

Aus dem Zentrum der Morphologie (Dr. Senckenbergische Anatomie) des Klinikums der  
Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main

Institut für Anatomie III (Zelluläre und molekulare Anatomie)

Direktor: Prof. Dr. rer. nat. J. H. Stehle

UNTERSUCHUNGEN ZUR EXPRESSION VON UHRENGENEN IN DER  
KORTIKOTROPHEN AT-T-20 TUMORZELLINIE DER MAUS

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin  
des Fachbereichs der Medizin der Johann Wolfgang Goethe-Universität  
Frankfurt am Main

vorgelegt von

Johannes M. H. Hennings  
aus Gräfelting

Frankfurt am Main 2005

Dekan: Prof. Dr. J. Pfeilschifter

Referent: Prof. Dr. J. H. Stehle

Koreferent: Prof. Dr. G. Auburger

Tag der mündlichen Prüfung: 23.01.2006

*Meinen lieben Eltern*

*Hiltrud und Günter*

Pour qu'une chose soit intéressante, il suffit de la regarder longtemps.

*Gustave Flaubert*

**INHALTSVERZEICHNIS**

<b>1. EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Biologische Rhythmen</b>	<b>1</b>
<b>1.2 Das photoneuroendokrine System (PNS) der Säuger</b>	<b>2</b>
<i>1.2.1 Auge und retinohypothalamischer Trakt</i>	3
<i>1.2.2. Der suprachiasmatische Kern (SCN) im Verbund des PNS</i>	4
<i>1.2.3. Pinealorgan</i>	5
<b>1.3. Der suprachiasmatische Kern: Funktionsweise der inneren Uhr</b>	<b>6</b>
<i>1.3.1 Jedes einzelne Neuron des SCN ist ein Oszillator</i>	6
<i>1.3.2 Uhrengene, die molekulare Grundlage aller biologischer Uhren</i>	7
<i>1.3.2.1 Mit CLOCK-BMAL1 fängt der Tag an</i>	9
<i>1.3.2.2 Grünes Licht für Blaulichtrezeptoren bedeutet rotes Licht für CLOCK-BMAL1</i>	10
<i>1.3.2.3 REV-ERBa ist Bestandteil der positiven Schleife mit negativen Eigenschaften</i>	12
<i>1.3.2.4 Alles im Leben richtet sich nach der Uhr: Die innere Uhr steuert Lebensprozesse</i>	13
<i>1.3.4 Synchronisation einzelner Oszillatoren</i>	13
<b>1.4 Uhrengene in der Peripherie: Fast überall tickt eine Uhr</b>	<b>16</b>
<i>1.4.1 In peripheren Organen geben Tochter-Oszillatoren Stoffwechselprozessen eine zirkadiane Komponente</i>	16
<i>1.4.2 Uhrengene in Zellkultursystemen</i>	17
<i>1.4.3 Verstellung peripherer Uhren in vivo und in vitro</i>	18
<i>1.4.3.1 Der SCN synchronisiert die Peripherie</i>	18
<i>1.4.3.2 Periphere Synchronisatoren synchronisieren die Peripherie</i>	18
<i>1.4.3.3 Forscher synchronisieren Zellkulturen</i>	19
<b>1.6 AtT-20 Zellen als Modellzelllinie</b>	<b>19</b>
<b>1.7 Thema der Arbeit</b>	<b>20</b>
<b>2. MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>23</b>

<b>2.1 Chemikalien</b>	<b>23</b>
<b>2.2 Zellkulturtechniken</b>	<b>23</b>
2.2.1 <i>Splitting und Stocks</i>	23
2.2.2 <i>Stimulationsversuche</i>	24
<b>2.3 Arbeiten mit Nukleinsäuren</b>	<b>24</b>
2.3.1 <i>RNA-Isolation</i>	24
2.3.2 <i>Quantifizierung von Nukleinsäuren</i>	25
2.3.3 <i>Reverse Transkriptase Reaktion</i>	25
2.3.4 <i>Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)</i>	26
2.3.5 <i>Agarosegelelektrophorese</i>	28
2.3.6 <i>Semiquantitative Reverse Transkriptase-PCR (sqRT-PCR)</i>	29
2.3.7 <i>Real-Time quantitative PCR (RTQ-PCR)</i>	31
2.3.8 <i>Relative Quantifizierung der RTQ-PCR mittels <math>\Delta\Delta C_T</math>-Methode</i>	33
2.3.9 <i>Bestimmung der Periodenlänge <math>\tau</math></i>	36
<b>2.4 Methoden zur Proteinerkennung</b>	<b>36</b>
2.4.1 <i>Proteinextraktion und Proteinbestimmung</i>	36
2.4.2 <i>SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)</i>	37
2.4.3 <i>Immunoblotting</i>	37
2.4.4 <i>Autoradiographie</i>	38
2.4.5 <i>Wiederverwenden von Blotmembranen (Membran-Stripping)</i>	39
2.4.6 <i>Auswertung</i>	40
<b>2.5 Statistische Auswertung</b>	<b>40</b>
<b>3. ERGEBNISSE</b>	<b>41</b>
<b>3.1 Molekularbiologischer Nachweis von Uhrengenen in AtT-20 Zellen mittels RT-PCR-Techniken</b>	<b>41</b>
<b>3.2 Validierungsexperimente zur <math>\Delta\Delta C_T</math>-Methode</b>	<b>43</b>
3.2.1 <i>Konstant hohe Amplifikationsraten verwendeter DNA-Fragmente im Real-Time-Assay</i>	45
3.2.2 <i>Die Amplifikationsrate des Zielgens verhält sich regelmäßig parallel zu der des Haushaltsgens Hprt</i>	46

3.2.3 Konstanter Abstand der Verdünnungsgeraden von Zielgen und Haushaltsgen ( $\Delta$ slope)	47
<b>3.3 Stimulationsversuche mit Forskolin zur Induktion relevanter Uhrengene und von Icer</b>	<b>48</b>
3.3.1 Forskolin induziert einen raschen Anstieg an <i>Per1</i> mRNA in AtT-20 Zellen	48
3.3.2 Differenzieller Einfluss von Forskolin auf die Induktion von <i>Per2-3</i> , <i>Cry1-2</i> , <i>Bmall</i> , <i>Clock</i> und <i>CK1<math>\epsilon</math></i> , sowie von <i>Icer</i>	49
3.3.3 Forskolin-abhängige Phosphorylierung von <i>CREB</i> und <i>MAPK</i>	51
<b>3.4 Forskolin-induzierte zirkadiane Expression von Uhrengenen in AtT-20 Zellen</b>	<b>52</b>
3.4.1 Semiquantitative Darstellung zirkadianer Uhrengen-Expression mittels RT-PCR	53
3.4.2 Quantitative Analyse zirkadianer Uhrengen-Expression mittels RTQ-PCR	54
3.4.2.1 Die Expression von <i>Period</i> -Genen folgt einer zirkadianen Rhythmik in AtT-20 Zellen nach Forskolin-Stimulation	55
3.4.2.2 Die Expression von <i>Cryptochrom</i> -Genen verläuft synchron zur <i>Per</i> -Expression	56
3.4.2.3 Die <i>Bmall</i> -Expression verläuft rhythmisch in Antiphasse zur <i>Per2</i> -Expression	58
3.4.2.4 <i>Clock</i> und <i>CK1<math>\epsilon</math></i> zeigen keine zirkadiane Schwankungen im Expressionsprofil	58
3.4.2.5 <i>Icer</i> mRNA korreliert zeitlich nur mit dem initialen <i>Per1</i> -Spitzenwert	59
3.4.3 Bestimmung der Periodenlänge $\tau$	60
<b>4. DISKUSSION</b>	<b>61</b>
<b>4.1 AtT-20 Zellen exprimieren relevante Uhrengene</b>	<b>61</b>
<b>4.2 Die <math>\Delta\Delta C_T</math>-Methode der Real-Time PCR ist für die Darstellung genexpressiver Unterschiede von Uhrengenen geeignet</b>	<b>62</b>
<b>4.3 Forskolin induziert für die Synchronisation peripherer Gewebe relevante <i>immediate early genes</i> in AtT-20-Zellen</b>	<b>66</b>
4.3.1 <i>Per1</i> und die zeitliche Korrelation mit aktivierten Komponenten der Signaltransduktion	66
4.3.2 <i>Per2</i> tritt verzögert auf	68
4.3.3 Induktion von <i>Icer</i>	69
4.3.4 <i>Per3</i> , <i>Cry1-2</i> , <i>Bmall</i> , <i>Clock</i> , <i>Ck1<math>\epsilon</math></i>	74

<b>4.4 AtT-20 Zellen weisen nach Forskolin-Stimulation eine rhythmische Expression von Uhrengenen auf</b>	<b>76</b>
<i>4.4.1 Methodische Überlegungen zur Variabilität</i>	77
<i>4.4.2 Selektivität des Stimulus</i>	78
<i>4.4.3 Antiphasischer Verlauf von Per2 und Bmal1</i>	81
<b>4.5 Ausblick</b>	<b>83</b>
<b>5. ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>88</b>
<b>6. SUMMARY</b>	<b>90</b>
<b>7. ABKÜRZUNGEN</b>	<b>92</b>
<b>8. LITERATUR</b>	<b>94</b>
<b>9. VERWENDETE LÖSUNGEN UND PUFFER</b>	<b>108</b>
<b>10. DANKSAGUNG</b>	<b>112</b>



## 1. EINLEITUNG

### 1.1 Biologische Rhythmen

In der Evolution der Lebewesen spielt die Anpassungsfähigkeit an Umweltbedingungen eine entscheidende Rolle. In ganz besonderem Maße wird unser Leben durch die sich täglich ändernden Beleuchtungsverhältnisse bestimmt. Nahezu alle Lebensvorgänge, wie Nahrungsaufnahme, Arbeits- und Ruhephasen, aber auch Stoffwechsellleistungen unterliegen der zeitlichen Organisation dieses durch den Sonnentag vorgegebenen Rhythmus. Protozoen wie Metazoen, die solche äußere Veränderungen vorwegnehmen (antizipieren) können, besitzen daher einen wichtigen Selektionsvorteil. So ist zu verstehen, dass sich zur Antizipation des Tag-Nacht-Rhythmus sehr früh in der Phylogenie endogene Mechanismen der Zeitmessung, so genannte innere Uhren, ausgebildet haben (Pittendrigh 1993). Tatsächlich zeigen neuere genetische Untersuchungen, dass molekulare Komponenten biologischer Zeitmesser bereits in Archaeobakterien und Proteobakterien entwickelt waren (Dvornyk et al. 2003). Diese endogenen Oszillatoren können einen Organismus auf die nächste Hellphase vorbereiten, noch bevor sie eingetreten ist. Die innere Uhr des Menschen verursacht bereits vor Sonnenaufgang einen Anstieg von Herzfrequenz, Blutdruck und Blutkortisolspiegel. Mittlerweile konnte in einer Vielzahl von Lebensformen, angefangen von einzelligen Blaualgen bis hin zu komplexen Organismen wie den Säugetieren, endogene Oszillatoren nachgewiesen werden (zur Übersicht siehe Dunlap 1999, Johnson & Golden 1999).

Ein Wesensmerkmal aller inneren Uhren ist, dass sie auch ohne den Einfluss äußerer periodischer Reize (Zeitgeber) in der Lage sind, einen Rhythmus aufrecht zu erhalten. Da die Periodenlänge ( $\tau$ ) hierbei etwa einer Tageslänge entspricht, bezeichnet man solche Rhythmen als zirkadian (Pittendrigh 1960). Externe Reize, in erster Linie Licht, vermögen, die mit einem freilaufenden Rhythmus oszillierende innere Uhr zu verstellen, und sie so mit der tatsächlichen Tageslänge zu synchronisieren. Ein Rhythmus, der für seine Oszillationen abhängig von externen Reizen ist, wird als diurnal bezeichnet. Folgerichtig wird bei Zeitangaben in chronobiologischen Experimenten zwischen zirkadianen Bedingungen (Einheit CT [*circadian time*]) und diurnalen Bedingungen (Einheit ZT [*zeitgeber time*]) unterschieden.

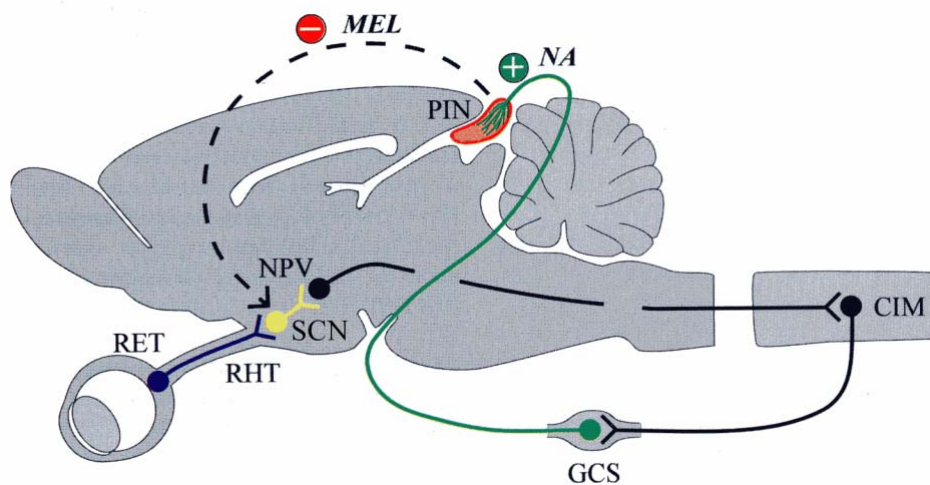
Es ist leicht vorstellbar, dass Störungen dieser außergewöhnlichen Uhr, besonders bei deren Synchronisation, mit erheblichen Beeinträchtigungen für den ganzen Organismus einhergehen: Die Reproduktionsrate von verschiedenen Cyanobakterien-Stämmen ist umso niedriger, je weniger ihr endogenes  $\tau$  mit den tatsächlichen Beleuchtungsverhältnissen übereinstimmt (Ouyang et al. 1998). Eine experimentell wiederholte Phasenverschiebung reduziert bei *Drosophila* die Lebensdauer (Aschoff et al. 1971). Schicht- und Nachtarbeit erhöht beim Menschen die Krankheitshäufigkeit und mindert das Wohlbefinden (Clemens 1981, Carpentier & Cazamian 1981). Schließlich kann der Verlust des Augenlichts zur vollständigen Entkopplung des endogenen Rhythmus mit den sich ändernden äußeren Beleuchtungsverhältnissen führen, was mit schweren Schlaf- und Befindlichkeitsstörungen einhergeht (sog. *free-running blindness*, zur Übersicht siehe Sack et al. 1992).

Wo aber genau ist nun diese innere Uhr anatomisch lokalisiert und wie ist sie aufgebaut?

## **1.2 Das photoneuroendokrine System (PNS) der Säuger**

Wie bei allen Tieren, bei denen ein übergeordneter Oszillator zirkadiane Schrittmacherfunktion für den gesamten Körper übernimmt, hat auch die innere Uhr des Säugers ein neuronales Korrelat, welches sich in dem paarig angelegten *Nucleus suprachiasmaticus* (SCN) des Hypothalamus befindet (Klein et al. 1991). Obwohl erste anatomische Beschreibungen des SCN bis in das frühe letzte Jahrhundert zurückreichen (Gurdjian 1927, Krieg 1932), konnte seine funktionelle Bedeutung als neuronales Korrelat der inneren Uhr durch zahlreiche Lesions- und Transplantationsversuche erst ein halbes Jahrhundert später verstanden werden (Moore & Eichler 1972, Stephan & Zucker 1972, Raisman & Brown-Grant 1977, Ibuka et al. 1977, van den Pol & Powley 1979, Meijer & Rietvelt 1989, Drucker-Colin et al. 1984, Lehman et al. 1987, Sawaki et al. 1984). Die Synchronisation dieses *master circadian pacemaker* (Weaver 1998) durch Lichtreize erfolgt durch seine Ankopplung an das Auge über den so genannten retinohypothalamischen Trakt (RHT; Moore & Lenn 1972, Moore et al. 1995). Der SCN nutzt zur Weitervermittlung seiner rhythmischen Aktivität an den Körper unter anderem die rhythmische Freisetzung des Neurohormons Melatonin aus der Zirbeldrüse (*Corpus pineale*, Epiphyse, Pinealorgan). Diese drei Komponenten des zirkadianen Systems, der Synchronisator (Auge und RHT), der endogene Oszillator (SCN) und der Effektor (Zirbeldrüse und Melatonin), werden zum photoneuroendokrinen System (PNS) zusammengefasst (Abb. 1.1; zur Übersicht siehe Korf 1994). Interessanterweise sind die Bausteine die-

ses Systems trotz ihrer unterschiedlichen Lokalisation im Gehirn allesamt Derivate des *Diencephalon* (Zwischenhirn).



**Abb. 1.1:** Das photoneuroendokrine System des Säugers. Signale der aktuellen Photoperiode erreichen die Retina (RET) und werden über ein gesondertes Faserbündel innerhalb des Sehnervens, den Retinohypothalamischen Trakt (RHT, blau) an den hypothalamischen *Nucleus suprachiasmaticus* (SCN, gelb) weitergeleitet. Seine Efferenzen projizieren u. a. zum *Nucleus paraventricularis* (NPV), von wo aus über das zentrale Grau die *Columna intermediolateralis* (CIM) des vegetativen Nervensystems erreicht wird. Nach Umschaltung auf postganglionäre Fasern im *Ganglion cervicale superius* (GCS), innervieren diese (grün) als Teil des Kopf-sympathikus das Pinealorgan (PIN). Jeden Tag wird aus ihren Endigungen zu Beginn der Dunkelheit Noradrenalin (NA) freigesetzt, welches die rhythmische Synthese von Melatonin (MEL) bewirkt. Über das Melatonin erfährt der SCN eine Rückkopplung seiner eigenen Aktivität (unterbrochene Linie). (Modifiziert nach Korf 1994).

### 1.2.1 Auge und retinohypothalamischer Trakt

Die retinofugalen Nervenfasern des RHT zweigen bereits vor dem *Corpus geniculatum laterale* vom *Tractus opticus* ab (extragenikuläre Bahnen) und erreichen innerhalb des rostralen Hypothalamus überwiegend den ventrolateralen Teil des SCN (retinorezipiente Zone des SCN). Über diesen Weg wird die innere Uhr an die Photoperiode angeglichen (*photoentrainment*, Roenneberg & Foster 1997). Eine Zerstörung dieser Bahn führt zur sog. zirkadianen Blindheit (Johnson et al. 1988). Eine bestimmte Gruppe retinaler Ganglienzellen projiziert mit ihren axonalen Fortsätzen über den RHT zu den Zellen des SCN und scheint mit dem Melanopsin ihr eigenes Photopigment zu besitzen (Hattar et al. 2002, Provencio et al. 1998, 2000). Diese Neurone werden somit einmal durch die herkömmlichen Efferenzen der Photorezeptoren über die äußere Körnerschicht depolarisiert, aber werden auch durch ihre

eigenen photorezeptiven Eigenschaften<sup>1</sup> in ihrer Aktivität beeinflusst. (zur Übersicht: Berson 2003, Rollag et al. 2003).

### *1.2.2. Der suprachiasmatische Kern (SCN) im Verbund des PNS*

An der Spitze des streng hierarchisch organisierten zirkadianen Systems des Säugers steht der SCN. Das paarig angelegte Kerngebiet liegt am Boden des 3. Ventrikels, unmittelbar oberhalb des *Chiasma opticum* (anteriore präoptische Zone, innerhalb der periventrikulären Längszone des Hypothalamus). Die elektrische, metabolische und genexpressive Aktivität des SCN weißt bei allen bis jetzt untersuchten Spezies eine hohe Aktivität während des Tages und eine niedrige Aktivität während der Nacht auf (Weaver 1998). Er besteht bei Nagern aus ca. 10.000 dicht gepackten Neuronen, die sich in ein ventrolaterales und ein dorsomediales Gebiet gliedern (van den Pol 1980). Die Neurone des SCN sind durch zahlreiche synaptische Kontakte miteinander verbunden (Güldner & Wolff 1996). Darüber hinaus deuten elektrophysiologische und Tracer-Studien darauf hin, dass auch interneuronale Kontakte über *gap junctions* existieren (Jiang et al. 1997).

Neben dem RHT empfängt der SCN weitere Signale über neuronale Afferenzen, die u.a. aus dem serotonergen System stammen und womöglich ebenfalls in das *entrainment* der Uhr involviert sind. Sie sollen Phasenverschiebungen durch andere Zeitgeber als Licht wie z.B. Weckreize oder körperliche Aktivität vermitteln (zur Übersicht Hastings et al. 1997, van Esseveldt et al. 2000). Ein wichtiges Ausgangssignal des SCN scheint AVP zu sein, was sich in einer zirkadianen Freisetzung dieses Transmitters in benachbarte Kerne und in den Liquor zeigt (Jolkkonen et al. 1988, Kalsbeek et al. 1995, Kruisbrink et al. 1987, Reppert et al. 1981a, Schwartz et al. 1983, Schwartz & Reppert 1985, Seckl & Lightman 1987). Efferenzen erreichen vornehmlich thalamische und hypothalamische Kerngebiete (Hoorneman & Buijs 1982, Watts 1991, Watts et al. 1987), wodurch zahlreiche physiologische Prozesse eine zirkadiane Komponente erhalten (Buijs et al. 1998). Für das PNS spielt die Verbindung zum *Nucleus paraventricularis* (NPV) des Hypothalamus eine ent-

---

<sup>1</sup>Allerdings bedarf die Anregung des Melanopsins deutlich höhere Lichtintensitäten, als dies für Zapfen und Stäbchen nötig ist. Wie Experimente mit *knockout*-Mäusen gezeigt haben, kann beim Ausfall eines der beiden Systeme das jeweils andere das *photoentrainment* übernehmen (Lucas et al. 2003, Panda et al. 2003, Semo et al. 2003), wodurch auch erklärbar wird, wieso bei manchen blinden Menschen die Fähigkeit zur Synchronisation erhalten bleibt, obwohl sie visuelle Reize nicht bewusst wahrnehmen können (Czeisler et al. 1995, Thapan et al. 2001).

scheidende Rolle. Über ihn und eine polysynaptische Neuronenkette erhält der SCN Anschluss an das Pinealorgan (Abb. 1.1).

Die Phasenverschiebung der rhythmischen Aktivität des SCN durch Lichtreize wird v. a. über die Ausschüttung der exzitatorischen Aminosäure Glutamat vermittelt (Liou et al. 1986). Das Neuropeptid PACAP (*Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide*) wird ebenfalls aus den Neuronen des RHT ausgeschüttet und soll vorgeben, ob der Lichtreiz Phasenbeschleunigend oder –verzögernd auf den SCN wirkt (zur Übersicht siehe: Hannibal 2002). Weitere Transmittersubstanzen, wie L-Aspartat oder N-Azetyl-Aspartylglutamat, scheinen nach heutigem Kenntnisstand keine überzeugende Rolle bei der Signalübertragung im RHT zu spielen (Hannibal 2002).

### 1.2.3. Pinealorgan

Das Pinealorgan mit seinem Neurohormon Melatonin übernimmt innerhalb des PNS des Säugers die Funktion eines neuroendokrinen Effektorsystems. Phylogenetisch betrachtet war das Pinealorgan ursprünglich selbst lichtempfindlich und vereinigte die drei Funktionen des PNS (Synchronisator, Oszillator und Effektor) in jedem einzelnen Pinealozyten. Diese Fähigkeiten sind bei anderen Vertebraten wie den Anamnioten und Sauropsiden noch vorzufinden (Oksche 1983, Oksche et al. 1987). Die Epiphyse des Säugers hingegen ist weder lichtempfindlich, noch vermag sie, eigene Rhythmen zu generieren (Foster et al. 1989, Kramm et al. 1993, Vollrath 1981). Allerdings konnte Abe et al. (2002) in Ratten, die stabil mit einem Konstrukt transfiziert wurden, bei dem der Promotor des Uhrgens *Period1* mit dem Reporter gen *Luciferase* gekoppelt wurde (*Per-luc*-Ratten) zeigen, dass im explantierten Pinealorgan vorübergehend eine rhythmische *Per1-luc*-Aktivität aufrechterhalten wird. Die Rhythmusgeneration im Pinealorgan wird bei Säugetieren vielmehr durch ihre Verbindung zum SCN übernommen: Der über die Retina mit der Photoperiode synchronisierte SCN projiziert über den NPV in die CIM, deren Fasern wiederum im GCS auf postganglionäre Neurone umgeschaltet werden, und so über den Kopfsympathikus das Pinealorgan erreichen (zur Übersicht siehe Korf 1996). Die Aktivierung dieser Neuronenkette ist für die nächtliche Zunahme der Melatoninproduktion verantwortlich: Noradrenalin (NA) wird während der Dunkelperiode aus den sympathischen Axonterminalen in den perivaskulären Raum freigesetzt, von wo es an  $\alpha_1$ - und  $\beta_1$ -adrenerge

Rezeptoren der Pinealozytenmembran bindet (Drijfhout 1996, Klein 1985). Stimulation dieser Rezeptoren führt zu einer Aktivierung der cAMP (zyklisches Adenosinmonophosphat) -Signaltransduktionskaskade (siehe auch 1.3.4), wodurch die Transkription, Translation und Aktivität des Schlüsselenzyms der Melatoninbiosynthese<sup>2</sup>, der Arylalkamin (Serotonin) *N*-Azetyltransferase (AANAT) massiv gesteigert werden (Klein et al. 1996, Roseboom et al. 1996). Das stark lipophile Melatonin wird – ohne Speicherung in Vesikeln - zeitnah nach dem adrenergen Stimulus in den perivaskulären Raum abgegeben und gelangt passiv in die Zirkulation (Illnerová et al. 1978, 1979). Hier dient es dem gesamten Organismus als Signal für nächtliche Dunkelheit. Bemerkenswerterweise führt Dunkelheit während des subjektiven Tages nicht zur gesteigerten Aktivität der AANAT.

Lesionsuntersuchungen konnten zeigen, dass der SCN die adrenerge Stimulation des Pinealorgans und somit die Melatoninsynthese generiert (Moore & Klein 1974, Klein & Moore 1979, Reppert et al. 1981). Melatonin bindet an hochselektive MT1 (Mel<sub>1a</sub>)- und MT2 (Mel<sub>1b</sub>)- Melatoninrezeptoren, die speziessabhängig im Gehirn, dort v. a. am SCN und der hypophysären *Pars tuberalis* (PT) lokalisiert sind (zur Übersicht siehe: Morgan et al. 1994, Weaver 1999, Weaver et al. 1991).

### **1.3. Der suprachiasmatische Kern: Funktionsweise der inneren Uhr**

#### *1.3.1 Jedes einzelne Neuron des SCN ist ein Oszillator*

Wie Untersuchungen an dissoziierten Zellen gezeigt haben, scheint im SCN jedes einzelne Neuron einen Oszillator darzustellen, der seinen eigenen zirkadianen Rhythmus generiert; dies zeigt sich sowohl in der rhythmischen Entladungsfrequenz, als auch in der Sekretion von Neuropeptiden, wie dem AVP (Murakami et al. 1991, Welsh et al. 1995). Nach der heute gültigen Vorstellung bilden die SCN-Neurone einen Verbund aus einzelnen Oszillatoren, die sich gegenseitig über bis jetzt noch nicht eindeutig geklärte Mechanismen synchronisieren, wodurch ein einheitlicher Rhythmus zustande kommt (sog. Multioszillatorennetzwerk; Liu et al. 1997, Liu & Reppert 2000). Die Tatsache, dass einzelne SCN-Neurone unabhängig voneinander eine zirkadiane elektrische Aktivität zeigen (Welsh et al. 1995), deren Blockade allerdings nicht ihre Phasenlage beeinflusst (Earnest et al. 1991, Schwartz et al. 1987) und

---

<sup>2</sup> Die Steuerung der AANAT-Aktivität ist speziesspezifisch unterschiedlich: Während bei Nagern die Regulation v. a. auf translationaler Ebene liegt, wird bei Huftieren und wahrscheinlich auch beim Menschen die rhythmische Melatonin-

immortalisierte SCN-Neurone in Kultur eine dem SCN *in vivo* analoge metabolische Aktivität vorweisen (Earnest et al. 1999), lässt vermuten, dass zirkadiane Rhythmik einen molekularen Ursprung auf Zellebene hat.

### 1.3.2 Uhrengene, die molekulare Grundlage aller biologischer Uhren

Lange Zeit war die Erforschung zirkadianer Rhythmen rein phänomenologischer Natur und mehrere Modelle über die Funktionsweise des zellulären Oszillators blieben theoretische Spekulationen. Erst mit der genetischen Untersuchung zirkadianer Mutanten, der Identifizierung des *frequency* Gens (*frq*) in dem Pilz *Neurospora* sowie der Klonierung des Genes *per* und *tim* in der Fruchtfliege *Drosophila* konnte gezeigt werden, dass transkriptionale/translationale Rückkopplungsschleifen bestimmter Gene und ihrer Produkte das molekulare Uhrwerk bilden und ein speziesübergreifendes Prinzip zirkadianer Oszillatoren darstellen (zur Übersicht siehe Dunlap 1999).

Die Entdeckungen in *Drosophila* und *Neurospora* haben viele Forscher nun bewegt, auch in Säugetieren nach Homologen dieser so genannte Uhrengene (*clock genes*) zu suchen (Sangoram et al. 1998, Sun et al. 1997, Tei et al. 1997, Vitaterna et al. 1994, Zylka et al. 1998). Auf diese Weise konnte eine Reihe von homologen Uhrengenen in der Maus kloniert werden und ein vergleichbarer Uhren-Mechanismus nachweisen werden (Tab. 1.1), auch wenn sich mittlerweile herausstellte, dass die molekulare Säugeruhr komplexer aufgebaut ist als die von *Neurospora*, *Drosophila* oder Cyanobakterien (Dunlap 1999, Reppert & Weaver 2001, Young & Kay 2001). Die heute gültige Vorstellung über die Funktionsweise der inneren Uhr von Säugetieren auf molekularer Ebene ist in Abb. 1.2 dargestellt.

---

synthese über den proteasomalen Abbau der AANAT gesteuert (zur Übersicht siehe Ganguly et al. 2002, Stehle et al. 2001).

<b>Drosophila-Homologe<sup>δ</sup></b>	<b>Säuger</b>	<b>Protein-Familie</b>	<b>Funktion im zirkadianen Oszillator</b>	<b>Phänotyp bei Mutation</b>
<i>period</i>	<i>Period1 (Per1)</i>	PER-PAS	Bildet mit CRY und CK1 $\epsilon$ einen Komplex, der CLOCK-BMAL-vermittelte Expression unterbindet. Im SCN lichtinduzierbar.	Kurze Periode, dann arrhythmisch <sup>a</sup>
	<i>Period2 (Per2)</i>		Wie PER1. Aktiviert möglicherweise zusätzlich die Expression von <i>Bmal1</i> . Lichtinduzierbar.	Kurze Periode, dann arrhythmisch <sup>b</sup>
	<i>Period3 (Per3)</i>		Keine kritische Bedeutung in Rhythmusgeneration; möglicherweise Ausgangssignal. Nicht lichtinduzierbar.	Kurze Periode
<i>cryptochrom</i>	<i>Chryptochrome1 (Cry1)</i>	Flavoproteine	Negatives Element; hemmt jeweils zusammen mit PER CLOCK-BMAL1-vermittelte Transkription.	Kurze Periode
	<i>Chryptochrome2 (Cry2)</i>			Lange Periode <sup>c</sup>
<i>clock</i>	<i>Clock</i>	bHLH-PAS	Positives Element; erhöhen zusammen als CLOCK-BMAL1- Heterodimer die Transkription von <i>Per1-3</i> , <i>Cry1-2</i> , <i>Rev-Erba</i>	Lange Periode, dann arrhythmisch
<i>cycle</i>	<i>Bmal1 (MOP3)</i>			Arrhythmisch
	<i>Bmal2 (MOP9)</i>		Bedeutung für den Uhrenmechanismus noch ungeklärt.	
<i>doubletime</i>	<i>casein kinase 1<math>\epsilon</math> (CK1<math>\epsilon</math>)</i>	Caseinkinase	Bildet mit <i>Cry</i> und <i>Per</i> einen Komplex; phosphoryliert mehrere Uhrengene ( <i>Per</i> , <i>Cry</i> , <i>Bmal1</i> ).	Kurze Periode
	<i>casein kinase 1<math>\delta</math> (CK1<math>\delta</math>)</i>		Wahrscheinlich ähnliche Funktion wie CK1 $\epsilon$ .	
	<i>Rev-Erba</i>	Orphan nuclear receptor	Negatives Element; hemmt <i>Bmal1</i> -Expression, aber auch die von <i>E4BP4</i> .	Kurze Periode
<i>timeout</i>	<i>Timeless</i>		Interaktion mit <i>Per</i> , wahrscheinlich aber keine Rolle im zirkadianen Oszillator.	[Nullmutation führt zu embryonalem Tod]

$\delta$ : Ein weiteres Uhrengene von *Drosophila* ist *timeless*, für das in der Maus bisher kein Homologes gefunden wurde. Das früher dafür gehaltene *mTimeless* ist Homologes von *timeout*. a: *Per1* oder *Per1+Per3*. b: *Per2* oder *Per2+Per3*; Anm.: *Per1+Per2*: arrhythmisch. c: *Cry1+Cry2*: arrhythmisch.

**Tabelle 1.1:** Übersicht über die molekularen Komponenten des zirkadianen Oszillators der Maus und deren Homologe in *Drosophila*. (Modifiziert und ergänzt nach Reppert & Weaver 2001 und 2002).



### 1.3.2.1 Mit CLOCK-BMAL1 fängt der Tag an

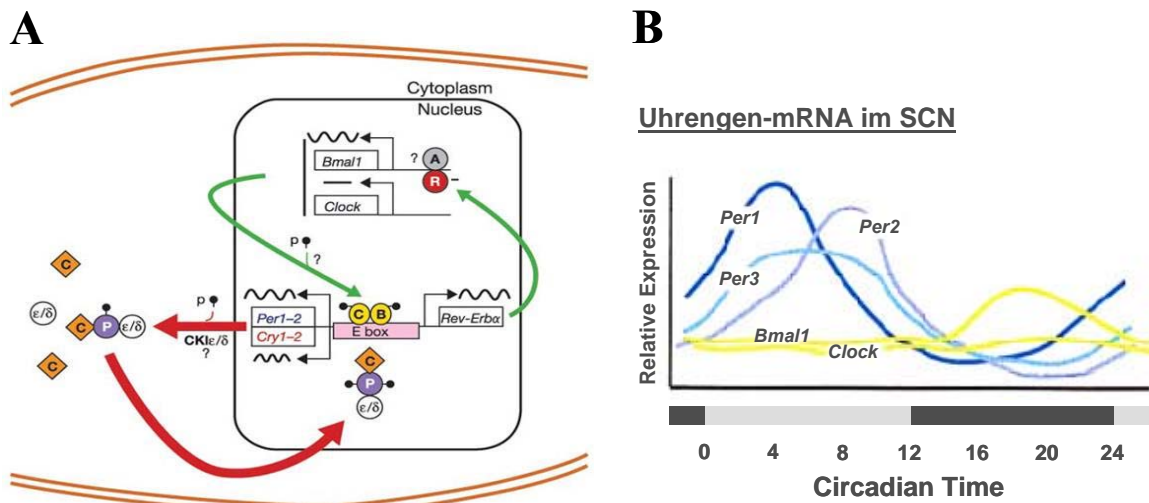
Der zirkadiane Tag beginnt (CT 0, früher subjektiver Tag), wenn Heterodimere zweier *basic helix-loop-helix* (bHLH)-PAS-Motive<sup>3</sup> enthaltenden Transkriptionsfaktoren, CLOCK und BMAL1, an E-box-Elemente im Promotor von *Period*-, *Cry*-, und *Rev-Erba*-Genen binden und so deren Transkriptionsrate erhöhen. CLOCK-BMAL1-Heterodimere bilden die aktivierenden Elemente des Uhrwerks und sind für sein Funktionieren unabdingbar (King et al. 1997, Gekakis et al. 1998, Hogenesch et al. 2000, Bunger et al. 2000). CLOCK-BMAL1 ist hochselektiv für E-box-Elemente mit der Nucleotidsequenz CACGTG (Gekakis et al. 1998, Hogenesch et al. 2000). Bei dieser Aktivierung scheint die Assoziation von CLOCK mit der *histone acetyltransferase p300* und Acetylierung des H3 Histon in der Promotorregion eine Rolle zu spielen (Etchegaray et al. 2003). Die Expression von *Bmal1*-mRNA im SCN ist rhythmisch, mit Spitzenwerten, die im Vergleich zu *Per* und *Cry* um 12 h zeitversetzt sind<sup>4</sup> (Abb. 1.2; Oishi et al. 2000, Shearman et al. 2000b). *Clock* hingegen zeigt weder zirkadiane Schwankungen der mRNA noch des Proteins (Shearman et al. 1999, Shearman et al. 2000b, Tei et al. 1997).

Für die Transkriptions-aktivierende Fähigkeit von CLOCK-BMAL1 spielt wahrscheinlich auch der Phosphorylierungsgrad des Komplexes eine Rolle (Lee et al. 2001), erstaunlicherweise ist nämlich die CLOCK-BMAL1-abhängige Transkriptionsrate am höchsten, wenn der Gehalt von CLOCK und BMAL1 im Kern am niedrigsten ist (Eide et al. 2002, Sanada et al. 2002). Die Caseinkinase CK1 $\epsilon$  und die Mitogen-aktivierte Kinase (MAPK) sollen hierbei involviert sein (Eide et al. 2002, Sanada et al. 2002).

---

<sup>3</sup> PAS ist das Akronym für die ersten drei gefundenen Proteine, die die gleiche wichtige Protein-Dimerisierungs-Domäne dieser Art besitzen: *Drosophila* PER, der humane *aryl hydrocarbon nuclear receptor* (ARNT) und das *Drosophila single-minded* Protein (SIM)

<sup>4</sup> Für das zirkadiane Auftreten von BMAL1 Protein liegen widersprüchliche Ergebnisse vor. In der Ratte soll BMAL1 im SCN rhythmisch schwanken, wohingegen es im SCN der Maus konstitutiv exprimiert sein soll (von Gall et al. 2003, Tamaru et al. 2000).



**Abb. 1.2:** **A:** Modell des zirkadianen Uhrwerkes der Säuger. Der Oszillator besteht aus positiven (grün) und negativen (rot) Rückkopplungsschleifen. CLOCK (C, Kreis) und BMAL1 (B, Kreis) bilden Heterodimere und aktivieren die Transkription von *Per1-3*, *Cry1-2* und *Rev-Erba*, indem sie an E-Box-Elemente in deren Promotor binden. Wenn PER (P, Kreis) im Cytosol ansteigt, bildet es mit CRY (C, Raute) und CK1 $\epsilon/\delta$  ( $\epsilon/\delta$ , Kreis) eine heterotrimeren Komplex, der phosphoryliert wird (p). Im Kern lagert sich der Komplex aus CRY-PER-CK1 $\epsilon/\delta$  an das Heterodimer CLOCK-BMAL1, dessen Aktivität dadurch unterdrückt wird, obwohl es weiterhin an DNA gebunden ist (negative Schleife). Die positive Schleife wird gebildet, indem REV-ERBA über *Rev-Erb/ROR response*-Elemente im Promotor von *Bmal1* dessen Transkription unterdrückt. Durch die CRY-/PER-vermittelte Hemmung der Transkription von *Rev-Erba* wird die Expression von *Bmal1* enthemmt. Ein Aktivator (A, Kreis), z.B. das kürzlich gefundene RORa soll die Transkription von *Bmal1* aktivieren (u.U. ist hierin auch PER2 involviert). Möglicherweise spielen auch andere Kinasen als CK1 $\epsilon/\delta$  in der Phosphorylierung von Uhrengen-Proteinen eine Rolle. Eine ähnliche Funktion wie CRY und PER wird DEC1/2 zugesprochen, das ebenfalls CLOCK-BMAL1-abhängig transkribiert wird und wiederum seine eigene Transkription hemmt (modifiziert und ergänzt nach Reppert & Weaver 2002). **B:** Schematischer Zeitverlauf der mRNA wichtiger Uhrengene im SCN. Dargestellt ist die relative Expression von *Per1*, *Per2*, *Per3*, *Bmal1* und *Clock*. Beachte, dass *Per* während des subjektiven Tages seinen Spitzenwert erreicht, während der von *Bmal1* um etwa 12 h zeitversetzt auftritt. Graue Balken symbolisieren den subjektiven Tag, schwarze Balken die subjektive Nacht (modifiziert nach Dunlap 1999).

### 1.3.2.2 Grünes Licht für Blaulichtrezeptoren bedeutet rotes Licht für CLOCK-BMAL1

Unter dem Einfluss von CLOCK-BMAL1 wird die zirkadiane Expression insbesondere von *Period* und *Cryptochromen*<sup>5</sup> aktiviert, was zu einem Anstieg entsprechender mRNA um CT

<sup>5</sup> Cryptochrome sind Flavoproteine, die interessanterweise in *Drosophila* und Pflanzen direkt Lichtempfindlich für blaues Licht ( $\lambda$  400-500 nm) sind und dort eine Rolle bei der Synchronisation der inneren Uhr spielen (Cashmore et al. 1999).

4-6 (*Per1*), CT 4-8 (*Per3*), CT 8 (*Per2*) und CT 10 (*Cry1*) führt (vergleiche Abb. 1.2B). Zeitversetzt kommt es dann zu einer Zunahme des Proteingehalts. Im Zytosol lagern sich PER über zwei verschiedene Bindungsstellen mit CRY und CK1 $\epsilon$  zu einem heterotrimeren Komplex zusammen. Für das Voranschreiten der inneren Uhr ist nun die Serin/Threonin-Kinaseaktivität von CK1 $\epsilon$  entscheidend, da sie über eine Phosphorylierung von PER eine Translokation des Komplexes in den Kern bewirkt (Lee et al. 2004, Takano et al. 2004). Im Kern lagert sich nun der CRY-PER-CK1 $\epsilon$ -Komplex an bereits DNA-gebundenes CLOCK-BMAL1 und unterbindet so deren Aktivität. Chromatinimmunpräzipitationen konnten interessanterweise zeigen, dass CLOCK-BMAL1 während des gesamten zirkadianen Zyklus an *Per1* gebunden ist und die rhythmische Transkriptionsaktivität vom Auftreten des negativen Elements CRY-PER-CK1 $\epsilon$  abhängt (Lee et al. 2001). Auf diese Weise hemmen PER und CRY ihre eigene Transkription, aber auch die von *Rev-Erba*, das auch eine CLOCK-BMAL1-getriebene E-box in seinem Promotor besitzt.

Für das Zustandekommen zirkadianer Rhythmik sind funktionstüchtiges PER und CRY unabdingbar. Allerdings scheinen *Per1* und *Per2*, ebenso wie *Cry1* und *Cry2* sich gegenseitig kompensieren zu können und Mutanten, die einen Defekt nur eines Teils (*Per1* oder *Per2*, *Cry1* oder *Cry2*) haben, werden nicht arrhythmisch, wie es bei komplettem Verlust von *Per1+2*, bzw. *Cry1+2* der Fall ist (siehe Tabelle 1.1; Bae et al. 2001, Cermakian et al. 2001, van der Horst et al. 1999, Vitaterna et al. 1999, Zheng et al. 1999, 2001). *Per3* hingegen scheint keine kritische Rolle für das Aufrechterhalten von Oszillationen zuzukommen (u. a. vermutlich wegen seiner fehlenden Interaktion mit CK1 $\epsilon$ ; Lee et al. 2004). PER3 dient womöglich als Ausgangssignal der inneren Uhr (Bae et al. 2001, Shearman et al. 2000a).

