerer regulatorischer Prozesse gewährleistet wird. Erstens wird zum Ende der Nacht hin zunehmend weniger NA aus den sympathischen Nerventerminalen ausgeschüttet (Drijfhout et al., 1996). Ein zweiter Mechanismus, der die Melatonin-Bildung blockiert, ist die Dephosphorylierung von pCREB. Experimente an isolierten Pinealozyten haben gezeigt, dass der Entzug von NA nach vorausgegangener Stimulation mit NA zu einer schnellen Dephosphorylierung von pCREB führt, auf die eine Erniedrigung des AANAT-mRNA- und AANAT-Protein-Spiegels sowie der Melatonin-Synthese folgt. In pharmakologischen Untersuchungen konnte eine Beteiligung der Serin/Threonin-Phosphatase 1 nachgewiesen werden (Koch et al., 2003). Schließlich weiß man, dass der inhibitorische Transkriptionsfaktor ICER an der Abschaltung der Melatonin-Biosynthese beteiligt ist (s. o.). Es wird vermutet, dass die rhythmische Transkription von cAMP-induzierbaren Genen wie dem Gen für die AANAT in Nagetieren durch Verschiebungen im mengenmäßigen Verhältnis zwischen pCREB und ICER und deren Konkurrenz um CREs bestimmt wird. Diese Annahme wird u. a. dadurch gestützt, dass es zu einem deutlichen Abfall von pCREB am Ende der Nacht und zu moderatem Anstieg von ICER in der zweiten Nachthälfte kommt (Stehle et al., 1993; Maronde et al., 1999; von Gall et al., 2000).

### Rinder (und Menschen?) lieben's posttranslational

In letzter Zeit haben vergleichende Untersuchungen ergeben, dass die Befunde zur Signaltransduktion im Pinealorgan von Ratten und Mäusen (Abb. 2) nicht unbedingt auf andere Säugetiere übertragbar sind. Beispielsweise gibt es auffallende Unterschiede im Melatonin-Profil zwischen Ratte und Rind. Bei der Ratte beginnt die Melatonin-Produktion ca. 1 bis 2 Stunden nach Einsetzen der Dunkelheit, also verzögert, vermutlich weil die Synthese der AANAT-mRNA einen gewissen zeitlichen Vorlauf erfordert. Im Rind kommt es dagegen unmittelbar nach Einsetzen der Dunkelheit zu einem Anstieg der Melatonin-Konzentration im Blut (Hedlund et al., 1977). Isolierte Pinealozyten des Rindes haben sich als ein besonders geeignetes Modellsystem erwiesen, um Gemeinsamkeiten und Unterschiede bei der Regulation der Melatonin-Bildung zwischen Nagetieren und Nicht-Nagern zu untersuchen. Ein Charakteristikum der noradrenergen Signalübertragung im Pinealorgan beider Versuchstiere ist, dass NA über die Aktivierung  $\beta_1$ -adrenerger Rezeptoren einen Anstieg der intrazellulären cAMP-Konzentration

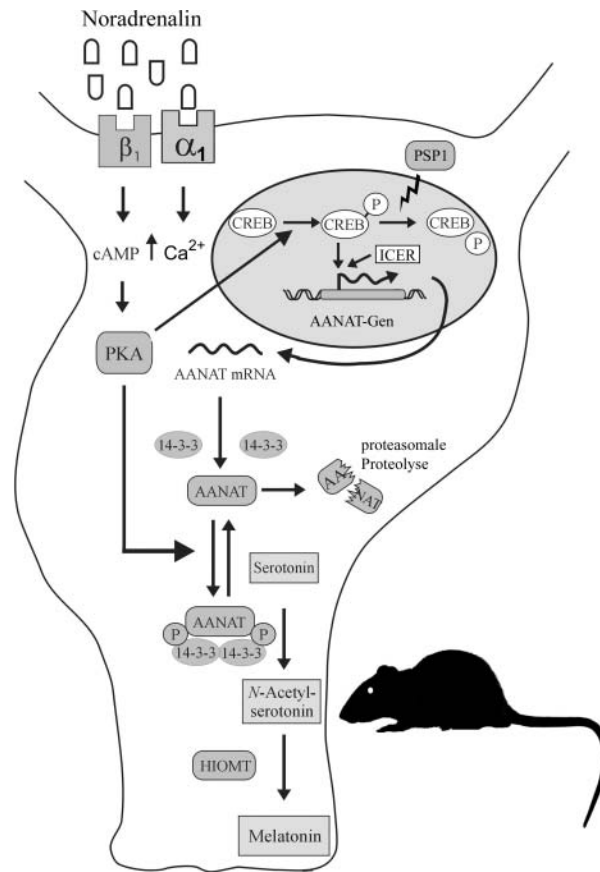


Abb. 2: Molekulare Kontrolle der Biosynthese von Melatonin im Pinealozyten der Ratte.  $\alpha_1$ ,  $\alpha_1$ -adrenerger Rezeptor;  $\beta_1$ ,  $\beta_1$ -adrenerger Rezeptor; PKA, cAMP-abhängige Proteinkinase A; CREB, cyclic AMP responsive element-binding protein; ICER, inducible cAMP early repressor; PSP1, Protein-Serin/Threonin-Phosphatase 1; AANAT, Arylalkylamin-N-acetyltransferase; 14-3-3, 14-3-3-Protein; HIOMT, Hydroxyindol-O-methyltransferase; P, Phosphatgruppe.