Die Phosphorylierung von Uhrengen-Proteinen durch CK1 $\epsilon$  (und wahrscheinlich auch CK1 $\delta$ ) soll deren intra- oder extranukleäre Lokalisation, ihren proteasomalen Abbau über Ubiquitinierung sowie deren Transkriptions-aktivierende Fähigkeit stark beeinflussen. Eine detaillierte Vorstellung über diese postranskriptionalen Vorgänge hat man allerdings noch nicht (Akashi et al. 2002, Eide et al. 2002, Lee et al. 2001, Lee et al. 2004, Takano et al. 2004). Dennoch spricht man CK1 $\epsilon$  eine wichtige Rolle in der Feinabstimmung der inneren Uhr zu, da eine Störung der CK1 $\epsilon$ -abhängigen Phosphorylierung zu (unterschiedlichen) veränderten Phasenlängen führt. So ist z.B. eine *missense*-Mutation innerhalb der CK1 $\epsilon$ -Bindungsstelle im menschlichen *Per2*-Gen für das *familiar advanced sleep phase syndrome* (FASPS) verantwortlich, was zu einem hypophosphoryliertem PER2 führt und eine verkürzte Periode mit gestörten Schlaf-Wach-Verhalten zur Folge hat (Toh et al. 2001).

Darüber hinaus scheint die Assoziation mit CRY für die Stabilität von PER2 wichtig zu sein, das sonst ubiquitinyliert und proteasomal abgebaut wird. Für die PER1-Stabilität hingegen scheint die Verbindung mit CRY keine Bedeutung zu haben (Shearman et al. 2000b, Lee et al. 2001).

#### 1.3.2.3 REV-ERBa ist Bestandteil der positiven Schleife mit negativen Eigenschaften

Erst kürzlich konnte das Bindeglied zwischen der positiven (CLOCK-BMAL1) und der negativen Schleife (CRY-PER) gefunden werden, das die Expression von *Bmal1* rhythmisch steuert. REV-ERBa, ein *orphan nuclear receptor*, dessen eigene Transkription über eine CLOCK-BMAL1-getriebene E-Box rhythmisch aktiviert wird, bindet an Rev-Erb/ROR *response*-Elemente im Promotor von *Bmal1*, dessen Expression so, ebenfalls in einer rhythmischen Weise, gehemmt wird (Preitner et al. 2002, Ueda et al. 2002). In der Folge fällt der *Bmal1*-mRNA-Gehalt, während *Per*- und *Cry*-mRNA ansteigen. Die CRY-PER-vermittelte Hemmung der Genexpression über Interaktion mit CLOCK-BMAL1 beinhaltet auch eine Unterdrückung von *Rev-Erba*, wodurch *Bmal1* enthemmt wird (Preitner et al. 2002, Yu et al. 2002). Für die positive Transkriptionskontrolle von *Bmal1* wurde lange Zeit *Per2* verantwortlich gemacht (Shearman et al. 2000b). Nach jüngsten Untersuchungen ist hier allerdings das Uhrengen *Rora* involviert, das über REV-ERB/ROR-Elemente (RRE) im Promotor von *Bmal1* bindet und für dessen normale Expression notwendig ist (Sato et al. 2004b).

Nach dem heute gültigen Konzept vom Aufbau der inneren Uhr, wie es in Abb. 1.2 vorgestellt ist, bedingt die Kinetik verschiedener einzelner biochemisch-molekularer Rückkopplungsprozesse, mit deren ihnen eigenen zeitlichen Verzögerungen durch Transkription, Translation und Phosphorylierung (und womöglich noch weiterer bisher ungeklärter posttranslationalen Modifizierungen), in der Summe eine sich selbstunterhaltende zirkadiane Oszillation (Roenneberg & Merrow 2003).

Zusätzlich zu dem molekularen Mechanismus der inneren Uhr, wie er hier beschrieben wurde, regulieren auch die rhythmisch exprimierten Leucin-Zipper-Transkriptionsfaktoren DBP (*D-Box binding protein*) und E4BP4 antagonistisch über eine D-Box im Promotor von *Per1* dessen Expression (Mitsui et al. 2001, Yamaguchi et al. 2000). Sie spielen womöglich eine Rolle als Ausgangssignal der inneren Uhr (siehe unten).

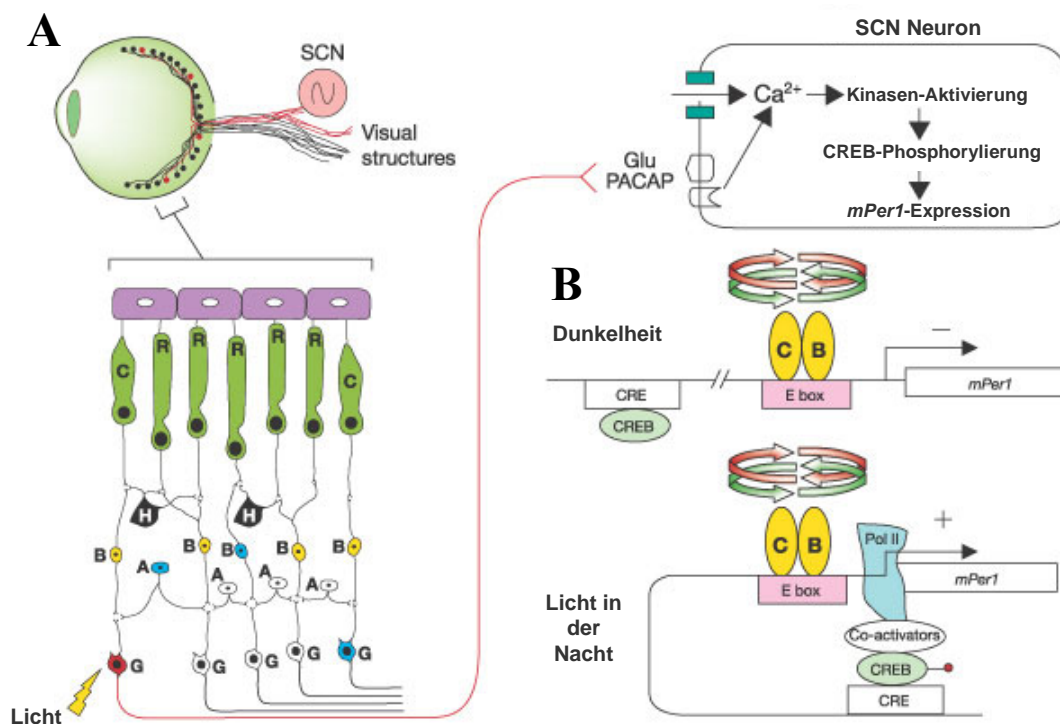
#### 1.3.2.4 Alles im Leben richtet sich nach der Uhr: Die innere Uhr steuert Lebensprozesse

Die innere Uhr ist nicht nur über neuronale Netzwerke (z.B. das autonome Nervensystem) oder humorale Signale (z.B. ACTH) in der Steuerung physiologischer Prozesse involviert. Ihre molekularen Komponenten regulieren auch unmittelbar die Expression von Genprodukten, die zirkadiane Funktionen außerhalb des Uhrwerkes übernehmen, so genannten *clock-controlled genes* (CCGs). Diese werden durch die innere Uhr z.B. über *cis*-Elemente in deren Promotor beeinflusst, wie z.B. E-Box, REV-ERB $\alpha$ /ROR-Elemente oder DBP-Bindungsstellen (Ueda et al. 2002). Zu den E-Box-gesteuerten CCGs gehören z.B. das Neuropeptid Arginin-Vasopressin (Jin et al. 1999), das Sekretionsprotein Prokineticin 2 (PK2; Cheng et al. 2002), der Serinprotease-Inhibitor Plasminogen-Aktivator-Inhibitor-1 (Maemura et al. 2000) und der Transkriptionsfaktor c-Myc (Fu et al. 2002). Eine Aufsehen erregende Entdeckung hat zudem kürzlich zeigen können, dass die innere Uhr E-Box-vermittelt über die Cdc2-Kinase *Weel* direkt die Zellteilung proliferierender Hepatozyten steuern kann (Matsuo et al. 2003).

#### 1.3.4 Synchronisation einzelner Oszillatoren

Im SCN werden als Antwort auf den Lichtreiz Glutamat und PACAP aus den Nervenendigungen des RHT freigesetzt. Diese bewirken in den Neuronen des SCN ein Chromatin-remodelling sowie die unmittelbare Induktion von *Per1* und *Per2*, nicht aber von *Per3* (Albrecht et al. 1997, Crosio et al. 2000, Shearman et al. 1997, Shigeyoshi et al. 1997). *Per1* und *Per2* werden daher auch zu der Gruppe der *immediate early genes* (IEG) gerechnet, von denen noch weitere Mitglieder Licht-induziert hochreguliert werden können (Morris et al. 1998). Travnickova-Bendova und Mitarbeiter konnten kürzlich zeigen, dass die Licht-abhängige Induktion von *Per1* durch ein cAMP-response Element (CRE) im Promotor von *Per1* vermittelt wird, welches durch Bindung an phosphoryliertes CREB-Protein (CRE-binding Protein) aktiviert wird (Travnickova-Bendova et al. 2002, Tischkau et al. 2003). Die nächtliche Lichtapplikation verursacht eine Phosphorylierung (Aktivierung) von CREB an Ser133 (Ginty et al. 1993) und an Ser142 (Gau et al. 2002). Für die Induktion von *Per1*, nicht aber von *Per2*, hat die Phosphorylierung an Ser142 eine entscheidende Bedeutung, v. a. für die Licht-induzierte Phasenbeschleunigung (Gau et al. 2002). *Per2* hingegen soll durch die cGMP-abhängige Proteinkinase II (PKGII) induziert werden und besonders für die Phasenverzögerung zuständig sein (Oster et al. 2003). Womöglich spielt die PKGII aber auch eine Rolle in *Per2*-bedingten Phasenbeschleunigung (Gillette & Mitchell 2002, Tischkau et al. 2003).

In die Licht-induzierte Phosphorylierung von CREB in SCN-Neuronen, die zur Phasenverschiebung und CRE-abhängigen Genexpression führt, ist besonders die Aktivierung (Phosphorylierung) der Mitogen-aktivierte Proteinkinase (MAPK = *extracellular regulated kinase 1/2* [ERK1/2]) eingeschaltet (Butcher et al. 2002, Coogan & Piggins 2003, Dziema et al. 2003, Obrietan et al. 1998). MAPK<sup>6</sup> selber wird hierbei wohl durch einen Ca<sup>2+</sup>/Calmodulin-Kinase (CaMKII)-abhängigen Mechanismus aktiviert, aber auch durch das (Licht-abhängig) aktivierte (phosphorylierte) transmembrane Glykoprotein BIT (*brain immunoglobulin-like molecule with tyrosine-based activation motifs*; Butcher et al.2002, Nakahata et al. 2000 et 2003, Nomura et al. 2003, Yokota et al. 2001). Abb. 1.3 gibt eine Übersicht zu den Vorgängen, die bei der Licht-induzierten Synchronisation der inneren Uhr ablaufen.



<sup>6</sup> Erstaunlich ist, dass die Licht-abhängige Phosphorylierung von MAPK sowie die Induktion von *Per* ausschließlich im retinorezipienten Teil des SCN stattfindet, der unter konstanter Dunkelheit weder Oszillationen an phosphorylierter MAPK noch von *Per* aufweist (Hamada et al. 2001). Diese Region des SCN exprimiert spezifisch das Calcium-bindende Protein Calbindin, welches in die Signalübertragung Licht-abhängiger Reize eingebunden ist (Hamada et al. 2003). Der Rhythmus der *Per*-Expression im ventrolateralen SCN gleicht sich unmittelbar an den der Photoperiode an, wohingegen die Phasenlage im dorsomedialen SCN (der im Gegensatz zum ventrolateralen SCN auch unter konstanten DD-Bedingungen endogene *Per1*-Oszillationen aufweist) nur allmählich adaptiert wird (Nagano et al. 2003, Hamada et al 2004).

**Abb. 1.3:** Synchronisation der inneren Uhr im SCN durch Licht. **A:** Melanopsin-positive Ganglienzellen (G, rot) in der Retina werden entweder direkt oder indirekt über amakrine (A) und Bipolar-Zellen (B) von Stäbchen und Zapfen durch Licht erregt. Ihre Axone bilden den retinohypothalamischen Trakt (RHT), der in den SCN projiziert. Die Freisetzung von Glutamat (Glu) und PACAP aus der präsynaptischen Membran bewirkt in SCN-Neuronen über eine Aktivierung von Proteinkinasen schließlich eine Phosphorylierung von CREB, welches die Expression von *Per1* induziert. **B:** In Dunkelheit wird die Expression von *Per1* von den positiven Elementen der inneren Uhr, CLOCK-BMAL1 (C, B) getrieben. Rote und grüne Pfeile symbolisieren die Rückkopplungsschleifen des molekularen Uhrwerks. Licht in der Nacht führt zur CLOCK-BMAL1-unabhängigen Transkriptionsaktivierung von *Per1* über pCREB-Interaktion an CRE-Elementen im Promotor von *Per1*. (Modifiziert nach Reppert & Weaver 2002).

Im Zusammenhang mit der phospho- (p)CREB-vermittelten Aktivierung von CRE-Strukturen spielen auch weitere Mitglieder der CREB-Familie eine Rolle, wie CREM (*cAMP response element modulator*), ATF-1 (*activation transcription factor-1*), sowie ICER (*inducible cAMP early repressor*). Im Pinealorgan ist das *Crem*-Gen interessanterweise tagsüber refraktär gegenüber einer cAMP-abhängigen Transkriptionsaktivierung (Stehle et al. 1993). Im besonderen Interesse für die Untersuchung zirkadianer Genexpression steht daher ICER<sup>7</sup>, das, unabhängig von einer vorausgehender Proteinsynthese, über einen ebenfalls CRE-Strukturen enthaltenden Promotor innerhalb einer Intronsequenz des *Crem*-Genes (P<sub>2</sub>) gesteuert wird (Molina et al. 1993). Es gehört zur Gruppe der IEG-Transkriptionsfaktoren und hemmt effektiv CRE-vermittelte Transkription, also auch seine eigene. Zusammen mit CREB ist es im Pinealorgan von Nagern direkt in die zirkadiane Kontrolle der Aktivität der AANAT, dem geschwindigkeitsbestimmenden Enzym der Melatoninbiosynthese, involviert (zur Übersicht siehe Stehle et al. 2001 et 2003). Darüber hinaus scheint ICER generell eine Rolle bei adaptiven Vorgängen im zirkadianen System zu spielen (Johnston et al. 2003, Messenger et al. 1999 et 2000).

<sup>7</sup> Durch alternatives Spleißen entstehen die vier ICER-Isoformen ICER I, ICER I<sub>γ</sub>, ICER II und ICER II<sub>γ</sub>, die entweder die DNA-Bindungsdomäne (DBD) I (ICER I, ICER I<sub>γ</sub>) oder die DBD II (ICER II, ICER II<sub>γ</sub>) enthalten, und entweder das Exon  $\gamma$  besitzen (ICER I, ICER II) oder nicht (ICER I<sub>γ</sub>, ICER II<sub>γ</sub>, [Molina et al. 1993]).

## 1.4 Uhrengene in der Peripherie: Fast überall tickt eine Uhr

### 1.4.1 In peripheren Organen geben Tochter-Oszillatoren Stoffwechselprozessen eine zirkadiane Komponente

Mit der Klonierung im SCN rhythmisch exprimierter Gene (v. a. von *Per*) wurden im Laufe der letzten Jahre eine Vielzahl von Organen identifiziert, die ebenfalls eine oszillierende Uhrengenenexpression zeigen, wie z.B. Leber, Leukozyten und Skelettmuskulatur (McNamara et al. 2001, Nonaka et al. 2001, Oishi et al. 1998b, Zylka et al. 1998). Diese Gene werden (u. a.) direkt vom zentralen Uhrenmechanismus reguliert, wodurch Stoffwechselfvorgänge eine zirkadiane Komponente erhalten (*clock controlled genes*, siehe 1.3.2.4). Ein bekanntes Beispiel ist der bereits erwähnte Transkriptionsfaktor DBP, dessen Transkription über eine E-Box rhythmisch reguliert wird. In der Leber steuert er direkt die Expression von Cytochromen, die in den Metabolismus von Cholesterolem, Aminosäuren, Arzneimitteln und Androgenen involviert sind (Lavery et al. 1999).

Diese peripheren Rhythmen scheinen vom SCN vorgegeben zu sein, da die Phasenlage peripher oszillierender Uhrengene zeitlich 3-6 h im Vergleich zum SCN verspätet sind und die Aufrechterhaltung dieser Rhythmen an einen intakten SCN gebunden ist (Sakamoto et al. 1998). Tatsächlich machten Yamazaki und Mitarbeiter (2000) die Beobachtungen, dass Rhythmen peripherer Organe *in vitro* nach 2-7 Zyklen abflachen, bis sie nicht mehr nachweisbar sind, isolierte SCN-Zellen in Kultur aber für mehr als einen Monat oszillieren. Lange Zeit war allerdings unklar, ob der SCN in peripheren Zellen einen sonst nicht vorhandenen Rhythmus induziert oder aber unabhängig voneinander schwingende Zellen oder Zellverbände synchronisiert und an seinen Rhythmus adaptiert (Balsalobre et al. 1998), bzw. ob ein prinzipieller Unterschied im Aufbau der Uhr im SCN und im peripheren Gewebe existiert. Periphere Oszillatoren zeigen, ob Gewebe oder kultivierte Zelllinien, dasselbe zeitliche Zusammenspiel von Uhrengenen, wie es vom SCN bekannt ist (Balsalobre et al. 1998), insbesondere den antiphasischen Verlauf von *Per* und *Bmal1* mRNA (Oishi et al. 1998a, Yagita et al. 2001). Darüber hinaus sind Rhythmusveränderungen der Uhrengenenexpression in *Cry*-defizienten embryonalen Mausfibroblasten vergleichbar mit den SCN-Rhythmen von Mäusen, die denselben Gendefekt tragen, was ebenfalls den gleichartigen Aufbau peripherer und zentraler Uhren impliziert (Yagita et al. 2001). Andererseits haben Untersuchungen an *Clock*-Mutanten Mäusen Hinweise auf eine



unterschiedliche Regulation von *Bmal1* im SCN und der Peripherie erbracht (Oishi et al. 2000). Auch können Transplantate immortalisierter SCN-Neurone, nicht aber (nach Serumschock) peripher oszillierende NIH/3T3-Zellen die zirkadiane Funktion in SCN-abladierten Mäusen wiederherstellen (Allen et al. 2001, Earnest et al. 1999). Reporter-Gen-Versuche haben nun dennoch zeigen können, dass einzelne Fibroblasten, wie die Neurone des SCN, einen anhaltenden (wenn auch voneinander unabhängigen) Rhythmus aufweisen, der sogar nach Zellteilung von Tochterzellen fortgeführt wird (Nagoshi et al. 2004).

Zusammenfassend nimmt man daher heute an, dass die peripheren Oszillatoren zumindest in weiten Bereichen dem SCN gleichen, v. a. aber, dass periphere Zellen selbst unterhaltende und von einander unabhängige Rhythmen produzieren können, die *in vivo* an den durch den SCN vorgegebenen Rhythmus synchronisiert werden (Nagoshi et al. 2004, Yagita et al. 2001).

#### 1.4.2 Uhrengene in Zellkultursystemen

Einen erstaunlichen Befund machte 1998 Balsalobre und Mitarbeiter, als sie zeigen konnten, dass nicht nur kultivierte Organe, sondern sogar immortalisierte Zelllinien, wie Rat-1 Fibroblasten, die schon über 30 Jahre *in vitro* kultiviert werden, durch geeignete Stimulationsverfahren, wie Aktivierung der cAMP-Signaltransduktion oder einem Serumschock (siehe hierzu 1.4.3.3), zirkadiane Rhythmen produzieren können (Balsalobre et al. 1998, Yagita & Okamura 2000, Yagita et al. 2001). Auch in anderen Zellsystemen, wie in immortalisierten GnRH-Neuronen (Chappell et al. 2003) und in H35 Hepatoma-Zellen (Balsalobre et al. 1998) kann eine rhythmische Expression von Uhrengenen stimuliert werden, die mindestens 3 zirkadiane Zyklen umfasst. Die Expressionsprofile der untersuchten Uhrengene gleichen hierbei denen von Gewebekulturen und dem SCN. Weiterhin konnte Balsalobre zeigen, dass *Per1* und *Per2*, die im SCN als Licht-induzierbar erkannt wurden, und somit eine wichtige Rolle bei der Synchronisation des SCN spielen (Albrecht et al. 1997 et 2001, Shearman et al. 1997, Shigeyoshi et al. 1997), auch durch einen Serumschock in Fibroblasten und Hepatoma-Zellen, vergleichbar der Situation im SCN, induziert werden können (Balsalobre et al. 1998).

### *1.4.3 Verstellung peripherer Uhren in vivo und in vitro*

#### *1.4.3.1 Der SCN synchronisiert die Peripherie*

*In vivo* ist ein intakter SCN für die Synchronisation peripherer Organe notwendig (Hara et al. 2001, Pando et al. 2002, Sakamoto et al. 1998, Yamazaki et al. 2000). Diese Synchronisation erfolgt einerseits über seine neuronale Verbindung zum autonomen Nervensystem (Akijama et al. 1999, Bartness et al. 2001, Kalsbeek & Buijs 2002). Andererseits haben mehrere Untersuchungen die These erhärtet, dass der SCN zumindest eine diffundierende Substanz produziert, die periphere Gewebe synchronisieren kann (Allen et al. 2001, Silver et al. 1996, Toussein & Meissl 2004). Allerdings kann der SCN auf Grund zu geringer Zellzahl wahrscheinlich keine ausreichend hohe Serumkonzentration dieses humoralen Faktors erreichen (Schibler et al. 2003) und wirkt daher vorerst lokal auf benachbarte Strukturen, die dann Hormone in ausreichender Menge produzieren können (analog eines Releasing-Faktors im Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Prinzip). Eine mögliche Zielstruktur könnten z.B. CRH-produzierende Zellen im Hypothalamus sein, die dann letztlich für die rhythmische Produktion von Glukokortikoiden verantwortlich sind, die ihrerseits wiederum in der Lage sind, periphere Zellen zu synchronisieren (Balsalobre et al. 2000a). Zwei weitere diffusible Faktoren, die Zeitgeber-Funktion haben, sind der transformierende Wachstumsfaktor (TGF $\alpha$ ; Kramer et al. 2001) und das bereits erwähnte Prokineticin 2 (PK2; Cheng et al. 2002). Beide hemmen die nächtliche lokomotorische Aktivität, wenn sie intraventrikulär appliziert werden und werden beide unter physiologischen Bedingungen rhythmisch von Gliazellen des SCN (parakrin synchronisiert?) produziert (Li et al. 2001). In wieweit TGF $\alpha$  und PK2 darüber hinaus periphere Organe synchronisieren können, ist bis jetzt unklar. Die Funktionen des Melatonins als Neurohormon sind komplex. Zwar scheint es kein wesentlicher Faktor bei der Synchronisation peripherer Zellen zu sein, da die Melatonin-defizienten C57BL/6-Mäuse auch ohne Melatonin rhythmische Uhrengen-Expressionen in peripheren Geweben aufweisen (Zylka et al. 1998b). Dennoch ist es in adaptive Vorgänge im neuroendokrinen System involviert (von Gall et al. 2002, Hastings & Follett 2001).

#### *1.4.3.2 Periphere Synchronisatoren synchronisieren die Peripherie*

Auch nicht vom SCN vermittelte Reize können periphere Zellen synchronisieren. Wenn man nachtaktiven Laborratten erlaubt, nur tagsüber Nahrung aufzunehmen, verstellen sich die peripheren Uhren des Gastrointestinaltraktes und oszillieren mit einem Rhythmus mit inverser

Phasenlage gegenüber dem SCN, der durch die externen Vorgaben selbst in seinem Rhythmus nicht beeinflusst wird (Damiola et al. 2000, Stokkan et al. 2001). Weitere Untersuchungen haben ebenfalls gezeigt, dass eine solche Nahrungsrestriktion ein potenter Zeitgeber peripherer Zellen ist (Hara et al. 2001, Pando et al. 2002). Das vom SCN gesteuerte Kortisol soll hierbei einer Entkopplung peripherer Oszillatoren vom SCN entgegenwirken (Le Minh et al. 2001).

#### 1.4.3.3 Forscher synchronisieren Zellkulturen

Die ersten Versuche an kultivierten Zelllinien wendeten einen Serumschock (Medium, das zu 50% Serum enthält) an, um Oszillationen von Uhrengenen hervorzurufen (Balsalobre et al. 1998). In Folgeversuchen wurden die unterschiedlichsten Substanzen (zur Übersicht siehe Tab. 4.2), v. a. an Fibroblasten eingesetzt, die alle ein vergleichbares Muster rhythmischer Genexpression hervorgerufen haben (Balsalobre et al. 1998, Balsalobre et al. 2000b, Yagita & Okamura 1999, Yagita et al. 2001). Eine Einzelanalyse von Signaltransduktionskaskaden erbrachte, dass die initiale Induktion von *Per1* von Aktivatoren des cAMP- (Forskolin, Dibutyryl-cAMP), PKC-[Phorbol-12-Myristat-13-Acetat (PMA)],  $Ca^{2+}$ - (Calcimycin) und des Tyrosinrezeptorkinase- [epidermaler Wachstumsfaktor (EGF), Insulin, Fibroblastenwachstumsfaktor (FGF)] Signaltransduktionsweges stimuliert werden kann (Balsalobre et al. 2000b).

Besonders Forskolin, PMA und Calcimycin riefen eine starke Zunahme des *Per1* mRNA-Gehaltes hervor. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass sowohl Forskolin, Dexamethason, PMA, Calcimycin und Endothelin-1 eine rhythmische Expression von Uhrengenen in Fibroblasten hervorrufen können (Balsalobre et al. 2000b, Yagita & Okamura 1999, Yagita et al. 2001). Akashi & Nishida (2000) konnten zeigen, dass, ähnlich wie im SCN, die MAPK in die Synchronisation peripherer Zellen involviert ist. Externe Temperaturveränderungen, die den täglichen Körpertemperaturschwankungen nachgeahmt werden, können eine rhythmische Uhrengenenexpression in Fibroblasten aufrechterhalten, auch wenn diese Temperaturschwankungen selber keinen Rhythmus induzieren können (Brown et al. 2002).

## 1.6 AtT-20 Zellen als Modellzelllinie

AtT-20 Zellen entstammen einem (adeno-) hypophysärem ACTH-produzierendem Adenokarzinom der LAF1-Mauslinie. AtT-20 Zellen sind morphologisch klein und rund. Sie wachsen

in Kulturmedium einschichtig adhärierend auf Petrischalen, wobei hormonell aktive Zellen in Aggregaten im Medium flotieren (beschrieben in Orth et al. 1973).

AtT-20 Zellen spiegeln das hormonelle Antwortverhalten von kortikotrophen Zellen der Hypophyse wider und wurden intensiv in dieser Hinsicht untersucht (van Wijk et al. 1995, Schecterson et al. 1991, Devi et al. 1992). Kovalovsky et al. (2002) konnte zeigen, dass AtT-20 Zellen *B-Raf* exprimieren, wodurch eine cAMP-vermittelte Phosphorylierung von MAPK in diesen Zellen möglich ist.

Lamas & Sassone-Corsi (1997) charakterisierte in AtT-20 Zellen die Kinetik verschiedener Komponenten des cAMP-Weges, insbesondere die Aktivität der Proteinkinase A (PKA) und von CREB, sowie die Dynamik und Refraktärverhalten der CREM-Transkription als Antwort auf eine Stimulation mit Forskolin. Es konnte gezeigt werden, dass das *Crem*-Gen (und damit auch die *Icer*-Isoformen) eine Refraktärperiode besitzt, deren Länge abhängig ist von der Dauer des vorangegangenen Stimulus. Beteiligt am Zustandekommen dieser Refraktärperiode sind der Anstieg des cAMP, die Aktivität der PKA, der Anteil an phosphoryliertem CREB und CREM, sowie der Gehalt an ICER. Eine maximale Expression von *Icer* konnte mit einer 2-stündigen Stimulation mit 10  $\mu$ M Forskolin erreicht werden. Darüber hinaus dokumentierte Lamas an stabil transfizierten AtT-20 Zellen die Wirkung ektopter ICER-Überproduktion, die sowohl die Morphologie und Proliferation, als auch die Sekretion von ACTH in AtT-20 Zellen beeinflusst (Lamas et al. 1997).

## 1.7 Thema der Arbeit

Das molekulare Wechselspiel von Uhrengenen und seinen Produkten ist für das Zustandekommen von zirkadianen Rhythmen verantwortlich. Zwar konnte in den letzten Jahren das Verständnis dieses Uhrwerks erheblich erweitert und neue Mechanismen aufgedeckt werden. Dennoch sind viele Einzelheiten des Uhrenmechanismus noch ungeklärt, was aber besonders in Hinblick auf eine mögliche pharmakologische Beeinflussung des zirkadianen Systems notwendig ist. Dies betrifft u.a. die Bedeutung postranskriptionaler Modifikationen von Uhrengenenprodukten, in erster Linie deren Phosphorylierung. Auch ist bisher nicht geklärt, ob überhaupt und wenn ja, wie sich periphere Oszillatoren von dem Uhrwerk des SCN letztendlich molekular unterscheiden. Es ist immer noch unklar, über welchen (welche?) humoralen Faktor(en) der SCN periphere Organe synchronisiert und welche Substanzen diese Information innerhalb der Zelle vermitteln. Durch den Nachweis rhythmischer Vorgänge in kultivierten

peripheren Zelllinien bei gleichzeitig bestehenden methodischen Schwierigkeiten in der Untersuchung des SCN, wurde zuletzt vermehrt gefordert, sich diesen Fragen zunächst an Hand eines Modellsystems, wie einer Zellkultur immortalisierter Zellen, zu nähern (Balsalobre et al. 1998, Rosbash 1998).

Die kortikotrophe Tumorzelllinie AtT-20 ist bereits als Modellsystem für neuroendokrine Signaltransduktion und Genregulation gut charakterisiert und ihre physiologischen Eigenschaften entsprechen weitestgehend dem kortikotropher Zellen in der Adenohypophyse (van Wijk et al. 1995, Schecterson et al. 1991, Devi et al. 1992). Weiterhin konnten AtT-20 Zellen erfolgreich stabil transfiziert werden (Lamas et al. 1997). Diese Eigenschaften machen sie auch zu einem Kandidaten als mögliches Modellsystem für die Untersuchung des zirkadianen Systems des Säugers.

- Zunächst ist daher Aufgabe dieser Arbeit, mittels RT-PCR-Technik nachzuweisen, dass Uhrengene endogen in AtT-20 exprimiert werden.
- In einem nächsten Schritt soll eine verlässliche Methode entwickelt werden, mit der man Zeit- und Kosten-effizient Expressionsunterschiede auf mRNA-Niveau auch niedrig exprimierter Gene nachweisen kann. Hierfür bietet sich die Real-Time Quantitative PCR (RTQ-PCR), insbesondere die  $\Delta\Delta C_T$ -Methode an, da sie ohne die Verwendung von Standards mit einem hohen Probendurchsatz arbeitet (Livak & Schmittgen 2001). Die Validierung soll die hierfür geforderten Experimente umfassen (Vgl. ABIPrism User Bulletin #2).
- Die Induzierbarkeit von *immediate early genes* wie *Per1* und *Per2* wurde in Zusammenhang mit der Synchronisation sowohl des SCN als auch peripherer Zellen gebracht. Ziel dieser Arbeit ist es weiter, zu untersuchen, ob sich in AtT-20 Zellen die Transkription der IEG *Per1*, *Per2* und *Icer* durch eine Stimulation mit Forskolin induzieren lässt.
- Darüber hinaus soll auch das Verhalten der zu diesem Zeitpunkt bekannten Uhrengene *Per3*, *Cry1-2*, *BMal1*, *Clock* und *CK1 $\epsilon$*  auf Forskolin-Stimulation dargestellt werden und über Immunoblot-Verfahren das Auftreten dieser Transkripte zeitlich korreliert werden mit der Dynamik der aktivierter Komponenten der cAMP-Signaltransduktion pMAPK und pCREB.
- In Fibroblasten konnte eine zweistündige Stimulation mit 10  $\mu$ M Forskolin eine zirkadiane Expression von Uhrengenen hervorrufen (Yagita & Okamura 2000). Ein weiterer Bestandteil dieser Arbeit ist daher, mittels RTQ-PCR zu untersuchen, wie sich in AtT-20 Zellen die mRNA relevanter Uhrengene und die von *Icer* im Zeitverlauf nach

einer solchen Stimulation verhält und, ob sich womöglich ähnliche rhythmische Expressionsmuster erkennen lassen.

## 2. MATERIAL UND METHODEN

### 2.1 Chemikalien

Alle Feinchemikalien wurden, soweit nicht anders angegeben von der Fa. Sigma-Aldrich (Schnelldorf) oder der Fa. Carl Roth (Karlsruhe) in p.a.-Qualität bezogen. Die für die Zellkultur verwendeten Chemikalien und Medien wurden von der Fa. Life Technologies (Eggenstein) geliefert. Alle Lösungen und Puffer wurden mit doppelt destilliertem Wasser (ddH<sub>2</sub>O) hergestellt und autoklaviert, bzw. sterilfiltriert (Sterilfilter: 0,2 µm Porenweite, Schleicher & Schüll, Dassel). Die Herstellung und Zusammensetzung verwendeter Lösungen und Puffer ist unter 9. aufgelistet.

### 2.2 Zellkulturtechniken

AtT-20 Zellen wurden über American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD, USA) bezogen. Die Zellen wurden bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>-Begasung in Brutschränken (Fa. Heraeus) in Kulturmedium gehalten (*Dulbecco's modified eagle medium/nutrient mix F12* [DMEM F/12], angereichert mit 10 mM HEPES, 2 mM Glutamin, 100 E/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin, 100 µg/ml Ascorbinsäure und 5% fetalem Kälberserum [FCS]); der pH des Mediums wurde mit NaOH auf 7,4 eingestellt. Kulturflaschen und -schalen wurden von der Fa. Greiner geliefert.

#### 2.2.1 Splitting und Stocks

Waren die Kulturschalen konfluent mit Zellen besiedelt, wurden sie mit Trypsin abgelöst und auf neue Schalen verteilt. Das Teilungsverhältnis auf neue Schalen betrug regelmäßig 1:2. Nach durchschnittlich 15 Aufteilungspassagen wurde die Kultivierung beendet und eine neue Zellreihe mit einer Charge der ursprünglichen Zellen begonnen. Zu Beginn der Arbeit wurden die hierzu notwendigen Vorratskulturen angelegt: Von Medium befreite AtT-20-Zellen wurden zunächst mit PBS gewaschen, dann mittels Trypsin vom Kulturgefäß abgelöst, abzentri-

fugiert, erneut mit PBS gewaschen und erneut abzentrifugiert. Der Niederschlag wurde anschließend in FCS-10% DMSO bei  $-80^{\circ}\text{C}$  weggefroren.

### *2.2.2 Stimulationsversuche*

Mindestens 4 Tage vor einem Stimulationsversuch wurden die Zellen zum letzten Mal aufgeteilt. Der Versuch wurde begonnen, wenn die Zellen zu etwa 80% konfluent waren. Zum Zeitpunkt 0 wurden dem Kulturmedium Forskolin (in DMSO) zugefügt (Endkonzentration 10  $\mu\text{M}$ ). Nach einer zweistündigen Stimulationsdauer wurde das Medium abgenommen und wieder in serumfreiem Medium ohne Forskolin kultiviert, um die Zellen in der  $G_0$ -Phase zu arretieren und nicht synchrone Zellteilungen zu unterdrücken. Zweimaliges Waschen der Zellen zu den angegebenen Zeitpunkten mit eiskaltem PBS beendete den Versuch. Anschließend wurden die Zellen bis zur weiteren Aufarbeitung bei  $-80^{\circ}\text{C}$  tiefgefroren.

## **2.3 Arbeiten mit Nukleinsäuren**

Beim Arbeiten mit Nukleinsäuren muss prinzipiell auf ein hohes Maß an Sauberkeit geachtet werden. Speziell die in dieser Arbeit verwendeten Techniken (Reverse Transkription, PCR) sind sehr anfällig für Kontamination mit Fremd-DNA oder RNasen, bzw. DNasen. Daher wurden für diese Arbeiten ausschließlich RNase- und DNase-freie sowie autoklavierte Gerätschaften und Lösungen verwendet. Hierzu wurden Glaswaren bei  $180^{\circ}\text{C}$  für 4 h erhitzt und Lösungen mit 0,1 % (v/v) Diethylpyrocarbonat (DEPC) versetztem  $\text{H}_2\text{O}$  angesetzt.

### *2.3.1 RNA-Isolation*

RNA wurde nach der Methode von Chomczynski (Chomczynski & Sacchi, 1987) mittels TRIzol<sup>®</sup> Reagent (Invitrogen) isoliert. Das in TRIzol<sup>®</sup> enthaltene Guanidinisothiocyanat denaturiert effektiv Proteine, insbesondere auch RNasen, während Phenol-Chloroform das Gemisch in drei Phasen teilt: eine organische (phenolische) mit Proteinen und kleineren DNA-Fragmenten, eine Interphase mit größeren DNA-Fragmenten und eine wässrige Phase, die die RNA enthält. Im Einzelnen wurde folgendermaßen vorgegangen: Zellen wurden mit 1 ml TRIzol<sup>®</sup> bei Raumtemperatur lysiert und mittels eines Ultra-Turrax T8 (IKA, Staufen) homogenisiert. 200  $\mu\text{l}$  Chloroform wurden zugegeben, die Lösung bei 12.000g zentrifugiert und die



RNA aus der wässrigen Phase mit 500 µl Isopropanol gefällt. Der durch erneute Zentrifugation entstandene Niederschlag wurde mit 75% Ethanol gewaschen und anschließend in ddH<sub>2</sub>O aufgenommen.

### *2.3.2 Quantifizierung von Nukleinsäuren*

Nukleinsäuren absorbieren ultraviolettes Licht einer Wellenlänge von 260 nm. Nach dem Lambert-Beerschen Gesetz kann hieraus die Konzentration einer Lösung bestimmt werden (Photometer: Spectronic Genesys 5, Milton Roy, Pont-Saint-Pierre, Frankreich). Für doppelsträngige DNA (dsDNA) entspricht einer Extinktion des Wertes 1 einer Konzentration von 50 µg/ml, für RNA einer Konzentration von 40 µg/ml. Der Quotient aus der Extinktion bei 260 nm und der bei 280 nm zeigt die Reinheit einer Nukleinsäurelösung an und sollte zwischen 1,8 und 2 liegen.

### *2.3.3 Reverse Transkriptase Reaktion*

Um die Expression bestimmter Gene auf mRNA-Ebene mittels PCR-Techniken zu untersuchen, muß zunächst aus der gewonnenen Gesamt-RNA selektiv mRNA in cDNA mittels einer RNA-abhängigen DNA-Polymerase (retroviralen Ursprungs) umgeschrieben werden. Hierbei macht man sich zu Nutze, dass mRNA an ihrem 3'-Ende einen sog. Poly-A-Schwanz enthält. Verwendet man für die Reverse Transkriptase Reaktion Primer, die an ihrem 5'-Ende mehrere Thymidinbasen (Oligo-dT) enthält, amplifiziert man spezifisch mRNA-Moleküle. Durch eine RNaseH-Aktivität der verwendeten Polymerase wird die hybridisierte mRNA-Matrize entfernt, die in der anschließend angewandten PCR stören würde. Routinemäßig wurde die Reverse Transkriptase Reaktion mit Omniscript<sup>®</sup> Reverser Transcriptase (Qiagen, Hilden) durchgeführt. 30 µl Reaktionsansatz enthielten in dem mitgelieferten Puffer je 0,5 mM dNTP, 1 µM Oligo-dT Primer (Invitrogen), 10 U/µl rekombinanter RNase-Inhibitor (Invitrogen), 4 U/µl Omniscript<sup>®</sup> Reverse Transcriptase und 1 µg Gesamt-RNA (vor Zugabe zum Ansatz für 5 min. bei 65°C denaturiert). Die Reaktion wurde für eine Stunde bei 37°C ausgeführt. Die Enzyme wurden anschließend für 5 min. bei 93°C hitzeinaktiviert.

### 2.3.4 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Die PCR ist eine Methode zur *in vitro*- Amplifizierung von definierten DNA-Fragmenten. Die Effektivität der Reaktion ist hierbei so hoch, dass sogar geringste Mengen einer Ausgangs-DNA (*template*) in einen nachweisbaren Bereich gelangen. Das Prinzip dieser Technik beruht auf dem Einsatz sog. thermostabiler DNA-abhängiger DNA-Polymerasen einerseits und den chemischen Eigenschaften doppelsträngiger DNA andererseits: Zunächst wird die DNA bei hoher Temperatur denaturiert. Beim Abkühlen auf etwa 60°C können nun Oligonukleotide an ihre komplementäre Sequenz auf der Ziel-DNA binden (Hybridisierung, *annealing*) und so als *Primer* für eine Polymerase in der anschließenden Elongationsphase (*extension*) wirken. Wiederholt man mehrfach diese drei Schritte, erreicht man mit jedem Zyklus eine Verdopplung, durch die Aneinanderreihung (Kette) mehrerer solcher Zyklen eine exponentielle Anreicherung der Ziel-DNA.

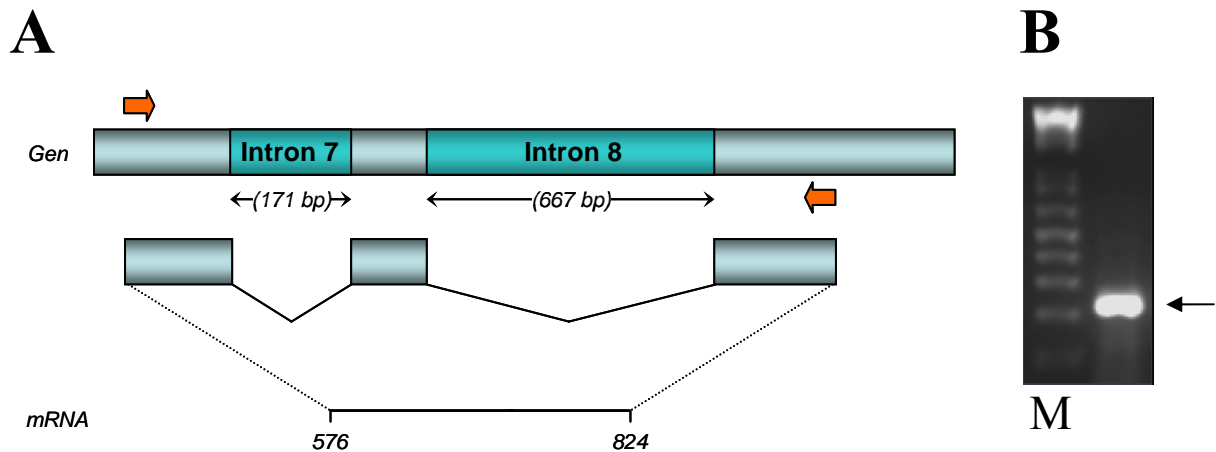
Bei der Wahl der Primer müssen mehrere Punkte bedacht werden: Die Länge der Primer sollte in etwa bei 20 Nukleotiden liegen, was ein Optimum aus Anlagerungswahrscheinlichkeit einerseits und Genspezifität andererseits darstellt. Der GC-Anteil in der Primersequenz sollte möglichst zwischen 40 % und 60 % betragen. Am 3'-Ende sollten zur besseren Hybridisierung und Elongation ein bis zwei G oder C Nukleotide sitzen. Die Primer mit den genannten Kriterien und deren optimale Annealingtemperatur ( $T_a$ ) wurden mittels Omega-Software (Oxford Molecular Ltd.) und der NCBI cDNA-Bank ermittelt. Die verwendeten Primer wurden von der Fa. MWG-Biotech (Ebersberg) geliefert und sind in Tabelle 2.1 dargestellt.