hervorrufen und dass die Erhöhung des cAMP eine essentielle Voraussetzung für den Beginn der Melatonin-Synthese darstellt (Schomerus et al., 2002). Interessanterweise ist beim Rind der cAMP-Anstieg aber weniger ausgeprägt (2fach) als bei der Ratte (100fach; Vanecek et al., 1985); der Grund dafür ist unbekannt. Eine weitere Gemeinsamkeit besteht darin, dass die Aktivierung  $\alpha_1$ -adrenerger Rezeptoren bei beiden Tierarten zu einem starken Anstieg von  $[Ca^{2+}]_i$  im Pinealozyten führt. Auch beim Rind resultiert der  $[Ca^{2+}]_i$ -Anstieg aus der Freisetzung von Calcium-Ionen aus intrazellulären Kompartimenten sowie aus dem Einstrom von Calcium-Ionen in die Zelle (Schomerus et al., 2002).

Offenbar sind die molekularen Mechanismen, die die intrazelluläre Konzentration an cAMP und  $Ca^{2+}$  steuern sowie die funktionelle Bedeutung der beiden Botenstoffe bei Rind und Ratte weitgehend ähnlich. Diesen Gemeinsamkeiten stehen deutliche Unterschiede auf der Ebene der Steuerung der AANAT gegenüber. Untersuchungen

an Pinealozyten des Schafes und des Rindes haben ergeben, dass das *Aanat*-Gen konstitutiv exprimiert wird und dass der *Aanat*-mRNA-Spiegel keinen Tag/Nacht-Schwankungen unterliegt (Coon et al., 1995; Klein et al., 1997; Schomerus et al., 2000). Offenbar reguliert der cAMP/PKA-Weg die Melatonin-Synthese nicht über die transkriptionelle Aktivierung der AANAT wie bei der Ratte. Vielmehr wird beim Schaf und beim Rind die Melatonin-Bildung über die Kontrolle der Rate reguliert, mit der AANAT-Protein proteolytisch abgebaut wird (Klein et al., 1997; Schomerus et al., 2000; Ganguly et al., 2001). In unstimulierten Pinealozyten ist der cAMP-Spiegel niedrig. Unter diesen Bedingungen wird AANAT-Protein aus der konstitutiv vorhandenen *Aanat*-mRNA ständig gebildet und durch das Proteasom sofort wieder abgebaut („Tagsituation“). Nach noradrenerger Stimulation steigt der cAMP-Gehalt in der Zelle an. Dies führt zur PKA-abhängigen Phosphorylierung der AANAT, die dadurch vor der proteasomalen Proteolyse geschützt ist („Nachtsituation“). Dieser verschwenderisch erscheinende, posttranslationale Regulationsmechanismus spiegelt vermutlich die Bedeutung wider, die der Organismus einem scharfen und präzisen Melatonin-Profil zumisst. Er wurde zuerst in Pinealozyten der Ratte entdeckt. In Nagern ist die Steuerung der Proteolyse aber nur ein Prozess, der die obligatorische transkriptionelle Aktivierung der AANAT ergänzt, indem das Enzym stabilisiert wird. Nur in Ausnahmesituationen – bei unerwartetem Licht inmitten der Nacht – spielt die proteasomale Proteolyse auch bei der Ratte die führende Rolle bei der Kontrolle der Melatonin-Synthese, weil durch den rapiden Abfall des cAMP-Spiegels die AANAT dephosphoryliert wird und damit vor der proteasomalen Proteolyse nicht mehr geschützt ist (Gastel et al., 1998). Bei Schafen und Rindern, bei denen die AANAT nicht transkriptionell aktiviert wird, ist die Kontrolle der AANAT-Proteolyse dagegen der entscheidende Mechanismus, der über die Melatonin-Bildung bestimmt (Abb. 3). Erste Studien sprechen dafür, dass dies auch beim Menschen so sein könnte. In autopsischen Proben aus menschlichen Pinealorganen wurden keine signifikanten Tag/Nacht-Schwankungen im *Aanat*-mRNA-Gehalt festgestellt (Ackermann et al., 2006). Ähnliche Ergebnisse wurden zuvor an Pinealorganen erhoben, die Rhesusaffen entnommen wurden (Coon et al., 2002). Gegen eine transkriptionelle Aktivierung des *Aanat*-Gens beim Rind und beim Menschen spricht weiterhin, dass AANAT-Aktivität und Melatonin-Synthese unmittelbar nach Eintritt der Dunkelheit einsetzen (Hedlund et al., 1977; Reppert et al., 1979; Arendt, 1998). Dieser Befund lässt sich so interpretieren, dass das *Aanat*-Gen konstitutiv exprimiert wird, so dass keine zusätzliche Zeit für die Akkumulation von *Aanat*-mRNA benötigt wird wie bei der Ratte. Diese Gemeinsamkeiten im Melatonin-Stoffwechsel zwischen Rindern und Primaten unterstreichen die besondere modellhafte Bedeutung, die Untersuchungen an Pinealozyten des Rindes haben.