Der Reaktionsansatz enthielt in 50  $\mu$ l Lösungsvolumen standardmäßig folgende Komponenten: 20 mM Tris-HCl (pH 8,4), 50 mM KCl, 0,2 mM von jedem dNTP (A, C, G und T), 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,4  $\mu$ M von jedem Primer, 2  $\mu$ l Template-DNA, 1,5 U *Taq* DNA Polymerase (Invitrogen, Groningen, Niederlande), ddH<sub>2</sub>O *ad* 50  $\mu$ l. Die Reaktion wurde in einem programmierbaren Thermocycler der Fa. Perkin-Elmer (Weiterstadt) durchgeführt: Nach jedem initialen Denaturierungsschritt für 5 min bei 94°C folgte eine variable Anzahl von Zyklen, die jeweils aus einer 45 s dauernden Denaturierung bei 94°C, einer 30 s dauernden Anheftungsphase (Annealing mit DNA-spezifischer Temperatur) und 1 min Extension bei 72°C bestanden. Abschließend wurde nochmals für 10 min extendiert. Am Ende der Reaktion wurde der Ansatz mit 10  $\mu$ l DNA-Ladungspuffer versetzt und routinemäßig 20  $\mu$ l des Gesamtvolumens zur Auswertung auf ein analytisches Gel aufgetragen (siehe 2.3.5).

Gen	Gene accessi- on number	Oligonukleotidsequenz	Produktlänge (Position) [bp]	T <sub>a</sub> [°C]
<i>BMall</i>	AB014494.1	forward: 5'-CAA CCT TCC CGC AGC TAA CA-3' reverse: 5'-TCC GCG ATC ATT CGA CCT AT-3'	151 (1758-1908)	60,0
<i>CK1ε</i>	NM_013767.2	forward: 5'-CCT ACC GGG AAA ACA AGA ACC-3' reverse: 5'-TTG ACA TCT TCT TCT CGC TAA TCC-3'	207 (585-791)	57,4
<i>Clock</i>	AF000998.1	forward: 5'-CAA ATA TTA CAG AGG GCA CAC C- 3' reverse: 5'-CAT CAC AGC CAA AGC ACG-3'	379 (3304-3682)	55,8
<i>Cry1</i>	NM_007771.1	forward: 5'-CAG CAG CCA CAA ACA ACC-3' reverse: 5'-ACA GCC ACA TCC AAC TTC C-3'	309 (1211-1519)	60,0
<i>Cry2</i>	AF156987.1	forward: 5'-ACC ACC CCT TAC CTA CAA GC-3' reverse: 5'-CCT CCA TTC GGT CAA ACC-3'	497 (503-999)	60,0
<i>Gapdh</i>	NM_008084.1	forward: 5'-TTG GGC TAC ACT GAG GAC C-3' reverse: 5'-GGA AAT TGT GAG GGA GAT GC-3'	284 (860-1143)	58,3
<i>Icer</i>	AJ311667.1	forward: 5'-AAG AAG CAA CTC GCA AGC-3' reverse: 5'-AAG AGA CCC ATC TAC AAG TCC-3'	285 (176-460)	57,7
<i>Per1</i>	NM_011065.2	forward: 5'-AAG TGG CAA TGA GTC CAA CG-3' reverse: 5'-GGA TGT GAT ATG CTC CAA TTC C- 3'	475 (156-630)	60,0
<i>Per2</i>	NM_011066.1	forward: 5'-TGG AAT CTT CCA ACA CTC ACC-3' reverse: 5'-ACA GCC ACA GCA AAC ATA TCC-3'	388 (341-728)	60,0
<i>Per3</i>	NM_011067.1	forward: 5'-CGC CAG TCA TTG ACA TTA AGG-3' reverse: 5'-CCA TCA GGA AGA AGC ACC-3'	460 (3782-4241)	59,8
<i>Hprt*</i>	NM_013556	forward: 5'-GCT GGT GAA AAG GAC CTC T-3' reverse: 5'-CAC AGG ACT AGA ACA CCT GC-3'	248, bzw. 1086 (576-824)	61,0

**Tabelle 2.1:** Liste der verwendeten Oligonukleotidprimer mit Angaben der spezifischen Amplifikationsbedingungen (T<sub>a</sub>, optimale Zyklenzahl). \*Intron-überspannende *Hprt-Primer*.

Bei jedem Versuch wurde zum Ausschluss möglicher Verunreinigungen eine Nullkontrolle mit durchgeführt, die statt der Template-DNA lediglich Wasser enthielt (*no template control*, NTC). Kam es hier zu einer Amplifikation von DNA, wurde die komplette Versuchsreihe verworfen. Weiterhin wurden alle Proben routinemäßig auf Kontaminationen mit genomischer DNA untersucht. Hierzu wurden Intron-überspannende Primer für das *Hprt*-Gen (*Hypoxanthin-Guanin Phosphoribosyltransferase*) im PCR-Ansatz verwandt (Abb. 2.1).



**Abb. 2.1:** Funktionsweise des *Hpvt*-Primerpaares. **A:** Der schematische Ausschnitt aus dem *Hpvt*-Gen zeigt, wie die beiden Primer (Pfeile) zwei Introne überspannen, die nicht in mRNA umgeschrieben werden. Im Falle einer Kontamination mit genomischer DNA entstehen neben dem 249 bp großen Produkt der mRNA ein 1087 bp großes Fragment. **B:** Eine ausschließlich cDNA enthaltende Probe ergibt eine zur entsprechenden mRNA komplementäre Bande bei 249 bp (Pfeil), die Bande der Größe von 1086 bp fehlt. M: DNA-Größenmarker.

### 2.3.5 Agarosegelelektrophorese

Im elektrischen Spannungsfeld wandern Nukleinsäuren auf Grund ihrer negativ geladenen Phosphatgruppen anodenwärts. Lädt man eine zu untersuchende Lösung auf ein Agarosegel und legt Spannung an, müssen die DNA-Fragmente die netzartigen Strukturen des Polysaccharids passieren; somit können durch Laufzeitunterschiede die einzelnen Fragmente ihrer Größe nach aufgetrennt werden. Durch Zugabe eines interkalierenden Fluoreszenzfarbstoffes wie Ethidiumbromid kann nun doppelsträngige DNA unter UV-Licht sichtbar gemacht werden.

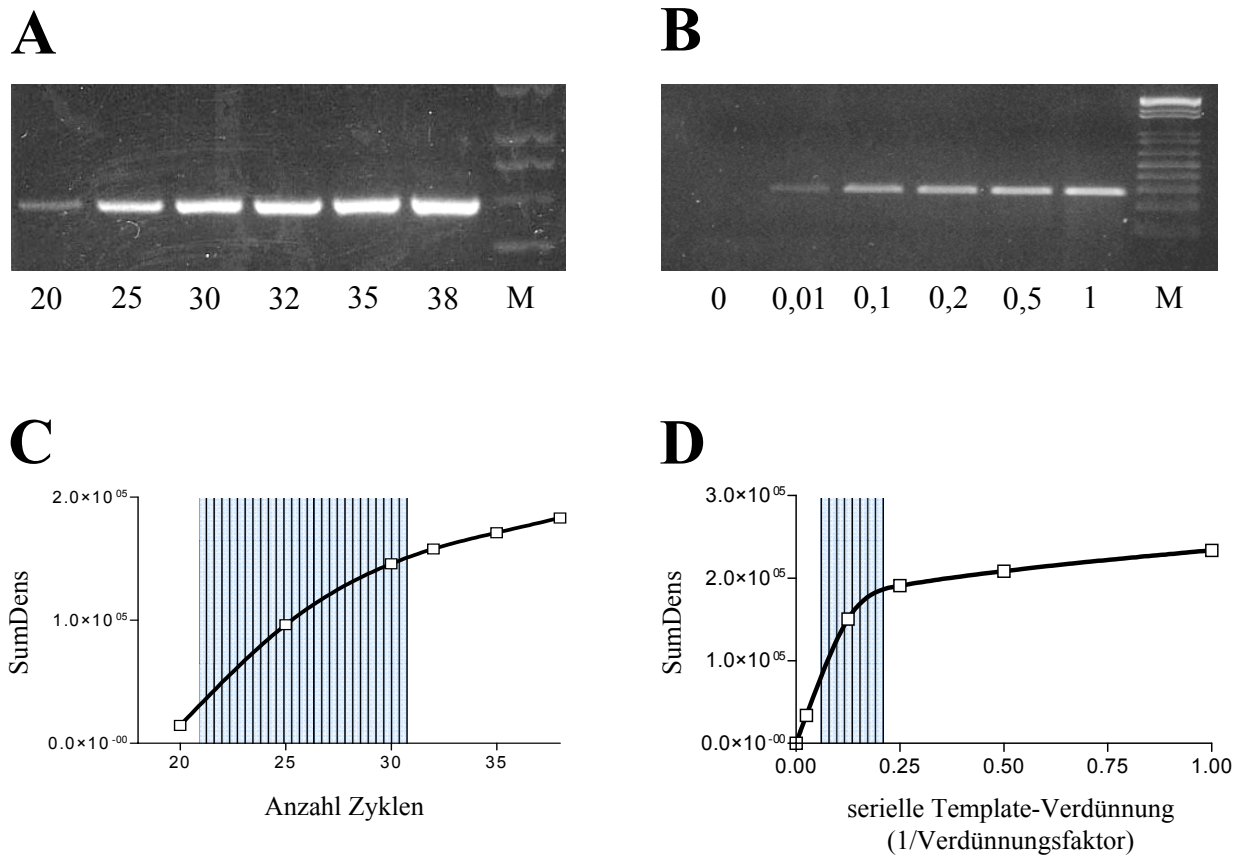
Im einzelnen wurde folgendermaßen vorgegangen: Für ein 2%iges Gel (geeignet für Fragmente bis zu 2 kb), wurde die entsprechende Menge Agarose in Elektrophoresepuffer (0,5x TBE) durch Erhitzen gelöst und nach Zugabe von Ethidiumbromid in einen Flachbettschlitten gegossen. Den Proben wird vor dem Auftragen auf das Gel 1/5 Volumen DNA-Probenpuffer zugesetzt. Die Elektrophorese erfolgte nun für etwa eine Stunde bei 10 V/cm. Anschließend wurden die Gele unter UV-Licht photographiert. Zur Größenbestimmung wurde ein DNA-Größenmarker mit aufgetragen (z.B.: 1 kb plus DNA ladder, Invitrogen).

### 2.3.6 Semiquantitative Reverse Transkriptase-PCR (sqRT-PCR)

Zunächst wurde in Vorversuchen der generelle quantitative Charakter der angewandten Methode dargestellt. Hierzu wurde für jedes Gen die Zyklenzahl ermittelt, die im unteren exponentiellen Bereich der Amplifikation (*log-linear range*) liegt (optimale Zyklenzahl, siehe Abb. 2.2). Weiterhin konnte durch Verdünnungsreihen von eingesetzter Template-DNA gezeigt werden, dass verschiedene Mengen an Ausgangs-DNA in entsprechend verschiedenen DNA-Mengen am Ende der Reaktion resultierten (Abb. 2.2).

Um quantitative Unterschiede in der Genexpression mittels RT-PCR darzustellen, bezieht man die Signalintensitäten eines PCR-Produktes im Agarosegel auf die eines mitamplifizierten Referenzgens (externer Standard). Für die semiquantitative RT-PCR wurde das Haushaltsgen *Gapdh* (Glycerinaldehyd-3-phosphat-dehydrogenase) verwendet, von dem man annimmt, dass es konstitutiv exprimiert wird, i. e. dass dessen mRNA-Menge nicht oder nur in einem geringen Maße schwankt (Apostolakos et al. 1993, Zhao et al. 1995).

Die zu untersuchenden Banden wurden rechnergestützt mittels eines KS300 Bildanalyse-system (Kontron, Eching) densitometrisch ausgewertet. Hierzu wurden die Anzahl der Pixel einer Bande sowie deren einzelne Grauwerte zu einem Summendichtewert (SumDens) zusammengefasst (Wicht et al. 1999). Die entsprechenden Werte wurden nun als Teil des jeweils korrespondierenden *Gapdh*-Wertes ausgedrückt ( $\text{SumDens Gen X} / \text{SumDens Gapdh}$ ), um den Fehler zu korrigieren, der z.B. durch eine vermindert effektive RT-Reaktion entstanden sein könnte. Innerhalb einer Probenreihe wurde nun der höchste dieser Quotienten als 100% festgesetzt, die übrigen als Prozentanteil davon berechnet.



**Abb. 2.2:** Validierungsexperimente zur semiquantitativen RT-PCR am Beispiel des Haushaltsgens *Gapdh*: **A, C:** PCR-Produkte einer Standard-PCR mit jeweils gleichen Template-Mengen aber unterschiedlichen Zyklenzahl wurden auf ein mit Ethidiumbromid gefärbtes Agarosegel aufgetragen. Über einen weiten Bereich resultiert aus einer höheren Anzahl Zyklen eine zunehmende optische Dichte (SumDens) bei der digitalen Auswertung des spezifischen Signals im Agarosegel. Diese Unterschiede verringern sich im Bereich hoher Zyklenzahlen (nachlassende Enzymaktivität, Substratverbrauch). **B, D:** PCR-Produkte einer Standard-PCR mit unterschiedlichen Mengen eingesetzter Template-DNA aber gleicher Zyklenzahl (hier: 22). Im untersuchten Verdünnungsbereich resultiert aus einer höheren Template-Menge eine höhere optische Dichte im Agarosegel. Bei hohen Template-Konzentrationen erreicht die Intensitäts-Template-Kurve ein Plateau, wo kaum noch Unterschiede in der Signalintensität festgestellt werden können (Enzymsättigung). M: DNA-Größenmarker. Für jedes Gen wurde an Hand solcher Versuche die für semiquantitative Untersuchung optimale Zyklenzahl und Template-Menge ermittelt, i. e. der Bereich, in dem ein deutliches Signal im Gel vorhanden war und zugleich die Intensität von der Zyklenzahl, bzw. der eingesetzten Template-Menge abhing (schraffierte Bereiche).

### 2.3.7 Real-Time quantitative PCR (RTQ-PCR)

Die Verwendung dieser Technik gestattet in dieser Arbeit zweierlei: Erstens kann die RTQ-PCR als eine quantitative Methode die Validität der semiquantitativen RT-PCR überprüfen. Zweitens erlaubt sie es auf Grund ihrer hohen Sensitivität bei deutlich weniger notwendigen Amplifikationszyklen, auch Unterschiede des mRNA-Gehaltes bei schwach exprimierten Genen darzustellen.

Das Prinzip der RTQ-PCR beruht darauf, dass man zum PCR-Ansatz einen Fluoreszenzfarbstoff (hier: SYBR Green I, Qiagen, Hilden) zugibt, der mit neu synthetisierter DNA interagiert. In speziellen Thermocyclern, in die eine UV-Lampe und eine CCD-Kamera integriert sind, kann nun am Ende eines jeden Amplifikationszyklus die Fluoreszenz gemessen und auf den Gehalt an vorhandener DNA rückgeschlossen werden.

Da der interkalierende Farbstoff auch unspezifische Produkte wie z.B. Primer-Dimere anfärbt, wurde zur Erhöhung der Spezifität in dieser Arbeit eine sog. Hot-Start-Polymerase (HotStart Taq DNA Polymerase, Qiagen, Hilden) verwendet. Darüber hinaus wurde für jedes Primerpaar eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt. Die erforderlichen Oligonukleotidprimer wurden entsprechend den Anforderungen der Methode mittels zugehöriger Software (Applied Biosystems, Darmstadt) und der NCBI cDNA-Bank ermittelt (Tab. 2.2).

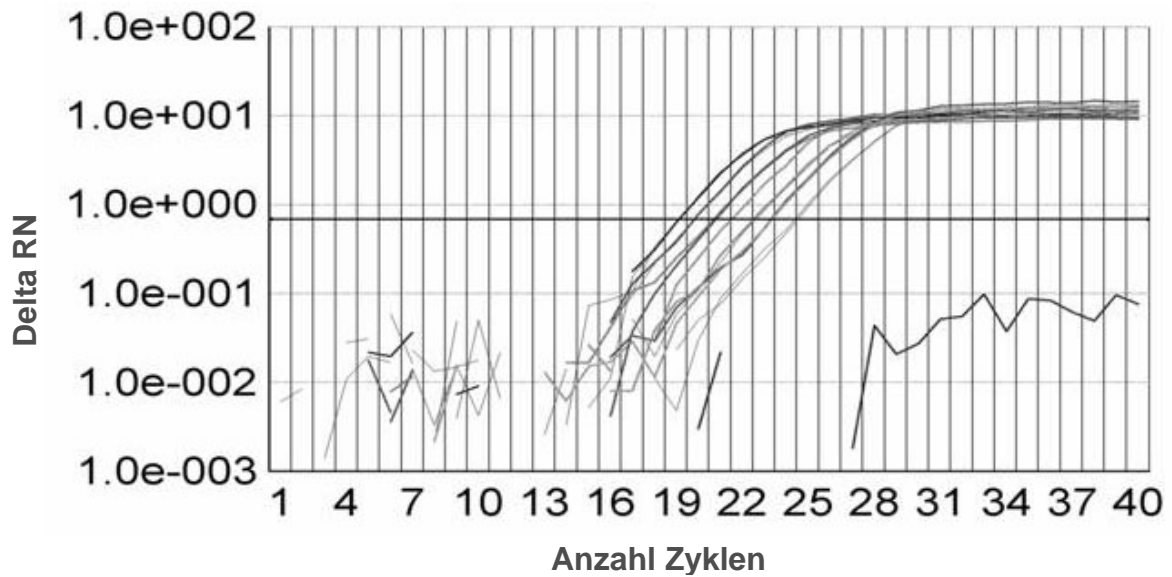
In den letzten Jahren wurde vermehrt über das Auftreten von Pseudo-Genen in der *Gapdh*-Sequenz berichtet, die entweder bei RT-PCR-Verfahren mitamplifiziert werden oder den konstitutiven Expressionscharakter dieses Gens beeinflussen können (Harper et al. 2003). Daher wurden in allen RTQ-PCR-Experimenten nur noch *Hprt* (Jiralerspong & Patel, 1996) als Standard verwendet.

Gen	Gene accession number	Oligonukleotidsequenz	Produktlänge (Position) [bp]
<i>Bmall</i>	AB0144494.1	forward: 5'-CAA CCT TCC CGC AGC TAA CA-3' reverse: 5'-TCC GCG ATC ATT CGA CCT AT-3'	151 (1758-1908)
<i>CK1ε</i>	NM_013767.2	forward: 5'-AGC CAT CA GCT CGA ATG TGT-3' reverse: 5'-CAG CAG CTC CAT GAC CAT CA-3'	151 (193-343)
<i>Clock</i>	AF000998.1	forward: 5'-CAC CGA CAA AGA TCC CTA CTA CTG AT-3' reverse: 5'-TGA GAC ATC GCT GGC TGT GT-3'	151 (1740-1890)
<i>Cry1</i>	NM_007771.2	forward: 5'-CCT CTG TCT GAT GAC CAT GAT GA-3' reverse: 5'-CCC AGG CCT TTC TTT CCA A-3'	151 (895-1045)
<i>Cry2</i>	AF156987.1	forward: 5'-AGG GCT GCC AAG TGC ATC AT-3' reverse: 5'-AGG AAG GGA CAG ATG CCA ATA G-3'	151 (1434-1584)
<i>Icer</i>	AJ311667.1	forward: 5'-CTT ACC AGA TCC CAG CTC CTA-3' reverse: 5'-CGG GCA GCT TCC CTG TTT-3'	151 (80-230)
<i>Per1</i>	NM_011065.2	forward: 5'-CTC AGG TCT TTG GAG AGC TGC TGC AA-3' reverse: 5'-TTG CTG ACG ACG GAT CTT TCT-3'	151 (2128-2150)
<i>Per2</i>	NM_011066.1	forward: 5'-CTG GCT TCA CCA TGC CTG TT-3' reverse: 5'-AAG GCC TGA GGC AGG TTT G-3'	151 (2747-2897)
<i>Per3</i>	NM_001067.1	forward: 5'-GTG TAC ACA GTG TGC AAG CAA ACA-3' reverse: 5'-ACG GCC GCG AAG GTA TCT-3'	151 (611-761)
<i>Hprt</i>	NM_013556	forward: 5'-TCC CAG CGT CGT GAT TAG C-3' reverse: 5'-CTT CAT GAC ATC TCG AGC AAG TCT-3'	151 (92-252)

**Tabelle 2.2:** Liste der in der RTQ-PCR verwendeten Oligonukleotidprimer

Die Reaktion wurde in 25 µl Reaktionsvolumen [1x QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix (Qiagen), 300 nM von jedem Primer, 2 µl Template-DNA, ddH<sub>2</sub>O ad 25 µl] in einem ABIPrism 7700 Thermocycler (Applied Biosystems, Darmstadt) mit folgenden Bedingungen durchgeführt: 1x 15 min 95°C, 40x (15 sec 95°C, 1 min 60°C, 30 sec 72°C), 1x 30 sec 72°C. Der ebenfalls im Ansatz enthaltene Farbstoff ROX diente als sog. passive Referenz, die es dem Detektionsgerät ermöglicht, nicht-PCR-abhängige Unterschiede des Fluoreszenzsignals herauszufiltern (Abb. 2.3). Auch hier wurden wie bei der gewöhnlichen PCR routinemäßig *no template controls* (NTC) mitgeführt.





**Abb. 2.3:** Ergebnisfenster einer RTQ-PCR: Messung des um die Hintergrundstrahlung ( $R_n^-$ ) bereinigtes Fluoreszenzsignals ( $\Delta R_n = R_n^+ - R_n^-$ ; wobei  $R_n^+$  die zum Zeitpunkt X gemessene Fluoreszenz ist) in Abhängigkeit der Zyklenzahl im ABI Prism Thermocycler am Beispiel einer seriellen Template-Verdünnung des Haushaltsgens *Hprt* (halblogarithmische Darstellung). Mit steigender Zyklenzahl gelangt die PCR in die log-lineare Phase, in dem die Fluoreszenz-Zyklus-Kurven verschiedener Proben parallel zueinander verlaufen. Durch Anlegen einer Schwelle (*threshold*, horizontale Linie bei etwa 0,7) im unteren Bereich der log-linearen Phase kann im Schnittpunkt mit der Amplifikationskurve der sog.  $C_T$ -Wert (*threshold cycle*) bestimmt werden (siehe 2.3.10 und 2.3.11).

### 2.3.8 Relative Quantifizierung der RTQ-PCR mittels $\Delta\Delta C_T$ -Methode

Expressionsunterschiede können mittels RTQ-PCR in sehr zuverlässiger Weise dargestellt werden, auch ohne, dass absolute DNA-Mengen aus dem Fluoreszenzsignal oder relative Unterschiede mit einer Standardkurve bestimmt werden müssen. Die sog.  $\Delta\Delta C_T$ -Methode (Livak & Schmittgen 2001) bedient sich hierbei arithmetischer Formeln, die aus der Kinetik der PCR abgeleitet wurden. Gemessen wird diejenige Zyklenzahl, bei der als erstes eine klare Zunahme des Fluoreszenzsignals erkennbar war ( $C_T$ ), i. e. der Beginn der exponentiellen Amplifikationsphase (Abb. 2.3). Dem liegt die Annahme zu Grunde, dass der  $C_T$ -Wert ein Indikator für das Expressionsniveau ist. Wie bei der semiquantitativen RT-PCR wird auch hier eine endogene Kontrolle (Referenz) benötigt, um z.B. eine unterschiedlich effiziente RT zu berücksichtigen. Aus der Exponentialfunktion, die die Amplifikation der PCR beschreibt, ergibt sich folgende Formel für die Anzahl an Zielmolekülen zum Zeitpunkt  $C_T$  in Abhängigkeit von der Ausgangsmenge an DNA:

Für die Anzahl an Zielmolekülen: 
$$X_T = X_0 \times (1 + E_X)^{C_{T,X}} \quad (1)$$

Für die Anzahl an Referenzmolekülen: 
$$R_T = R_0 \times (1 + E_R)^{C_{T,R}} \quad (2)$$

<i>wobei:</i>			
$X_T$	Anzahl an Zielmolekülen zum Zeitpunkt $C_T$	$R_T$	Anzahl an Referenzmolekülen zum Zeitpunkt $C_T$
$X_0$	Anzahl an Zielmolekülen zu Beginn der Reaktion	$R_0$	Anzahl an Referenzmolekülen zu Beginn der Reaktion
$E_X$	Amplifikationseffizienz des Zielmoleküls	$E_R$	Amplifikationseffizienz des Referenzmoleküls
$C_{T,X}$	$C_T$ des Zielmoleküls	$C_{T,R}$	$C_T$ des Referenzmoleküls

Die eigentliche Berechnung erfolgt in zwei Schritten: Zunächst wird der Ziel-DNA-Menge zu Beginn der Reaktion auf die des Referenzmoleküls bezogen (*normalisiert*):

$$\frac{X_T}{R_T} = \frac{X_0 \times (1 + E_X)^{C_{T,X}}}{R_0 \times (1 + E_R)^{C_{T,R}}} = K \quad (3)$$

<i>wobei:</i>	
$X_T$	Anzahl an Zielmolekülen zum Zeitpunkt $C_T$
$R_T$	Anzahl an Referenzmolekülen zum Zeitpunkt $C_T$
$K$	Konstante

Geht man davon aus, dass die Amplifikationseffizienz  $E_X$  und  $E_R$  gleich sind, lässt sich Folgendes ableiten:

$$E_X = E_R = E :$$

$$\frac{X_0}{R_0} \times (1 + E)^{C_{T,X} - C_{T,R}} = K \quad (4)$$

$$X_N \times (1 + E)^{\Delta C_T} = K \quad (5)$$

<i>wobei:</i>	
$X_N$	$X_0/R_0$ ; auf endogene Kontrolle normalisierte Menge an Zielmolekülen
$\Delta C_T$	$C_{T,X} - C_{T,R}$

hieraus:

$$X_N = K \times (1 + E)^{-\Delta C_T} \quad (6)$$

Schließlich wird auf eine Referenzprobe (Kalibrator) normalisiert, für die, je nach Fragestellung, in dieser Arbeit die jeweils unstimulierte Probe, bzw. die Probe mit der maximalen Expression des Zielgens (geringster  $\Delta C_T$ -Wert) diene:

$$\frac{X_{N,q}}{X_{N,cb}} = \frac{K \times (1 + E)^{-\Delta C_{T,q}}}{K \times (1 + E)^{-\Delta C_{T,cb}}} = (1 + E)^{-\Delta \Delta C_T} \quad (7)$$

<i>wobei:</i>	
$X_{N,q}$	$X_N$ der Probe
$X_{N,cb}$	$X_N$ der unstimulierten Probe
$\Delta \Delta C_T$	$C_{T,q} - C_{T,cb}$

Beträgt die Effizienz der Reaktion 100% ( $E=1$ ) kann der Term weiter vereinfacht werden:

$$\frac{X_{N,q}}{X_{N,cb}} = 2^{-\Delta \Delta C_T} \quad (8)$$

Nun ist es möglich, mit Hilfe der  $C_T$ -Werte Expressionsanalysen durchzuführen. Allerdings müssen bestimmte Validitätskriterien erfüllt sein, die es erlauben, wie beschrieben umzuformen und den vereinfachten Term zu verwenden: (1) Die Effizienz des Assays muss hoch sein ( $E \approx 1$ ), (2) die Amplifikationseffizienzen von Ziel- und Referenzmolekülen sollten vergleichbar sein und (3) unabhängig vom Templategehalt zu Beginn der Reaktion (zu mindest in dem für die Messung relevanten Bereich). Die entsprechenden Validierungsexperimente sind unter 3.2 dargestellt.

Die über (8) errechneten Werte sind wie folgt zu interpretieren: Es wird eine Probe als Referenz (Kalibrator) gewählt. Für die Darstellung von Induktionsvorgängen wurde die unstimulierte Probe als Kalibrator bestimmt und 1 gesetzt. Die übrigen Proben sind als Teil, bzw. als Vielfaches dessen ausgedrückt (z.B. ist bei einem Wert von 2 die Expression eines Genes in einer Probe doppelt so hoch wie in der Referenzprobe. Bei der Darstellung der 72 h-Zeitverläufe wurde die Probe mit der stärksten Expression innerhalb einer Probenreihe (geringster  $\Delta C_T$ -Wert) als Bezug genommen (= 100 %) und die übrigen Proben als %-Wert davon ausgedrückt.

War die unstimulierte Probe der Referenzpunkt (= 1), wurde für die Variabilität in dieser Probe der Standardfehler einer in Triplikaten ausgeführten PCR angegeben.

### 2.3.9 Bestimmung der Periodenlänge $\tau$

Zur Bestimmung der Periodenlänge ( $\tau$ ) zirkadianer Schwankungen in der Uhrengen-Expression wurden zunächst die Mittelpunkte von Spitzenwerten im Zeitverlauf normalisierter Uhrengen-mRNA (relative Auftragung als Prozent der maximalen Expression; Werte von mindestens drei unabhängigen Versuchen als Mittelwert dargestellt) bestimmt. Der zeitliche Abstand zwischen zwei aufeinander folgenden Spitzen wurde als  $\tau$  definiert (Balsalobre et al. 1998). Ausgenommen wurden Spitzenwerte, die durch die initiale Hochregulation von Genen als Antwort auf den applizierten Stimulus innerhalb der ersten 8 h erfolgten. Pro Gen sind in die Berechnung der mittleren Periodenlänge auf diese Weise folgende Anzahl einzelner Perioden eingeflossen: *Per1* (2), *Per2* (1), *Per3* (1), *Cry1* (1), *Bmall* (2).

## 2.4 Methoden zur Proteinerkennung

Zur quantitativen und qualitativen Darstellung von Proteinen werden Proteinextrakte zunächst gelelektrophoretisch aufzutrennt und anschließend immunologisch markiert.

### 2.4.1. Proteinextraktion und Proteinbestimmung

Die Zellen wurden zunächst mechanisch von den Kulturschalen abgelöst (Cellscraper, Greiner), abzentrifugiert, mit eiskaltem PBS gewaschen, um Reste des Kulturmediums zu entfernen, und nochmals abzentrifugiert. Der Zelleniederschlag wurde in 70  $\mu$ l Lysepuffer aufgelöst und mittels Ultraschall bei 70 Hz homogenisiert (Sonopuls HD 70, Fa. Bandelin, Berlin). Durch einen weiteren Zentrifugationsschritt erhält man im Überstand die löslichen Proteine. Die Konzentrationsbestimmung der Proteinlösung erfolgte nach der Methode von Bradford (Bradford 1976). Das Prinzip beruht darauf, dass Coomassie Brilliant Blue G-250 an Proteine bindet und so deren Absorptionsmaximum auf 595 nm verschiebt. Durch den Einsatz einer Eichreihe mit bekannten Proteinkonzentrationen, kann aus der Extinktion auf die Konzentration einer Probe rückgeschlossen werden. Im Einzelnen wurde folgendermaßen vorgegangen: 1  $\mu$ l Probenlösung (adäquat mit ddH<sub>2</sub>O vorverdünnt, in der Regel 1:5) wurden mit 499  $\mu$ l ddH<sub>2</sub>O und 500  $\mu$ l Coomassie Brilliant Blue G-250 (Pierce, Rockford, IL, USA) versetzt, für 10 min. inkubiert und anschließend die Extinktion bei 595 nm gemessen (Photometer: Spectronic Genesys 5, Milton Roy, Pont-Saint-Pierre, Frankreich). Für die Herstellung der

Eichreihe wurde definierte Mengen BSA (New England BioLabs, Beverly, MD, USA) verwendet.

#### 2.4.2 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Natriumdodecylsulfat (SDS) ist ein anionisches Detergenz, das (1) effektiv nichtkovalente Bindungen von Proteinen (Quartärstruktur) zerstört und (2) durch Bildung eines negativ geladenen SDS-Protein-Komplexes ein konstantes Ladungs-zu-Masse-Verhältnis schafft. Trennt man eine so vorbehandelte Proteinmischung nun in einer Polyacrylamidmatrix unter denaturierenden Bedingungen elektrophoretisch auf, erreicht man eine Darstellung allein nach der molekularen Masse. Durch ihre höhere Laufgeschwindigkeit sind kleinere Proteine näher an der Anode anzutreffen.

Die Gelelektrophorese wurde nach der von Laemmli vorgeschlagenen Methode (Laemmli 1970) durchgeführt. Im Einzelnen wurde folgendermaßen vorgegangen: In eine Vorrichtung für Proteingele (Mini Protean II, Bio-Rad, München) wurden nacheinander das Trenngel (Auftrennung) und das Sammelgel übereinander liegend gegossen (konzentriert das Probenmaterial und gewährleistet einen gemeinsamen Startpunkt). Die Porengröße des Trenngels wurde über den Gehalt an Acrylamid/Bisacrylamid an die Molekülgröße des gesuchten Proteins angepasst. Das Volumen Proteinextrakt für 40 µg Protein wurden 1:1 mit denaturierendem Probenpuffer (2x) versetzt und für 5 min gekocht. Anschließend wurde das Gel in einer Elektrophoresekammer mit Elektrophoresepuffer (nach Laemmli) überschichtet und mit dem vorbehandelten Probenmaterial beschickt. Zur späteren Größenbestimmung der Proteinbanden wurde ein Farbmarker (Sigma, Deisenhofen) mit aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte zunächst 20 min bei 80 V, bis die Lauffront das Trenngel erreichte, anschließend für ca. 40 min. bei 80 V.

#### 2.4.3 Immunoblotting

Um die Proteine nach der Gelelektrophorese selektiv durch Antikörpermarkierung (*Immuno-*) darstellen zu können, müssen sie zunächst auf ein stabiles Trägermedium transferiert werden (*-blotting*). Hierzu wurde die Methode nach Towbin verwandt, bei der durch Anlegen eines elektrischen Feldes die Proteine auf eine Nitrozellulosemembran wandern (Towbin et al. 1979): Gel und Membran wurden zwischen mit Blotpuffer befeuchtetes Filterpapier gelegt und in eine entsprechende mit Blotpuffer befüllte Kammer gespannt. Für ca. 1,5 h wurde nun

unter Kühlung mit Eis eine Spannung von 125 V angelegt. Die Lagerung der Membran war hierbei anodenseitig, die des Gels kathodenseitig. Nach der Übertragung der Proteine vom Gel auf die Membran wurde das Gel mit einer Coomassielösung angefärbt, um den Erfolg des Transfers sowie die gleichmäßige Gelbeladung zu kontrollieren.

Die folgenden Schritte dienen der Aufbereitung der Nitrozellulosemembran und der anschließenden immunologischen Markierung: Die Membran wurde zunächst zweimal für 5 min. mit TBST (*Tris buffered saline*, Tween 20) gewaschen. Freie Bindungsstellen der Nitrozellulosemembran wurden durch Inkubation (1 h, Raumtemperatur, unter leichtem Schütteln) einer Blockierungslösung (5% BSA in TBST) abgesättigt. Nun wurde über Nacht bei 4°C unter leichtem Schütteln mit dem Primärantikörper inkubiert (Auflistung aller verwendeten Antikörper siehe Tab. 2.3). Überschüssige Antikörper wurden am nächsten Morgen durch dreimaliges Waschen mit TBST für je 10 min entfernt. Die Membran wurde nun mit einem gegen den Primärantikörper gerichteten Sekundärantikörper inkubiert (1 h, Raumtemperatur, unter Schütteln). Es folgte ein gründlicher Reinigungsschritt mit TBST (6 x 10 min., Raumtemperatur, unter leichtem Schütteln).

#### 2.4.4 Autoradiographie

Die immunchemisch vorbehandelte Membran wurde nun 7 min mit Chemilumineszenzsubstrat (SuperSignal Ultra, Pierce, Rockford, IL, USA) inkubiert. Durch die Peroxidaseaktivität des an den Sekundärantikörper gekoppelten Enzyms wird in Anwesenheit von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Luminol oxidiert, wodurch Licht emittiert wird. Die Lichtemission wurde durch Auflegen eines Röntgenfilms (Biomax, Kodak, Stuttgart) sichtbar gemacht.

Antigen	Primärantikörper (Beschreibung, Verdünnung, Blockierung, Bezugsquelle)	Sekundärantikörper (Beschreibung, Verdünnung, Blockierung, Bezugsquelle)	Bande [kDa]
TotalCREB	Polyklonaler Kanninchen-Anti-CREB-Ig (1:1.000, 5% BSA (w/v), New England BioLabs, Beverly, MA, USA)	HRP <sup>1</sup> -gekoppelter Ziege-anti-Kanninchen IgG (1:25.000, 5% BSA (w/v), Cell Signaling, Beverly, MA, USA)	43
Phospho-CREB (phosphoryliert an Ser133)	Polyklonaler Kanninchen-anti-pCREB (Ser133), detektiert auch ATF-1 und CREM (1:1.000, 5% BSA (w/v), Cell Signaling, Beverly, MA, USA)	HRP <sup>1</sup> -gekoppelter Ziege-anti-Kanninchen IgG (1:25.000, 5% BSA (w/v), Cell Signaling, Beverly, MA, USA)	43 (pCREB), 40 (pATF-1)
p44/42 MAPK (totalMAPK; =totalERK1/2)	Polyklonaler Kanninchen-anti-p44/42 MAPK (1:3.000, 5% BSA (w/v), Cell Signaling, Beverly, MA, USA)	HRP <sup>1</sup> -gekoppelter Ziege-anti-Kanninchen IgG (1:25.000, 5% BSA (w/v), Cell Signaling, Beverly, MA, USA)	44 (ERK1), 42 (ERK2)
p44/42 MAPK, (phosphoryliert an Thr202/Tyr204; =pERK1/2)	Monoklonaler Maus-anti-p44/42 MAPK (Thr202/Tyr204) 1:1.000 5%BSA (w/v), Cell Signaling, Beverly, MA, USA)	HRP <sup>1</sup> -gekoppelter Ziege-anti-Maus IgG (1:25.000, 5% BSA (w/v), Cell Signaling, Beverly, MA, USA)	44 (pERK1), 42 (pERK2)

**Tabelle 2.3:** Liste der verwendeten Antikörper. <sup>1</sup> HRP=*horseradish peroxidase* (Meerrettich-Peroxidase)

#### 2.4.5 Wiederverwenden von Blotmembranen (Membran-Stripping)

Durch eine besondere Behandlung können Membranen mehrfach wieder verwendet werden. Der Vorteil liegt darin, dass man dasselbe Probenmaterial nochmals auf ein anderes Protein hin untersuchen kann, ohne eine neue SDS-PAGE ausführen zu müssen. Ebenso ist ein höheres Maß an Vergleichbarkeit gegeben.

Nach der Autoradiographie wurde die Membran für eine halbe Stunde bei 42°C unter leichtem Schütteln mit Restore Stripping Buffer (Pierce, Rockford, IL, USA) inkubiert. Anschließend wurde zunächst 3x5 min. mit ddH<sub>2</sub>O, dann 3x5 min. mit TBST gewaschen. Der Blockierungsschritt erfolgte in diesem Fall für 45 min mit Roti-Block (Roth, Karlsruhe). Die weitere immunchemische Behandlung erfolgte dann wie oben beschrieben.

#### 2.4.6 Auswertung

Die Auswertung der spezifischen Banden wurde analog der unter 2.3.6. für Agarosegele beschriebenen Methode durchgeführt. Der SumDens-Wert der pCREB-Bande wurde auf die Signalstärke der dazugehörigen CREB-Bande bezogen, das als interner Standard der aufgetragenen Proteinmenge dienen kann (Maronde et al. 1999). Entsprechend wurden SumDens-Werte der pospho-ERK1/2-Banden auf die der Gesamt-ERK1/2-Banden normalisiert. Innerhalb einer Probenreihe wurde nun diese Quotienten auf die Probe mit dem höchsten Wert (= 100 %) bezogen und die übrigen als % davon ausgedrückt. Alle Proben die auf diese Weise ausgewertet wurden, sind jeweils auf demselben Gel gelaufen, bzw. gemeinsam auf einer Membran prozessiert worden.

### 2.5 Statistische Auswertung

Als Nullhypothese wurde festgesetzt, dass alle untersuchten Gruppen derselben Grundgesamtheit entstammen. Der p-Wert gibt die Wahrscheinlichkeit an, zufällige Unterschiede beobachtet zu haben. Statistisch signifikante Unterschiede wurden ab einem p-Wert  $p < 0,05$  angenommen. Alle statistischen Tests wurden mit dem Computerprogramm GraphPad Prism Version 3.0 (GraphPad, San Diego, CA, USA) für mindestens drei unabhängige Experimente durchgeführt.

Zwei Gruppen wurden über den Student t-Test miteinander verglichen, mehrere über eine Varianzanalyse (*one-way analysis of variance*, ANOVA). Teste nach Bonferroni (Vergleich ausgewählter Paare) und Dunnet (Vergleich aller Datensätze mit der Kontrolle) wurden der Varianzanalyse angeschlossen.

Die Daten der Validierungsexperimente wurden mit dem Standardfehler des Mittelwertes ( $\pm$  SEM) und dem 95% Vertrauensintervall (CI) angegeben. Für die Expressionsstudien der einzelnen Gene (mRNA und Protein) wurden jeweils der Mittelwert und der Standardfehler (SEM) mit angezeigt.

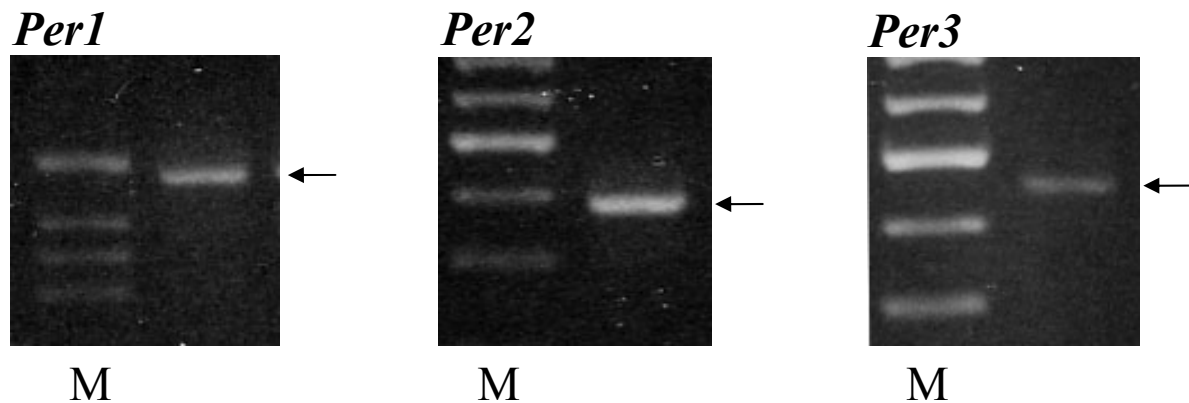
Sofern nicht anders angezeigt, wurden alle Versuche mindestens dreimalig unabhängig voneinander durchgeführt. Generell wurde folgenden Symbole verwendet: ns (nicht signifikant); \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ .