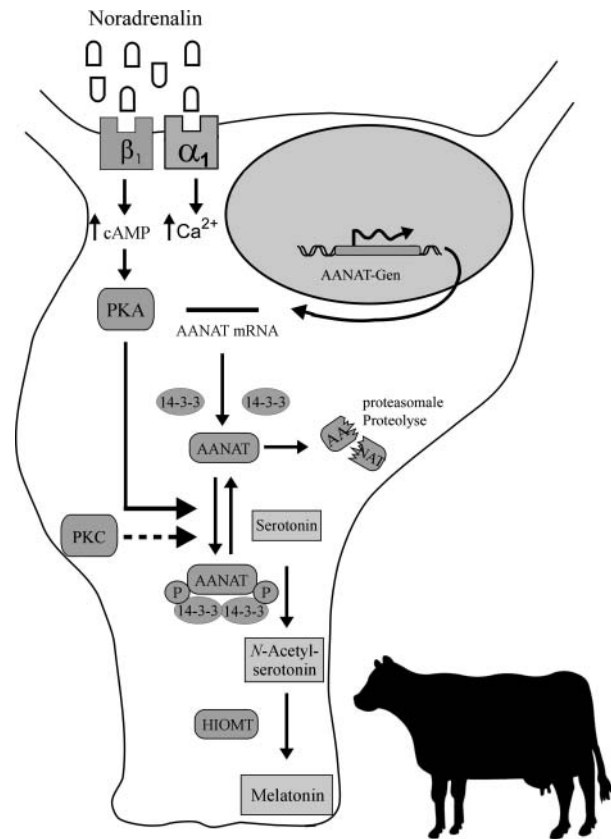


Abb. 3: Molekulare Kontrolle der Biosynthese von Melatonin im Pinealozyten des Rindes.  $\alpha_1$ ,  $\alpha_1$ -adrenerger Rezeptor;  $\beta_1$ ,  $\beta_1$ -adrenerger Rezeptor; PKA, cAMP-abhängige Proteinkinase A; CREB, cyclic AMP responsive element-binding protein; AANAT, Arylalkylamin-N-acetyltransferase; 14-3-3, 14-3-3-Protein; PKC, Proteinkinase C; HIOMT, Hydroxyindol-O-methyltransferase; P, Phosphatgruppe.

Die cAMP-abhängige Phosphorylierung der AANAT erfolgt an zwei kurzen Abfolgen von Aminosäuren innerhalb der AANAT, die als Erkennungssequenzen für die PKA dienen. Sie liegen in regulatorischen Domänen am Amino- und Carboxyterminus der AANAT, die ein zentralgelegenes katalytisches Zentrum flankieren, welches über Bindungsstellen für Arylalkylamine und Acetyl-CoA verfügt (Klein et al., 1997). Die Phosphorylierung der Aminosäuren Threonin-31 und Serin-205 innerhalb der beiden PKA-Erkennungssequenzen lässt ein Motiv entstehen, das von sog. 14-3-3-Proteinen erkannt wird (Ganguly et al., 2001; Obsil et al., 2001; Zheng et al., 2005). 14-3-3-Proteine gehören zu einer Gruppe regulatorischer Proteine, die ubiquitär vorkommen und an eine Vielzahl von – zumeist phosphorylierten – Zielproteinen binden können (Klein et al., 2003; Aitken, 2006). Die Bildung von pAANAT-14-3-3-Proteinkomplexen hat mindestens zwei Effekte: (1) 14-3-3 wirkt wie eine Tarnkappe, die die pAANAT vor Molekülen schützt, welche die Proteolyse einleiten. Dabei handelt es sich vermutlich um Phosphatasen und/oder Makromoleküle wie Ubiqui-

tin, die abzubauen Proteine für die proteasomale Proteolyse markieren. (2) 14-3-3 erhöht die Affinität zwischen AANAT und ihrem Substrat Serotonin und erleichtert dadurch die Umwandlung von Serotonin in *N*-Acetylserotonin in der Nacht, wenn die Serotonin-Konzentration im Pinealozyten niedriger als am Tag ist.

Unabhängig von der untersuchten Tierart ist der cAMP/PKA-Weg offensichtlich von zentraler Bedeutung für die Aktivierung der AANAT. Jedoch gibt es Hinweise, dass auch andere Signalübertragungskaskaden an der Regulation dieses Enzyms beteiligt sein können. Von besonderem Interesse ist der Befund, dass in Pinealozyten des Rindes die direkte Aktivierung der PKC durch Phorbol-ester starke Anstiege von AANAT-Protein, AANAT-Aktivität und Melatonin-Bildung bewirkt (Schomerus et al., 2004). Diese Daten unterscheiden sich deutlich von Untersuchungen an Pinealozyten der Ratte, in denen Phorbol-ester keine Wirkung auf die genannten Merkmale haben (Sugden et al., 1985; Zatz, 1985). Bemerkenswerterweise haben Phorbol-ester keinen Einfluss auf den AANAT-mRNA-Gehalt der Zellen. Das lässt den Schluss zu, dass Phorbol-ester die AANAT auf posttranskriptioneller Ebene kontrollieren. Der interessanteste Aspekt an diesen Untersuchungen ist aber, dass den zellulären Antworten, die durch Phorbol-ester ausgelöst werden, keine cAMP-Erhöhung vorausgeht. Offenbar kann die Melatonin-Bildung in Pinealozyten des Rindes über einen cAMP-unabhängigen Mechanismus beeinflusst werden, an dem PKC beteiligt ist. Dieser überraschende Befund wirft eine Reihe von Fragen auf. Besonders naheliegend ist die Frage, über welche molekularen Mechanismen die PKC die AANAT aktiviert. Der Vergleich der Aminosäuresequenz von AANATs aus verschiedenen Tierarten zeigt, dass neben den beiden PKA-Erkennungssequenzen auch eine streng konservierte PKC-Erkennungssequenz zu finden ist, die am Carboxyterminus der AANAT lokalisiert ist (Klein et al., 1997). Es wäre also denkbar, dass die PKC die AANAT ebenfalls durch direkte Phosphorylierung aktiviert. Weitere Studien sollten der Frage nachgehen, durch welchen physiologischen Stimulus sich der PKC-vermittelte, cAMP-unabhängige Weg aktivieren lässt.

### Cholinerge Signalverarbeitung im Pinealorgan von Säugetieren

Eine parasympathische Innervation des Pinealorgans wurde in einer Reihe von neuroanatomischen Studien in verschiedenen Tierarten mit unterschiedlicher Intensität und Ausprägung nachgewiesen (Übersicht: Phansuwan-Pujito et al., 1999; Møller und Baeres, 2002). Als Ursprungsorte der cholinergen Fasern gelten das *Ganglion sphenopalatinum* und das *Ganglion oticum* (Shiotani et al., 1986; Møller und Liu, 1999). Der Nachweis nikotinischer Acetylcholin-Rezeptoren (nicAChRs; Reuss et al., 1992; Stankov et al., 1993; Yeh et al., 2001) und muskarinischer

Acetylcholin-Rezeptoren (musAChRs; Taylor et al., 1980; Finocchiaro et al., 1989; Govitrapong et al., 1990) über *in situ*-Hybridisierung, immunzytochemische Untersuchungen oder Bindungsstudien spricht für die Annahme, dass Acetylcholin (ACh) die Melatonin-Synthese modulieren kann. In einer Reihe funktioneller Untersuchungen an Pinealozyten der Ratte und des Rindes wurde das Antwortverhalten der Zellen auf Stimulation mit ACh analysiert. Pinealozyten neonataler Ratten antworten auf ACh mit einem Anstieg von  $[Ca^{2+}]_i$ , der über muskarinische AChRs vermittelt wird (Schomerus et al., 1999). Während der zweiten postnatalen Woche kommt es interessanterweise zu einer Veränderung hinsichtlich von Reizwahrnehmung und Reizweiterleitung: Das ACh-induzierte Calcium-Signal wird nicht mehr über musAChRs, sondern über nicAChRs vermittelt. Da musAChRs und nicAChRs mit unterschiedlichen nachgeschalteten Signaltransduktionskaskaden gekoppelt sein können, ist anzunehmen, dass ACh über musACh-Rezeptor in einem engen Zeitfenster die frühe postnatale Entwicklung des Pinealorgans beeinflusst.

In adulten Pinealozyten der Ratte bewirkt ACh den  $[Ca^{2+}]_i$ -Anstieg ausschließlich über nicAChRs (Schomerus et al., 1995; Letz et al., 1997). In elektrophysiologischen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass der nicAChR, der selbst ein Liganden-gesteuerter Ionenkanal ist, sich öffnet und  $Na^+$ -Ionen in die Zelle einströmen lässt. Dieser  $Na^+$ -Influx ruft eine Depolarisation des Pinealozyten hervor, die schließlich zur Öffnung spannungsabhängiger Calcium-Kanäle und einen  $Ca^{2+}$ -Einstrom in den Pinealozyten führt. Die funktionelle Bedeutung des ACh-induzierten  $Ca^{2+}$ -Signals ist umstritten. Bei der Ratte gibt es Befunde, nach denen die  $[Ca^{2+}]_i$ -Erhöhung zur Freisetzung von Glutamat aus dem Pinealozyten führt. Das Glutamat hat nach diesen Untersuchungen eine auto- oder parakrine Wirkung: Es hemmt über einen speziellen Glutamat-Rezeptor (GlutR3) die Adenylatzyklase, erniedrigt dadurch den cAMP-Spiegel und hemmt somit der Melatonin-Bildung (Yamada et al., 1998a, 1998b; Abb. 4). Im Gegensatz zur Ratte wirkt ACh in Pinealozyten des Rindes sowohl über musAChRs als auch über nicAChRs und führt zu einer Erhöhung von  $[Ca^{2+}]_i$ . Allerdings hemmen ACh oder Glutamat weder den NA-induzierten Anstieg der AANAT-Aktivität noch den NA-induzierten Anstieg der Melatonin-Synthese (Schomerus et al., 2002). Die funktionelle Bedeutung der AChRs und der spannungsabhängigen Calcium-Kanäle in Pinealozyten des Rindes ist daher noch ungeklärt.