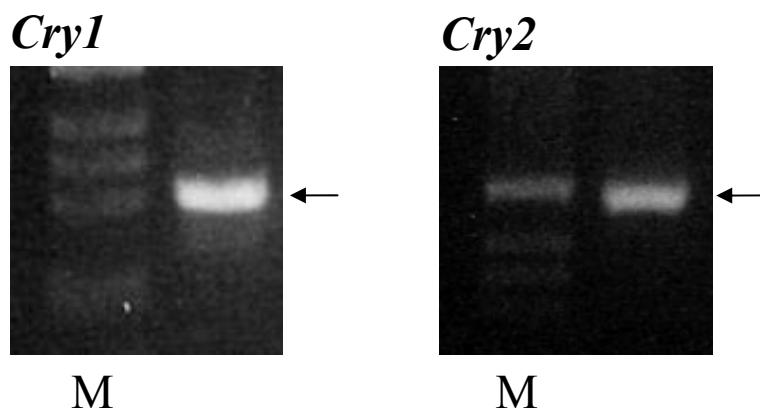
### 3. ERGEBNISSE

#### 3.1 Molekularbiologischer Nachweis von Uhrengenen in AtT-20-Zellen mittels RT-PCR-Techniken

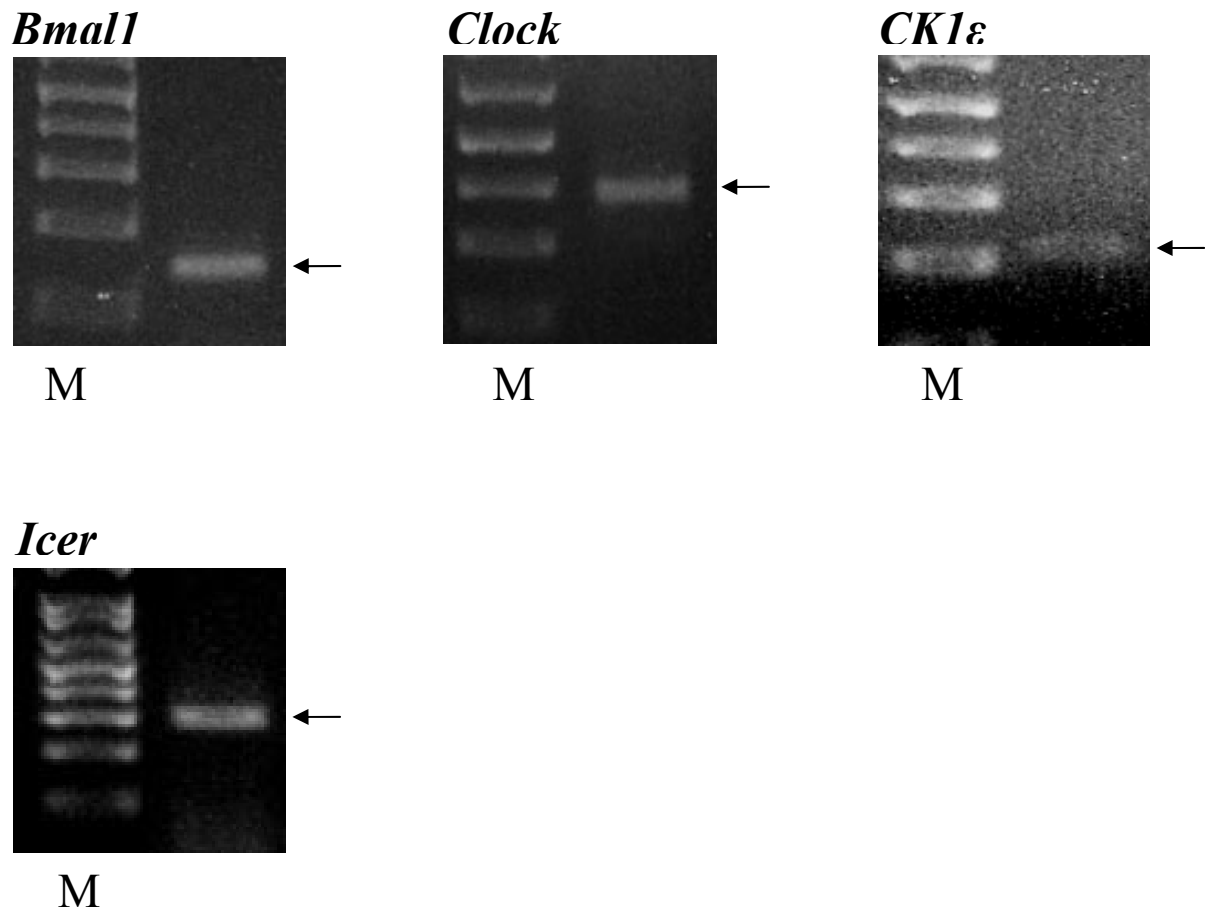
Zum Nachweis von Uhrengenen in AtT-20-Zellen wurde von RNA-Isolationen unstimulierter Zellen cDNA hergestellt. Die cDNA wurde mit hoher Zyklenzahl in einer PCR amplifiziert und das Produkt auf ein Agarosegel aufgetragen. Die Spezifität wurde an Hand eines mitaufgetragenen Größenmarkers bestimmt. Auf diese Weise konnte die mRNA folgender Uhrengene in AtT-20-Zellen nachgewiesen werden: *Per1*, *Per2*, *Per3*, *Bmall*, *CK1 $\epsilon$* , *Clock*, *Cry1* und *Cry2*. Auch der Nachweis der mRNA des inhibitorischen Transkriptionsfaktors *Icer* gelang mit dieser Methode (siehe Abb. 3.1-3.3).



**Abb. 3.1:** Nachweis von cDNA-Fragmenten der *Period*-Familie. Aufgetragen sind auf einem mit Ethidiumbromid gefärbten Agarosegel ein DNA-Größenmarker (M) sowie das jeweilige PCR-Produkt. Mit Pfeil gekennzeichnete Banden entsprechen den zu erwartenden Größen: *Per1* (475 bp), *Per2* (388 bp), *Per3* (460 bp).



**Abb. 3.2:** Nachweis von cDNA-Fragmenten der *Cryptochrom*-Familie. Aufgetragen sind auf einem mit Ethidiumbromid gefärbten Agarosegel ein DNA-Größenmarker (M) sowie das jeweilige PCR-Produkt. Mit Pfeil gekennzeichnete Banden entsprechen den zu erwartenden Größen: *Cry1* (309 bp) und *Cry2* (497 bp).

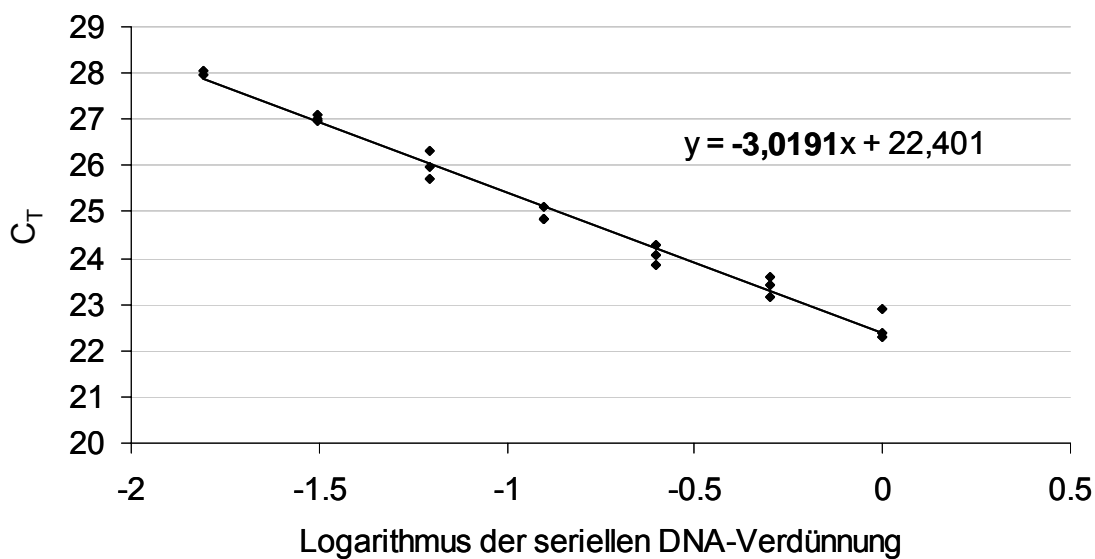


**Abb. 3.3:** Nachweis von cDNA-Fragmenten der Uhrengene *Bmal1*, *Clock* und *CK1ε* sowie von *Icer*. Aufgetragen sind auf einem mit Ethidiumbromid gefärbten Agarosegel ein DNA-Größenmarker (M) sowie das jeweilige PCR-Produkt. Mit Pfeil gekennzeichnete Banden entsprechen den zu erwartenden Größen: *Bmal1* (151 bp), *Clock* (393 bp) und *CK1ε* (207 bp), sowie von *Icer* (285 bp).

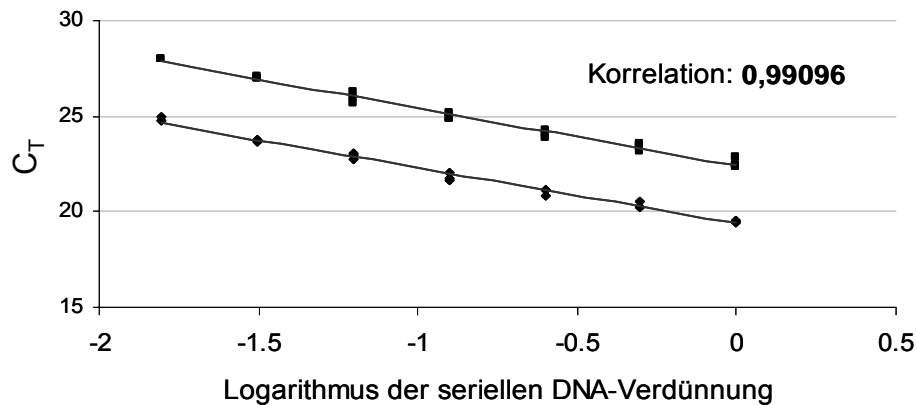
### 3.2 Validierungsexperimente zur $\Delta\Delta C_T$ -Methode

Wie unter 2.3.8 beschrieben, sind Validierungsexperimente notwendig, um mittels der  $\Delta\Delta C_T$ -Methode Aussagen über genexpressive Vorgänge treffen zu können. Hierzu wurde eine 2-fache Verdünnungsreihe der Template-DNA (1-1/64) angefertigt und anschließend eine RTQ-PCR durchgeführt. Aus den Ergebnissen wurden Berechnungen zur Effizienz des gesamten Assays, der Vergleichbarkeit verschiedener Effizienzen und der Konzentrationsabhängigkeit der Amplifikationseffizienz angestellt. Eine 100 %ige Effizienz liegt vor, wenn die Steigung

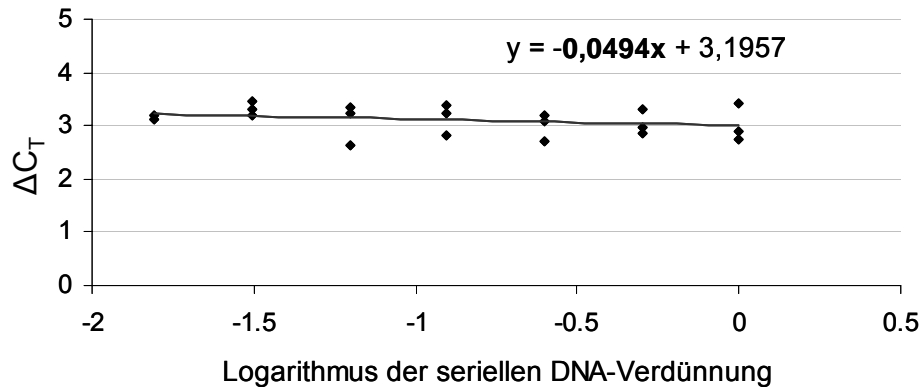
der Geraden (*slope*), die die Amplifikation beschreibt (bei halblogarithmischer Auftragung  $C_T$  vs.  $\log$  Template-Verdünnung), bei  $-3,32$  liegt ( $= 1/\log 0,5$ ; Abb. 3.4). Diese Steigung entspricht der geforderten Verdopplung der DNA-Menge pro PCR-Zyklus. Trägt man parallel die Kurven für das Ziel- und das Referenzgen in einer solchen Darstellung auf, gibt die Korrelation der beiden Geraden Aufschluss über die Vergleichbarkeit entsprechender Effizienzen (Abb.3.5). Über eine möglichst niedrige Steigung (sog.  $\Delta slope$ ;  $< 0,1$ ) bei der Auftragung  $\Delta C_T$  vs.  $\log$  Template-Verdünnung wird direkt ablesbar, ob die Effizienzen von Ziel- und Referenzgen sich bei unterschiedlichen Template-Konzentrationen ähnlich zueinander verhalten (Abb. 3.6). Die hier aufgeführten Ergebnisse der Validierungsexperimente erfüllen die von der Firma ABIPrism aufgestellten Forderungen zur Verwendung der  $\Delta\Delta C_T$ -Methode (Vgl. ABIPrism User Bulletin #2).



**Abb. 3.4:** Assayeffizienz am Beispiel des *Per1*-Genes. Der  $C_T$ -Wert ist halblogarithmisch gegen die serielle Template-Verdünnung aufgetragen. Aus der Geradengleichung ist die Steigung mit  $-3,0191$  (*slope*) zu erkennen, was nahe an der optimalen Effizienz liegt  $-3,32$  liegt.



**Abb. 3.5:** Korrelationsanalyse von Zielgen und Haushaltsgen *Hprt* am Beispiel des *Per1*-Genes: Die  $C_T$ -Werte von *Per1* und *Hprt* sind halblogarithmisch gegen die serielle Template-Verdünnung aufgetragen. Die Korrelation beider Geraden beträgt hier 0,99096.



**Abb. 3.6:** Konzentrationsunabhängigkeit des  $\Delta C_T$ -Wertes am Beispiel des *Per1*-Genes. Der  $\Delta C_T$ -Wert ist halblogarithmisch gegen die serielle Template-Verdünnung aufgetragen. Die Steigung der Geraden liegt bei -0,0494 (*Slope*, gefordert  $< 0,1$ ), was nochmals die Parallelität der  $C_T$  vs. der Template-Verdünnungs-Geraden im untersuchten Bereich verdeutlicht.

### 3.2.1 Konstant hohe Amplifikationsraten verwendeter DNA-Fragmente im Real Time-Assay

Die Analyse der PCR-Effizienz mittels deskriptiver Statistik (Tab.3.1) ergab durchweg für alle untersuchten cDNA-Fragmente eine hohe DNA-Amplifikationsrate, gemessen an der

Steigung der Geraden, die nahe bei -3,32 lag, was der geforderten Verdopplung der DNA-Menge pro PCR-Zyklus entspricht.

Gen	$\mu$ slope	SEM	95%-CI
<i>Bmall</i>	-3,104	0,0899	-3,491; -2,717
<i>CK1<math>\epsilon</math></i>	-3,287	0,1418	-3,897; -2,677
<i>Clock</i>	-3,271	0,0078	-3,305; -3,238
<i>Cry1</i>	-3,377	0,0299	-3,502; -3,252
<i>Cry2</i>	-3,293	0,0601	-3,552; -3,035
<i>Hprt</i>	-3,117	0,1399	-3,718; -2,515
<i>Icer</i>	-3,233	0,1012	-3,668; -2,797
<i>Per1</i>	-3,115	0,0572	-3,297; -2,933
<i>Per2</i>	-3,005	0,1108	-3,482; -2,528
<i>Per3</i>	-3,223	0,0989	-3,649; -2,798

**Tabelle 3.1:** Assayeffizienz, dargestellt an Hand der Steigung der Geraden (*slope*). Mit  $\mu$ = Mittelwert, SEM= Standardfehler vom Mittelwert, 95%-CI (*confidence intervall*) = 95 %-Vertrauensbereich.

### 3.2.2 Die Amplifikationsrate des Zielgens verhält sich regelmäßig parallel zu der des Haushaltsgens *Hprt*

Die Untersuchung der Korrelation zwischen Zielgen und Haushaltsgen belegt, dass die Amplifikationsraten im untersuchten Verdünnungsbereich jeweils parallel mit denen des Haushaltsgens *Hprt* verlaufen, i. e. die Y-Werte ( $C_T$ ) beider Gene sich in Abhängigkeit von der eingesetzten Templatmenge gleichsinnig verhalten (Tab. 3.2). Die mittlere Korrelation der Geraden lag bei allen untersuchten cDNA-Fragmenten bei über 0,99.

Gen	$\mu$ Korrelation	SEM	95%-CI
<i>Bmall</i>	0,9922	0,0013	0,9868; 0,9976
<i>CK1<math>\epsilon</math></i>	0,9960	0,0007	0,9928; 0,9992
<i>Clock</i>	0,9953	0,0017	0,9880; 1,003
<i>Cry1</i>	0,9939	0,0021	0,9850; 1,003
<i>Cry2</i>	0,9941	0,0029	0,9818; 1,007
<i>Hprt</i>	-	-	-
<i>Icer</i>	0,9921	0,0010	0,9879; 0,9963
<i>Per1</i>	0,9939	0,0015	0,9891; 0,9986
<i>Per2</i>	0,9971	0,0024	0,9869; 1,007
<i>Per3</i>	0,9911	0,0002	0,9904; 0,9918

**Tabelle 3.2:** Vergleichbarkeit der Amplifikationseffizienzen zwischen Zielgen und Haushaltsgen (*Hprt*), dargestellt an Hand der Korrelation der beiden Geraden ( $C_T$  vs. Verdünnung, halblogarithmisch aufgetragen). Mit  $\mu$ = Mittelwert, SEM= Standardfehler vom Mittelwert, 95%-CI = 95 % -Vertrauensbereich.

### 3.2.3 Konstanter Abstand der Verdünnungsgeraden von Zielgen und Haushaltsgen ( $\Delta slope$ )

In Ergänzung zur Korrelationsanalyse ist auch das Amplifikationsverhältnis zwischen Zielgen und Haushaltsgen in Abhängigkeit der Templatekonzentration im untersuchten Verdünnungsbereich konstant. Der Parameter  $\Delta slope$  berücksichtigt zusätzlich, ob sich die beiden Verdünnungsgeraden, auch wenn sie sich gleichsinnig verhalten, von einander wegbewegen, oder einander annähern, wodurch es zu einer Verzerrung der Ergebnisse käme (Abb. 3.6). Der mittlere Wert für das  $\Delta slope$  liegt bei den verwendeten DNA-Fragmenten und im untersuchten Verdünnungsbereich regelmäßig unter dem vom Hersteller ABI Prism geforderten Wert von 0,1 (Tab. 3.3).

Gen	$\mu$ <i>Δslope</i>	SEM	95%-CI
<i>Bmall</i>	0,03746	0,0116	-0,01263; 0,0875
<i>CK1ε</i>	0,09001	0,0298	-0,03801; 0,2180
<i>Clock</i>	0,06718	0,0100	0,02420; 0,1102
<i>Cry1</i>	0,04552	0,0427	-0,1384; 0,2294
<i>Cry2</i>	0,04936	0,0071	0,0188; 0,07987
<i>Hprt</i>	-	-	-
<i>Icer</i>	0,04743	0,0266	-0,06720; 0,1621
<i>Per1</i>	0,04615	0,0047	0,03129; 0,06101
<i>Per2</i>	0,06170	0,0189	-0,01961; 0,1430
<i>Per3</i>	0,05966	0,0222	-0,03589; 0,1552

**Tabelle 3.3:** Konzentrationsunabhängigkeit des  $\Delta C_T$ -Wertes, dargestellt an Hand der Steigung der Geraden ( $\Delta C_T$  vs. Verdünnung, in halblogarithmischer Darstellung). Mit  $\mu$ = Mittelwert, SEM= Standardfehler vom Mittelwert, 95%-CI = 95 % -Vertrauensbereich.

### 3.3 Stimulationsversuche mit Forskolin zur Induktion relevanter Uhrengene und von

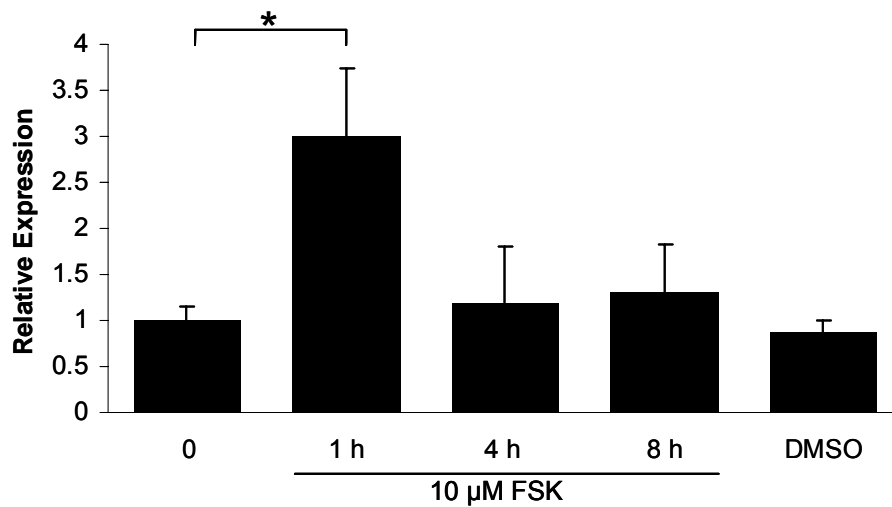
#### *Icer*

#### 3.3.1 Forskolin induziert einen raschen Anstieg an *Per1* mRNA in AtT-20 Zellen

Zur Überprüfung, ob sich *Per1* auch in AtT-20 Zellen durch FSK induzieren lässt, wurden AtT-20 Zellen für 2 h mit 10  $\mu$ M Forskolin behandelt. Bei der Expressionsanalyse mittels RTQ-PCR ( $\Delta\Delta C_T$ -Methode) zeigte sich eine signifikante Zunahme der *Per1*-Expression bereits nach einer Stunde im Vergleich zur unstimulierten Zellkultur ( $p < 0,05$ ;  $n = 7$ ). Das Expressionsniveau befand sich 4 h nach Stimulationsbeginn wieder auf dem Niveau der unstimulierten Probe. Eine Kontrollgruppe, die für 1 h nur mit der entsprechenden Menge des



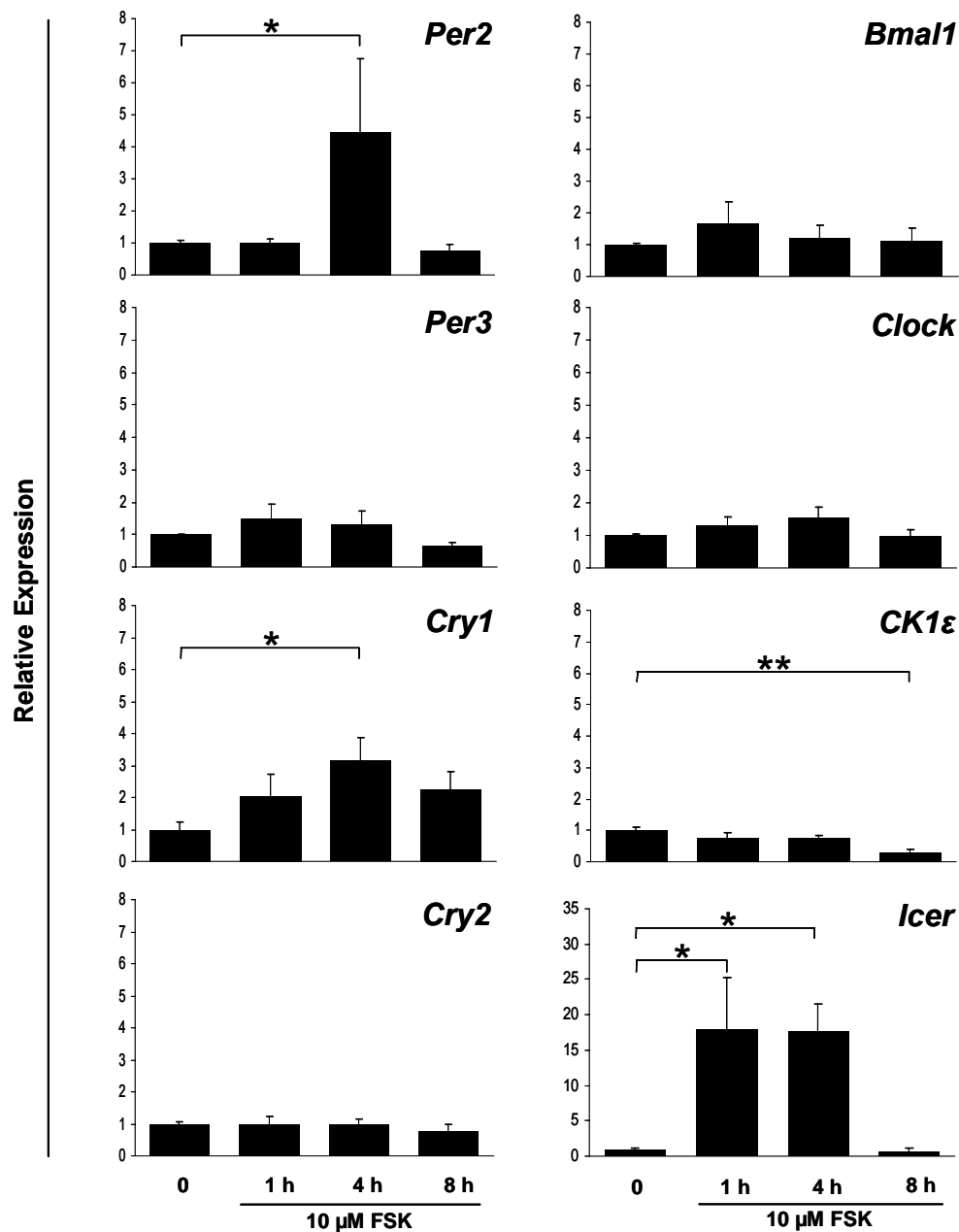
Lösungsmittels (DMSO) behandelt wurde, zeigte hingegen keinen Unterschied in der *Per1*-Expression im Vergleich zur unstimulierten Probe (Abb.3.7).



**Abb. 3.7:** Induzierbarkeit von *Per1* mRNA. Durch Behandlung der Zellen mit 10µM Forskolin (FSK) über eine Stunde steigt die Expression von *Per1* auf das ca. 3-fache im Vergleich zur unstimulierten Probe (0) an ( $p < 0,05$ ;  $n = 7$ ). Nach 4 h entspricht das Expressionsniveau praktisch wieder dem der unstimulierten Probe. Eine nur mit Lösungsmittel (DMSO) ohne FSK behandelte Zellkultur zeigt keine signifikante Veränderung der *Per1*-Expression. Statistische Auswertung: ANOVA mit Zusatztest nach Dunnett, dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SEM.

### 3.3.2 Differenzieller Einfluss von Forskolin auf die Induktion von *Per2-3*, *Cry1-2*, *Bmall*, *Clock* und *CK1ε*, sowie von *Icer*

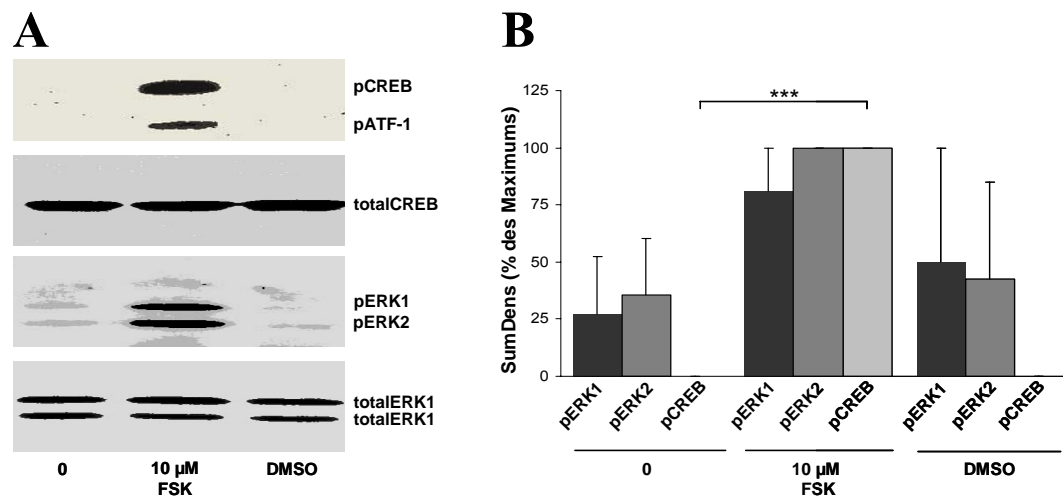
Weiterhin wurde der Einfluss von Forskolin auf die Expression der übrigen Uhrgene *Per2-3*, *Cry1-2*, *Bmall*, *Clock*, *CK1ε* sowie von *Icer* innerhalb der ersten 8 h nach Stimulation untersucht (Abb 3.8). Hierbei konnte eine signifikante Zunahme der Expression für *Per2* nach 4 h ( $p < 0,05$ ;  $n = 3$ ), für *Cry1* nach 4 h ( $p < 0,05$ ;  $n = 5$ ) und für *Icer* bereits nach 1 h ( $p < 0,05$ ;  $n = 3$ ) festgestellt werden. Besonders stark ist hierbei die Induktion von *Icer*, die im Bereich des 18-fachen in Bezug auf die unstimulierte Probe liegt. Auch nach 4 h ist die Expression von *Icer* noch um das etwa 17,5-fache erhöht ( $p < 0,05$ ;  $n = 3$ ). *Cry2*, *Bmall* und *Clock* zeigen keine signifikante Veränderung der Expression im Untersuchungszeitraum. Für die *CK1ε* wurde, bei konstitutiver Expression innerhalb der ersten 4 h nach Stimulation, eine signifikante Abnahme des cDNA-Gehaltes nach 8 h auf ca. die Hälfte des unstimulierten Ausgangswertes beobachtet ( $p < 0,01$ ;  $n = 3$ ).



**Abb. 3.8:** Induzierbarkeit von *Per2-3*, *Cry1-2*, *Bmal1*, *Clock*, *CK1ε* und *Icer* mRNA. Behandlung mit 10 μM Forskolin induziert die Expression von *Per2* mit einem Spitzenwert nach 4 h ( $p < 0,05$ ;  $n = 3$ ), für *Cry1* nach 4 h ( $p < 0,05$ ;  $n = 5$ ) und für *Icer* eine etwa 18-fach erhöhte Expression nach 1 h im Vergleich zur unstimulierten Probe ( $p < 0,05$ ;  $n = 3$ ). Auch nach 4 h ist die Expression von *Icer* noch um das 17,5-fache erhöht ( $p < 0,05$ ;  $n = 3$ ). Unverändert bleibt hingegen die Expression von *Per3*, *Cry2*, *Bmal1* und *Clock*. *CK1ε* wird nach 8 h herunterreguliert ( $p < 0,01$ ;  $n = 3$ ). Statistische Auswertung: ANOVA mit Zusatztest nach Dunnet, dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SEM.

### 3.3.3 Forskolin-abhängige Phosphorylierung von CREB und MAPK

Der unter 3.3.1 gezeigte Anstieg an *Per1*-Transkripten sollte korreliert werden mit dem Auftreten von aktiviertem (phosphoryliertem) CREB sowie von phosphorylierter MAPK (pERK1/2) in AtT-20 Zellen. Proteinextrakte mit anschließendem Immunoblot wurden von unstimulierten Zellen (0), von für 1 h mit 10  $\mu$ M Forskolin stimulierten sowie von für 1 h mit Lösungsmittel behandelten Zellen (DMSO) angefertigt. Es wurden spezifischer Antikörper gegen pCREB (phosphoryliert am Serin133), Gesamt-CREB (totalCREB), phosphorylierte MAPK (pERK1/2) und Gesamt-MAPK (totalERK1/2) eingesetzt. Repräsentative Blot-Ergebnisse sind in Abb. 3.9 dargestellt. Hierbei zeigte sich eine signifikante Zunahme des pCREB-Signals nach einstündiger FSK-Stimulation gegenüber der unstimulierten Probe ( $p < 0,001$ ;  $n = 3$ ). Eine Behandlung mit DMSO hatte keinen Einfluss auf die Aktivierung von CREB. Veränderungen des pERK1/2-Signals zeigten keine signifikanten Werte wegen einer hohen Variabilität in der 0- und DMSO-Kontrolle.



**Abb. 3.9:** Phosphorylierung von CREB und MAPK durch Stimulation mit Forskolin (FSK) in AtT-20 Zellen. Immunchemische Darstellung von phosphoryliertem (Ser133) CREB (pCREB), totalCREB, phosphorylierter MAPK (pMAPK; pERK1/pERK2) und totalMAPK (totalERK1/totalERK2). Verglichen wurden Proteinextrakte aus unstimulierten Zellen (0), Zellen, die 1 h mit 10  $\mu$ M FSK behandelt wurden, bzw. 1 h das Lösungsmittel (DMSO) als Zusatz zum Kulturmedium erhielten. Statistische Auswertung: ANOVA mit Zusatztest nach Dunnett, dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SEM. **A:** Repräsentative Darstellung der gesuchten Proteine im Immunoblot. Das pCREB-Immunsignal (43 kDa, obere Bande) ist in unstimulierten Proben, sowie der DMSO-Kontrolle praktisch nicht zu erkennen, erscheint aber deutlich nach einstündiger FSK-Behandlung. Vom Antikörper mit erkannt wird pATF-1 (untere Bande im pCREB-Blot). Keine relevanten Signalunterschiede zeigen sich hingegen in den totalCREB-Banden (43 kDa). Auch pERK1 (44 kDa, obere Bande) und pERK2 (42 kDa, untere Bande) zeigen eine deutliche Zunahme des Immunsignals nach FSK gegenüber den Kontrollen (0, DMSO) bei konstitutivem totalERK1/2 (Banden bei 44 und 42 kDa). **B:** Semiquantitative Analyse der Immunreaktivität. Die spezifischen Immunsignale von pERK2, pERK1 und pCREB, ausgedrückt als SumDens-Werte, wurden gegen die der entsprechenden Gesamtproteinform (totalERK1, totalERK2 und totalCREB) normalisiert. Der jeweilige Spitzenwert wurde 100 % gesetzt, die übrigen Werte als % davon ausgedrückt. Deutlich signifikant ist die Zunahme des pCREB-Signals nach 10  $\mu$ M FSK-Stimulation gegenüber der unstimulierten Probe ( $p < 0,001$ ;  $n = 3$ ). Durch die hohe Variabilität in der 0- und DMSO-Kontrolle bleiben die Veränderungen bei pERK1/2 nicht signifikant.

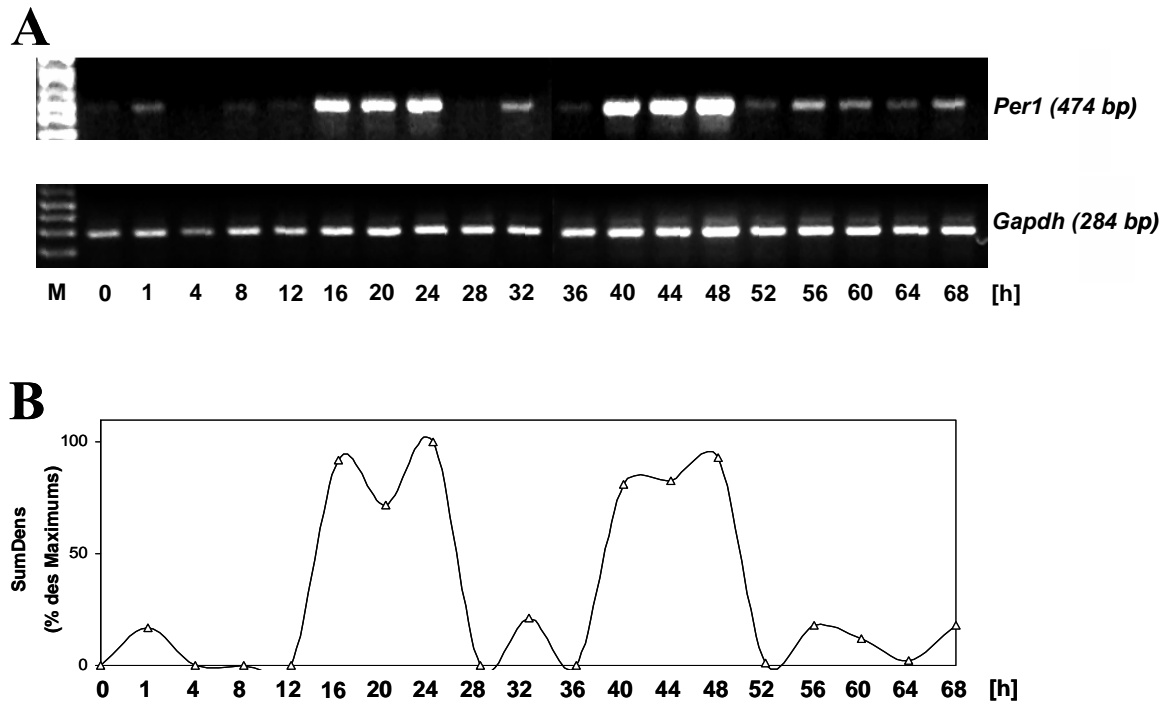
### 3.4 Forskolin-induzierte zirkadiane Expression von Uhrengenen in AtT-20 Zellen

Eine Aktivierung von CREB und MAPK durch eine Aktivierung der Adenylatzyklase in AtT-20 Zellen konnte bereits in Vorversuchen (siehe 3.3.3) dokumentiert werden. AtT-20 Zellen wurden zum Nachweis einer rhythmischer Genexpression für 2 h mit 10  $\mu$ M Forskolin behandelt (in regulärem Kulturmedium). Die Zellen waren mindestens 4 Tage zuvor ausplattiert

worden und der letzte Mediumwechsel lag 24 h zurück. Anschließend wurden die Zellen in serumfreies Medium überführt, um eine weitere Zellproliferation zu unterdrücken. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden über 3 Tage (72 h) die Zellen geerntet, RNA isoliert, auf cDNA umgeschrieben und in einer PCR amplifiziert.

#### *3.4.1 Semiquantitative Darstellung zirkadianer Uhrengen-Expression mittels RT-PCR*

Zunächst wurden in einer Standard-PCR cDNA-Proben verschiedener Zeitpunkte nach Forskolin-Stimulation amplifiziert, gelelektrophoretisch aufgetragen, densitometrisch ausgewertet, der SumDens-Wert auf das Haushaltsgen (*Gapdh*) normalisiert und als % des Maximums ausgedrückt (Abb. 3.10). Es zeigte sich bereits beim ersten Versuch dieser Art nach einer initialen Zunahme der *Per1* mRNA nach 1 h weitere deutliche Spitzen im Fluoreszenzsignal nach 20 h (16-24 h) sowie nach 44 h (40-48 h), die somit eine zirkadiane Periode von etwa 24 h umschreiben. Im *Gapdh*-Signal sind hingegen keine Schwankungen zu erkennen, die Expression erscheint konstitutiv.



**Abb. 3.10:** Semiquantitative Darstellung zirkadianer *Per1*-Expression in AtT-20 Zellen mittels RT-PCR. AtT-20 Zellen wurden initial mit 10  $\mu$ M Forskolin stimuliert und die Reaktion zu angegebenen Zeitpunkten beendet. Die Expression spezifischer DNA-Fragmente wurde über semiquantitative RT-PCR analysiert. **A:** Ethidiumbromid-gefärbte Agarosegele zeigen die spezifischen PCR-Produkte *Per1* und *Gapdh* einer Stimulationreihe. Die einzelnen Banden entsprechen den unten gekennzeichneten Zeitpunkten (Stunden nach Stimulation). Mit aufgetragen ist zur Bandenselektion ein DNA-Größenmarker (M). Spitzen im *Per1* Fluoreszenzsignal sind zu erkennen zu den Zeitpunkten 1 h, 16-24 h und 40-48 h. Hingegen sind im *Gapdh*-Signal keine deutlichen Schwankungen zu erkennen. **B:** Die mit Ethidiumbromid gefärbten Banden einer Stimationsreihe wurden densitometrisch ausgewertet, der SumDens-Wert auf das Haushaltsgen (*Gapdh*) normalisiert und als % des Maximums ausgedrückt. Die Spitzenwerte liegen nach augenscheinlicher Beurteilung für *Per1* bei 1 h, 16-24 h, 40-48 h.

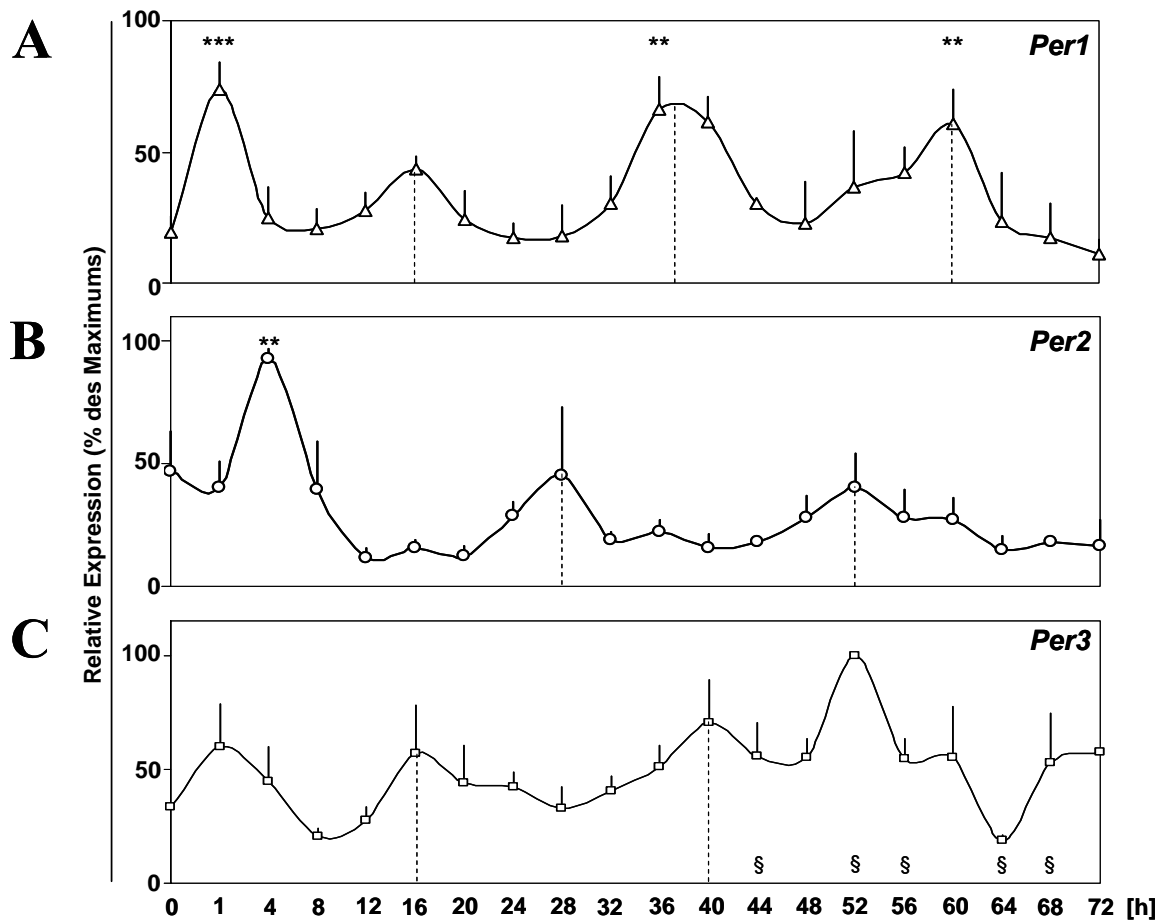
### 3.4.2 Quantitative Analyse zirkadianer Uhrengenen-Expression mittels RTQ-PCR

Die unter 3.4.1 dargestellten Ergebnisse sollten durch eine sensitivere und leistungsfähigere Methode bestätigt und erhärtet werden. Die cDNA mit Forskolin stimulierter Proben wurde in einem Real-Time Thermocycler (ABIPrism) amplifiziert und am Ende jedes Zyklus die Fluoreszenz automatisiert gemessen. Anhand der an einer willkürlich angelegten Schwelle im Fluoreszenz-Zyklus-Diagramm wurde der  $C_T$ -Wert für jede Probe bestimmt, auf das Haushaltsgen *Hprt* normalisiert und hieraus über die  $\Delta\Delta C_T$ -Methode die relative Expression

berechnet. Die Probe mit der maximalen Expression wurde 100% gesetzt, die übrigen Werte einer Probenreihe als % davon ausgedrückt.

#### *3.4.2.1 Die Expression von Period-Genen folgt einer zirkadianen Rhythmik in AtT-20 Zellen nach Forskolin-Stimulation*

Die Betrachtung der erhaltenen Daten für das *Per1*-Gen zeigt, dass eine zweistündige Forskolin-Behandlung nach einer raschen initialen Hoch- und anschließenden Herunterregulation der Expression nach 1 h ( $p < 0,001$ ;  $n = 7$ ), ein rhythmisches Expressionsmuster für etwa drei zirkadiane Zyklen hervorrufen kann. Es konnten Spitzenwerte nach 16 h, 36-40 h (24 h vs. 36 h;  $p < 0,01$ ;  $n = 7$ ) sowie nach 60 h (60 h vs. 72 h;  $p < 0,01$ ;  $n = 6$ ) beobachtet werden, so dass zwischen den Spitzenwerten eine Zeitspanne mit niedrigen Werten von etwa 22-24 h eingeschlossen wird (Abb. 3.11 A). Der *Per2*-mRNA-Gehalt nimmt 4 h nach Beginn der Stimulation signifikant zu (4 h vs. 0;  $p < 0,01$ ,  $n = 5$ ), weitere Spitzenwerte liegen nach 28 h und 52 h (Abb. 3.11 B). Auch im Falle von *Per2* wird somit ein etwa 24-stündiges Intervall eingeschlossen, das allerdings im Vergleich zu *Per1* um ca. 12 h zeitversetzt erscheint. Bei *Per3* fehlt eine signifikante initiale Expressionszunahme als Antwort auf den Forskolin-Stimulus, Spitzenwerte liegen bei 16 h, 40h und 52 h (Abb. 3.11 C).



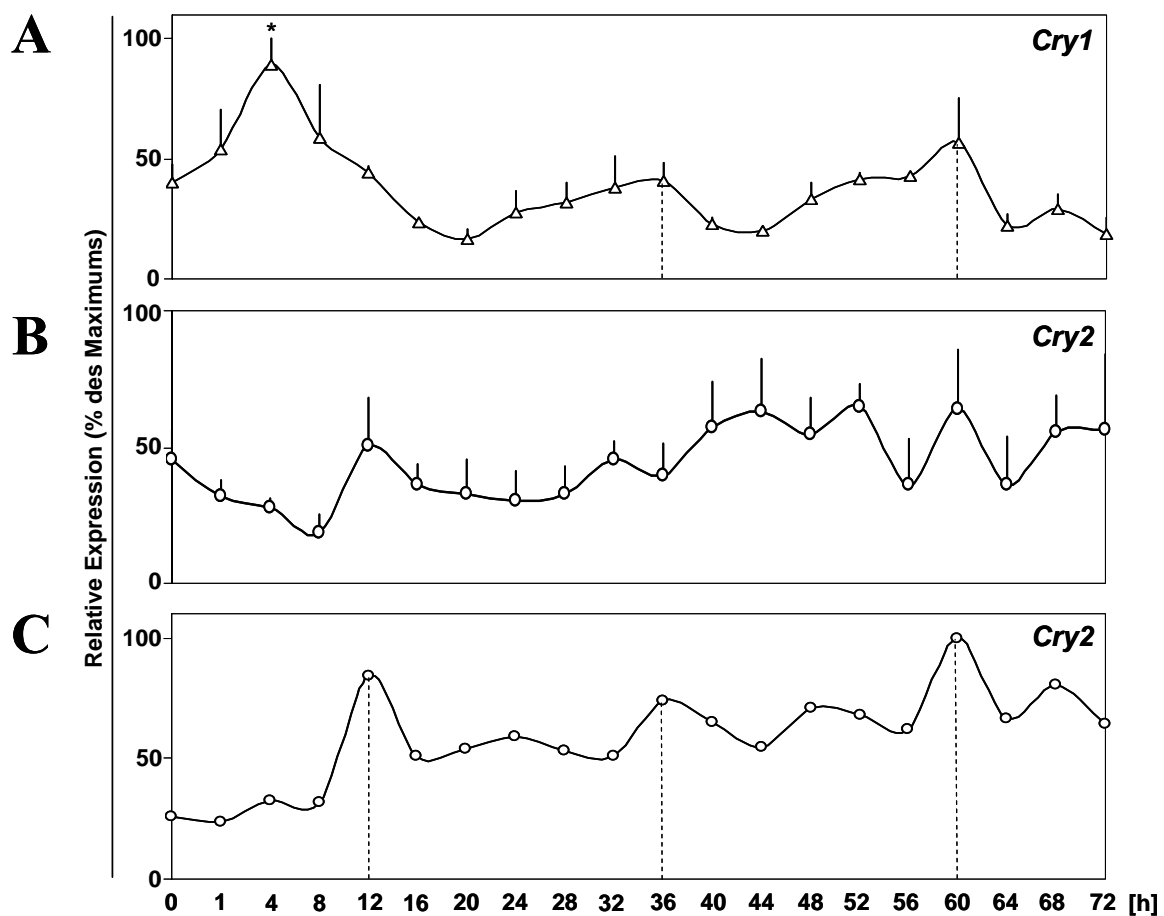
**Abb. 3.11:** Zirkadiane Expression von *Period*-Genen. AtT-20 Zellen wurden für 2 h mit 10  $\mu$ M Forskolin stimuliert. Zu den angegebenen Zeitpunkten nach Beginn der Stimulation wurden die Zellen geerntet und die Genexpression mittels RTQ-PCR analysiert ( $\Delta\Delta C_T$ -Methode), das jeweilige Maximum ist mit 100% angegeben. Statistische Auswertung: ANOVA mit Zusatztest nach Bonferroni, dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SEM. **A:** *Per1* zeigt nach einem signifikanten initialen Spitzenwert bei 1 h (verglichen mit der unstimulierten Probe;  $p < 0,001$ ;  $n = 7$ ) drei weitere Spitzen in den 72 h nach Stimulation. Diese liegen bei 16 h, 36-40 h (24 h vs. 36 h;  $p < 0,01$ ;  $n = 7$ ) sowie 60 h (60 h vs. 72 h;  $p < 0,01$ ;  $n = 6$ ) und umspannen so zwei etwa 24-stündige Zwischenintervalle mit niedrigen Werten. **B:** Expressionsprofil von *Per2* im 72 h-Zeitverlaufsexperiment. *Per2* steigt 4 h nach Stimulation an (4 h vs. 0 h;  $p < 0,01$ ,  $n = 5$ ), weitere Spitzen liegen bei 24 h und 52 h, und sind somit in Bezug auf *Per1* etwa 12 h zeitversetzt. **C:** *Per3* zeigt keinen signifikanten Spitzenwert in den ersten 8 h nach Stimulation. Zwei Spitzen bei 16 h und um 40 h liegen zeitlich mit denen von *Per1*. Ein weiterer Spitzenwert liegt bei 52 h, gefolgt von einem Tal bei 64 h (§:  $n = 2$ ).

#### 3.4.2.2 Die Expression von Cryptochrom-Genen verläuft synchron zur *Per*-Expression

Das *Cry1*-Expressionsprofil zeigt im 72 h-Zeitverlauf nach einem signifikanten Spitzenwert 4 h nach Stimulationsbeginn (4 h vs. 0;  $p < 0,05$ ;  $n = 5$ ) zwei weitere Spitzen bei 36 h und 60 h (Abb. 3.12 A), die zeitlich zusammenfallen mit den Spitzenwerten des *Per1*-Expressionsmuster (36-40 h und 60 h, vgl. Abb. 3.11 A). Die Mittelwerte der *Cry2*-



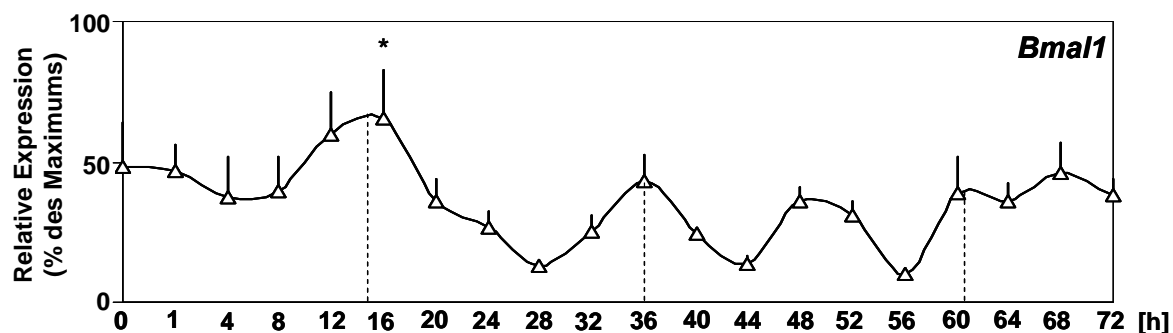
Expression hingegen scheinen nur geringen Schwankungen zu unterliegen und zeigen keine erkennbare zirkadiane Rhythmik (Abb. 3.12 B). In der Analyse von *Cry2*-mRNA-Mengen einzelner Stimulationsversuche wurden bei insgesamt geringen Expressionsunterschieden Spitzen nach 12 h, 36 h und 60 h erkennbar, die jeweils ein etwa 24-stündiges Intervall umspannen (Abb. 3.12 C). Die Spitzenwerte nach 36 h und 60 h korrelieren zudem mit den entsprechenden Spitzenwerten der *Cry1*-Expression. Auf einem niedrigen Niveau scheint also auch *Cry2*, zumindest in einzelnen Stimulationen, zirkadian zu fluktuieren.



**Abb. 3.12:** Expressionsmuster von Cryptochrom-Genen im 72 h–Zeitverlaufsexperiment nach Forskolin-Stimulation. Zu den angegebenen Zeitpunkten nach Beginn der Stimulation wurden die Zellen geerntet und Genexpression mittels RTQ-PCR analysiert ( $\Delta\Delta C_T$ -Methode), das jeweilige Maximum ist mit 100% angegeben. Statistische Auswertung: ANOVA mit Zusatztest nach Bonferroni, dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SEM. **A:** Signifikante Hochregulation der *Cry1*-Expression bei 4 h nach Stimulationsbeginn (4 h vs. 0;  $p < 0,05$ ;  $n = 5$ ). Im weiteren Verlauf treten Spitzen bei 36 h und 60 h auf. **B:** Die Mittelwerte der Expression von *Cry2* zeigen keine signifikanten Spitzen, insgesamt erscheint der Verlauf der Expression nur geringen Schwankungen unterworfen zu sein. **C:** Bei der Analyse von *Cry2* eines einzelnen Stimulationsversuchs sind bei insgesamt geringen Expressionsunterschieden Spitzenwerte nach 12 h, 36 h und 60 h zu erkennen. Sie schließen jeweils ein etwa 24-stündiges Intervall ein, und die beiden letzten korrelieren mit entsprechenden Spitzen der *Cry1*-Expression.

### 3.4.2.3 Die *Bmal1*-Expression verläuft rhythmisch in Antiphase zur *Per2*-Expression

Der *Bmal1*-mRNA-Gehalt im 72 h-Zeitverlauf zeigt Spitzenwerte nach 12-16 h (1 h vs. 16 h,  $p < 0,05$ ;  $n = 5$ ), 36 h, 48-52 h und 60-68 h (Abb. 3.13). Die ersten beiden Gipfel schließen ein etwa 24-stündiges Intervall mit niedrigen Werten ein, in dem *Per2* einen Spitzenwert aufweist (28 h, siehe oben). Die sich dem *Bmal1*-Spitzenwert um 36 h nach Beginn der Stimulation anschließenden Gipfel folgen in einem nur 12-stündigen Intervall.

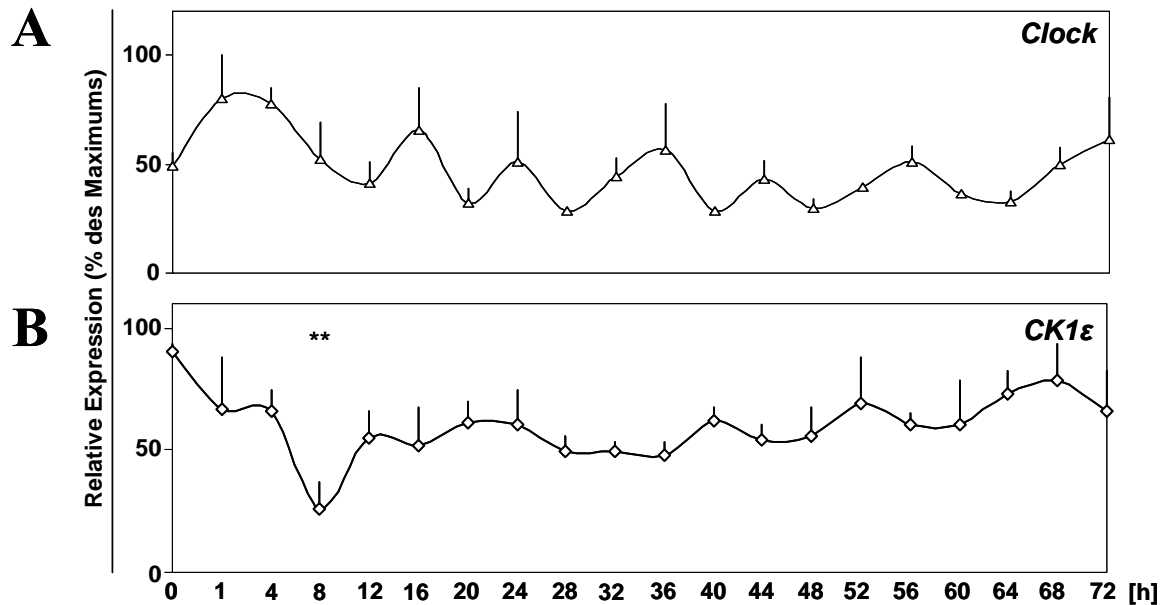


**Abb. 3.13:** Expressionsmuster von *Bmal1* im 72 h-Zeitverlaufsexperiment nach Forskolin-Stimulation. Zu den angegebenen Zeitpunkten nach Beginn der Stimulation wurden die Zellen geerntet und die Genexpression mittels RTQ-PCR analysiert ( $\Delta\Delta C_T$ -Methode), das jeweilige Maximum ist mit 100% angegeben. Statistische Auswertung: ANOVA mit Zusatztest nach Bonferroni, dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SEM. Spitzenwerte liegen bei 12-16 h nach Stimulationsbeginn (16 h vs. 1 h,  $p < 0,05$ ;  $n = 5$ ), 36 h gefolgt von einem weiteren Spitzenwert bei 36, 48-52 h und 60-68 h.

### 3.4.2.4 *Clock* und *CK1ε* zeigen keine zirkadiane Schwankungen im Expressionsprofil

Im 72 h-Zeitverlaufsexperiment nach initialer Forskolin-Stimulation zeigt *Clock* in AtT-20 Zellen keine zirkadiane Oszillation der Genexpression (Abb. 3.14 A). Die Expression fluktuiert ohne zeitlichen Bezug zur *Per1*-Rhythmik um ein mittleres Expressionsniveau (Mittelwert:  $47,36 \% \pm 3,37$ ), das in etwa der unstimulierten Probe entspricht ( $49,18 \% \pm 5,74$ ;  $p = 0,8225$ ; Student t-Test).

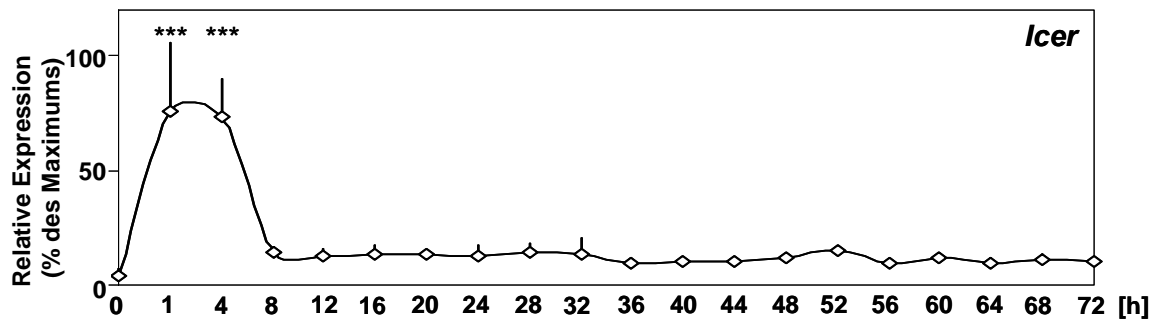
Die Expression von *CK1ε* zeigt ebenfalls keine zirkadiane Rhythmik (Abb. 3.14 B). Bemerkenswert ist eine hochsignifikante Herunterregulation der Expression 8 h nach Beginn der Forskolin-Behandlung (8 h vs. 0 h;  $p < 0,01$ ;  $n = 3$ ). Zum nächsten Untersuchungszeitpunkt 12 h nach FSK-Stimulation entspricht die Expression bereits wieder dem 4 h-Wert. Bis auf den solitären Tiefpunkt bei 8 h zeigt *CK1ε* ein konstitutives Expressionsmuster.



**Abb. 3.14:** Expressionsmuster von *Clock* und *CK1ε* im 72 h–Zeitverlaufsexperiment nach Forskolin-Stimulation. Zu den angegebenen Zeitpunkten nach Beginn der Stimulation wurden die Zellen geerntet und Genexpression mittels RTQ-PCR analysiert ( $\Delta\Delta C_T$ -Methode), das jeweilige Maximum ist mit 100% angegeben. Statistische Auswertung: ANOVA mit Zusatztest nach Bonferroni, dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SEM. **A:** *Clock* zeigt im 72 h-Zeitverlauf keine signifikanten Schwankungen, die Expression scheint ohne zirkadianem Bezug in einem gewissen Umfang um ein mittleres Niveau zu oszillieren. **B:** Die Expression von *CK1ε* nimmt zum Zeitpunkt 8 h signifikant ab (0 h vs. 8 h;  $p < 0,05$ ;  $n = 3$ ). Im weiteren Verlauf scheint *CK1ε* konstitutiv exprimiert zu werden, die Schwankungen liegen in einem engeren Bereich als die von *Clock*.

#### 3.4.2.5 *Icer* mRNA korreliert zeitlich nur mit dem initialen *Per1*-Spitzenwert

Der Forskolin-Stimulus resultiert in einer starken Hochregulation der *Icer*-Expression in AtT-20 Zellen innerhalb der ersten 4 h (0 h vs. 1 h; 0 h vs. 4;  $p < 0,001$ ;  $n = 3$ ; siehe auch 3.3.2). Im weiteren Verlauf (72 h) kommt es nicht mehr zu solchen Schwankungen im *Icer* mRNA-Gehalt (Abb. 3.15 A), die Expression fällt auf ein basales Niveau zurück, das etwa bei 12 % des Maximums liegt ( $11,59 \% \pm 0,43$ ). Insbesondere scheint *Icer* auch keinen oder kaum zirkadianen Schwankungen zu unterliegen, zumindest nicht in der Magnitude, wie die initiale Induktion nach Forskolin-Stimulation, die im Bereich des 18-fachen Wertes der unstimulierten Probe liegt.



**Abb. 3.15:** Expressionsmuster von *Icer* im 72 h–Zeitverlauf nach Forskolin-Stimulation. Zu den angegebenen Zeitpunkten nach Beginn der Stimulation wurden die Zellen geerntet und die Genexpression mittels RTQ-PCR analysiert ( $\Delta\Delta C_T$ -Methode), das jeweilige Maximum ist mit 100% angegeben. Statistische Auswertung: ANOVA mit Zusatztest nach Bonferroni, dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SEM. Der *Icer* mRNA-Gehalt in AtT-20 Zellen nimmt nach Forskolin-Stimulation stark zu (0 h vs. 1 h; 0 h vs. 4 h;  $p < 0,001$ ;  $n = 3$ ), um dann nach 8h wieder ein basales Expressionsniveau zu erreichen, das im weiteren Verlauf über 72 h beibehalten wird.

### 3.4.3 Bestimmung der Periodenlänge $\tau$

Die mittlere Periodenlänge ( $\tau$ ) zirkadianer Expressions-Rhythmen in AtT-20 Zellen wurde aus dem zeitlichen Abstand der Spitzenwerte ermittelt, die ein Intervall mit niedrigen Werten einschließen (siehe 2.3.9). Spitzenwerte, die innerhalb der ersten 8 h nach Beginn der Stimulation auftraten, wurden nicht berücksichtigt. Auf diese Weise konnte aus den Schwankungen der Gene *Per1*, *Per2*, *Per3*, *Cry1* und *Bmal1* ein mittleres  $\tau$  von  $23,07 \pm 0,44$  h (SEM) berechnet werden.

#### 4. DISKUSSION

Die Charakterisierung molekularer Komponenten der inneren Uhr am SCN stößt zunehmend an methodische Grenzen, je weiter man in Details vordringt und zu deren Darstellung man Manipulationen am Untersuchungsobjekt vornehmen will. Gerade hier können Zelllinien das Spektrum der Möglichkeiten erweitern und einen wertvollen Beitrag zum Verständnis der inneren Uhr leisten. Ziel dieser Arbeit war es daher, zu evaluieren, ob sich die kortikotrope Tumorzelllinie AtT-20 prinzipiell für diesen Einsatz eignet.

Drei vorrangige Fragen galt es zu beantworten:

- (1) Exprimieren AtT-20 endogen Uhrengene, besitzen sie also die notwendigen Moleküle, um zirkadiane Oszillationen zu generieren?
- (2) Zeigen für die Synchronisation peripherer Zellen relevante Gene- und Genprodukte (*Per1*, pCREB) in AtT-20 Zellen ein ähnliches Verhalten als Antwort auf ein Stimulationsverfahren, wie es für den SCN und andere Zellsysteme beschrieben ist?
- (3) Kann schließlich durch ein solches Stimulationsverfahren eine rhythmische Expression von Uhrengenen in AtT-20 Zellen hervorgerufen werden?

Die hier vorgelegten Ergebnisse der Experimente an AtT-20 Zellen sollen in Hinblick auf diese Fragen diskutiert werden. Es soll aber auch vergleichend betrachtet werden, in wie weit die dokumentierten Befunde vergleichbar sind mit Daten, die im SCN und anderen peripheren Zellen erhoben wurden. Zusammenfassend sollen dann die Vorteile, die AtT-20 Zellen gegenüber anderen Systemen für die Erforschung zirkadianer Mechanismen bieten, angesprochen werden.

##### 4.1 AtT-20 Zellen exprimieren relevante Uhrengene

Die molekularen Komponenten der inneren Uhr stellen sog. Uhrengene dar, deren Produkte via Rückkopplungsschleifen als Transkriptionsfaktoren auf die eigene Transkription wirken, und deren Abundanzkinetik eine etwa 24-stündige Periode aufweist (Reppert & Weaver 2002, Roenneberg & Merrow 2003). Ein funktionierendes Uhrwerk ist an das Vorhandensein dieser Uhrenmoleküle gebunden, da deren gezielte Abschaltung in *knockout*-Tieren in einer verän-

dernten Phasenlage des endogenen Oszillators oder gar in Arrhythmie des Tieres resultiert (Vgl. Tab. 1.1).

In dieser Arbeit wurde über RT-PCR-Technik nachgewiesen, dass die Uhrgene *Per1-3*, *Cry1-2*, *Bmal1*, *Clock* und *CK1ε* endogen in AtT-20 Zellen exprimiert werden. Im Säuger scheinen Uhrgene, insbesondere *Per1* und *Per2*, praktisch ubiquitär exprimiert zu sein, auch in Strukturen, die primär keine Rolle im zirkadianen System innehaben (zur Übersicht siehe Balsalobre 2002). Hierzu gehören z. B. Herz, Gehirn, Lunge, Leber, Skelettmuskulatur, Niere und Hoden. Es wurde postuliert, dass Gewebe, die Uhrgene exprimieren, auch *in vivo* einen aktives oszillierendes Uhrwerk beherbergen (Zylka et al. 1998b). In Zusammenhang mit dieser Arbeit ist interessant, dass Abe und Mitarbeiter (2002) eine rhythmische Aktivierung des *Per1*-Promotors sowohl in der explantierten Neuro- wie Adenohypophyse von *Per1-luc* transfizierten Ratten für etwa 6 Zyklen nachweisen konnten. Es konnte daher vermutet werden, dass die in dieser Arbeit zunächst in unstimulierten AtT-20 Zellen nachgewiesenen Uhrgenen in ihrer Menge eine physiologische Rolle spielen und möglicherweise ebenfalls zirkadian oszillieren, wie es in Zellen des Hypophysenvorderlappens gezeigt wurde (Abe et al. 2002).

#### **4.2 Die $\Delta\Delta C_T$ -Methode der Real-Time PCR ist für die Darstellung genexpressiver Unterschiede von Uhrgenen geeignet**

RT-PCR-Techniken (zur Übersicht siehe Tabelle 4.1) sind zwar äußerst potent, um seltene Transkripte zu amplifizieren, bergen aber damit auch die Gefahr eines falsch positiven Nachweises von Kontaminationsartefakten. Die RT-PCR hat auf Grund ihrer hohen Sensitivität den Nachweis auch geringer DNA-Mengen ermöglicht, z.B. bei niedrig exprimierten Genen oder, wenn Mehrfach-Analysen einer Probe durchgeführt werden sollen. Die Erfahrung hat gezeigt, dass ein Datenabgleich der RT-PCR-Befunde mit denen, die über direkte mRNA-Darstellung mittels Hybridisierungs-Techniken erhoben wurden, wie Northern Blot und RNase Protection Assay (Murphy et al. 1990, Noonan et al. 1990) sinnvoll ist. Die Quantifizierung der Standard-RT-PCR (auch Endpunkt-PCR genannt) ist allerdings Zeit- und Material-intensiv, da für jedes Amplikon und das Haushaltsgen zunächst empirisch der log-lineare Bereich der PCR bestimmt werden muss (siehe Abschnitt 2.3.6). Die anschließende densitometrische Auswertung über Gelelektrophorese (Bandendensitometrie) oder Hybridisierungstechniken (Sondenhybridisierung) erfordert weitere aufwendige

Nachbearbeitungsschritte. Um die Bestimmung des log-linearen Amplifikationsbereiches zu umgehen, wurde die kompetitive PCR entwickelt, die in jedem Ansatz einen internen Standard als Konkurrent der Reaktion mit bekannter Konzentration mit amplifiziert (Becker-Andre 1991, Piatak et al. 1993a,b).

1996 stellte Christian Heid und Mitarbeiter eine neue quantitative PCR-Methode vor, die in Echtzeit (*real time*) das Voranschreiten der Reaktionszyklen darstellt (*Real-Time Quantitative PCR*, RTQ-PCR; Heid et al. 1996). Sie erlaubt bei hoher Sensitivität, den sicheren DNA-Nachweis innerhalb der log-linearen Phase ohne entsprechende Vorversuche und erfordert keine Anschluss-Schritte an die PCR zur Auswertung. Darüber hinaus können die Daten mit spezieller Software einfach analysiert werden. Mehrere Untersuchungen haben eine gute Korrelation der RT-PCR-Daten mit über Northern-Blot-Verfahren erhobenen Daten gezeigt (Schmittgen et al. 2000, Winer et al. 1998). Zwei häufig eingesetzte Nachweisverfahren sind das *TaqMan*-Prinzip sowie die direkte dsDNA-Färbung mit dem Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green I, die in Abschnitt 2.3.7 vorgestellt wurde. *TaqMan* setzt ein mit einem Fluochrom markierten Oligonukleotidprimer ein, der durch die Polymerase freigesetzt wird und dann Licht einer bestimmten Wellenlänge emittiert (Livak et al. 1995). Die relative Quantifizierung<sup>8</sup> der RTQ-PCR wird in der Regel über eine Standardverdünnung erbracht, die bei jedem Ansatz mitläuft.

---

<sup>8</sup> Die absolute Quantifizierung soll hier nicht diskutiert werden, da sie für die Fragestellung in dieser Arbeit nicht relevant ist. Die absolute Menge an umgeschriebener cDNA gibt bei dem hier benutzten Versuchsaufbau keinerlei Auskunft über die spezifische mRNA-Menge einer Zelle. Auch dieser Wert müsste zudem auf ein Haushaltsgen als endogener Expressionsmarker bezogen werden, wodurch jeglicher Informationsgewinn durch die absolute Quantifizierung sowieso wieder verloren ginge.

Schmittgen und Mitarbeiter (2000) verglichen zwei Endpunkt-RT-PCR- (Bandendensitometrie sowie Sonden-Hybridisierung) und zwei RTQ-Techniken (*TaqMan* und SYBR Green I) zum Nachweis von Expressionsunterschieden im Hinblick auf Testgütekriterien. Real-Time-Techniken, wie auch die Sondenhybridisierungs-Technik lieferten eine vergleichbar hohe Sensitivität, die 65x über der der Bandendensitometrie lag. Die Variabilität der Ergebnisse bei einem Expressionsvergleich (n = 22) waren für beide Techniken hoch, sowohl für die Bandendensitometrie (Variationskoeffizient, VC = 44,9 %) als auch für die Sondenhybridisierung (VC = 45,1 %). Dahingegen waren die Variationskoeffizienten für die RTQ-PCR deutlich niedriger, wobei SYBR Green mit einem VC von 14,2 % den niedrigsten Wert erreichte (*TaqMan*: 24,0 %). In anderen Studien wurden ähnliche Variabilitäten für RTQ-PCR-Verfahren gefunden (Heid et al. 1996, Winer et al. 1999). Da bei allen vier Methoden, die Schmittgen untersuchte, Stammlösungen (die bereits alle Einzelkomponenten enthielten) verwandt wurden, muss man davon ausgehen, dass die zusätzlichen Nachbearbeitungsschritte bei den konventionellen Verfahren zu dieser Messungengenauigkeit geführt haben.

Eine Erweiterung der RTQ-PCR ist die hier angewandte so genannte  $\Delta\Delta C_T$ -Methode (Livak & Schmittgen 2001). Wie in 2.3.8 vorgestellt, werden bei ihr arithmetische Formeln benutzt, um relative Expressionsunterschiede darzustellen. Die  $\Delta\Delta C_T$ -Methode benötigt keine Standardverdünnung, deren Proben bei jedem PCR-Ansatz mit aufgetragen werden müssen, und erlaubt dadurch einen höheren Probendurchsatz. Zusätzlich treten keine Verzerrungen bei der Berechnung der relativen DNA-Mengen auf, die durch Pipetierfehler oder sonstige Unregelmäßigkeiten bei der Herstellung der Standardkurve entstehen können. Allerdings müssen bestimmte Validierungsexperimente im Vorfeld durchgeführt werden, die sicherstellen, dass Zielgen und Referenzgen eine vergleichbare und hohe Amplifikationseffizienz besitzen. Die Ergebnisse dieser im Handbuch des Thermocyclers (ABIPrism User Bulletin #2) geforderten Versuche sind in Abschnitt 3.2 dargestellt. Sie zeigen für alle hier verwendeten Primerpaare, bzw. deren Amplikone, eine hohe Amplifikationseffizienz (*slope*), die dicht an dem mathematisch ermittelten Optimalwert von -3,32 liegt. Die Korrelation der Amplifikationseffizienzen von Zielgen und Referenzgen in Abhängigkeit von der eingesetzten DNA-Menge ist für alle untersuchten Amplikone nahezu 100%. Die Amplifikationseffizienzen aller untersuchten Zielgene verhalten sich in Abhängigkeit von der eingesetzten DNA-Menge konstant zu der des Referenzgens ( $\Delta slope$ ). Anzumerken ist, dass diese Aussagen nur für den eingesetzten Verdünnungsbereich gelten. In



dieser Arbeit wurden 2-fach Verdünnungsschritte eingesetzt im Bereich zwischen einer einfachen und einer 1 zu 64 verdünnten Lösung, wie es auch vom Hersteller vorgeschlagen wurde. Als Ausgangs-Probe wurde eine Mischung verschiedener mit Forskolin stimulierter und unstimulierter Proben eingesetzt, um sicherzustellen, dass sich die Verdünnung für alle Experimente in einem für die Messung relevanten Bereich befindet. Allerdings können in Proben mit einer sehr hohen oder einer sehr niedrigen Konzentration vorliegende cDNA außerhalb dieses Bereiches liegen, wodurch es hier (vorausgesetzt ist eine andere Amplifikationseffizienz) zu Verzerrung kommen kann. Es muss jedoch angemerkt werden, dass das gleichermaßen für extrapolierte Werte bei Verwendung der Standardkurvenmethode zutrifft.

Methoden	Quantifizierung	Vorteile	Nachteile	Referenz
Konventionelle RT-PCR	Bandendensitometrie	Kostengünstig	Geringste Sensitivität aller vorgestellten PCR-Techniken, hohe Variabilität, aufwendige Validierungsexperimente und Proben-Nachbearbeitung	Schmittgen et al. 2000
	Sondenhybridisierung	Ähnlich hohe Sensitivität wie RTQ-Verfahren	Hohe Variabilität, aufwendige Validierungsexperimente und Proben-Nachbearbeitung	Schmittgen et al. 2000
Kompetitive RT-PCR	Bandendensitometrie/Sondenhybridisierung + Standardverdünnung	Weniger Vorversuche notwendig als bei konventioneller RT-PCR	Immer noch relative aufwendige Validierungsexperimente und Proben-Nachbearbeitung, besonders wenn mehrere Gene untersucht werden sollen	Becker-Andre 1991; Piatak et al. 1993a,b; Heid et al. 1996
RTQ-PCR	<i>TaqMan</i> + Standardkurve	Hohe Sensitivität, hohe Präzision, Keine speziellen Validierungsexperimente, keine Proben-Nachbereitung, gewisse zusätzliche Spezifität durch markierte Primer	Bedarf spezieller Primer, Kosten	Livak et al. 1995; Schmittgen et al. 2000
	SYBR Green I + Standardkurve	Günstiger als <i>TaqMan</i> , geringere Präzision als <i>TaqMan</i> , sonst gleichwertig wie <i>TaqMan</i>	Kosten	Schmittgen et al. 2000; Winer et al. 1998
	SYBR Green I + $\Delta\Delta C_T$	Zeit- und Kostenersparnis durch Wegfall der Standardverdünnung, sonst gleichwertig wie SYBR Green I + Standardkurve	(Kosten), (einfache) Validierungsexperimente	Livak & Schmittgen 2001; Winer et al. 1998

**Tab. 4.1:** Übersicht der diskutierten RT-PCR-Techniken

Zusammenfassend bieten RTQ-PCR-Methoden, insbesondere der Einsatz von SYBR Green I als Detektionsfarbstoff, im Vergleich zu herkömmlichen RT-PCR-Verfahren für Expressionsanalysen ein hohes Maß an Sensitivität und Präzision, wenn direkte RNA-Nachweise nicht praktikabel sind (Tab. 4.1). Unter den RTQ-PCR-Verfahren mit relativer Quantifizierung bietet die  $\Delta\Delta C_T$ -Methode eine besonders schnelle und unkomplizierte Durchführbarkeit. Dies äußert sich in Zeit- und Kosten-Effizienz bei gleicher Zuverlässigkeit. Auch für die Untersuchung von Uhrengenen mit den hier eingesetzten Primer ist die  $\Delta\Delta C_T$ -Methode hervorragend geeignet.

#### **4.3 Forskolin induziert für die Synchronisation peripherer Gewebe relevante *immediate early genes* in AtT-20 Zellen**

In der Licht-vermittelten Synchronisation des SCN kommt es zur Induktion von *immediate early genes* wie *c-Fos*, *Fos-B*, *Jun-B*, *Nurr77* und *Per1* (zur Übersicht siehe Morris et al. 1998). *Per1* ist aus dieser Gruppe das einzige Uhrengen, das äußerst rasch (innerhalb von 15-30 min) als Antwort auf einen Lichtpuls in seiner Expression hochreguliert wird (Albrecht et al. 1997, Shearman et al. 1997, Shigeyoshi et al. 1997, Wilsbacher et al. 2002). Zudem heben *Per1*-antisense Oligonukleotide im SCN Licht-induzierte Phasenverschiebungen auf (Akiyama et al. 1999, Tischkau et al. 2003). Mittlerweile konnte gezeigt werden, dass *Per1* ein vergleichbares Antwortverhalten auf verschiedenste Stimulanzen auch in peripheren Zellen dokumentiert (zur Übersicht siehe Tab. 4.2). Man muss daher annehmen, dass bei der Synchronisation des SCN durch Licht und der Synchronisation peripherer Zellen an die Vorgaben des SCN sich ähnliche, womöglich dieselben zellulären Vorgänge abspielen und, dass die Induktion von *Per1* hierbei ein ubiquitäres Prinzip darstellt.

##### *4.3.1 Per1 und die zeitliche Korrelation mit aktivierten Komponenten der Signaltransduktion*

Werden AtT-20 Zellen mit Forskolin stimuliert, kommt es nach einer Stunde zu einem signifikanten Anstieg von *Per1* und *Icer* mRNA. Im Falle von *Per1* ist die Expression bereits drei Stunden später auf das Ausgangsniveau zurückgefallen, *Icer* hingegen ist auch dann noch deutlich erhöht (3.3.1 und 3.3.2). Sein Wert normalisiert sich erst wieder 8 h nach Stimulationsbeginn. Bei keinem anderen untersuchten Gen (*Per2*, *Per3*, *Cry1*, *Cry2*, *Bmall*, *Clock* *CK1ε*) fand sich eine signifikante Expressionszunahme innerhalb der ersten Stunde nach Stimulation. *Per1* und *Icer* werden zu den IEG gezählt (Morgan et al. 1998, Molina et

al. 1993), da ihre Expression rasch (innerhalb von Minuten) als Antwort auf einen Stimulus und unabhängig von einer zwischengeschalteten Eiweißneusynthese hochreguliert wird. Shearman und Mitarbeiter (1997) berichten im SCN von einem signifikanten Anstieg der *Per1*-Expression bereits nach 30 min und einem Abfall auf das Ausgangsniveau nach 150 min. In Fibroblasten wurde *Per2* ebenfalls in Zusammenhang mit IEGs erwähnt (Balsalobre et al. 1998). Allerdings ist seine Induktion sowohl durch Licht im SCN deutlich verzögert (innerhalb 2-3 h) oder schwach (Albrecht et al. 1997, Shearman et al. 1997, Zylka et al. 1998b), als auch durch Stimulanzen *in vitro* nur inkonstant möglich (siehe unten und Tab 4.2).

Nach neueren Erkenntnissen wird dieses ungleiche Verhalten der beiden Licht-induzierbaren *Period*-Gene auf die Aktivierung unterschiedlicher Signaltransduktionskaskaden zurückgeführt. Im Falle von *Per1* bewirkt die Bindung von pCREB an die CRE-Sequenz im Promotor von *Per1* die Zunahme der Transkription (Obrietan et al. 1999, Tischkau et al. 2003, Travnickova-Bendova et al. 2002). Hierbei scheint die notwendige Phosphorylierung von CREB durch mehrere Signaltransduktionswege möglich zu sein (zur Übersicht siehe Gillette & Mitchell 2002), physiologisch (bei Stimulation durch Licht) wird sie im SCN möglicherweise durch die Aktivität der MAPK bewerkstelligt (Butcher et al. 2002, Coogan & Piggins 2003, Dziema et al. 2003). Akashi & Nishida (2000) und Akiyama (Akiyama et al. 2003) berichten von einer MAPK-abhängigen Induktion von *Per1* auch in peripheren Zellen. Die vorliegenden Befunde weisen darauf hin, dass es auch in AtT-20 Zellen durch die Aktivierung der cAMP-Signaltransduktion zu einer Phosphorylierung von CREB gekommen ist, die wiederum die Transkriptionsaktivierung von *Per1* bewirkt haben könnte. Dafür spricht das annähernd zeitgleiche Auftreten von pCREB und von *Per1*-Transkripten. Der im Immunoblot verwandte Antikörper richtet sich gegen die an Ser133 phosphorylierte Form von CREB, die im SCN durch Licht induzierbar ist (Ginty et al. 1993) und auch in peripheren Zellen bei synchronisierenden Reizen zunimmt (Yagita & Okamura 2000). Nach neueren Befunden von Gau und Mitarbeitern (2002) spielt für Phasen-verschiebende Lichtreize im SCN und die Induktion von *Per1* besonders die Phosphorylierung von CREB an Ser142 eine Rolle. In wieweit diese Phosphorylierungsstelle auch bei der Synchronisation peripherer Zellen involviert ist, ist zurzeit noch unklar.

Möglicherweise wird die in dieser Arbeit gezeigte Aktivierung von CREB ebenfalls – zumindest in Ergänzung zur Aktivität der PKA - durch die MAPK bewerkstelligt, die auch hier (zumindest in einzelnen Experimenten) eine deutliche Zunahme der phosphorylierten

Formen (pERK1/2) gezeigt hat. Diese Befunde sind interessant, da die Fähigkeit einer Zelle, über die cAMP-Signaltransduktion die MAPK zu aktivieren, die Expression von *B-Raf* voraussetzt (Dugan et al. 1999, Vossler et al. 1997), was z. B. in Neuronen gezeigt werden konnte. Kürzlich hatte Kovalovsky et al. (2002) darstellen können, dass auch AtT-20 Zellen *B-Raf* exprimieren. Im Widerspruch dazu steht eine Veröffentlichung von Yehia et al. (2001b), die ein Jahr zuvor eine cAMP-abhängige Hemmung der MAPK in AtT-20 Zellen gefunden hat. Allerdings wurde ebenfalls eine, wenn auch schwache Expression von *B-Raf* nachgewiesen. Im Verweis auf andere gegensätzliche Befunde wurde in der Arbeit von Yehia diskutiert, dass die cAMP-vermittelte Hemmung sowohl vom Zelltyp als auch vom Entwicklungsstatus der Zelle abhängen könnte. Eine eindeutige Klärung, wie sich cAMP in Bezug auf die MAPK in den hier verwendeten AtT-20 Zellen verhält, müsste daher durch einen (möglichst auch quantitativen) Nachweis von *B-Raf* erbracht werden. Im Hinblick auf die vorliegenden Daten kann zumindest vermutet werden, dass in den dargestellten Experimenten cAMP die MAPK über *B-Raf* aktiviert hat. Somit würde die PKA in AtT-20 Zellen CREB einerseits direkt, andererseits indirekt über den *B-Raf*-MAPK-Signalweg phosphorylieren.

#### 4.3.2 *Per2* tritt verzögert auf

Im SCN soll die Regulierung der *Per2*-Transkription CREB-unabhängig durch die cGMP-Kinase (PKGII) über einen bisher unbekanntem Mechanismus vermittelt werden (Oster et al. 2003). Travnickova-Bendova und Mitarbeiter (2002) fanden heraus, dass der *Per2*-Promotor, wie der von *Per1*, ein CRE besitzt. Zudem konnten sie zeigen, dass zumindest der isolierte Promotor ähnlich wie *Per1* auf pCREB reagiert. Sie postulierten, dass das CRE von *Per2 in situ* u. U. durch Interaktionen mit anderen Molekülen unterdrückt wird. Die *Per2*-Induktion soll besonders bei der Phasenverzögerung durch Lichtreize während der frühen subjektiven Nacht eine Rolle spielen (Oster et al. 2003, Wakamatsu et al. 2001). In Ratten-Fibroblasten liegen für die Induzierbarkeit unterschiedliche Ergebnisse vor. Balsalobre und Mitarbeiter (2000b) gelang es nur durch einen Serumschock, *Per2* zu induzieren, nicht aber durch Aktivatoren der PKC, der Tyrosinrezeptorkinase, des cAMP-Signaltransduktionsweges und durch ein Kalziumionophor. Für *Per1* riefen alle diese Stimulanzen eine robuste Transkriptionsaktivierung hervor. Man postulierte daher, dass entweder ein weiterer Signaltransduktionsweg für die Induktion von *Per2* verantwortlich ist, der durch ein im Serum enthaltenen Stoff aktiviert wurde, oder, dass eine synergistische Beteiligung mehrerer Signaltransduktionswege

notwendig ist. Für die durch die Aktivierung von muskarinen Acetylcholinrezeptoren induzierte Phasenverschiebung im SCN haben kürzlich Artinian und Mitarbeiter (2001) einen Mechanismus vorgeschlagen, bei dem die PKC in die Aktivierung der PKG involviert ist. Sollte auch in peripheren Zellen die PKGII bei der Transaktivierung von *Per2* involviert sein, hätte sich in den Versuchen von Balsalobre und Mitarbeitern u. U. durch Stimulation der PKC ebenfalls ein Anstieg der *Per2*-mRNA hervorrufen lassen müssen. Allerdings wurde die Expression nur eine Stunde nach Beginn der Stimulation untersucht, und es ist denkbar, dass sich ein Anstieg von *Per2* innerhalb der nächsten 2 h gezeigt hätte (vgl. oben).