### Zusammenfassung

Infolge intensiver Untersuchungen sind sowohl die noradrenerge als auch die cholinerge Signaltransduktion im Pinealorgan von Säugetieren gut charakterisiert. Die um-

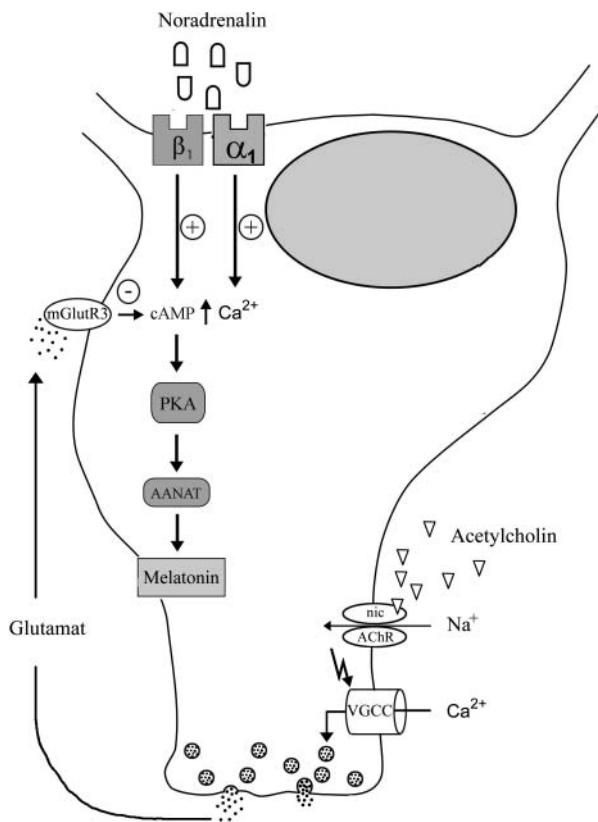


Abb. 4: Cholinerge Signalübertragung im Pinealorgan der Ratte.  $\alpha_1$ ,  $\alpha_1$ -adrenerger Rezeptor;  $\beta_1$ ,  $\beta_1$ -adrenerger Rezeptor; PKA, cAMP-abhängige Proteinkinase A; AANAT, Arylalkylamin-N-Acetyltransferase; nicAChR, nikotinischer Acetylcholin-Rezeptor; VGCC, spannungsabhängiger Calcium-Kanal; mGluR3, metabotroper Glutamat-Rezeptor 3.

fangreiche Kenntnis über die molekularen Komponenten und deren Wechselwirkungen macht das Pinealorgan zu einem ausgezeichneten Modellsystem für die weitere Untersuchung beider Signalübertragungswege. Die funktionelle Bedeutung der cholinergen Erregbarkeit, die ein konserviertes Element in der Signalübertragung des Pinealorgans darstellt und in Pinealozyten aller untersuchten Säugetiere nachgewiesen werden konnte, bedarf weiterer Untersuchungen. Bei einer vergleichenden Betrachtung der noradrenergen Signalübertragung im Pinealorgan fällt auf, dass ein gut definiertes, endokrines Ausgangssignal – die Bildung von Melatonin – durch verschiedene regulatorische Mechanismen gesteuert wird. Diese tierartlichen Unterschiede haben sich im Verlauf der Evolution herausgebildet und reflektieren eindrucksvoll die große adaptive Plastizität des Pinealorgans. Sie machen auch deutlich, dass vergleichende Untersuchungen hilfreich und notwendig sind, um das photoneuroendokrine System besser zu verstehen, eingeschlossen das vom Menschen.

Eine offensichtliche Frage ist die nach der funktionellen Bedeutung dieser auffallenden Unterschiede. Möglich erscheint, dass sie auf Aspekte des Verhaltens zurückzuführen sind wie beispielsweise Tagaktivität (Rind,

Schaf, Mensch) bzw. Nachtaktivität (die große Mehrheit der Nagetiere). Untersuchungen an der Grasmücke *Arvicaria ansorgei* haben jedoch gezeigt, dass auch in einem tagaktiven Nagetier die Kontrolle des *Aanat*-Gens über transkriptionelle Aktivierung erfolgt (Garidou et al., 2002).

Unabhängig von der Antwort auf diese Frage macht eine vergleichende Betrachtung deutlich, dass Melatonin als endokriner Code für die Nacht für die Physiologie der Säugetiere von essentieller Bedeutung sein muss, weil dieses Signal im Verlauf der Evolution trotz aller Veränderungen in den regulatorischen Mechanismen in seinem Kern erhalten geblieben ist.

### Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Horst-Werner Korf für seine konstruktive Unterstützung aller Untersuchungen sowie Frau Elke Laedtke für ihre nimmermüde technische Assistenz. Die Studien wurden finanziell unterstützt durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft.

### Literatur

- Abraham U, Albrecht U, Brandstätter R. 2003. Hypothalamic circadian organization in birds. II. Clock gene expression. *Chronobiol Int* 20:657–69.
- Ackermann K, Bux R, Rüb U, Korf HW, Kauert G, Stehle JH. 2006. Characterization of human melatonin synthesis using autaptic pineal tissue. *Endocrinology* 147:3235–3242.
- Aitken A. 2006. 14-3-3 proteins: a historic overview. *Semin Cancer Biol* 16: 162–172.
- Arendt J. 1998. Melatonin and the pineal gland: influence on mammalian seasonal and circadian physiology. *Rev Reprod* 3:13–22.
- Baler R, Covington S, Klein DC. 1997. The rat arylalkylamine N-acetyltransferase gene promoter. *J Biol Chem* 272:6979–6985.
- Berson DM, Dunn FA, Takao M. 2002. Phototransduction by retinal ganglion cells that set the circadian clock. *Science* 295:1070–1073.
- Borjigin J, Wang MM, Snyder SH. 1995. Diurnal variation in mRNA encoding serotonin N-acetyltransferase in the pineal gland. *Nature* 378:783–785.
- Cahill GM. 2002. Clock mechanisms in zebrafish. *Cell Tissue Res* 309:27–34.
- Coon SL, Del Olmo E, Young 3<sup>rd</sup> WS, Klein DC. 2002. Melatonin synthesis enzymes in *Macaca mulatta*: focus on arylalkylamine N-acetyltransferase (EC 2.3.1.87). *J Clin Endocrinol Metab* 87:4699–4706.
- Coon SL, Roseboom PH, Baler R, Weller JL, Namboodiri MAA, Koonin EV, Klein DC. 1995. Pineal serotonin N-acetyltransferase: expression cloning and molecular analysis. *Science* 270:1681–1683.
- Drijfhout WA, van der Linde S, Kooi C, Grol B, Westerink BHC. 1996. Norepinephrine release in the rat pineal gland: the input from the biological clock measured by in vivo microdialysis. *J Neurochem* 66:748–755.