Die in dieser Arbeit erhobenen Befunde (3.3.2) dokumentieren einen signifikanten Anstieg der *Per2*-mRNA 4 h nach Beginn einer zweistündigen Forskolin-Stimulation. Zusammen mit dem Auftreten des aktivierten Proteins pCREB (und wahrscheinlich auch von pMAPK) nach 1 h, könnte man vermuten, dass zumindest in AtT-20 Zellen der cAMP-(MAPK)-CREB-Signaltransduktionsweg bei der Aktivierung von *Per2* eine Rolle spielt. Es ist denkbar, dass das verzögerte Auftreten von *Per2* durch das Benötigen eines weiteren Proteins zu Stande kommt, das erst *de novo* synthetisiert werden muss. Interessant ist in diesem Zusammenhang, dass Yagita und Mitarbeiter (2001) durch Einsatz von Endothelin-1 (ET-1), das eine Aktivierung von PKC, MAPK und CREB einschließt (Kuwaki et al. 1997, Yanagisawa et al. 1988), in Fibroblasten eine deutliche Induktion von *Per2* bereits nach einer Stunde bewirken konnte. Zusammenfassend scheint daher die Aktivierung einzelner Signaltransduktionswege einen späten (nach 4h, wie in dieser Arbeit) oder nur schwachen (Balsalobre et al. 2000b) Anstieg der *Per2*-mRNA hervorzurufen, wohingegen die gleichzeitige Aktivierung mehrerer (Serumchock, ET-1) den Anstieg zu beschleunigen vermag. Es ist weiterhin nicht ausgeschlossen, dass hierbei auch in peripheren Zellen die PKGII (über PKC) beteiligt ist.

#### 4.3.3 Induktion von *Icer*

In der vorliegenden Arbeit wird die Expression des IEG *Icer* nach einstündiger Stimulation mit Forskolin signifikant hochreguliert, ist auch 4 h nach Beginn noch deutlich erhöht und erst zum Zeitpunkt 8 h wieder auf ein basales Niveau abgefallen. Zeitlich korreliert der Anstieg der *Icer*-Transkripte mit dem Auftreten von aktiviertem CREB und *Per1*-mRNA. Das IEG *Icer* gehört zur Familie cAMP-abhängiger Leucin-Zipper-Transkriptionsfaktoren (bZIP) der CREBs und CREMs (Landschulz et al. 1988). Diese zeichnen sich durch hochkonservierte DNA-Bindungsdomänen aus, die Amino-proximal eine basische DNA-Erkennungssequenz

(b), sowie eine Carboxy-terminale Protein-Dimerisierungsdomäne besitzen (ZIP). *Icer/ICER* unterscheidet sich in zweierlei Hinsicht von den anderen Mitgliedern der CREB-Familie: (1) ICER fehlt die N-terminale Phosphorylierungsdomäne des CREM-Gens (P-Box), weshalb man annimmt, dass seine biochemische Aktivität vornehmlich durch das Auftreten von ICER Protein selbst bestimmt wird (Molina et al. 1993, Stehle et al. 1993). Weiterhin macht die fehlende Phosphorylierungsdomäne des ICER, die CREB zum Aktivator der Genexpression macht, diesen Transkriptionsfaktor zu einem Repressor cAMP-vermittelter Transaktivierung, wenn es an CRE-Sequenzen in genregulativen Abschnitten der DNA bindet (Molina et al. 1993). (2) *Icer* ist über 4 CRE-Elemente innerhalb der Promotor-Struktur induzierbar, die in vier tandemartig verbundenen *cAMP autoregulatory elements* (CARE1-4) organisiert sind (Molina et al. 1993). ICER bildet Homodimere und Heterodimere mit CREB und CREM, die jetzt mit pCREB und CREM um Bindung an CRE-Strukturen konkurrieren und so die Transaktivierung CRE-regulierter Gene supprimieren. Molina et al. (1993) dokumentierte in AtT-20, dass bereits nach einer 15-minütigen Stimulation mit Forskolin (unabhängig von einer *de-novo*-Protein-Synthese) der Gehalt der *Icer*-mRNA stark ansteigt, nach 2-3 h ein Maximum erreicht und nach 6 h auf das basale Niveau zurückgefallen ist. Der Anstieg wurde – ohne nähere Quantifizierung – als sehr stark beschrieben. Eine maximale Transaktivierung wurde durch eine 2-stündige Forskolin-Stimulation erreicht. In dieser Arbeit liegen die Werte für *Icer*-mRNA nach 1 h um das etwa 18-fache erhöht vor gegenüber der Kontrolle, und damit deutlich über den sonst in der vorliegenden Arbeit beobachteten Expressionsunterschieden. Das mit CREB um CRE-Bindungsstellen konkurrierende ICER Protein tritt bereits nach etwa 2 h auf und erreicht ein Maximum bei etwa 4 h (Molina et al. 1993).

Der in der vorliegenden Arbeit dargestellte Verlauf der *Icer*-Expression deckt sich hervorragend mit den Daten, die von Molina et al. (1993) erhoben wurden. Zudem deutet die Dynamik von pCREB, *Per1* und *Icer* auf eine lebhafte Interaktion dieser Moleküle untereinander als Antwort auf den hier applizierten Stimulus: aktiviertes CREB induziert über CRE-Strukturen sowohl die Transkription von *Per1* als auch von *Icer*, deren mRNA unmittelbar auftritt (hier: 1 h). Nach Transkription (frühestes in der Literatur dokumentiertes ICER Protein bereits 2 h nach Forskolin-Stimulation, s. o.), tritt ICER in den Kern ein und unterdrückt die Expression von *Per1* (Normalisierung des mRNA-Gehaltes nach 4 h) und seine eigene (Normalisierung nach 8 h). Beachtenswert ist der zeitliche Unterschied, mit dem ICER *Per1* und seine eigene Expression zu unterdrücken vermag, der durch die hier gewählten Untersuchungszeitpunkte etwa 4 h beträgt. ICER scheint *Per1* deutlich effektiver zu unterdrücken, was nicht durch die

negative Rückkopplung von *Per1* selber erklärbar ist (PER1 Protein tritt mit einer etwa 6-stündigen Verzögerung auf [Reppert & Weaver 2001]). Denkbar ist, dass die stimulierte Expression im *Per1*-Gen ohnehin schon schwächer ist als die von *Icer* und daher bereits eine geringe Menge an ICER genügt, diese auf Ausgangsniveau zurückzuführen. Die relativen Expressionsunterscheide dieser beiden Gene, wie sie in dieser Arbeit gefunden wurden, unterstützen diese Vermutung.

Im weiteren Verlauf über 72 h treten keine signifikanten Änderungen mehr im *Icer*-mRNA-Gehalt auf, obwohl man auf Grund von Untersuchungen von Lamas & Sassone-Corsi (1997) zum Refraktärverhalten von *Icer* in AtT-20 Zellen davon ausgehen kann, dass dieser Transkriptionsfaktor prinzipiell wieder induzierbar ist. In ähnlicher Weise wurden auch in oszillierenden Fibroblasten keine rhythmischen Schwankungen von pMAPK gefunden (Akashi & Nishida). Eine solche Überlegung ist nicht abwegig, da zumindest im Pinealorgan die Transkription der Adenylatzyklase rhythmisch reguliert wird und über diesen Mechanismus im Antwortverhalten auf adrenerge Stimuli ein Zeitfenster determiniert (Tzavara et al. 1996).

Weitere Aspekte sind in Zusammenhang mit der Rolle von *Icer* interessant:

- (1) Ursprünglich nahm man an, dass *Icer* spezifisch durch die cAMP-aktivierte PKA induziert wird (Molina et al. 1993). Nach neueren Untersuchungen, v. a. an neuronalen Zellen, scheinen allerdings eine Vielzahl von Stimuli eine *Icer*-Induktion hervorzurufen, einschließlich MAPK und PKC (Pfeffer et al. 1999; zur Übersicht siehe: Mioduszewska et al. 2003). Erstaunlich sind Einzelheiten, die in J774.2 Zellen nach Interferon  $\gamma$ -Stimulation zur Expression von *Icer* führen. Hierbei ist die Aktivität der Caseinkinase II (CKII) involviert, für die erst kürzlich gezeigt werden konnte, dass sie auch an der Phosphorylierung von Uhrengenen – zumindest in *Arabidopsis* und *Drosophila* – beteiligt zu sein scheint (zur Übersicht siehe: Bibby & Litchfield 2005, Lin et al. 2002). Eine nähere Untersuchung dieser Mechanismen könnten daher auch Verbindungen zum zirkadianen System des Säugers aufdecken.
- (2) Yehia et al. (2001b) konnte zeigen, dass MAPK ICER an Ser41 phosphorylieren kann, das daraufhin ubiquitinyliert und proteasomal abgebaut wird. Somit bestimmt die Aktivität der MAPK die Halbwertszeit von ICER und spielt womöglich nicht nur eine Rolle bei der Initiierung des synchronisierenden Reizes, sondern auch bei seiner

Beendigung. Aber auch außerhalb zirkadianer Systeme könnte die weitere Charakterisierung dieses Mechanismus von Bedeutung sein: ICER hat in mehreren Untersuchungen seine antiproliferativen und antionkogenen Eigenschaften belegt (Lamas et al. 1997, Razavi et al. 1998), gleichzeitig ist der MAPK-Signalweg häufig molekulares Ziel während der Karzinogenese. Tatsächlich ist bei über 30 % maligner Tumoren des Menschen die Aktivität der MAPK durch Mutation des Onkogen *Ras* pathologisch erhöht. Zudem fand sich ein deutlich verminderter Gehalt von ICER in Zellen des Prostatakarzinoms, bei denen zuvor ein konstitutiv aktivierter MAPK-Signalweg beschrieben wurde (Bakin et al. 2003, Yehia et al. 2001a).

- (3) Lamas & Sassone-Corsi (1997) konnten in AtT-20 Zellen zeigen, dass die Induzierbarkeit von *Icer* eine Refraktärperiode besitzt, deren Länge abhängig ist von der Dauer des vorangegangenen Stimulus. Man nimmt an, dass sich das physiologische Korrelat dieser molekularen Befunde u.a. in der Eingliederung von ICER an adaptive Vorgänge des zirkadianen Systems dokumentiert. Im Pinealorgan bestimmt die Länge der vorausgehenden Dunkelphase den Gehalt an ICER und damit die Induzierbarkeit cAMP-abhängiger Gene (wie die AANAT; zur Übersicht siehe Stehle et al. 2001). Auch bei der molekularen Organisation jahreszeitlicher Rhythmen in der hypophysären *Pars tuberalis* scheint ICER eine Rolle zu spielen (Johnston et al. 2003, Messenger et al. 1999, 2000).

Zusammenfassend erfüllt ICER eine entscheidende Funktion in der Dynamik der cAMP-abhängigen Transkription, die auch die Kontrolle des Uhrengens *Per1* einzuschließen scheint. Weitere Untersuchungen müssen die Regulation von ICER durch posttranskriptionale Modifikationen erhellen, die auch bei der Informationsvermittlung innerhalb des zirkadianen Systems – insbesondere der Synchronisation peripherer Zellen durch humorale Faktoren – eine wichtige Rolle spielen könnten. AtT-20 Zellen bieten für diese wissenschaftlichen Fragestellungen ein hervorragendes System.



Substanz	Signal	System	IEG- Expression (1 h)	Rhythmische Uhrengen- Expression	Referenz [Anmerkung]
Serum (50%)	?	Fibroblasten (Ratte)	<i>Per1, Per2,</i> <i>c-Fos</i>	<i>Per1, Per2, Dbp,</i> <i>Rev-Erba</i>	Balsalobre et al. 1998, Hirota et al. 2002
		H35	<i>Per1, Per2</i>	<i>Per2, Dbp, Rev-</i> <i>Erba</i>	Balsalobre et al. 1998
		Hepatomazellen <sup>§</sup>			
		GT1-7 (Maus, Hypothalamus)	<i>Per1</i>	<i>Per1, Per2</i>	Chappell et al. 2003
Forskolin	cAMP	Fibroblasten (Ratte)	<i>Per1, c-Fos</i>	<i>Per1<sup>§§</sup>, Per2, Dbp,</i> <i>Rev-Erba</i>	Balsalobre et al. 2000b*, Yagita & Okamura 2000 <sup>b</sup>
		GT1-7 (Maus, Hypothalamus)	<i>Per1</i>	<i>Per1, Per2</i>	Chappell et al. 2003*
PMA	PKC	Fibroblasten (Ratte)	<i>Per1, (Per2),</i> <i>(c-Fos)</i>	<i>Per1<sup>§</sup>, Per2, Dbp,</i> <i>Rev-Erba, Cry1</i>	Balsalobre et al. 2000b
TPA	PKC	NIH-3T3- Fibroblasten	<i>Per1</i>	<i>Per1, Per2, Dbp</i>	Akashi & Nishida 2000
Calcimycin	Ca <sup>2+</sup>	Fibroblasten (Ratte)	<i>Per1, (Per2),</i> <i>c-Fos</i>	<i>Per1<sup>§</sup>, Per2, Dbp,</i> <i>Rev-Erba, Cry1</i>	Balsalobre et al. 2000b
Dexamethason	Kortikoid- Rezeptor	Fibroblasten (Ratte)	<i>Per1</i>	<i>Rev-Erba, Dbp</i>	Balsalobre et al. 2000b
Endothelin1	PKC	Fibroblasten	<i>Per1, Per2</i>	<i>Per1, Per2, Per3,</i> <i>Dbp, Bmall, Cry1</i>	Yagita et al. 2001 [nicht rhythmisch: <i>CK1ε, Clock, Cry2</i> ]
		Embryonale Fibroblasten (Maus)	<i>Per1</i>	<i>Per1, Dbp, Bmall</i>	Yagita et al. 2001 [auch als arrhythmische <i>Cry</i> -defiziente Mutanten]
Serum-freies Medium	?	Fibroblasten (Ratte)	[Abfall von <i>Per1, Per2</i> ]	<i>Per2, Dbp, Bmall,</i> <i>Cry1</i>	Hirota et al. 2002 [Phasenlage 4 h beschleunigt gegenüber Serumschock], Chappell et al. 2003
Glucose	?	Fibroblasten (Ratte)	<i>Tiegl<sup>+</sup>,</i> <i>Vdup1<sup>+</sup></i> [Abfall von <i>Per1, Per2</i> ]	<i>Per2, Dbp, Bmall,</i> <i>Cry1</i>	Hirota et al. 2002 [Phasenlage entsprechend Stimulation mit Serum- freien Medium]

Anm.: §: schwache oder nur kurze zirkadiane Oszillationen; §: inkonstante Beobachtung; Φ: 2 h Forskolin, dann Serum-frei; \*: 15 min Forskolin, dann Serum-frei. Durchgestrichene Gene wurden untersucht, waren aber nicht induzierbar oder arrhythmisch. +: Glucose-induzierte *immediate early genes* VDUP1 (*Vitamin D<sub>3</sub> up-regulated protein*) und TIEG1 (*transforming growth factor β-inducible early gene*).

**Tab. 4.2:** Substanzen die in Zellkulturen eine rhythmische Expression von Uhrengen hervorrufen können (Auswahl).

#### 4.3.4 *Per3*, *Cry*, *Bmal1*, *Clock*, *Cklε*

Innerhalb der ersten 8 h nach Forskolin-Stimulation fand sich in dieser Arbeit eine signifikante Zunahme der Expression für *Cry1* bereits nach 4 h. *Cry1* wird nicht zu den IEG gezählt und hat bisher keine bedeutende Rolle bei der Synchronisation zirkadianer Rhythmen – wie es bei *Per1* der Fall ist – gezeigt (Mrosovsky 2001). Balsalobre und Mitarbeiter (2000b) konnten an Fibroblasten durch Calcimycin eine ähnliche Dynamik für die *Cry1*-mRNA dokumentieren, ebenso Yagita und Mitarbeiter (2001) durch ET-1. Nach jüngsten Ergebnissen von Etchegaray und Mitarbeiter (2003) wird *Cry1* neben über eine CLOCK-BMAL-abhängige E-Box (Kume et al. 1999) auch über *Rev-Erba* reguliert. Da nach einer Stimulation durch die initiale *Per*-Induktion die Expression von *Rev-Erba* supprimiert wird (Balsalobre et al. 1998), wird die *Cry1*-Transkription enthemmt und der mRNA-Gehalt steigt an. Durch diese bimodale Regulation von *Cry1* entsteht ein Shunt-Mechanismus zwischen positiver und negativer Schleife, der dem System zusätzliche Stabilität verleihen soll (Emery & Reppert 2004). Die hier beobachteten Spitzenwerte von *Cry1* sind daher wahrscheinlich nicht direkt durch den applizierten Stimulus zustande gekommen. Als weiteres Indiz für diesen Mechanismus kann gewertet werden, dass *Cry2*, für das bisher kein REV-ERB/ROR-Element (RRE) im Promotor beschrieben wurde, keinen mRNA-Spitzenwert zu diesem Zeitpunkt aufweist. In ähnlicher Weise und vermutlich ebenfalls durch indirekte Mechanismen hervorgerufen, wurde in Fibroblasten ein Anstieg der *Bmal1*-mRNA nach 4-8 h Stimulation beschrieben (Yagita et al. 2001, Yagita & Okamura 2000), der sich in dieser Arbeit allerdings nicht nachvollziehen ließ.

Für die übrigen Uhrengene *Per3*, *Cry2*, *Clock* und *CK1ε* konnte in dieser Arbeit keine signifikante Expressionszunahme in den ersten 8 h nach Forskolin-Applikation gefunden werden. Vielmehr zeigt sich eine hochsignifikante Abnahme des *CK1ε*-mRNA-Gehaltes nach 8 h. Diese Beobachtung könnte durch das vermehrte Auftreten der supprimierenden Transkriptionsfaktoren PER1, PER2 und ICER zu diesem Zeitpunkt erklärt werden. Von *CK1ε* nimmt man an, dass es konstitutiv exprimiert wird (Yagita et al. 2001), tatsächlich ist über seine Regulation noch wenig bekannt, was ebenso für das Uhrengen *Clock* zutrifft. *Per3* besitzt nicht wie seine Homologe *Per1* und *Per2* eine CRE-Struktur in seinem Promotor (und ist dadurch auch nicht Licht-induzierbar), wohl aber, wie auch *Cry2*, CLOCK-BMAL1-getriebene E-Box-Elemente (Kume et al. 1999, Travnickova-Bendova et al. 2002).

Zum Verständnis der Vorgänge, die zur Synchronisation des SCN oder periphere Zellen führen, ist eine genaue Untersuchungen genregulativer Strukturen innerhalb aller am Uhrenmechanismus beteiligter Gene von großer Wichtigkeit und muss daher noch weiter ausgebaut werden. Tabelle 4.3 gibt eine Übersicht zum Aufbau bisher funktionell untersuchter Regulatorelemente in Uhrengenen.

Gen	CRE	E-Box	RRE	D-Box	Anmerkung/Referenz
	CREB, CREM, ICER	CLOCK-BMAL1, CRY-PER-CK1 $\epsilon$	REV- ERB $\alpha$ , ROR $\alpha$	DBP, E4BP4	Transkriptionsfaktoren
<i>Per1</i>	■	■ ■ ■		■	Travnickova-Bendova et al. 2002, Yamaguchi et al. 2000, Mitsui et al. 2001
<i>Per2</i>	(■)*	■ ■ ■ ■ ■ ■ ■ ■			Travnickova-Bendova et al. 2002
<i>Per3</i>		■ ■ ■ ■			Travnickova-Bendova et al. 2002
<i>Cry1</i>		■	■		Etchegaray et al. 2003, Kume et al. 1999
<i>Cry2</i>		■			Kume et al. 1999
<i>Bmal1</i>			■		Ueda et al. 2002
<i>Clock</i>					?
<i>Ckl1<math>\epsilon</math></i>					?
<i>Rev-Erba</i>		■			Ueda et al. 2002
<i>Icer</i>	■ ■ ■ ■				Molina et al. 1993

**Tab. 4.3:** Übersicht zur genregulativen Strukturen (Auswahl) relevanter Uhrengene und von *Icer*. Die Kästchen symbolisieren die Anzahl entsprechender Regulatorelemente (soweit bekannt).\* Das CRE von *Per2* soll funktionell inaktiv sein (Travnickova-Bendova et al. 2002).

Nicht in dieser Arbeit untersucht wurden die Uhrengene *Rev-Erba*, *Dec1-2*, sowie *Rora*, deren Zusammenhang mit dem zirkadianen System erst kürzlich nachgewiesen wurden (Preitner et al. 2002, Ueda et al. 2002, Honma et al. 2002, Kawamoto et al. 2004, Gréchez-Cassiau et al. 2004, Sato et al. 2004b). Die funktionelle Bedeutung von *Rev-Erba* als Repressor von *Bmal1* für den Uhrenmechanismus ist allgemein akzeptiert. Über REV-ERB $\alpha$ /ROR-Elemente ist es auch in die Regulation von Ausgangssignalen involviert (z.B.

*E4bp4*; zur Übersicht siehe Reppert & Weaver 2002). Sein funktioneller Antagonist als Transaktivator von *Bmal1* wurde kürzlich *Rora* identifiziert (Sato et al. 2004b). DEC1 und DEC2, zwei im SCN lichtinduzierbare und rhythmisch exprimierte Proteine der bHLH-Familie, weisen ähnliche molekulare Eigenschaften wie CRY und PER auf. Die Expression von *Dec1* und *Dec2* wird über CLOCK-BMAL1 vermittelt und DEC1/2 hemmt wiederum CLOCK-BMAL1-vermittelte Transkription (Alvarez & Sehgal 2002, Honma et al. 2002, Kawamoto et al. 2004, Sato et al. 2004a). Gréchez-Cassiau und Mitarbeiter (2004) fanden keinen charakteristischen Phänotyp bei *Dec1-knockout*-Mäusen, auch war die Expression von Uhrengenen in der Leber unbeeinträchtigt. Allerdings könnte nach den Befunden von Gréchez-Cassiau (Gréchez-Cassiau et al. 2004) *Dec1/2* eine Rolle als Ausgangssignal zukommen, ohne selber für ein funktionstüchtiges Uhrwerk notwendig zu sein. Doppel-*knockout*-Experimente stehen für die Beantwortung dieser Frage allerdings noch aus.

#### **4.4 AtT-20 Zellen weisen nach Forskolin-Stimulation eine rhythmische Expression von Uhrengenen auf**

Forskolin-Zugabe zum Kulturmedium von AtT-20 Zellen ruft über mindestens drei Tage eine rhythmische Expression von Uhrengenen hervor, die auch *in vivo* im SCN oszillieren (*Per*, *Cry*, *Bmal1*). Die Expression der hier untersuchten Haushaltsgene *Hprt* und *Gapdh* hingegen unterliegt keinen rhythmischen Schwankungen. Die Periode, die zwischen den jeweiligen mRNA-Spitzenwerten liegen, umfasst etwa 24 h. Nach einer initialen Hochregulation von *Per1* 1 h nach Beginn der Stimulation (diskutiert in 4.3.1) fällt die Expression rasch auf das Ausgangsniveau ab, um dann bei 16 h wieder einen Hochpunkt zu erreichen. Im weiteren Verlauf schließen sich noch zwei weitere solcher Zyklen an, mit Spitzen nach 36-40 h, sowie 60 h nach Stimulation. Im Vergleich zu einer Arbeit von Yagita & Okamura (2000), die ein ähnliches Stimulationsprotokoll an Fibroblasten verwendet haben, treten diese Spitzen etwa 4-8 h früher auf (16-24 h, 48 h, 68 h). Balsalobre und Mitarbeiter (2000b) modifizierten das Protokoll und wendeten eine nur 15-minütige Stimulation mit Forskolin an (in dieser Arbeit und bei Yagita & Okamura: 2 h; gleiche Konzentration). Es gelang ihnen, nur einen schwachen *Per1*-Rhythmus hervorzurufen, aber mit vergleichbaren Spitzenwerten um 16-24 h und 40-44 h. Allerdings muss angemerkt werden, dass in beiden zitierten Veröffentlichungen für *Per1* nur Daten eines Zeitverlaufs exemplarisch vorgestellt wurden, wohingegen in dieser Arbeit Mittelwerte mehrerer Versuche abgebildet sind. Prinzipiell scheinen daher die *Per1*-

Expressionsmuster von Fibroblasten auf die von AtT-20-Zellen übertragbar zu sein. Die geringen zeitlichen Differenzen können durch die variable Ausstattung beider Zelltypen mit Signaltransduktionsmolekülen bedingt sein (siehe oben [4.3]).

#### 4.4.1 Methodische Überlegungen zur Variabilität

Ein methodisch wichtiger Gesichtspunkt bei der Untersuchung von Expressionsunterschieden oszillierender Uhrengene ist die Variabilität der erhobenen Daten. Abgesehen von der initialen Hochregulierung von IEGs nach Applikation des synchronisierenden Stimulus, sind die Schwankungen der Uhrengene-mRNA (durch direkte Nachweismethoden ermittelt) eher gering und eine hohe Variabilität unterschiedlichster Ursache kann sich besonders stark auswirken. Bei Balsalobre und Mitarbeiter (1998) betragen die Expressionsunterschiede etwa 50 % der mRNA-Menge im Vergleich zur unstimulierten Probe für *Rev-Erba*, *Per2* und *Dbp*; bei Yagita & Okamura (2000) sind es immerhin etwa 100% für *Per1*, *Per2* und *Dbp*. Da es sich insgesamt immer um relative Darstellung handelt, ist die Wahl der Bezugsgröße für die Beurteilung der Daten relevant. Häufig wurde in diesen Arbeiten als Bezugsgröße die unstimulierte Probe verwendet und nur einzelne Zeitverläufe ohne statistische Auswertung vorgestellt.

Nagishi und Mitarbeiter fand 2004 heraus, dass einzelne Fibroblasten in Kultur unabhängig voneinander und mit unterschiedlicher Phasenlage zirkadian oszillieren. Man kann also vermuten, dass auch in Kulturen von AtT-20 Zellen dies der Fall ist. Befindet sich jetzt aber in unterschiedlichen Referenzproben jeweils eine unterschiedliche Anzahl von Zellen in einer bestimmten Phasenlage – die Verteilung der Phasenlagen auf mehrere Zellen muss nicht stochastisch sein, u.U. könnten z.B. räumliche Faktoren (inhomogene Verteilung in der Kulturschale) die Zellteilung beeinflussen und so einer lokalen Desynchronisation entgegenwirken (s.u.) -, ist auch die mittlere Phasenlage der beiden Kulturen unterschiedlich. In der Tat schwankt der *Per1*-mRNA-Gehalt (in Bezug auf das Haushaltsgen) in der unstimulierten Probe in dieser Arbeit zwischen dem 0,17- und 3,55-fachen des entsprechenden Mittelwertes. Unter Umständen kann daher eine ‚ungünstige‘ Konstellation in der unstimulierten Probe (wenn man diese als Bezug wählt) dazu führen, dass zirkadiane Oszillationen fälschlich als schwach oder sogar überhaupt nicht als solche erkannt werden. Zwei weitere Einflussfaktoren müssen bedacht werden: (1) Durch die biologische Variabilität wird diese Situation bei der Wiedergabe von Mittelwerten mehrerer Versuchsreihen nochmals

verschärft. Ein Beispiel für ein solches Phänomen ist in dieser Arbeit an Hand des *Cry2*-Expressionsprofils dargestellt, das in der Literatur teilweise als arrhythmisch beschrieben wurde (Vitaterna et al. 1999). Erst in der Darstellung von Zeitverläufen einzelner Versuche zeigt sich eine zirkadiane Oszillation, die sehr gut mit dem Expressionsprofil des in dieser Arbeit dokumentierten *Cry1*-Verlaufs korreliert (siehe 4.3.4). (2) Wie stark letztendlich die Variabilität in der Darstellung der Werte zur Ausprägung kommt, hängt auch von der verwendeten Methode ab. Wie unter 4.2 diskutiert, ist die (intrinsische) Variabilität der Real-Time PCR unter den vorgestellten PCR-Techniken am geringsten. Allerdings wirken sich allgemein bei Amplifikationsverfahren Unregelmäßigkeiten ggf. stärker aus als bei direkten Nachweisverfahren.

#### 4.4.2 Selektivität des Stimulus

Ende 2002 machte Hirota und Mitarbeiter die Aufsehen erregende Entdeckung, dass alleinige Glucose-Applikation in das Kulturmedium in der Lage war, *Per1* und *Per2* in Rat-1 Fibroblasten initial herunterzuregulieren, und anschließend eine rhythmische Expression dieser Gene hervorzurufen. Die Spitzenwerte lagen bei 16-20 h und 40-44 h nach Glucoseapplikation für *Per2*. Die Oszillationen für *Per1* verliefen interessanterweise deutlich schwächer und waren kaum erkennbar. Dieselben Ergebnisse wurden durch einen Mediumwechsel erreicht. Ein Jahr später tauschte Chappell und Mitarbeiter (2003) das Kulturmedium von GT1-7 Zellen in Serum-freies Medium und verursachte ähnliche *Per1*- und *Per2*-Rhythmen mit gemeinsamen Spitzen bei 16 h, 36 h, 56 h. 15-minütige Forskolin-Stimulation vor dem Wechsel zu Serum-freiem Medium hingegen rief einen abweichenden Expressionsverlauf hervor, wobei (abgesehen von der initialen Hochregulierung) der *Per1*-Rhythmus 12 h, der *Per2*-Rhythmus nur 4 h später im Vergleich zu den Zellen auftraten, die ausschließlich Serum-freies Medium erhalten haben. Daher scheint Forskolin vornehmlich auf *Per1*, weniger auf *Per2* zu wirken. Übertragen auf die Situation bei dem in dieser Arbeit angewandten Stimulationsprotokoll ergeben sich folglich drei Umstände, die einen relevanten Einfluss auf die rhythmische Expression von Uhrengenen in AtT-20 Zellen ausüben:

- (1) 24 h vor der eigentlichen Stimulation erfuhren die Zellen einen Mediumwechsel, der durch eine Zunahme der Glucose-Konzentration im Medium eine Synchronisation

bewirkt haben kann<sup>9</sup>. Da die Zellen aber bis zum Zeitpunkt der Synchronisation in Serum-haltigem Medium gehalten wurden, ist anzunehmen, dass sie bereits teilweise durch Zellteilung desynchronisiert wurden (siehe Abschnitt zur Desynchronisation unter 4.4.3). Zudem konnte Nagoshi und Mitarbeiter (2004) zeigen, dass die Phasenlage zumindest von Fibroblasten keine Auswirkung auf das Antwortverhalten der Zelle bei Stimulation hat (so genannte Typ-0-Phasenantwort).

- (2) Die Zellen wurden für einen Zeitraum von 2 h durch die Zugabe von Forskolin stimuliert, was zuvor in einer Arbeit von Lamas & Sassone-Corsi (1997) gezeigt hatte, eine maximale Expression des IEG *Icer* hervorrufen zu können. Der Unterschied zu einer kürzeren, 15-minütigen Stimulation, wie bei Chappell (2003), würde durch die in dieser Arbeit verwendeten Zeitabstände womöglich überhaupt nicht erfasst werden. Durch die anhaltende Phosphorylierung von Proteinkinasen kann spekuliert werden, dass zusätzliche Regulatorproteine aktiviert werden und so zu einer Beschleunigung oder aber Verlangsamung des Synchronisationsprozesses führen.
- (3) Nach Beendigung des Forskolin-Stimulus wurde das aktuelle Medium gegen Serum-freies Medium ausgetauscht, was wiederum ein synchronisierender Reiz auf die Zellen gewesen sein mag. Hierbei könnte es zu einer Addition zweier Effekte kommen, denn das durch Forskolin induzierte ICER (und etwas später auch PER1) hemmt bereits *Per1*, wenn es zusätzlich zu einer Glucose-induzierten Suppression von *Per1* kommt.

Zudem konnte auch in dieser Arbeit ein unterschiedliches Verhalten von *Per1* und *Per2* beobachtet werden. Bei relativ schwachen Expressionsunterschieden scheint *Per2* gegenüber *Per1* deutlich zeitversetzt. Bezieht man obige Überlegungen mit ein, ist vorstellbar, dass AtT-20 Zellen durch den Mediumwechsel am Vortag synchronisiert wurden, auf *Per1* hingegen dieser Reiz kaum Wirkung hatte (wie bei Hirota et al. 2002). *Per1* reagiert nun stark auf Forskolin und passt seinen Rhythmus unmittelbar an, wohingegen *Per2* träger reagiert und seine Schwingungen hinter denen von *Per1* zurückblieben (vgl. Reppert & Weaver 2001). Zwei wichtige Befunde stützen indirekt diese Überlegung: (1) Im SCN ist nicht nur die Induktion von *Per2* in Bezug auf *Per1* zeitlich verzögert, sondern auch das Auftreten der

---

<sup>9</sup> Es wird angenommen, dass diese Synchronisation unter Beteiligung der Glucose-induzierten *immediate early genes* VDUP1 (*Vitamin D3 up-regulated protein*) und TIEG1 (*transforming growth factor  $\beta$ -inducible early gene*) abläuft (Hirota et al. 2002). Für die Nahrungsmittel-induzierte Synchronisation peripherer Zellen wird auch eine Redox-Abhängigkeit von CLOCK und seinem Paralog NPAS2 diskutiert, die in diesem Zusammenhang auch eine Rolle spielen könnte (Schibler et al. 2003).

zirkadianen Spitzenwerte, was vermuten lässt, dass *Per2* einen generell schwächeren Promotor als *Per1* besitzt (vergleiche Travnickova-Bendova et al. 2002). (2) Auf Grund von Versuchen mit *Per2-knockout*-Mäusen (*Per2<sup>Brdm1</sup>*) wird postuliert, dass *Per2* keine bedeutende Rolle in der Suppression seiner eigenen oder der von *Per1* spielt und vielmehr auf *Bmal1* transaktivierend wirkt (Zheng et al. 1999).

Letztendlich aber kann der tatsächliche Ablauf des Synchronisationsprozesses, die Reaktionsfreudigkeit von Uhrengenen und die Relevanz für die Situation *in vivo* nur vermutet werden. Die Übertragbarkeit auf physiologische Prozesse ist bei einem Stimulationsprotokoll, wie es hier verwendet wurde und in Abwandlung zurzeit an ähnlichen Modellen vielfältig genutzt wird, auf Grund der mangelnden Reizelektivität nur bedingt möglich. Da aber Zellkulturen immer einen regelmäßigen Austausch von Medium notwendig machen ist eine solche Einflussnahme praktisch nur durch (aufwendige) kontinuierlichen Mediumwechsel im Rahmen eines Durchflusssystems einigermaßen sicher auszuschließen. Zudem sind Einzelzellbeobachtungen wünschenswert, die eine bessere zeitliche und räumliche Auflösung ermöglichen und molekulare Vorgänge unmittelbarer darstellen können.

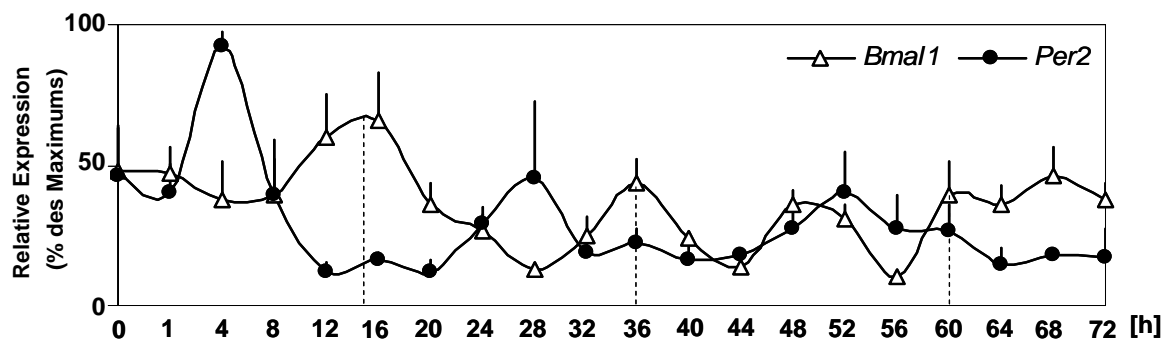
Dennoch kann vermutet werden, dass die initiale Hochregulierung der Repressoren PER1 (PER2) und ICER, wie er in der vorliegenden Arbeit dokumentiert wurde, einen dominanten Anteil bei der Synchronisation von AtT-20 übernehmen. Die nukleäre Akkumulation ihrer Proteine ruft eine starke Hemmung aller durch E-Box- oder CRE-Strukturen am Aufbau zentralen Uhrenmechanismus beteiligter Gene, namentlich von *Pers*, *Crys* und *Rev-Erba* hervor. Durch zwei Mechanismen kann die Uhr nun neu gestartet werden: Jetzt vermehrt vorliegendes PER2 kann die Expression von *Bmal1* antreiben. Gleichzeitig sinkt der REV-ERB $\alpha$ -Gehalt durch CRY-PER-vermittelte Suppression an E-Box-Elementen ab, wodurch *Bmal1* enthemmt wird. Mit der Aktivität von CLOCK-BMAL1 kann nun der erste zirkadiane Zyklus nach der Stimulation eingeleitet werden (vgl. 1.3.2).

Es stellt sich daher für das hier vorgestellte Zellmodell die Frage, ob die beschriebenen Oszillationen Ausdruck einzelner Rückkopplungsmechanismen von Teilkomponenten des molekularen Uhrwerks darstellen, oder ob sie - wie eben beschrieben – tatsächlich die Tätigkeit eines genuinen zirkadianen Oszillators repräsentieren?



#### 4.4.3 Antiphasischer Verlauf von *Per2* und *Bmal1*

Das zeitlich um 12 h versetzte Auftreten (Antiphase) von *Per2*- und *Bmal1*-Transkripten wird häufig als wichtiges Kriterium angeführt, um zu belegen, dass ein funktionierendes zirkadianes Uhrwerk vorliegt (Shearman et al. 2000b, Oishi et al. 1998a, Yagita & Okamura 2000). Auch in dieser Arbeit sind die Spitzenwerte von *Per2* und *Bmal1* um 12 h versetzt (Abb. 4.1): 4 h nach Beginn der Stimulation mit Forskolin erreicht *Per2* einen Spitzenwert, wohingegen sich *Bmal1* auf einem basalen Niveau befindet. Nach Translation tritt PER2 wieder in den Kern ein, um hier seine eigene Transkription zu unterdrücken und/oder die von *Bmal1* zu aktivieren (zusammen mit RORa, bzw. durch eine Enthemmung durch abfallendes REV-ERB $\alpha$ ). BMAL1 kann nun wiederum als CLOCK-BMAL1-Heterodimer die Transkription von *Per*-Genen antreiben. Dieses Wechselspiel ist in den vorliegenden Ergebnissen zumindest für 48 h gegeben. Ein bei 48-52 h zusätzlich auftretender *Bmal1*-Spitzenwert mag Ausdruck einer allmählichen Desynchronisation einer Untergruppe von Zellen sein. Im späteren Verlauf bei 60-64 h ist das gegensätzliche Verhältnis wieder hergestellt: *Bmal1* ist hoch, während *Per2* niedrig ist.



**Abb. 4.1:** Antiphasischer Verlauf der Transkriptmenge von *Per2* und *Bmal1*. Das zeitliche Auftreten von *Bmal1*-Transkripten nach Forskolin-Stimulation in AtT-20 Zellen ist gegenüber den Spitzenwerten von *Per2* um etwa 12 h versetzt (Antiphase). Nach Translation hemmt PER2 seine eigene Transkription und/oder aktiviert die Expression von *Bmal1*. Zusammen mit CLOCK vermittelt BMAL1 den Antrieb der *Per2*-Transkription. Im späteren Verlauf tritt ein zusätzlicher Spitzenwert für *Bmal1* bei 48-52 h auf, der Ausdruck allmählichen Desynchronisation einzelner Zellnester sein mag. Bei 60-64 h stellen sich allerdings nochmals die erwarteten Verhältnisse ein: *Bmal1* ist hoch, während *Per2* niedrig ist.

Wie kommt es aber dazu, dass Zellverbände desynchronisieren? Prinzipiell ist denkbar, dass auch innerhalb eines genetisch homogenen Organismus unterschiedliche Zelltypen durch

unterschiedlichen Enzymbesatz untereinander kleine Abweichungen der Phasenlänge aufweisen, und somit *in vivo* täglich einen synchronisierenden Reiz benötigen, um einheitlich schwingen zu können. Allerdings desynchronisieren auch Zellen eines Organs sowie genetisch homogene Zellen einer Zelllinie in Kultur. Einen wichtigen Beitrag zur Klärung dieser Frage konnte Nagoshi und Mitarbeiter (2004) durch Einzelzellbeobachtungen an Fibroblasten leisten. Sie fanden heraus, dass der zirkadiane Rhythmus von der Mutterzelle auf die Tochterzellen weitergegeben wird. Die übernommene Schwingung der Tochterzellen setzt den Rhythmus der Mutterzelle praktisch fort, allerdings mit einer kleinen Unterbrechung, die in einer Phasenbeschleunigung oder einer Phasenverzögerung resultiert. Nagoshi erklärte das Phänomen dadurch, dass je nachdem, in welcher Phase sich die Mutterzelle zum Zeitpunkt der Zellteilung befindet, der vorübergehende Stopp der Proteinbiosynthese während der Mitose einen beschleunigten Abfall des absteigenden CRY-PER-Gehaltes (Phasenbeschleunigung) bewirkt, bzw. das verspätete Erreichen des Spitzenwertes, wenn sich die Uhr im aufsteigenden Schenkel des CRY-PER-Zyklus befindet. Bei einer Generationszeit (Verdopplungszeit der Zellpopulation) von 15 h für Rat-1 Fibroblasten (Balsalobre et al. 1998) ist leicht vorstellbar, dass innerhalb kürzester Zeit ein Großteil der Zellen in einer anderen Phase schwingt. In dieser Arbeit wurde daher AtT-20 Zellen im Anschluss an die Stimulation in Serum-freiem Medium kultiviert und haben über drei Tage robuste zirkadiane *Per1*-Rhythmen gezeigt. Dennoch kam es am dritten Tag bei einigen der untersuchten Gene zu zusätzlichen mRNA-Spitzenwerten (*Per3* bei 52 h und *Bmall* bei 48-52 h), die Ausdruck einer teilweisen Desynchronisation des Uhrwerks sein können. Die Ursachen hierfür sind nicht bekannt, es kann aber spekuliert werden dass mutierte AtT-20 Zellen sich von der Zellzykluskontrolle abgekoppelt haben und sich nun auch in Serum-freiem Medium teilen können.

Weitere Kriterien sollen zur Beurteilung der Frage herangezogen werden, ob es sich bei den in dieser Arbeit beschriebenen Schwankungen der mRNA-Transkripte um zirkadiane Oszillationen handelt:

- (1) Die Periode ( $\tau$ ), die aus den Abständen der jeweiligen Spitzenwerte der oszillierenden Gene *Per1*, *Per2*, *Per3*, *Cry1* und *Bmall* berechnet wurden (ausgenommen sind initiale Hochregulierungen als Antwort auf den Forskolin-Stimulus) liegt bei  $23,07 \pm 0,44$  h (SEM) und entspricht somit Werten, wie sie allgemein für zirkadiane Periodenlängen beschrieben wurden (vergleiche Pittendrigh 1993).

- (2) Von allen in dieser Arbeit untersuchten Gene zeigen all diejenigen einen oszillierenden Expressionsverlauf, die auch im SCN rhythmischen Schwankungen unterliegen (*Per1*, *Per2*, *Per3*, *Cry1* und *Bmal1*). Andererseits zeigen *Cry2*, *Clock* und *CK1ε* keine oder nur schwache Oszillationen, wie es zuvor auch im SCN beschrieben wurde (vergleiche Dunlap 1999, Ishida et al. 2001, Okamura et al. 1999, Vitaterna et al. 1999).
- (3) Die relative Phasenlagen der hier dargestellten Oszillationen entsprechen prinzipiell denen im SCN bekannten:  $Per1 \rightarrow Per3 \rightarrow Per2 \rightarrow Cry \rightarrow Bmal1$ <sup>10</sup> (vergleiche Reppert & Weaver 2001).
- (4) Obwohl die Mechanismen bei der Synchronisation von AtT-20 Zellen durch Forskolin noch nicht ausreichend geklärt sind, gleicht die initiale Hochregulierung des IEG *Per1* (und *Per2*) der Situation bei Applikation eines Phasen-verschiebenden Lichtreizes im SCN.

Zusammen mit dem Nachweis eines antiphasischen Verlaufs der Uhrengene *Per2* und *Bmal1*, kann man deshalb davon ausgehen, dass sich in AtT-20 Zellen ein robuster zirkadianer Uhrenmechanismus befindet, der im Aufbau dem des SCN zumindest sehr ähnlich ist. Nach der aktuellen Vorstellung über zirkadiane Rhythmen ist es daher möglich, die Rhythmen einzelner AtT-20 Zellen so miteinander zu synchronisieren – z.B. über eine Stimulation mit Forskolin –, dass ein Nachweis dieser Oszillationen mit gängigen molekularbiologischen Methoden – inklusive der PCR – möglich ist. In der Weiterentwicklung dieses Modellsystems können Einzelzellbetrachtungen angestrebt werden, um präzisere Auskunft über sich bei der Synchronisation von peripheren Zellen abspielende Vorgänge zu erlangen.

#### 4.5 Ausblick

Dieser Ausblick soll in drei Teile unterteilt werden: Zunächst soll nochmals auf die Vorgänge bei der Synchronisation eingegangen werden und angeregt werden, durch welche Arbeiten sie in Zukunft erhellt werden könnten. In einem nächsten Schritt sollen kurz wichtige Anwendungsmöglichkeiten für die klinische Medizin aber auch die generelle Bedeutung für Naturwissenschaften aufgezeigt werden, die aus Erkenntnissen der zirkadianen Rhythmus-

Forschung gezogen werden können. Schließlich wird umrissen, welchen Beitrag das Modellsystem der AtT-20 Zellen hierzu leisten kann.

In den letzten Jahren hat das Verständnis der molekularen Mechanismen, die den zentralen Uhrenmechanismus unterhalten und ihn synchronisieren können, enorm zugenommen. Dennoch ist letztlich nicht klar, durch welche Substanz periphere Zellen synchronisiert werden, noch welche Signaltransduktionswege hierzu eingeschlagen werden. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass sich AtT-20 Zellen prinzipiell für die Erforschung zirkadianer Rhythmen eignen. Periphere Zelllinien bieten zwar generell ein attraktives Untersuchungsmodell, die bisherigen Ergebnisse aus verschiedenen Zellsystemen deuten aber darauf hin, dass diese auf Grund ihrer ihnen eigenen Ausstattung an Signalmolekülen unterschiedlich auf synchronisierende Reize reagieren. Daher ist für die Beurteilung, ob der eingesetzte Stimulus physiologische Bedeutung hat, eine Charakterisierung der Komponenten der Signaltransduktionswege vorrangig.

- In den verwendeten AtT-20 Zellen sollte dargestellt werden, ob oder wie stark *B-Raf* exprimiert wird und welchen Einfluss das auf die Aktivierbarkeit der MAPK tatsächlich hat, da hier in der Literatur widersprüchliche Ergebnisse vorliegen. Welche quantitative Rolle spielt die Adenylatzyklase bei der Phosphorylierung von CREB, wenn MAPK über den cAMP-Weg nicht zur Verfügung steht? Welche Rolle spielen die modulierenden Proteine, die an der Vermittlung der pCREB-Transaktivierung beteiligt sind, wie CBP (CREB bindendes Protein) oder CREM? Gibt es Anhalte dafür, dass der MAPK im Laufe mehrerer Zellpassagen durch Mutation des *Ras*-Protoonkogen in AtT-20 Zellen konstitutiv aktiviert wird?
- Eine gegenüberstellende Darstellung von Uhrengen-mRNA mit den entsprechenden Proteinen ist zur Charakterisierung des zirkadianen Oszillators unabdingbar. Darüber hinaus liegen für periphere Zellen bislang nur unvollständig Proteindaten vor. Diese aber gerade sind wichtig, um postrtranslationale Mechanismen illustrieren zu können.
- Diese Arbeit hat weiterhin Hinweise auf eine wichtige Beteiligung von *Icer/ICER* an Synchronisationsprozessen geliefert. Im Pinealorgan und der PT der Hypophyse ist ICER in der Darstellung jahres- und tageszeitlicher Rhythmen durch seine besonderen Eigenschaften in der Signalverarbeitung eingeschlossen. Die Charakterisierung dieser

---

<sup>10</sup> Das besonders späte Auftreten von *Per2* wurde weiter oben erörtert. Bei der dargestellten Reihenfolge wurden die Spitzen der *Per2*-mRNA als Bezugspunkt gewählt unter der Annahme, dass gerade *Per2* und sein antiphasischer Verlauf am besten die Vorgänge des molekularen Uhrwerks widerspiegeln.

könnte zu einem erweiterten Verständnis von adaptiven Prozessen im zirkadianen System beitragen.

- Transfektionsexperimente mit unterschiedlichsten Konstrukten können zudem selektiv die Bedeutung einzelner Uhrengenenprodukte oder von ICER für Synchronisationsprozesse beschreiben. Reporter-gen-transfizierte AtT-20 Zellen böten zusätzlich eine unmittelbare Darstellung der zirkadianen Oszillationen mit hoher zeitlicher und räumlicher Auflösung.

Die Bedeutung von Erkenntnissen, die aus der Erforschung zirkadianer Rhythmen gefunden werden, ist evident. Eine Vielzahl von Lebensprozessen wird durch die innere Uhr mitbestimmt. Allein im Menschen sind die molekularen Spieler dieses zirkadianen Oszillators in vielfältige physiologische wie pathologische Vorgänge involviert:

- Eine beachtlicher Teil der Bevölkerung (in den USA sind es 20%) arbeiten in Schichtarbeit, die sich tief greifend auf das zirkadiane System auswirkt. Intensiv wird daher nach Stoffen gesucht, die eine Justierung der gestörten inneren Uhr bewirken (Chronobiotika). In ähnlicher Weise führen genetische Veränderungen an Uhrengenen zu Beeinträchtigung des Schlaf-Wach-Verhalten, wie beim *familiar advanced sleep phase syndrome* (Toh et al. 2001). Die Aufdeckung zentraler und peripherer Zielstrukturen für Phasen-Bestimmende Signale des Körpers und bei Synchronisationsvorgängen ist hierfür notwendig.
- Periphere Oszillatoren steuern z. B. in der Leber die Synthese von Gallensäuren und Androgenen sowie den Metabolismus von Xenobiotika. Durch eine gezielte, an den zirkadianen Metabolismus adaptierte Applikation von Arzneimitteln kann so deren Bioverfügbarkeit erhöht werden.
- Die CLOCK-BMAL1-abhängige Transkriptionsdynamik des Gens *Weel* reguliert über die Cdc2-Kinase die Progression des Zellzyklus in Hepatozyten (Matsuo et al. 2003). *In vivo* wirkt PER2 antionkogen (Fu & Lee 2003, Fu et al. 2002). Eine Einflussnahme auf die innere Uhr bietet daher womöglich neue Wege in der Tumorthherapie.
- Mittlerweile konnten in *Microarray*-Verfahren mehrere Hunderte gewebespezifischer Gene identifiziert werden, die von der inneren Uhr gesteuert werden (Zur Übersicht

siehe Oishi et al. 2003). Die therapeutischen Möglichkeiten, die sich bei einer pharmakologischen Beeinflussung des Uhrenmechanismus bieten, sind in ihrem Umfang daher noch gar nicht abschätzbar.

Die Ergebnisse dieser Arbeit belegen, dass AtT-20 prinzipiell als Modell zur Erforschung zirkadianer Rhythmen geeignet sind. Sie sind stimulierbar, ihr Antwortverhalten gleicht dem des SCN auf Lichtreize und sie zeigen rhythmische Schwankungen der Uhrengen-Expression, die mit Standard-molekularbiologischen Verfahren nachweisbar sind. Generell bieten Zelllinien – mit Einschränkung durch ihren artifiziellen Charakter - gegenüber dem SCN als Untersuchungsobjekt erhebliche Vorteile. Über die allgemeinen Anwendungsmöglichkeiten dieser Zellsysteme hinaus, wie sie oben grob angedeutet wurden, bieten AtT-20 Zellen – besonders im Vergleich zu den häufig untersuchten Fibroblasten - ein erweitertes Spektrum:

- Zirkadiane Phänomene sind besonders in endokrinen und neuroendokrinen Systemen beschrieben (Korf et al. 1998), die einerseits teilweise selber Bestandteil des zirkadianen Systems sind, andererseits über ihre Hormone die Steuerung essentieller Stoffwechselleistungen übernehmen. Befunde aus einer endokrinen Zelllinie, die in wesentlichen organspezifischen Eigenschaften den Parenchymzellen *in vivo* entspricht, haben daher womöglich höhere physiologische Relevanz, als Erkenntnisse von Bindegewebsvorläuferzellen.
- Im Rahmen der Charakterisierung der cAMP-Signaltransduktion wurden AtT-20 Zellen bereits 1997 stabil mit *sense*- und *antisense*-Konstrukten von *Icer* transfiziert (Lamas et al. 1997), welches auch Untersuchungsgegenstand dieser Arbeit war. Es wird vermutet, dass *Icer* besonders bei Signal-verarbeitenden Prozessen des zirkadianen Systems eine distinkte Rolle spielt. Versuche an solchen Zellen könnten einen wesentlichen Beitrag zur Charakterisierung dieses Transkriptionsfaktors und seiner Bedeutung für die Synchronisation der inneren Uhr leisten.
- Das von AtT-20 Zellen produzierte ACTH kann ggf. als Ausgangssignal der inneren Uhr dargestellt werden. Es ist bekannt, dass die rhythmische ACTH-Inkretion der Hypophyse für die täglichen Schwankungen der Kortisol-Synthese in der Nebennierenrinde verantwortlich ist (Literatur in Veldhuis et al. 2001). Zwei Befunde sind hierbei äußerst interessant: (1) Die Expression von POMC wird als Antwort auf CRH über PKA-abhängige und -unabhängige Mechanismen (CAMKII, MAPK)

induziert, wobei die Nur77- und Nurr1-Kernrezeptoren involviert sind (Kovalovsky et al. 2002). (2) Weiterhin wird berichtet, dass verschiedene bHLH-Transkriptionsfaktoren durch Bindung an eine spezifische E-Box (CANNTG) transaktivierend agieren (Poulin et al. 1997, Therrien et al. 1993). Es stellt sich daher die Frage, welche Wirkung CRH auf die innere Uhr in AtT-20 Zellen hat? Ist es denkbar, dass CRH einen synchronisierenden Effekt auf oszillierende AtT-20 Zellen hat? In welchem Maße wird die E-Box im POMC-Gen von den bHLH-Transkriptionsfaktoren CLOCK-BMAL1 beeinflusst? Sollte CRH keinen Einfluss auf die innere Uhr besitzen, kann die Charakterisierung seines Signaltransduktionsweges indirekt Aufschluss geben über diejenige Signalkaskade, die erfolgreich zur Synchronisation führt.

Trotz der Vielzahl der Möglichkeiten, wie es die AtT-20 Zellen für die Aufdeckung neuer Zusammenhänge bieten, müssen aber auch immer die Einschränkungen bedacht werden, die ein artifizielles System in sich birgt.

## 5. ZUSAMMENFASSUNG

In den unterschiedlichsten Lebewesen, wie Cyanobakterien, Pilzen, Pflanzen und Tieren können tägliche Rhythmen biologischer Aktivität beobachtet werden, die von einem endogenen zirkadianen Oszillator gesteuert werden. Dieser zirkadiane Oszillator residiert bei Säugern im *Nucleus suprachiasmaticus* (SCN) des Hypothalamus, unterhält auch unter konstanten Bedingungen einen Rhythmus mit einer Periodenlänge von etwa 24 h und wird unter natürlichen Bedingungen an den täglichen Wechsel der Beleuchtungsverhältnisse über neuronale Signale, die von den Augen kommen, angepasst. Für die Generation dieser endogenen Oszillationen konnte die rhythmische Expression von so genannten Uhrengenen verantwortlich gemacht werden. Nach der heute gültigen Vorstellung bilden diese zusammen mit ihren Proteinprodukten interagierende transkriptionelle-translationale Rückkopplungsschleifen, die für einen vollständigen Durchlauf, bis ein neuer Zyklus beginnt, etwa 24 h brauchen. Dabei aktivieren zwei Transkriptionsfaktoren der bHLH-PAS-Familie, CLOCK und BMAL1, zu Beginn eines zirkadianen Zyklus als Heterodimer über eine hochspezifisches E-Box-Promotorelement die Transkription der Uhrengene *Per1-3*, *Cry1-2* und *Rev-Erba*. Im Zytosol bilden die Uhrengeneprodukte der CRYs und PERs zusammen mit der Caseinkinase I $\epsilon$  (CKI $\epsilon$ ) einen heterotrimeren Komplex, der im Kern wiederum die CLOCK-BMAL1-abhängige Transkription blockiert. Überraschend ist, dass nicht nur die Neurone des Schrittmachers im SCN diese Rhythmen endogen produzieren können, sondern auch eine Vielzahl peripherer Zellen, selbst, wenn sie über Jahre in Kultur gehalten wurden. Man nimmt an, dass der Rhythmus peripherer Zellen *in vivo* sowohl über neuronalen Verbindungen als auch über bisher noch nicht identifizierte humorale Faktoren synchronisiert wird. Es ist bis heute weder geklärt, worin die molekularen Unterschiede peripherer Oszillatoren im Vergleich zum SCN bestehen, noch, wie der Synchronisationsprozess dieser Zellen zu Stande kommt. Auf Grund methodischer Schwierigkeiten bei der Untersuchung des SCN wurde zuletzt vermehrt gefordert, sich diesen Fragen zunächst an Hand eines Modellsystems, wie einer Zellkultur aus immortalisierten Zellen zu nähern.

In der vorliegenden Arbeit wurde deshalb untersucht, ob sich die kortikotrophe hypophysäre AtT-20 Tumorzelllinie der Maus prinzipiell für die Erforschung zirkadianer Rhythmen und deren Synchronisation eignet, d.h. ob sie selbst über eine stimulierbare rhythmische Uhren-



gen-Expression verfügen. Weiterhin sollte eine geeignete Methode gefunden werden, um zirkadiane Rhythmen auf mRNA-Ebene darzustellen.

In einem ersten Schritt wurde über RT-PCR Technik erstmals nachgewiesen, dass die essentiellen Uhrengene *Per1*, *Per2*, *Per3*, *Cry1*, *Cry2*, *Bmal1*, *Clock* und *CK1 $\epsilon$*  endogen in AtT-20 Zellen exprimiert werden. Für jedes dieser Gene wurde nun eine Variante der quantitativen Real-Time-PCR (RTQ-PCR), die  $\Delta\Delta C_T$ -Methode, validiert, die bei hohem Probendurchsatz zuverlässig Expressionsunterschiede wiedergeben kann. Durch Stimulation mit Forskolin, einem Aktivator der Adenylatzyklase, konnte in dieser Arbeit dokumentiert werden, dass kultivierte AtT-20 Zellen in der Lage sind, eine rhythmische Expression von Uhrengenen mit einer Periodenlänge von etwa 24 h für mindestens drei Tage zu zeigen. Von allen hier untersuchten Uhrengenen wiesen alle diejenigen eine oszillierende Schwankung des mRNA-Gehaltes auf, die auch im SCN rhythmisch exprimiert werden, namentlich *Per1-3*, *Cry1-2*, *Bmal1*. Im SCN konstitutiv exprimierten Uhrengene (*Clock*, *Ck1 $\epsilon$* ) fluktuieren auch nicht in AtT-20 Zellen. Darüber hinaus antworteten Zellen auf das hier angewandte Stimulationsprotokoll mit einer initialen Hochregulierung der Transkription für das Uhrengen *Per1*, das im SCN eine prominente Rolle bei der Anpassung des endogenen Rhythmus an die exogenen Beleuchtungsverhältnisse spielt und dort als Antwort auf synchronisierende Lichtpulse in ähnlicher Weise induziert werden kann. Zeitlich korreliert die Zunahme von *Per1*-Transkripten – ebenfalls der Situation im SCN entsprechend – mit einer Aktivierung des Transkriptionsfaktors CREB und der Induktion seines molekularen Gegenspielers *Icer*. Die zeitlich umschriebene Hochregulation der Transkriptionsrate des Repressors *Icer* während der ersten Stunden nach Applikation des synchronisierenden Reizes spricht dafür, dass dieser womöglich in AtT-20, wie auch bereits für Elemente des zirkadianen Systems beschrieben, eine wichtige Rolle bei der Verarbeitung von Synchronisationsreizes im molekularen Uhrwerk spielt.

Die genaue Analyse der hier erhobenen Expressions-Rhythmen von Uhrengenen und deren zeitliches Verhältnis zueinander deuteten darauf hin, dass in AtT-20 Zellen ein funktionsfähiges zirkadianes Uhrwerk existiert, das dem des SCN in weiten Teilen gleicht. Die Möglichkeiten der Stimulation und Manipulation (z.B. durch Transfektion) erheben AtT-20 Zellen zu einem Modellsystem für die Erforschung der molekularen Abläufe in der zirkadianen Rhythmusgeneration und –synchronisation. Erkenntnisse aus dieser Forschung können in den unterschiedlichsten klinischen Disziplinen wichtige Anwendungsmöglichkeiten finden.

## 6. SUMMARY

Daily rhythms of biological activity are driven by an endogenous circadian oscillator and can be observed in living organisms as diverse as cyanobacteria, fungi, plants and animals. In mammals, this circadian oscillator resides in the suprachiasmatic nucleus of the hypothalamus and produces robust rhythms of a period length of about 24 hours, even under constant conditions. Under natural conditions, neuronal input from the eyes entrains its activity to the environmental light-dark cycle. Endogenous oscillations are generated by rhythmic expression of so called clock genes and their protein products that form interacting transcriptional-translational feedback loops, covering a cycling period close to 24 hours. The circadian cycle starts when two transcription factors of the bHLH-PAS family, CLOCK and BMAL1, enhance transcription by binding as heterodimers to highly selective E-Box elements of *Per1-3*, *Cry1-2* and *Rev-Erba*. In turn, a heterotrimeric complex of the clock gene products of CRYs, PERs and CK1 $\epsilon$  translocates into the nucleus and blocks CLOCK-BMAL1 driven transcription. Surprisingly, not only SCN pacemaker neurons are capable to exhibit endogenous oscillations but also a multitude of different peripheral cells, even if they have been cultured for years. One can assume that *in vivo* the SCN synchronizes rhythms of peripheral cells by means of both neuronal connections and yet unknown humoral factors. To date, it is still not elucidated in which way the molecular setup of pacemaker neurons of the SCN differs from that of peripheral oscillators, nor it is clear, how synchronization of these cells is performed. As the use of the SCN harbours certain methodical difficulties, it has been proposed to clarify these questions for the present by means of culturing immortalized cells.

The present work therefore aimed to determine whether the hypophyseal corticotroph AtT-20 cell line of the mouse can serve as a model to investigate generation and synchronization processes of circadian rhythms, i.e. whether they exhibit rhythmic circadian expression of clock genes upon stimulation. Further, a suitable method should be found, to analyse circadian mRNA rhythms.

Here it has been shown for the first time by means of the RT-PCR technique that AtT-20 cells express endogenously the essential clock genes *Per1*, *Per2*, *Per3*, *Cry1*, *Cry2*, *Bmal1*, *Clock* and *CK1 $\epsilon$* . For each of these genes, a variant of quantitative Real-Time PCR, the  $\Delta\Delta C_T$  method, has been validated, which offers both high-throughput processing of many samples and a reliable display of differences in expression.

This work shows that cultured AtT-20 cells are able to exhibit an almost 24 hour rhythm in clock gene expression for at least 3 days upon stimulation with forskolin, an activator of the *adenylate cyclase*. From all genes investigated, all those (*Per1-3*, *Cry1-2*, *Bmall*) showed oscillating changes of mRNA levels that are also known to be rhythmic in the SCN. On the other hand, clock genes that are constitutively expressed in the SCN did also not oscillate in AtT-20 cells (*Clock*, *CK1ε*). Further, AtT-20 cells showed an initial up regulation of mRNA of the clock gene *Per1* upon stimulation, similar to SCN neurons when synchronized by photic input signals. Similarly, the increase of *Per1* transcripts correlates with the activation of the transcription factor CREB and the induction of its molecular opponent ICER. In AtT-20 cells the up regulation of *Icer* expression is limited to the first hours after stimulation, indicating that this transcriptional repressor plays an important role in the processing of synchronizing stimuli to the molecular clock mechanism, as it has been described in other elements of the circadian system.

The analysis of the here presented rhythms of clock gene expression and their phase relation demonstrates that a functional circadian oscillator exists in AtT-20 cells that is very similar in structure and function to that of the SCN. The possibilities to stimulate and manipulate AtT-20 cells mark them to a model system for the exploration of molecular processes, involved in generation and synchronization of circadian rhythms. Findings of this research may furthermore be applied in various clinical disciplines.

## 7. ABKÜRZUNGEN

Für englischsprachige und lateinische Begriffe, Bezeichnungen für Gene und mRNA wurde generell Kursivschrift verwendet. Proteine wurden in Grossbuchstaben gefasst.

AANAT	Arylalkamin <i>N</i> -acetyltransferase
ACTH	Adrenokortikotrophes Hormon
ADH	Antidiuretisches Hormon (=AVP)
AMPS	Ammoniumpersulfat
ANOVA	<i>Ony-way analysis of variance</i>
AVP	Arginin-Vasopressin (=ADH; antidiuretisches Hormon)
BMAL	<i>Brain and muscle Arnt-like protein</i>
bHLH	<i>Basic helix-loop-helix</i>
BSA	<i>Bovine serum albumine</i> (Rinderserumalbumin)
bp	<i>Base pairs</i> (Basenpaare)
cAMP	Zyklisches Adenosinmonophosphat
cDNA	Complementary DNA
cGMP	Zyklisches Guanosinmonophosphat
CK	Caseinkinase
CLOCK	<i>Circadian locomotor output cycles kaput</i>
CRE	<i>Ca<sup>2+</sup>/cAMP responsive element</i>
CREB	<i>Ca<sup>2+</sup>/cAMP responsive element binding protein</i>
CREM	<i>Ca<sup>2+</sup>/cAMP responsive element modulator</i>
CRY	Cryptochrom
C <sub>T</sub>	<i>Threshold cycle number</i>
CT	<i>Circadian time</i> (zirkadiane Zeit)
CRH	<i>Corticotropin releasing hormone</i> (Kortikoliberin)
DBP	<i>D-element binding protein</i>
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
E-Box	<i>Enhancer Box</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat

---

ERK	Extrazellulär regulierte Kinase
FCS	<i>Fetal calf serum</i>
GCS	<i>Ganglion cervicale superius</i>
HEPES	Hydroxyethylpiperazin-Ethansulfonsäure
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i>
ICER	<i>Inducible cAMP early repressor</i>
IEG	<i>Immediate early gene</i>
MAPK	<i>Mitogen activated protein kinase</i>
mRNA	<i>Messenger RNA</i>
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
PAS	Per-Arnt-Sim
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PER	PERIOD
pERK	Phosphorylierte ERK
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
pMAPK	Phosphorylierte MAPK
PNS	Photoneuroendokrines System
PT	<i>Pars tuberalis hypophysealis</i>
RHT	Retinohypothalamischer Trakt
RRE	<i>REV-ERB/ROR responsive element</i>
RT-PCR	Reverse Transkriptase PCR
RTQ-PCR	Real-Time quantitative PCR
SCN	<i>Nucleus suprachiasmaticus</i>
SDS	<i>Sodiumdodecyl sulfate</i>
SEM	Standardfehler des Mittelwertes
sqRT-PCR	Semiquantitative RT-PCR
SumDens	Summendensitätswert
TBE	Tris Borsäure EDTA
TBST	<i>Tris buffered saline</i> und Tween 20
TEMED	Tetramethyldiamin
TPA	12-O-Tetradecanoylphorbol-13-Acetat
VIP	Vasoaktives Intestinales Polypeptid
ZT	Zirkadiane Zeit

## 8. LITERATUR

- Abe M, Herzog ED, Yamazaki S, Straume M, Tei H, Sakaki Y, Menaker M, Block GD (2002) Circadian rhythms in isolated brain regions. *J Neurosci* 22, 350-356.
- ABIPrism User Bulletin #2, ABIPrism 7700 Sequence Detection System (Version 10/2001), Applied Biosystems, Darmstadt
- Akashi M, Nishida E (2000) Involvement of the MAP kinase cascade in resetting of the mammalian circadian clock. *Genes Dev* 14(6),645-9.
- Akashi M, Tsuchiya Y, Yoshino T, Nishida E (2002) Control of intracellular dynamics of mammalian period proteins by casein kinase 1 $\epsilon$  (CK1 $\epsilon$ ) and CK1 $\delta$  in cultured cells. *Mol Cell Biol* 22, 1693-1703.
- Akiyama M, Kouzu Y, Takahashi S, Wakamatsu H, Moriya T, Meatani M, Watanabe S, Tei H, Sakaki Y, Shibata S (1999) Inhibition of light- or glutamate-induced *mPer1* expression represses the phase shifts into the mouse circadian locomotor and suprachiasmatic firing rhythms. *J Neurosci* 19, 1115-1121.
- Akiyama M, Minami Y, Kuriyama K, Shibata S (2003) MAP kinase-dependent induction of clock gene expression by alpha 1-adrenergic receptor activation. *FEBS Lett* 542(1-3),109-14.
- Albrecht U, Sun ZS, Eichele G, Lee CC (1997) A differential response of two putative mammalian circadian regulators, *mper1* and *mper2*, to light. *Cell* 91, 1055-1064.
- Albrecht U, Zheng B, Larkin D, Sun ZS, Lee CC (2001) *mPer1* and *mPer2* are essential for normal resetting of the circadian clock. *J Biol Rhythms* 16, 100-104.
- Allen G, Rappe J, Earnest DJ, Cassone VM (2001) Oscillating on borrowed time: diffusible signals from immortalized suprachiasmatic nucleus cells regulate circadian rhythmicity in cultured fibroblasts. *J Neurosci* 21(20), 7937-43.
- Alvarez JD, Sehgal A (2002). Finer clock control. *Nature* 419, 789-799.
- Apostolakos MJ, Schuermann WH, Frampton MW, Utel MJ, Willey JC (1993) Measurement of gene expression by multiplex competitive polymerase chain reaction. *Anal. Biochem.* 213, 277-284.
- Artinian LR, Ding JM, Gillette MU (2001) Carbon monoxide and nitric oxide: interacting messengers in muscarinic signaling to the brain's circadian clock. *Exp Neurol* 171(2), 293-300.
- Aschoff J, Saint Paul U von, Wever R (1971) Die Lebensdauer von Fliegen unter dem Einfluß von Zeitverschiebungen. *Naturwiss* 58, 574.
- Bae K, Jin X, Maywood ES, Hastings MH, Reppert SM, Weaver DR (2001) Differential functions of *mPer1*, *mPer2* and *mPer3* in the SCN circadian clock. *Neuron* 30, 525-536.
- Bartness TJ, Song CK, Demas GE (2001) SCN efferents to peripheral tissues: implications for biological rhythms. *J Biol Rhythms* 16(3), 196-204.
- Bakin RE, Gioeli D, Sikes RA, Bissonette EA, Weber MJ (2003) Constitutive activation of the Ras/mitogen-activated protein kinase signaling pathway promotes androgen hypersensitivity in LNCaP prostate cancer cells. *Cancer Res.* 63(8), 1981-9.
- Balsalobre A, Damiola F, Schibler U (1998) A serum shock induces circadian gene expression in mammalian tissue culture cells. *Cell* 93, 4092-4096.
- Balsalobre A, Brown SA, Marcacci L, Tronche F, Kellendonk C, Reichardt HM, Schutz G, Schibler U (2000a) Resetting of circadian time in peripheral tissues by glucocorticoid signaling. *Science* 289(5488), 2344-7.

- Balsalobre A, Marcacci L, Schibler U (2000b) Multiple signaling pathways elicit circadian gene expression in cultured Rat-1 fibroblasts. *Current Biology* 10, 1291-1294.
- Becker-Andre M (1991) Quantitative evaluation of mRNA levels. *Meth Mol Cell Biol* 2, 189-201.
- Berson DM (2003) Strange vision: ganglion cells as circadian photoreceptors. *Trends Neurosci* 26, 314-20.
- Bibby AC, Litchfield DW (2005) The Multiple Personalities of the Regulatory Subunit of Protein Kinase CK2: CK2 Dependent and CK2 Independent Roles Reveal a Secret Identity for CK2beta. *Int J Biol Sci* 1(2), 67-79.
- Bradford M (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254.
- Brown SA, Zimbrunn G, Fleury-Olela F, Preitner N, Schibler U (2002) Rhythms of mammalian body temperature can sustain peripheral circadian clocks. *Curr Biol* 12, 1574-1583.
- Buijs RM, Hermes MH, Kalsbeck A (1998) The suprachiasmatic nucleus-paraventricular nucleus interactions: a bridge to the neuroendocrine and autonomic nervous system. *Prog Brain Res* 119, 365-382.
- Bunger MK, Wilsbacher LD, Moran SM, Clendenin C, Radcliffe LA, Hogenesch JB, Simon MC, Takahashi JS, Bradfield CA (2000) *Mop3* is an essential component of the master circadian pacemaker in mammals. *Cell* 103, 1009-1017.
- Butcher GQ, Dziema H, Collamore M, Burgoon PW, Obietran K (2002) The p42/44 mitogen-activated protein kinase pathway couples photic input to circadian clock entrainment. *J Biol Chem* 277, 29519-29525.
- Carpentier J, Cazamian P (1981) *Nachtarbeit – Ihre Auswirkungen auf Gesundheit und Wohlbefinden* (1977). Rationalisierungskuratorium der deutschen Wirtschaft (RKW). Eschborn.
- Cashmore AR, Jarillo JA, Wu YJ, Liu D (1999) Cryptochromes: blue light receptors for plants and animals. *Science* 284(5415),760-5.
- Cermakian N, Monaco L, Pando M, Dietrich A, Sassone-Corsi P (2001) Altered behavioural rhythms and clock gene expression in mice with a targeted mutation in the *Period1* gene. *EMBO J* 20, 3967-3974.
- Chappell PE, White RS, Mellon PL (2003) Circadian gene expression regulates pulsatile gonadotropin-releasing hormone (GnRH) secretory patterns in the hypothalamic GnRH-secreting GT1-7 cell line. *J Neurosci* 23(35),11202-13.
- Cheng MY, Bullock CM, Li C, Lee AG, Bermak JC, Belluzzi J, Weaver DR, Leslie FM, Zhou QY (2002) Prokineticin 2 transmits the behavioural circadian rhythm of the suprachiasmatic nucleus. *Nature* 417, 405-410.
- Chomczynski P, Sacchi N (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidine thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162, 156-159.
- Clemens W (1981) Arbeitsbelastung und gesundheitliche Auswirkungen bei Schichtarbeit. *Sozialer Fortschritt* 30, 25-29
- Crosio C, Cermakian N, Allis CD, Sassone-Corsi P (2000) Light induces chromatin modifications of mammalian circadian clock. *Nat Neurosci* 3, 1241-1247.
- Coogan AN, Piggins HD (2003) Circadian and photic regulation of phosphorylation of ERK1/2 and Elk-1 in the suprachiasmatic nuclei of the Syrian hamster. *J Neurosci* 23, 3085-3095.
- Czeisler CA, Shanahan TL, Klerman EB, Martens H, Brotman DJ, Emens JS, Klein T, Rizzo JF (1995) Suppression of melatonin secretion in some blind patients by exposure to bright light. *N Engl J Med* 332, 6-11.
- Damiola F, Le Minh N, Preitner N, Kornmann B, Fleury-Olela F, Schibler U (2000) Restricted feeding uncouples circadian oscillators in peripheral tissues from the central pacemaker in the suprachiasmatic nucleus. *Genes Dev* 14, 2950-2961.

- Devi L (1992) Secretion and regulation of a neuropeptide-processing enzyme by AtT-20 cells. *Endocrinology* 131(4), 1930-5.
- Drijfhout W, van der Linde A, Kooi S, Grol C, 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.
- Drucker-Colin R, Aguilar-Roblero R, Garcia-Fernandez F, Fernandez-Cancino F, Rattoni FB (1984) Fetal suprachiasmatic nucleus transplants: diurnal rhythm recovery of lesioned rats. *Brain Res* 311, 353-357
- Dvornyk V, Vinogradova O, Nevo E (2003) Origin and evolution of circadian clock genes in prokaryotes. *Proc Natl Acad Sci USA* 100, 2495-2500
- Dugan LL, Kim JS, Zhang Y, Bart RD, Sun Y, Holtzman DM, Gutmann DH (1999) Differential effects of cAMP in neurons and astrocytes. Role of B-raf. *J Biol Chem* 274(36), 25842-8.
- Dunlap JC (1999) Molecular Bases of Circadian Clocks. *Cell* 96, 271-290.
- Dziema H, Oatis B, Butcher GQ, Yates R, Hoyt KR, Obrietan K (2003) The ERK/MAP kinase pathway couples light to immediate-early gene expression in the suprachiasmatic nucleus. *Eur J Neurosci* 17, 1617-1627.
- Earnest DJ, Digiorgio CD, Sladek CD (1991) Effects of tetrodotoxin on the circadian pacemaker mechanism in suprachiasmatic explants in vitro. *Brain Res Bull* 26, 677-682.
- Earnest DJ, Liang FQ, Ratcliff M, Cassone VM (1999) Immortal time: circadian clock properties of rat suprachiasmatic cell lines. *Science* 283, 693-695.
- Eide EJ, Vielhaber EL, Hinz WA, Virshup DM (2002) The circadian regulatory proteins BMAL1 and cryptochromes are substrates of casein kinase 1 $\epsilon$ . *J Biol Chem* 277(19), 17248-17254.
- Emery P, Reppert SM (2004) A rhythmic Ror. *Neuron*. 43(4), 443-6
- Esseveldt LKE van, Lehman MN, Boer GJ (2000) The suprachiasmatic nucleus and the circadian time-keeping system revisited. *Brain Res Rev* 33, 34-77.
- Etchegaray JP, Lee C, Wade PA, Reppert SM (2003) Rhythmic histone acetylation underlies transcription in the mammalian circadian clock. *Nature* 421, 177-182.
- Foster RG, Timmers AM, Schalken JJ, de Grip WJ (1989) A comparison of some photoreceptor characteristics in the pineal and retina. II. The Djungarian hamster (*Phodopus sungorus*). *J Comp Physiol* 165, 565-572.
- Fu L, Lee CC (2003) The circadian clock: pacemaker and tumour suppressor. *Nat Rev Cancer* 3(5), 350-61.
- Fu L, Pelicano H, Liu J, Huang P, Lee C (2002) The circadian gene *Period2* plays an important role in tumor suppression and DNA damage response in vivo. *Cell* 111(1),41-50.
- Gall C von, Noton E, Lee C, Weaver DR (2003) Light does not degrade the constitutively expressed BMAL1 protein in the mouse suprachiasmatic nucleus. *Eur J Neurosci* 18, 125-133.
- Gall C von, Stehle JH, Weaver DR (2002) Mammalian melatonin receptors: molecular biology and signal transduction. *Cell Tissue Res* 309, 151-162.
- Ganguly S, Coon SL, Klein DC (2002) Regulation of melatonin biosynthesis in the mammalian pineal organ. *Cell Tissue Res* 309, 127-138.
- Gau D, Lemberger T, von Gall C, Kretz O, Le Minh N, Gass P, Schmid W, Schibler U, Korf HW, Schutz G (2002) Phosphorylation of CREB Ser142 regulates light-induced phase shifts of the circadian clock. *Neuron* 34(2),245-53.
- Gekakis N, Staknis D, Nguyen HB, Davis FC, Wilsbacher LD King DP, Takahashi JS, Weitz CJ (1998) Role of the CLOCK protein in the mammalian circadian mechanism. *Science* 280, 1564-69.
- Gillette MU, Mitchell JW (2002) Signaling in the suprachiasmatic nucleus: selectively responsive and integrative. *Cell Tissue Res* 309, 99-107.



- Ginty DD, Kornhauser JM, Thompson MA, Bading H, Mayo KE, Takahashi JS, Greenberg ME (1993) Regulation of CREB phosphorylation in the suprachiasmatic nucleus by light and a circadian clock. *Science* 260, 238-241.
- Gréchez-Cassiau A, Panda S, Lacoche S, Teboul M, Azmi S, Laudet V, Hogenesch JB, Taneja R, Delaunay F (2004) The transcriptional repressor STRA13 regulates a subset of peripheral circadian outputs. *J Biol Chem* 279, 1141-1150.
- Güldner FH, Wolff JR (1996) Complex synaptic arrangements in the rat suprachiasmatic nucleus: a possible basis for the “Zeitgeber” and non-synaptic synchronization of neuronal activity. *Cell Tissue Res.* 284, 203-214.
- Gurdjian ES (1927) The diencephalons of the albino rat. *J Comp Neurol* 43, 1-114.
- Hamada T, Antle MC, Silver R (2004) Temporal and spatial expression patterns of canonical clock genes and clock-controlled genes in the suprachiasmatic nucleus. *Eur J Neurosci* 19, 1741-1748.
- Hamada T, Le Sauter J, Venuti JM, Silver R (2001) Expression of *Period* genes: rhythmic and nonrhythmic compartments of the suprachiasmatic nucleus pacemaker. *J Neurosci* 21, 7742-7750.
- Hamada T, LeSauter J, Lokshin M, Romero MT, Yan L, Venuti JM, Silver R (2003) Calbindin influences response to photic input in suprachiasmatic nucleus. *J Neurosci* 23, 8820-8826.
- Hannibal J (2002) Neurotransmitters of the retino-hypothalamic tract. *Cell Tissue Res* 309, 73-88.
- Hattar S, Liao HW, Takao M, Berson DM, and Yau K-W (2002) Melanopsin-containing retinal ganglion cells: Architecture, projections, and intrinsic photosensitivity. *Science* 295, 1065-1070.
- Hara R, Wan K, Wakamatsu H, Aida R, Moriya T, Akiyama M, Shibata S (2001) Restricted feeding entrains liver clock without participation of the suprachiasmatic nucleus. *Genes Cells* 6, 269-278.
- Harper LV, Hilton AC, Jones AF (2003) RT-PCR for the pseudogene-free amplification of the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene (*gapd*). *Mol Cell Probes* 17(5), 261-5.
- Hastings MH, Duffield GE, Ebling FJP, Kidd A, Maywood ES, Schurov I (1997) Non-photoc signalling in the suprachiasmatic nucleus. *Biol Cell* 89, 495-503.
- Hastings MH, Follett BK (2001) Toward a molecular biological calendar? *J Biol Rhythms* 16(4), 424-30.
- Heid CA, Stevens J, KJ Livak, Williams PM (1996) Real time quantitative PCR. *Gen Res* 6, 986-994.
- Hirota T, Okano T, Kokame K, Shirotani-Ikejima H, Miyata T, Fukada Y (2002) Glucose down-regulates *Per1* and *Per2* mRNA levels and induces circadian gene expression in cultured Rat-1 fibroblasts. *J Biol Chem* 277(46), 44244-51.
- Hogenesch JB, Gu YZ, Moran SM, Shimomura K, Radcliff LA (2000) The basic helix-loop-helix-PAS protein MOP9 is a brain-specific heterodimeric partner of circadian and hypoxia factors. *J Neurosci* 20, RC83
- Honma S, Kawamoto T, Takagi Y, Fujimoto K, Sato F, Noshiro M, Kato Y, Honma KI (2002) *Dec1* and *Dec2* are regulators of the mammalian clock. *Nature* 419, 841-844.
- Hoorneman EM, Buijs RM (1982) Vasopressin fiber pathways in the rat brain following suprachiasmatic nucleus lesioning. *Brain Res* 243, 235-241.
- Horst van der GT, Muijtjens M, Kobayashi K, Takano R, Kanno S, Takao M, de Wit J, Verkerk A, Eker AP, van Leenen D, Buijs R, Bootsma D, Hoeijmakers JH, Yasui A. (1999) Mammalian *Cry1* and *Cry2* are essential for maintenance of circadian rhythms. *Nature* 398, 627-630.

- Ibuka M, Inouye ST, Kawamura H (1997) Analysis of sleep-wakefulness rhythms in male rats after suprachiasmatic nucleus lesions and ocular enucleation. *Brain Res* 122, 33-47.
- Illnerová H, Backstrom M, Saaf J, Wetterberg L, Vanbo M (1978) Melatonin in rat pineal gland and serum: rapid parallel decline after light exposure at night. *Neurosci Lett* 9, 189-193.
- Illnerová H, Vanecek J, Krecek J, Wetterberg L, Saaf J (1979) Effect of one minute exposure to light at night on rat pineal serotonin N-acetyltransferase and melatonin. *J Neurochem* 32, 673-675.
- Jin X, Shearman LP, Weaver DR, Zylka MJ, De Vries GJ, Reppert SM (1999) A molecular mechanism regulating rhythmic output from the suprachiasmatic circadian clock. *Cell* 96, 57-68.
- Jiang ZG, Yang Y, Liu ZP, Allen CN (1997) Membrane properties and synaptic inputs of suprachiasmatic nucleus neurons in rat brain slices. *J Physiol* 499, 141-159.
- Jiralerspong S, Patel PI (1996) Regulation of the hypoxanthine phosphoribosyltransferase gene: in vitro and in vivo approaches. *Proc Soc Exp Biol Med* 212(2), 116-27.
- Johnson RF, Moore RY, Morin LP (1988) Loss of entrainment and anatomical plasticity after lesions of the hamster retinohypothalamic tract. *Brain Res* 460, 297-313.
- Johnson CH, Golden SS (1999) Circadian programs in cyanobacteria: adaptiveness and mechanisms. *Ann Rev Microbiol* 53, 389-409.
- Johnston JD, Cagampang FR, Stirland JA, Carr AJ, White MR, Davis JR, Loudon AS (2003) Evidence for an endogenous per1- and ICER-independent seasonal timer in the hamster pituitary gland. *FASEB J* 17(8), 810-5.
- Jolkkonen J, Tuomisto L, Van Wimersma Greidanus TB, Riekkinen PJ (1988) Vasopressin levels in the cerebrospinal fluid of the rats with lesions of the paraventricular and suprachiasmatic nuclei. *Neurosci Lett* 86, 184-188.
- Kramer A, Yang FC, Snodgrass P, Li X, Scammell TE, Davis FC, Weitz CJ (2001) Regulation of daily locomotor activity and sleep by hypothalamic EGF receptor signaling. *Science* 294, 2511-2515.
- Kalsbeek A, Buijs RM (2002) Output pathways of the mammalian suprachiasmatic nucleus: coding circadian time by transmitter selection and specific targeting. *Cell Tissue Res* 309(1), 109-18.
- Kalsbeek A, Buijs RM, Engelmann M, Wotjak CT, Landgraf R (1995) In vivo measurement of a diurnal variation in vasopressin release in the rat suprachiasmatic nucleus. *Brain Res* 682, 75-82.
- Kawamoto T, Noshiro M, Sato F, Maemura K, Tkeda N, Nagai R, Iwata T, Fujimoto K, Furukawa M, Miyazaki K, Honma S, Honma K, Kato Y (2004) A novel autofeedback loop of *Decl* involved in circadian rhythm regulation. *Biochem Biophys Res Commun* 313(1), 117-24.
- King DP, Zhao Y, Sangoram AM, Wilsbacher LD, Tanaka M, Antoch MP, Steeves TDL, Vitaterna MH, Kornhauser JM, Lowery PL, Turek FW, Takahashi JS (1997) Positional cloning of the mouse circadian *Clock* gene. *Cell* 89, 641-653.
- Klein DC (1985) Photoneural regulation of the mammalian pineal gland. In: *Photoperiodism, melatonin and the pineal gland*. Ciba Foundation Symposium 117, Pitman, London, pp. 38-56.
- Klein DC, Moore RY (1979) Pineal N-acetyltransferase and hydroxyindol-O-methyltransferase: control by the retinohypothalamic tract and the suprachiasmatic nucleus. *Brain Res* 174, 245-262.
- Klein DC, Moore RY, Reppert SM (1991) *Suprachiasmatic nucleus: the mind's clock*. Oxford Univ Press, New York Oxford
- Klein DC, Roseboom PH, Coon SL (1996) New light is shining on the melatonin rhythm enzyme – the first postcloning view. *Trends Endocrinol Metabol* 7, 106-112.