- Falcon J, Gothilf Y, Coon SL, Boeuf G., Klein DC. 2003. Genetic, temporal and developmental differences between melatonin rhythm generating systems in the teleost fish pineal organ and retina. *J Neuroendocrinol* 15:378–382.
- Finocchiaro LM, Scheucher A, Finkielman S, Nahmod VE, Piro-la CJ. 1989. Muscarinic effects on the hydroxy- and methoxy-indole pathway in the rat pineal gland. *J Endocrinol* 123:205–211.
- Ganguly S, Gastel JA, Weller JL, Schwartz C, Jaffe H, Nambodiri MAA, Coon SL, Hickman AB, Rollag M, Obsil T, Beauverger P, Ferry G, Boutin JA, Klein DC. 2001. Role of a pineal cAMP-operated arylalkylamine *N*-acetyltransferase/14-3-3 binding switch in melatonin synthesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:8083–8088.
- Garidou ML, Gauer F, Vivien-Roels B, Sicard B, Pevet P, Simonneaux V. 2002. Pineal arylalkylamine *N*-acetyltransferase gene expression is highly stimulated at night in the diurnal rodent, *Arvicanthis ansorgei*. *Eur J Neurosci* 15:1632–1640.
- Gastel JA, Roseboom PH, Rinaldi PA, Weller JL, Klein DC. 1998. Melatonin production: proteosomal proteolysis in serotonin *N*-acetyltransferase regulation. *Science* 279:1358–1360.
- Govitrapong P, Phansuwan-Pujito P, Ebadi M. 1989. Studies on the properties of muscarinic cholinergic receptor sites in bovine pineal gland. *Comp Biochem Physiol C* 94:159–164.
- Hannibal J, Fahrenkrug J. 2006. Neuronal input pathways to the brain's biological clock and their functional significance. *Adv Anat Embryol Cell Biol* 182:1–71.
- Hastings MH, Reddy AB, Maywood ES. 2003. A clockwork web: circadian timing in brain and periphery, in health and disease. *Nat Rev Neurosci* 4:649–661.
- Hedlund L, Lischko MM, Rollag MD, Niswender GD. 1977. Melatonin: daily cycle in plasma and cerebrospinal fluid of calves. *Science* 195:686–687.
- Klein DC. 1985. Photoneural regulation of the mammalian pineal gland. In: Evered D, Clark S, editors. *Photoperiodism, melatonin and the pineal gland*. Pitman, London: Ciba Foundation Symposium 117. pp. 38–56.
- Klein DC, Coon SL, Roseboom PH, Weller JL, Bernard M, Gastel JA, Zatz M, Iuvone PM, Rodriguez IR, Bégay V, Falcón J, Cahill GM, Cassone VM, Baler R. 1997. The melatonin rhythm-generating enzyme: molecular regulation of serotonin *N*-acetyltransferase in the pineal gland. *Rec Progr Horm Res* 52:307–358.
- Klein DC, Ganguly S, Coon SL, Shi Q, Gaildrat P, Morin F, Weller JL, Obsil T, Hickman A, Dyda F. 2003. 14-3-3 proteins in pineal photoneuroendocrine transduction: how many roles? *J Neuroendocrinol* 15:370–377.
- Koch M, Mauhin V, Stehle, Schomerus C, Korf HW. 2003. Dephosphorylation of pCREB by protein serine/threonine phosphatases is involved in inactivation of Aanat gene transcription in rat pineal gland. *J Neurochem* 85:170–179.
- Korf HW, Schomerus C, Stehle JH. 1998. The pineal organ, its hormone melatonin, and the photoneuroendocrine system. *Adv Anat Embryol Cell Biol* 146:1–100.
- Letz B, Schomerus C, Maronde E, Korf, Korbmacher C. 1997. Stimulation of a nicotinic ACh receptor causes depolarization and activation of L-type  $Ca^{2+}$  channels in rat pinealocytes. *J Physiol* 499:329–340.
- Lincoln GA, Andersson H, Loudon A. 2003. Clock genes in calendar cells as the basis of annual timekeeping in mammals – a unifying hypothesis. *J Endocrinol* 179:1–13.
- Maronde E, Pfeffer M, Olcese J, Molina CA, Schlotter F, Dehghani F, Korf HW, Stehle JH. 1999. Transcription factors in neuroendocrine regulation: rhythmic changes in pCREB and ICER levels frame melatonin synthesis. *J Neurosci* 19:3226–3336.
- Møller M, Baeres FMM. 2002. The anatomy and innervation of the pineal gland. *Cell Tissue Res* 309:139–150.
- Møller M, Liu W. 1999. Innervation of the rat pineal gland by nerve fibres originating in the sphenopalatine, otic and trigeminal ganglia. A retrograde in vivo neuronal tracing study. *Reprod Nutr Dev* 39:345–353.
- Moore RY. 1996. Neural control of the pineal gland. *Behav. Brain Res* 73:125–130.
- Natesan A, Geetha L, Zatz M. 2002. Rhythm and soul in the avian pineal. *Cell Tissue Res* 309:35–45.
- Obsil T, Ghirlando R, Klein DC, Ganguly S, Dyda F. 2001. Crystal structure of the serotonin *N*-acetyltransferase complex: a role for scaffolding in enzyme regulation. *Cell* 105:257–267.
- Panda S, Hogenesch JB. 2004. It's all in the timing: many clocks, many outputs. *J Biol Rhythms* 19:374–387.
- Peirson S, Foster RG. 2006. Melanopsin: another way of signaling light. *Neuron* 49:331–339.
- Pfeffer M, Maronde E, Molina CA, Korf HW, Stehle JH. 1999. Inducible cyclic AMP early repressor protein in rat pinealocytes: a highly sensitive natural reporter for regulated gene transcription. *Mol Pharmacol* 56:279–289.
- Phansuwan-Pujito P, Moller M, Govitrapong P. 1999. Cholinergic innervation and function in the mammalian pineal gland. *Microsc Res Tech* 46:281–295.
- Provencio I, Rodriguez IR, Jiang G, Hayes WP, Moreira EF, Rollag MD. 2000. A novel human opsin in the inner retina. *J Neurosci* 20:600–605.
- Reppert SM, Perlow MJ, Tamarkin L, Klein DC. 1979. A diurnal melatonin rhythm in primate cerebrospinal fluid. *Endocrinology* 104:295–301.
- Reppert SM, Weaver DR. 2002. Coordination of circadian timing in mammals. *Nature* 418:935–941.
- Reuss S, Moore RY. 1989. Neuropeptide Y-containing neurons in the rat superior cervical ganglion: projections to the pineal gland. *J Pineal Res* 6:307–316.
- Roseboom PH, Coon SL, Baler R, McCune SK, Weller JL, Klein DC. 1996. Melatonin synthesis: analysis of the more than 150-fold nocturnal increase in serotonin *N*-acetyltransferase messenger ribonucleic acid in the rat pineal gland. *Endocrinology* 137:3033–3044.
- Roseboom PH, Klein DC. 1995. Norepinephrine stimulation of pineal cyclic AMP response element-binding protein phosphorylation: involvement of a  $\beta$ -adrenergic/cyclic AMP mechanism. *Mol Pharmacol* 47:439–449.
- Scharrer E. 1964. Photo-neuro-endocrine systems: General concepts. *Ann NY Acad Sci* 117:13–22.
- Schomerus C, Korf HW, Laedtke E, Weller JL, Klein DC. 2000. Selective adrenergic/cyclic AMP-dependent switch-off of proteasomal proteolysis alone switches on neural signal transduction: an example from the pineal gland. *J Neurochem* 75:2123–2132.
- Schomerus C, Laedtke E, Korf HW. 1995. Calcium responses of isolated, immunocytochemically identified rat pinealocytes to noradrenergic, cholinergic and vasopressinergic stimulations. *Neurochem Int* 27:163–175.
- Schomerus C, Laedtke E, Korf HW. 1999. Analyses of signal transduction cascades in rat pinealocytes reveal a switch in



- cholinergic signaling during postnatal development. *Brain Res* 833:39–50.
- Schomerus C, Laedtke E, Korf HW. 2004. Activation of arylalkylamine *N*-acetyltransferase by phorbol esters in bovine pinealocytes suggests a novel regulatory pathway in melatonin synthesis. *J Neuroendocrinol* 16:741–749.
- Schomerus C, Laedtke E, Olcese J, Weller JL, Klein DC, Korf HW. 2002. Signal transduction and regulation of melatonin synthesis in bovine pinealocytes: impact of adrenergic, peptidergic and cholinergic stimuli. *Cell Tissue Res* 309:417–428.
- Schomerus C, Maronde E, Laedtke E, Korf HW. 1996. Vasoactive intestinal peptide (VIP) and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) induce phosphorylation of the transcriptional factor CREB in subpopulations of rat pinealocytes: immunocytochemical and immunochemical evidence. *Cell Tissue Res* 286:305–313.
- Sekaran S, Foster RG, Lucas RJ, Hankins MW. 2003. Calcium imaging reveals a network of intrinsically light-sensitive inner-retinal neurons. *Curr Biol* 13:1290–1298.
- Shiotani Y, Yamano M, Shiosaka S, Emson PC, Hillyard CJ, Girgis S, MacIntyre I. 1986. Distribution and origins of substance P (SP)-, calcitonin gene-related peptide (CGRP)-, vasoactive intestinal polypeptide (VIP)- and neuropeptide Y (NPY)-containing nerve fibers in the pineal gland of gerbils. *Neurosci Lett* 70:187–192.
- Simonneaux V, Ribelayga C. 2003. Generation of the melatonin endocrine message in mammals: a review of the complex regulation of melatonin synthesis by norepinephrine, peptides, and other pineal transmitters. *Pharmacol Rev* 55:325–395.
- Stankov B, Cimino M, Marini P, Lucini V, Fraschini F, Clementi F. 1993. Identification and functional significance of nicotinic cholinergic receptors in the rat pineal gland. *Neurosci Lett* 156:131–134.
- Stehle JH, Foulkes NS, Molina CA, Simonneaux V, Pevet P, Sassone-Corsi P. 1993. Adrenergic signals direct rhythmic expression of transcriptional repressor CREM in the pineal gland. *Nature* 356:314–320.
- Sugden LA, Sugden D, Klein DC. 1987. Alpha 1-adrenoceptor activation elevates cytosolic calcium in rat pinealocytes by increasing net influx. *J Biol Chem* 262:741–745.
- Sugden D, Vanecek J, Klein DC, Thomas TB, Anderson WB. 1985. Activation of protein kinase C potentiates isoprenaline-induced cyclic AMP accumulation in rat pinealocytes. *Nature* 314:359–360.
- Tamotsu S, Schomerus C, Stehle JH, Roseboom PH, Korf HW. 1995. Norepinephrine-induced phosphorylation of the transcription factor CREB in isolated rat pinealocytes: an immunocytochemical study. *Cell Tissue Res* 282:219–226.
- Taylor RL, Albuquerque MLC, Burt DR. 1980. Muscarinic receptors in pineal. *Life Sci* 26:2195–2200.
- Vanecek J, Sugden D, Weller JL, Klein DC. 1985. Atypical synergistic  $\alpha_1$ - and  $\beta$ -adrenergic regulation of adenosine 3',5'-monophosphate and guanosine 3',5'-monophosphate in rat pinealocytes. *Endocrinology* 116:2167–2173.
- von Gall C, Lewy A, Schomerus C, Vivien-Roels B, Pevet P, Korf HW, Stehle JH. 2000. Transcription factor dynamics and neuroendocrine signalling in the mouse pineal gland: a comparative analysis of melatonin-deficient C57BL mice and melatonin-proficient C3H mice. *Eur J Neurosci* 12:964–972.
- Weaver DR. 1998. The suprachiasmatic nucleus: a 25-year retrospective. *J Biol Rhythms* 13:100–112.
- Yamada H, Ogura A, Koizumi S, Yamaguchi A, Moriyama Y. 1998a. Acetylcholine triggers L-glutamate exocytosis via nicotinic receptors and inhibits melatonin synthesis in rat pinealocytes. *J Neurosci* 18:4946–4952.
- Yamada H, Yastushiro S, Ishio S, Hayashi M, Nishi T, Yamamoto A, Futai M, Yamaguchi A, Moriyama Y. 1998b. Metabotropic glutamate receptors negatively regulate melatonin synthesis in rat pinealocytes. *J Neurosci* 18:2056–2062.
- Yeh JJ, Yasuda RP, Davila-Garcia RP, Xiao Y, Ebert S, Gupta T, Kellar KJ, Wolfe BB. 2001. Neuronal nicotinic acetylcholine receptor alpha3 subunit protein in rat brain and sympathetic ganglion measured using a subunit-specific antibody: regional and ontogenic expression. *J Neurochem* 77:336–346.
- Zatz M. 1985. Phorbol esters mimic alpha-adrenergic potentiation of serotonin *N*-acetyltransferase induction in the rat pineal. *J Neurochem* 45:637–639.
- Zheng W, Schwarzer D, Lebeau A, Weller JL, Klein DC, Cole PA. 2005. Cellular stability of serotonin *N*-acetyltransferase conferred by phosphonodifluoromethylene alanine (Pfa) substitution for Ser-205. *J Biol Chem* 280:10462–10467.