- Korf HW (1994) The pineal organ as a component of the biological clock. *Ann NY Acad Sci* 719, 13-42.
- Korf HW (1996) The innervation of the pineal gland. In: Burnstock G (Eds) *The autonomic nervous system*. Vol. 10: Autonomic-endocrine interaction (Unsicker K, Ed) Amsterdam, Harwood, pp. 129-180.
- 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.
- Kovalovsky D, Refojo D, Liberman AC, Hochbaum D, Pereda MP, Coso OA, Stalla GK, Holsboer F, Arzt E (2002) Activation and induction of NUR77/NURR1 in corticotrophs by CRH/cAMP: involvement of calcium, protein kinase A, and MAPK pathways. *Mol Endocrinol* 16(7), 1638-51.
- Kramer A, Yang FC, Snodgrass P, Li X, Scammell TE, Davis FC, Weitz CJ (2001) Regulation of daily locomotor activity and sleep by hypothalamic EGF receptor signaling. *Science* 294(5551), 2511-5.
- Kramm CM, de Grip WJ, Korf HW (1993) Rod-opsin immunoreaction in the pineal organ of the pigmented mouse does not indicate the presence of a functional photopigment. *Cell Tissue Res* 274, 71-78.
- Krieg WJS (1932) The hypothalamus of the albino rat. *J Comp Neurol* 55, 19-89.
- Kruisbrink J, Mirmiran M, Van der Woude TP, Boer GJ (1987) Effects of enhanced cerebrospinal fluid levels of vasopressin, vasopressin antagonist or vasoactive intestinal polypeptide on circadian sleep-wake rhythm in the rat. *Brain Res* 419, 76-86.
- Kume K, Zylka MJ, Sriram S, Shearman LP, Weaver DR, Jin X, Maywood ES, Hastings MH, Reppert SM. *Cell* 98, 193-205.
- Kuwaki T, Kurihara H, Cao WH, Kurihara Y, Uekawa M, Yazaki Y, Kumada M (1997) Physiological role of brain endothelin in the central autonomic control: from neuron to knockout mouse. *Prog Neurobiol* 51(5), 545-79.
- Laemmli UK. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227(5259), 680-5.
- Lamas M, Molina C, Foulkes NS, Jansen E, Sassone-Corsi P (1997) Ectopic ICER expression in pituitary corticotroph AtT20 cells: effects on morphology, cell cycle, and hormonal production. *Mol Endocrinol* 11(10), 1425-34.
- Lamas M, Sassone-Corsi P. (1997) The dynamics of the transcriptional response to cyclic adenosine 3',5'-monophosphate: recurrent inducibility and refractory phase. *Mol Endocrinol* 11(10), 1415-24.
- Landschulz WH, Johnson PF, McKnight S (1988) The leucine zipper: a hypothetical structure common to a new class of DNA binding proteins. *Science* 240(4860), 1759-64.
- Lee C, Etchegaray JP, Cagampang FRA, Loudon ASI, Reppert SM (2001) Posttranslational mechanism regulate the mammalian circadian clock. *Cell* 107, 855-867.
- Lee C, Weaver DR, Reppert SM (2004) Direct association between mouse PERIOD and CK1 $\epsilon$  is critical for a functioning circadian clock. *Mol Cell Biol* 24(2), 584-594.
- Lehman MN, Silver R, Gladstone WR, Kahn RM, Gibson M, Bittman EL (1987) Circadian rhythmicity restored by neural transplant: Immunocytochemical characterization of the graft and its integration with the host brain. *J Neurosci* 7, 1626-1638.
- Le Minh N, Damiola F, Tronche F, Schutz G, Schibler U (2001) Glucocorticoid hormones inhibit food-induced phase-shifting of peripheral circadian oscillators. *Embo J* 20, 7128-7136.
- Li M, Bullock CM, Knauer DJ, Ehlert FJ, Zhou QY (2001) Identification of two prokineticin cDNAs: Recombinant proteins potently contract gastrointestinal smooth muscle. *Mol Pharmacol* 59, 692-698.

- Li X, Sankrithi N, Davis FC (2002) Transforming growth factor- $\alpha$  is expressed in astrocytes of the suprachiasmatic nucleus in hamster: role of glial cells in circadian clocks. *Neuroreport* 13(16), 2143-7.
- Lin JM, Kilman VL, Keegan K, Paddock B, Emery-Le M, Rosbash M, Allada R (2002) A role for casein kinase 2 $\alpha$  in the *Drosophila* circadian clock. *Nature* 19-26, 420(6917):816-20.
- Liou SY, Shibata S, Iwasaki K, Ueki S (1986) Optic nerve stimulation-induced increase of release of 3H-glutamate and 3H-aspartate but not 3H-GABA from the suprachiasmatic nucleus in slices of rat hypothalamus. *Brain Res Bull* 16, 527-531.
- Liu C, Reppert SM (2000) GABA synchronizes clock cells within the suprachiasmatic circadian clock. *Neuron* 25, 123-128.
- Liu C, Weaver DR, Strogatz SH, Reppert SM (1997) Cellular construction of a circadian clock: period determination in the suprachiasmatic nuclei. *Cell* 91, 855-860.
- Livak KJ, Flood SJA, Marmaro J, Giustu W, Deetz K (1995) Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridization. *PCR Methods and Application* 4, 357-362.
- Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2 $^{-\Delta\Delta C(T)}$  Method. *Methods* 25 (4), 402-408.
- Lucas RJ, Hattar S, Tak0 M, Berson DM, Foster RS, Yau K-W (2003) Diminished pupillary light reflex at high irradiances in melanopsin-knockout mice. *Science* 299, 245-247.
- Maemura K, de la Monte SM, Chin MT, Layne MD, Hsieh CM, Yet SF, Perrella MA, Lee ME (2000) CLIF, a novel cycle-like factor, regulates the circadian oscillation of plasminogen activator inhibitor-1 gene expression. *J Biol Chem* 275(47), 36847-51.
- 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, 3326-3336.
- Matsuo T, Yamaguchi S, Mitsui S, Emi A, Shimoda F, Okamura H (2003) Control mechanism of the circadian clock for timing of cell division in vivo. *Science*. 302(5643), 255-9.
- McNamara P, Seo SP, Rudic RD, Sehgal A, Chakravarti D, FitzGerald GA (2001) Regulation of CLOCK and MOP4 by nuclear hormone receptors in the vasculature: a humoral mechanism to reset a peripheral clock. *Cell*. 105(7), 877-89.
- Meijer JH, Rietveld WJ (1989) Neurophysiology of the suprachiasmatic circadian pacemaker in rodents. *Physiol Rev* 69, 671-707.
- Messenger S, Hazlerigg DG, Mercer JG, Morgan PJ (2000) Photoperiod differentially regulates the expression of Per1 and ICER in the pars tuberalis and the suprachiasmatic nucleus of the Siberian hamster. *Eur J Neurosci* 12(8), 2865-70.
- Messenger S, Ross AW, Barrett P, Morgan PJ (1999) Decoding photoperiodic time through Per1 and ICER gene amplitude. *Proc Natl Acad Sci USA* 96(17), 9938-43.
- Mioduszevska B, Jaworski J, Kaczmarek L (2003) Inducible cAMP early repressor (ICER) in the nervous system--a transcriptional regulator of neuronal plasticity and programmed cell death. *J Neurochem* 87(6), 1313-20.
- Mitsui S, Yamaguchi S, Matsuo T, Ishida Y, Okamura H (2001) Antagonistic role of E4BP4 and PAR proteins in the circadian oscillatory mechanism. *Genes Dev* 15, 995-1006.
- Molina CA, Foulkes NS, Lalli E, Sassone-Corsi P (1993) Inducibility and negative autoregulation of CREM: an alternative promoter directs the expression of ICER, an early response repressor. *Cell* 75(5), 875-86.
- Moore RY, Eichler VB (1972) Loss of circadian adrenal corticosterone rhythm following suprachiasmatic nucleus lesions in the rat. *Brain Res* 42, 201-206.
- Moore RY, Klein DC (1974) Visual pathways and the central neural control of a circadian rhythm in pineal serotonin N-acetyltransferase activity. *Brain Res* 71, 17-33.

- Moore RY, Lenn NJ (1972) A retinohypothalamic projection in the rat. *J Comp Neurol* 146, 1-14.
- Moore RY, Speh JC, Card JP (1995) The retinohypothalamic tract originates from a distinct subset of retinal ganglion cells. *J Comp Neurol* 352, 351-366.
- Morgan PJ, Barrett H, Howell E, Helliwell R (1994) Melatonin receptors: localization molecular pharmacology and physiological significance. *Neurochem Int* 24, 101-146.
- Morgan PJ, Ross AW, Graham ES, Adam C, Messenger S, Barrett P (1998) *oPer1* is an early response gene under photoperiodic regulation in the ovine pars tuberalis. *J Neuroendocrinol* 10(5), 319-23.
- Morris ME, Viswanathan N, Kuhlman S, Davis FC, Weitz CJ (1998) A screen for genes induced in the suprachiasmatic nucleus by light. *Science* 279, 1544-1547.
- Mrosovsky N (2001) Further characterization of the phenotype of mCry1/mCry2-deficient mice. *Chronobiol Int* 18(4), 613-25.
- Murakami M, Takamura M, Takahashi K, Utunomiya K, Kuroda H, Ethoh T (1991) Long-term cultured neurons from rat suprachiasmatic nucleus retain the capacity for circadian oscillation of vasopressin release. *Brain Res* 545, 347-350.
- Murphy LD, Herzog CE, Rudick JB, Fojo AT, Bates SE (1990) Use of the polymerase chain reaction in the quantitation of *mdr-1* gene expression. *Biochem* 29, 10351-10356.
- Nagano M, Adachi A, Nakahama K, Nakamura T, Tamada M, Meyer-Bernstein E, Sehgal A, Shigeyoshi Y (2003) An abrupt shift in the day/night cycle causes desynchrony in the mammalian circadian center. *J Neurosci* 23(14), 6141-51.
- Nagoshi E, Saini C, Bauer C, Laroche T, Naef T, Schibler U (2004) Circadian gene expression in individual fibroblasts: cell-autonomous and self-sustained oscillators pass time to daughter cells. *Cell* 119, 693-705.
- Nakahata Y, Okumura N, Shima T, Okada M, Nagai K (2000) Light-induced tyrosine phosphorylation of BIT in the rat suprachiasmatic nucleus. *J Neurochem* 74, 2436-2444.
- Nakahata Y, Okumura N, Otani H, Hamada J, Numakawa T, Sano S, Nagai K (2003) Stimulation of BIT induces a circadian phase shift of locomotor activity in rats. *Brain Res* 976, 194-201.
- Nomura K, Takeuchi Y, Yamaguchi S, Okamura H, Fukunaga K (2003) Involvement of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II in the induction of *mPer1*. *J Neurosci Res* 72, 384-392.
- Nonaka H, Emoto N, Ikeda K, Fukuya H, Rohman MS, Raharjo SB, Yagita K, Okamura H, Yokoyama M (2001) Angiotensin II induces circadian gene expression of clock genes in cultured vascular smooth muscle cells. *Circulation* 104(15), 1746-8.
- Noonan KE, Beck C, Holzmayer TA, Chin JE, Wunder JS, Andrulis IL, Gazdar AF, Willmann CL, Griffith B, Von-Hoff DD, Robinson IB (1990) Quantitative analysis of MDR1 (multidrug resistance) gene expression in human tumors by polymerase chain reaction. *Proc Natl Acad Sci USA* 87, 7160-7164.
- Obrietan K, Impey S, Smith D, Athos J, Storm DR (1999) Circadian regulation of cAMP response element-mediated gene expression in the suprachiasmatic nuclei. *J Biol Chem* 274(25), 17748-56.
- Obrietan K, Impey S, Storm DR (1998) Light and circadian rhythmicity regulate MAP kinase activation in the suprachiasmatic nuclei. *Nat Neurosci* 1, 693-700.
- Oishi K, Miyazaki K, Kadota K, Kikuno R, Nagase T, Atsumi G, Ohkura N, Azama T, Mesaki M, Yukimasa S, Kobayashi H, Iitaka C, Umehara T, Horikoshi M, Kudo T, Shimizu Y, Yano M, Monden M, Machida K, Matsuda J, Horie S, Todo T, Ishida N (2003) Genome-wide expression analysis of mouse liver reveals CLOCK-regulated circadian output genes. *J Biol Chem* 278(42):41519-27.

- Oishi K, Fukui H, Ishida N (2000) Rhythmic expression of *Bmal1* mRNA is altered in Clock mutant mice: differential regulation in the suprachiasmatic nucleus and peripheral tissues. *Biochem Biophys Res Comm* 268, 164-171.
- Oishi K, Sakamoto K, Okada T, Nagase T, Ishida N (1998a) Antiphase circadian expression between *Bmal1* and period homologue mRNA in the suprachiasmatic nucleus and peripheral tissues of rats. *Biochem Biophys Res Commun* 253, 199-203.
- Oishi K, Sakamoto K, Okada T, Nagase T, Ishida N (1998b) Humoral signals mediate the circadian expression of rat period homologue (*rPer2*) mRNA in peripheral tissues. *Neurosci Lett* 256(2), 117-9.
- Okamura H, Berod A, Julien JF, Geffard M, Kitahama K, Mallet J, Bobillier P (1989) Demonstration of GABAergic cell bodies in the suprachiasmatic nucleus: in situ hybridization of glutamic acid decarboxylase (GAD) mRNA and immunocytochemistry of GAD and GABA. *Neurosci Lett* 102, 131-136.
- Oksche A (1983) Aspects of evolution of the pineal organ. In: The pineal gland and its endocrine role. Axelrod J, Fraschini F, Velo GP (Eds) New York: Plenum Press, pp. 15-35.
- Oksche A, Korf HW, Rodríguez EM (1987) Pinealocytes as photoneuroendocrine units of neuronal origin: concepts and evidence. *Adv Pineal Res* 2, 1-18.
- Orth DN, Nicholson WE, Mitchell WM, Island DP, Shapiro M, Byyny RL (1973) ACTH and MSH production by a single cloned mouse pituitary tumor cell line. *Endocrinology* 92, 385-393.
- Oster H, Werner C, Magnone MC, Mayser H, Feil R, Seeliger MW, Hofmann F, Albrecht U (2003) cGMP-dependent protein kinase II modulates *mPer1* and *mPer2* gene induction and influences phase shifts of the circadian clock. *Curr Biol* 13, 725-733.
- Ouyang Y, Andersson CR, Kondo T, Golden SS, Johnson CH (1998) Resonating circadian clocks enhance fitness in cyanobacteria. *Proc Natl Acad Sci USA* 95, 8660-8664.
- Panda S, Provencio I, Tu DC, Pires SS, Rollag MD, Castrucci AM, Pletcher MT, Sato TK, Wiltshire T, Andahazy M, Kay SA, Van Gelder RN, Hogenesch JB (2003) Melanopsin is required for non-image-forming photic responses in blind mice. *Science* 301, 525-527.
- Pando MP, Morse D, Cermakian N, Sassone-Corsi P (2002) Phenotypic rescue of a peripheral clock genetic defect via SCN hierarchical dominance. *Cell* 109, 307-320.
- 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* 1999 56(2), 279-89.
- Piatak MJ, Luk KC, Williams B, Lifson JD (1993a) Quantitative competitive polymerase chain reaction for accurate quantitation of HIV DNA and RNA. *BioTechniques* 14, 70-81.
- Piatak MJ, Saag MS, Yang LC, Clark SJ, Kappes JC, Luk KC, Hahn BH, Shaw GM, Lifson JD (1993b) High levels of HIV-1 in plasma during all stages of infection determined by competitive PCR. *Science* 259, 1749-1754.
- Pittendrigh CS (1993) Temporal organization – Reflections of a Darwinian clock-watcher. *Ann Rev Physiol* 55, 17-54.
- Pittendrigh CS (1960) Circadian rhythms and the organization of the circadian system. *Cold Spring Harbor Symp Quant Biol* 25, 159-184.
- Pol AN van den (1980) The hypothalamic suprachiasmatic nucleus of the rat: Intrinsic anatomy. *J Comp Neurol* 191, 661-702.
- Pol AN van den, Powley T (1979) A fine-grained anatomical analysis of the rat suprachiasmatic nucleus in circadian rhythms of drinking and feeding. *Brain Res* 160, 307-326.
- Poulin G, Turgeon B, Drouin J (1997) *NeuroD1/beta2* contributes to cell-specific transcription of the proopiomelanocortin gene. *Mol Cell Biol* 17(11), 6673-82.
- Preitner N, Damiola F, Lopez-Molina L, Zakany J, Duboule D, Albrecht U, Schibler U (2002) The orphan nuclear receptor REV-ERB $\alpha$  controls circadian transcription within the positive limb of the mammalian circadian oscillator. *Cell* 110, 251-260.

- Provencio I, Jiang G, De Grip WJ, Hayes WP, Rollag MD (1998) Melanopsin: an opsin in melanophores, brain and eye. *Proc Natl Acad Sci USA* 95, 340-345.
- 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.
- Raisman G, Brown-Grant K (1997) The 'suprachiasmatic syndrome': endocrine and behavioural abnormalities following lesions of the suprachiasmatic nuclei in the female rat. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 198, 279-314.
- Razavi R, Ramos JC, Yehia G, Schlotter F, Molina CA (1998) ICER-IIgamma is a tumor suppressor that mediates the antiproliferative activity of cAMP. *Oncogene* 17(23), 3015-9.
- Reppert SM, Artman HG, Swaminathan S, Fisher DA (1981a) Vasopressin exhibits a rhythmic daily pattern in cerebrospinal fluid but not in blood. *Science* 213, 1256-1257.
- Reppert SM, Perlow MJ, Ungerleider L, Mishkin M, Tamarkin L, Orloff DG, Hoffman H, Klein DC (1981) Effects of damage to the suprachiasmatic area of the anterior hypothalamus on the daily melatonin and cortisol rhythms in the Rhesus monkey. *J Neurosci* 1, 1414-1425.
- Reppert SM, Weaver DR (2001) Molecular analysis of mammalian circadian rhythms. *Ann Rev Physiol* 63, 647-676.
- Reppert SM, Weaver DR (2002) Coordination of circadian timing in mammals. *Nature* 418, 935-941.
- Rosbash M. (1998) Why the rat-1 fibroblast should replace the SCN as the in vitro model of choice. *Cell* 93(6), 917-9.
- 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 ribonucleotide acid in the rat pineal gland. *Endocrinology* 137, 3003-3044.
- Roenneberg T, Foster RG (1997) Twilight times: light and the circadian system. *Photochem Photobiol* 66, 549-561.
- Roenneberg T, Mellow M (2003) The network of time: Understanding the molecular Circadian System. *Curr Biol* 13, R198-R207.
- Rollag MD, Berson DM, Provencio I (2003) Melanopsin, ganglion-cell photoreceptors, and mammalian photoentrainment. *J Biol Rhythms* 18, 227-234.
- Sack RL, Lewy AJ, Blood ML, Keith LD, Nakagawa H (1992) Circadian rhythm abnormalities in totally blind people: incidence and clinical significance. *J Clin Endocrinol Metab* 75, 127-34.
- Sakamoto K, Nagase T, Fukui H, Horikawa K, Okada T, Tanaka H, Sato K, Miyake Y, Ohara O, Kako K, Ishida N (1998) Multitissue circadian expression of rat period homolog (*rPer2*) mRNA is governed by the mammalian circadian clock, the suprachiasmatic nucleus in the brain. *J Biol Chem*. 273(42), 27039-42.
- Sanada K, Okano T, Fukada Y (2002) Mitogen-activated protein kinase phosphorylates and negatively regulates basic helix-loop-helix-PAS transcription factor BMAL1. *J Biol Chem* 277, 267-271.
- Sangoram AM, Saez L, Antoch MP, Gekakis N, Staknis D, Whiteley A, Fruechte EM, Vitaterna MH, Shimomura K, King DP, Young MW, Weitz CJ, Takahashi JS (1998) Mammalian circadian autoregulatory loop: a Timeless ortholog and *mPer1* interact and negatively regulate CLOCK-BMAL1-induced transcription. *Neuron* 21, 1101-1113.
- Sato F, Kawamoto T, Fujimoto K, Noshiro M, Honda KK, Honma S, Honma K, Kato Y (2004a) Functional analysis of the basic helix-loop-helix transcription factor DEC1 in circadian regulation. *Eur J Biochem* 271(22), 4409-4419.

- Sato TK, Panda S, Miraglia LJ, Reyes TM, Rudic RD, McNamara P, Naik KA, FitzGerald GA, Kay SA, Hogenesch JB (2004b) A functional genomics strategy reveals Rora as a component of the mammalian circadian clock. *Neuron* 43(4), 527-37.
- Sawaki Y, Nihonmatsu I, Kawamura H (1984) Transplantation of the neonatal suprachiasmatic nuclei into rats with complete bilateral suprachiasmatic lesions. *Neurosci Res* 1, 67-72.
- Schecterson LC, McKnight GS (1991) Role of cyclic adenosine 3',5'-monophosphate-dependent protein kinase in hormone-stimulated beta-endorphin secretion in AtT20 cells. *Mol Endocrinol* 5(2), 170-8.
- Schibler U, Ripperberger J, Brown SA (2003) Peripheral circadian oscillators in mammals: time and food. *J Biol Rhythms* 18(3), 250-260.
- Schmittgen TD, Zakrajsek BA, Mills AG, Gorn V, Singer MJ, Reed MW (2000) Quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction to study mRNA decay: comparison of endpoint and real-time methods. *Anal Biochem* 285, 194-204.
- Schwartz WJ, Coleman RJ, Reppert SM (1983) A daily vasopressin rhythm in rat cerebrospinal fluid. *Brain Res* 263, 105-112.
- Schwartz WJ, Gross RA, Morton MT (1987) The suprachiasmatic nuclei contain a tetrodotoxin-resistant circadian pacemaker. *Proc Natl Acad Sci USA* 84, 1694-1698.
- Schwartz WJ, Reppert SM (1985) Neural regulation of the circadian vasopressin rhythm in cerebrospinal fluid: a pre-eminent role for the suprachiasmatic nuclei. *J Neurosci* 5, 2771-2778.
- Seckl JR, Lightman SL (1987) Diurnal rhythm of vasopressin but not of oxytocin in the cerebrospinal fluid of the goat: lack of association with plasma cortisol rhythm. *J Endocrinol* 114, 477-482.
- Semo M, Peirson S, Lupi D, Lucas RJ, Jeffery G, Foster RG (2003) Melanopsin retinal ganglion cells and the maintenance of circadian and pupillary responses to light ion aged rodless/coneless (*rd/rd cl*) mice. *Eur J Neurosci* 17, 1793-1801.
- Shearman LP, Jin X, Lee C, Reppert SM, Weaver DR (2000a) Targeted disruption of the *mPer3* gene: Subtle effects on circadian clock function. *Mol Cell Biol* 20, 6269-6275.
- Shearman LP, Sriram S, Weaver DR, Maywood ES, Chaves I, Zheng B, Kume K, Lee CC, van der Horst GTJ, Hastings MH, Reppert SM (2000b) Interacting molecular loops in the mammalian circadian clock. *Science* 288, 1013-1019.
- Shearman LP, Zylka MJ, Reppert SM, Weaver DR (1999) Expression of basic helix-loop-helix/PAS genes in the mouse suprachiasmatic nucleus. *Neuroscience* 89, 387-97.
- Shearman LP, Zylka MJ, Weaver DR, Kolakowski LF, Jr, Reppert SM (1997) Two period homologs: circadian expression and photic regulation in the suprachiasmatic nuclei. *Neuron* 19, 1261-1269.
- Shigeyoshi Y, Taguchi K, Yamamoto S, Takekida S, Yan L, Tei H, Moriya T, Shibata S, Loros JJ, Dunlap JC, Okamura H (1997) Light-induced resetting of a mammalian circadian clock is associated with rapid induction of the *mPer1* transcript. *Cell* 91, 1043-1053.
- Silver R, LeSauter J, Tresco PA, Lehman MN (1996) A diffusible coupling signal from the transplanted suprachiasmatic nucleus controlling circadian locomotor rhythms. *Nature* 382, 810-813.
- Stehle JH, von Gall C, Korf HW (2003) Melatonin: a clock-output, a clock-input. *J Neuroendocrinol* 15(4), 383-9.
- Stehle JH, von Gall C, Schomerus S, Korf HW (2001) Of rodents and ungulates and melatonin: Creating a uniform code for darkness by different signaling mechanisms. *J Biol Rhythms* 16, 312-325.
- 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* 365(6444), 314-20.



- Stephan FK, Zucker I (1972) Circadian rhythms in drinking behaviour and locomotor activity of rats are eliminated by hypothalamic lesions. *Proc Natl Acad Sci USA* 69, 1583-1586.
- Stokkan KA, Yamazaki S, Tei H, Sakaki Y, Menaker M (2001) Entrainment of the circadian clock in the liver by feeding. *Science* 291, 490-493.
- Sun ZS, Albrecht U, Zhuchenko O, Bailey J, Eichele G, Lee CC (1997) RIGUI, a putative mammalian ortholog of the *Drosophila* period gene. *Cell* 90, 1003-1011.
- Takano A, Isojima Y, Nagai K (2004) Identification of *mPer1* phosphorylation site responsible for nuclear entry. *J Biol Chem* 279(31), 32578-32585.
- Tamaru T, Isojima Y, Yamada T, Okada M, Nagai K, Takamatsu K (2000) Light and glutamate-induced degradation of the circadian oscillating protein BMAL1 during the mammalian clock resetting. *J Neurosci* 20, 7525-7530.
- Tei H, Okamura H, Shigeyoshi Y, Fukuhara C, Ozawa R, Hirose M, Sakaki Y (1997) Circadian oscillation of a mammalian homologue of the *Drosophila* period gene. *Nature* 389, 512-516.
- Thapan K, (2001) An action spectrum melatonin suppression: evidence for a novel non-rod, non-cone photoreceptor system in humans. *J Physiol* 535, 261-267
- Therrien M, Drouin J (1993) Cell-specific helix-loop-helix factor required for pituitary expression of the pro-opiomelanocortin gene. *Mol Cell Biol* 13(4), 2342-53.
- Tischkau SA, Mitchell JW, Tyan SH, Buchanan GF, Gillette MU (2003) Ca<sup>2+</sup>/cAMP response element-binding protein (CREB)-dependent activation of *Per1* is required for light-induced signaling in the suprachiasmatic nucleus circadian clock. *J Biol Chem* 278, 718-723.
- Toh KL, Jones CR, He Y, Eide EJ, Hinze WA, Virshup DM, Ptáček LJ, Fu Y-H (2001) An *hPer2* phosphorylation site mutation in familial advanced sleep phase syndrome. *Science* 291, 1040-1043.
- Toussou E, Meissl H (2004) Suprachiasmatic nuclei grafts restore the circadian rhythm in the paraventricular nucleus of the hypothalamus. *J Neurosci*. 24(12), 2983-8.
- Towbin H, Staehelin H, Gordon J (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamid gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA* 76, 4350-4354.
- Travnickova-Bendova Z, Cermakian N, Reppert SM, Sassone-Corsi P (2002) Bimodal regulation of *mPeriod* promoters by CREB-dependent signaling and CLOCK/BMAL1 activity. *Proc Natl Acad Sci USA* 99, 7728-7733.
- Tzavara ET, Pouille Y, Defér N, Hanoune J (1996) Diurnal variation of the adenylyl cyclase type 1 in the rat pineal gland. *Proc Natl Acad Sci USA* 93(20), 11208-12.
- Ueda HR, Chen W, Adachi A, Wakamatsu H, Hayashi S, Takasugi T, Nagano M, Nakahama K, Suzuki Y, Sugano S, Ino M, Shigeyoshi Y, Hashimoto S (2002) A transcription factor response element for gene expression during circadian night. *Nature* 418, 534-539.
- Veldhuis JD, Iranmanesh A, Naftolowitz D, Tatham N, Cassidy F, Carroll BJ (2001) Corticotropin secretory dynamics in humans under low glucocorticoid feedback. *J Clin Endocrinol Metab* 86(11), 5554-63.
- Vitaterna MH, King DP, Chang AM, Kornhauser JM, Lowrey PL, McDonald JD, Dove WF, Pinto LH, Turek FW, Takahashi JS (1994) Mutagenesis and mapping of a mouse gene, *Clock*, essential for circadian behavior. *Science* 264, 719-725.
- Vitaterna MH, Selby CP, Todo T, Niwa H, Thompson C, Fruechte EM, Hitomi K, Thresher RJ, Ishikawa T, Miyazaki J, Takahashi JS, Sancar A. (1999) Differential regulation of mammalian period genes and circadian rhythmicity by cryptochromes 1 and 2. *Proc Natl Acad Sci USA* 96, 12114-12119.
- Vollrath L (1981) The pineal organ. In: *Handbuch der mikroskopischen Anatomie des Menschen*. Oksche A & Vollrath L (Eds) Vol IV Part 10 1-665. Springer-Verlag. Berlin & New York.

- Vossler MR, Yao H, York RD, Pan MG, Rim CS, Stork PJ (1997) cAMP activates MAP kinase and Elk-1 through a B-Raf- and Rap1-dependent pathway. *Cell* 89(1), 73-82.
- Wakamatsu H, Takahashi S, Moriya T, Inouye ST, Okamura H, Akiyama M, Shibata S (2001) Additive effect of *mPer1* and *mPer2* antisense oligonucleotides on light-induced phase shift. *Neuroreport* 12, 127-131.
- Watts AG (1991) The efferent projections of the suprachiasmatic nucleus: anatomical insights into the control of circadian rhythms, in: Klein DC, Moore RY, Reppert SM (Eds.) *Suprachiasmatic nucleus. the mind's clock*. Oxford University Press, New York pp. 77-106.
- Watts AG, Swanson LW, Sanchez-Watts G (1987) Efferent projections of the suprachiasmatic nucleus: I. Studies using anterograde transport of *Phaseolus vulgaris* leucoagglutinin in the rat. *J Comp Neurol* 258, 204-229.
- Weaver DR (1998) The suprachiasmatic nucleus: a 25-years retrospective. *J Biol Rhythms* 13, 100-112.
- Weaver DR (1999) Melatonin and circadian rhythmicity in vertebrates. Physiological roles and pharmacological effects. In: Turek FW, Zee PC (eds) *Regulation of sleep and circadian rhythms*. Dekker, New York, pp 197-262.
- Weaver DR, Rivkees SA, Carlson LL, Reppert SM (1991) In: Klein DC Moore RY, Reppert SM (eds) *Suprachiasmatic nucleus: the mind's clock*. Oxford University Press, New York, pp 289-309.
- Welsh DK, Logothetis DE, Meister M, Reppert SM (1995) Individual neurons dissociated from rat suprachiasmatic nucleus express independently phased circadian firing rhythms. *Neuron* 14, 697-706.
- Wicht H, Maronde E, Olcese J, Korf HW (1999) A semiquantitative image-analytical method for the recording of dose-response curves in immunocytochemical preparations. *J Histochem Cytochem* 47, 411-449.
- van Wijk PA, van Neck JW, Rijnberk A, Croughs RJ, Mol JA (1995) Proliferation of the murine corticotropic tumour cell line AtT20 is affected by hypophysiotrophic hormones, growth factors and glucocorticoids. *Mol Cell Endocrinol* 111(1), 13-9.
- Wilsbacher LD, Yamazaki S, Herzog ED, Song EJ, Radcliffe LA, Abe M, Block G, Spitznagel E, Menaker M, Takahashi JS (2002) Photic and circadian expression of luciferase in *mPeriod1-luc* transgenic mice *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci USA* 99(1), 489-94.
- Winer J, Jung CKS, Shackel I, Williams PM (1999) Development and validation of real-time quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction for monitoring gene expression in cardiac myocytes *in vitro*. *Anal Biochem* 270, 41-49.
- Yagita K, Okamura H (2000) Forskolin induces circadian gene expression of *rPer1*, *rPer2* and *dbp* in mammalian rat-1 fibroblasts. *FEBS Lett* 465(1), 79-82.
- Yagita K, Tamanini F, van Der Horst GT, Okamura H (2001) Molecular mechanisms of the biological clock in cultured fibroblasts. *Science* 292, 278-281.
- Yamaguchi S, Mitsui S, Yan L, Yagita K, Miyake S, Okamura H (2000) Role of DBP in the circadian oscillatory mechanism. *Mol Cell Biol* 20, 4773-4781.
- Yamazaki S, Numano R, Abe M, Hida A, Takahashi R, Ueda M, Block GD, Sakaki Y, Menaker M, Tei H (2000) Resetting central and peripheral circadian oscillators in transgenic rats. *Science* 288, 682-685.
- Yanagisawa M, Kurihara H, Kimura S, Goto K, Masaki T (1988) A novel peptide vasoconstrictor, endothelin, is produced by vascular endothelium and modulates smooth muscle Ca<sup>2+</sup> channels. *J Hypertens Suppl* 6(4), S188-91.
- Yehia G, Razavi R, Memin E, Schlotter F, Molina CA. (2001a) The expression of inducible cAMP early repressor (ICER) is altered in prostate cancer cells and reverses the transformed phenotype of the LNCaP prostate tumor cell line. *Cancer Res* 2001 61(16), 6055-9.

- Yehia G, Schlotter F, Razavi R, Alessandrini A, Molina CA (2001b) Mitogen-activated protein kinase phosphorylates and targets inducible cAMP early repressor to ubiquitin-mediated destruction. *J Biol Chem* 2001 276(38), 35272-9.
- Yokota S, Yamamoto M, Moriya T, Akaiyama M, Fukunaga K, Miyamoto E, Shibata S (2001) Involvement of calcium-calmodulin kinase but not mitogen-activated protein kinase in light-induced phase delays and *Per* gene expression in the suprachiasmatic nucleus of the hamster. *J Neurochem* 77, 618-627.
- Young MW, Kay SA (2001) Time zones: a comparative genetics of circadian clocks. *Nature Rev Genet* 2, 702-715.
- Yu W, Nomura M, Ikea M (2002) Interacting feedback loops within the mammalian clock: BMAL1 is negatively autoregulated and upregulated by CRY1, CRY2 and PER2. *Biochem Biophys Res Comm* 290, 933-942.
- Zhao J, Araki N, Nishimoto SK (1995) Quantitation of matrix G1a protein mRNA by competitive polymerase chain reaction using glyceraldehyd-3-phosphate dehydrogenase as an internal control. *Gene* 155, 159-165.
- Zheng B, Albrecht U, Kaasik K, Sage M, Lu W, Vaishnav S, Li Q, Sun ZS, Eichele G, Bradley A, Lee CC (2001) Nonredundant roles of the mPer1 and mPer2 genes in the mammalian circadian clock. *Cell*;105(5), 683-94.
- Zheng B, Larkin DW, Albrecht U, Sun ZS, Sage M, Eichele G, Lee CC, Bradley A (1999) The mPer2 gene encodes a functional component of the mammalian circadian clock. *Nature* 400(6740), 169-73.
- Zylka MJ, Shearman LP, Levine JD, Jin XW, Weaver DR, Reppert SM (1998a) Molecular analysis of mammalian *Timeless*. *Neuron* 21, 1115-1122.
- Zylka MJ, Shearman LP, Weaver DR, Reppert SM (1998b) Three period homologs in mammals: differential light responses in the suprachiasmatic circadian clock and oscillating transcripts outside of brain. *Neuron*.20(6), 1103-10.

## 9. VERWENDETE LÖSUNGEN UND PUFFER

---

### Blotpuffer

0,3 M Glycin  
0,15% Ethanolamin  
20% Methanol

---

### Coomassielösung zum Anfärben von Proteingelen

0,01% Coomassie-Brillantblau  
25% Methanol  
10% ddH<sub>2</sub>O

---

### DEPC-H<sub>2</sub>O

0,1 % (v/v) Diethylpyrocarbonat (DEPC) in ddH<sub>2</sub>O, über Nacht unter ständigem Rühren inkubiert, dann autoklaviert.

---

### DNA-Probenpuffer (5-fach)

30% w/v Glycerin in 50 mM EDTA  
0,001% w/v Xylenyanol  
0,001% w/v Bromphenolblau

---

### Elektrophoresepuffer nach Laemmli (pH 8,9)

0,38 M Glycin  
0,05 M Tris  
0,1% SDS

---

### **Lysepuffer für Proteinextraktion**

75 µl complete™ Protease Inhibitor Cocktail (Boehringer Mannheim, Mannheim)  
5 µl 100 mM PMSF  
2 µl 0,5 M EDTA  
418 µl RIPA-Puffer

---

### **PBS (Phosphat gepufferte Saline)**

0,2 g KCl  
0,2 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
1,15 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>  
8 g NaCl  
mit ddH<sub>2</sub>O auf 1000 ml aufgefüllt, mit HCl auf pH 7,4 eingestellt

---

### **Protein-Probenpuffer (2-fach)**

0,8 ml ddH<sub>2</sub>O  
1,0 ml 0,5 M Tris/HCl, pH 6,8  
1,0 ml 0,6 M Imidazol/HCl, pH 6,8  
4,0 ml 10% SDS  
1,0 ml Glycerin  
0,2 ml β-Mercaptoethanol  
8,0 mg 0,1% Bromphenolblau

---

**RIPA-Puffer**

7,6 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
1,4 mM Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
125 mM NaCl  
0,4% NP40  
0,4% Na-Deoxycholat  
2 mM EDTA  
1 mM PMSF

---

**Sammelgel für SDS-PAGE**

2,9 ml ddH<sub>2</sub>O  
0,875 ml 0,5 M Tris/HCl, pH 6,8  
0,875 ml 0,5 M Imidazol/HCl, pH 6,8  
0,75 ml 40% Acrylamid/Bisacrylamid (Verhältnis AA/BAA: 37,5/1)  
0,05 ml 10% SDS  
0,40 ml 0,1% Bromphenolblau  
0,05 ml 10% AMPS  
0,01 ml TEMED

---

**TBE (0,5-fach)**

54 g Tris  
27,5 g Borsäure  
20 ml 0,5 M EDTA pH 8,0  
mit ddH<sub>2</sub>O auf 10 l aufgefüllt.

---

**TBST (*Tris buffered saline, Tween 20*)**

20 mM Tris  
137 mM NaCl  
0,1% Tween 20

---

**Trenngel für SDS-PAGE (10% Acrylamid/Bisacrylamid)**

7,25 ml ddH<sub>2</sub>O

3,75 ml 40% Acrylamid/Bisacrylamid (Verhältnis AA/BAA: 37,5/1)

3,75 ml 1,5 M Tris/HCl, pH 8,9

0,15 ml 10% SDS

0,05 ml 10% Ammoniumpersulfat (AMPS)

0,01 ml Tetramethyldiamin (TEMED)

---

## 10. DANKSAGUNG

Ich bedanke mich zunächst sehr herzlich bei meinem Doktorvater Prof. Dr. rer. nat. Jörg H. Stehle für die Überlassung des Themas und umfassende Unterstützung. Seine kreativen Anregungen, seine ständige Diskussionsbereitschaft und sein ansteckender Enthusiasmus für wissenschaftliche Fragestellungen haben mich über diese Arbeit hinaus maßgeblichen beeinflusst.

Meinen anatomischen Lehrern Prof. Braak, Prof. Korf, Prof. Nürnberger, PD Dr. Rami, Prof. Stehle und PD Dr. Wicht möchte ich mich besonders für die Begeisterung bedanken, die sie in mir für dieses Fach während meines Studiums vermitteln konnten.

Durch die Veranstaltungen des Graduiertenkollegs „Neuronale Plastizität: Moleküle, Strukturen, Funktionen“ wurden mir darüber hinaus eine Vielzahl von Anregungen vermittelt und Einsichten gewährt. Ich danke hierfür insbesondere Dr. Barbara Wicht, Dr. Gabi Lahner, PD Dr. Helmut Wicht und Prof. Dr. Herbert Zimmermann, die mich alle durch ihr Engagement sehr beeindruckt haben.

Frau Dr. Viviane Mauhin danke ich ganz besonders für ihren freundschaftlichen Einsatz bei der Einarbeitung in die Laborarbeit. Sie hat mir dabei viel Wissen, wertvolle Impulse und Begeisterung vermitteln können. Dr. Guido Burbach und Dr. Magdalena Karolczak haben mich bereitwillig in die Real-Time PCR-Technik eingeführt, wofür ich ihnen sehr dankbar bin. In diesem Zusammenhang danke ich auch Prof. Dr. Deller für die Bereitstellung der Thermocyclers. Dr. Martina Pfeffer danke ich besonders für ihre Unterstützung bei der Datenerhebung.

Dr. Maria Deicke, Dr. Claudia Heck, meinem Gesinnungsgenossen Dr. Marco Koch, Susanne Kreutz und Dr. Viviane Mauhin danke ich für ihre agreeable Gesellschaft.

Ein besonderer Dank gilt auch Frau Gisela Müller, die durch ihre hilfsbereite und aufgeschlossene Art die Arbeit am Institut vielfältig erleichterte. Gleiches gilt auch für alle aktuellen und ehemaligen Mitarbeiter der Dr. Senckenbergischen Anatomie.



### **Förderung**

Diese Arbeit wurde durch ein Promotionsstipendium des Graduiertenkollegs „Neuronale Plastizität: Moleküle, Strukturen, Funktionen“ im Rahmen des Sonderforschungsbereiches 269 „Molekulare und zelluläre Grundlagen neuronaler Prozesse“ unterstützt.

### **Veröffentlichung**

#### *Poster*

Hennings J, Korf HW, Stehle JH (2003) Expression of clock genes in the murine corticotroph AtT-20 cell line. 54. Mosbacher Kolloquium, Gesellschaft für Biochemie und Molekularbiologie, Mosbach, Baden, Deutschland

## ERKLÄRUNG

Ich erkläre, dass ich die dem Fachbereich Medizin der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main zur Promotionsprüfung eingereichte Dissertation mit dem Titel

„Untersuchungen zur Expression von Uhrengenenen in der kortikotropen AtT-20 Tumorzelllinie der Maus“

in dem Zentrum der Morphologie (Dr. Senckenbergische Anatomie), Institut für Anatomie III (Zelluläre und molekulare Anatomie),

unter Betreuung und Leitung von Prof. Dr. rer. nat. J. H. Stehle

ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Ich habe bisher an keiner in- oder ausländischen Universität ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht.

Die vorliegende Arbeit wurde bisher nicht als Dissertation eingereicht.

München, den 23.08.2005

Johannes M. H. Hennings

# Lebenslauf

von Johannes Matthias Heinrich Hennings, geboren am 31.05.1977 in Gräfelfing/München

## Schulbildung

1984-1988	Grund- und Teilhauptschule Wörthsee
1988-1990	Max Born-Gymnasium Germering
1990-1997	Gymnasium an der Stadtmauer Bad Kreuznach Abschluss: Abitur

## Zivildienst

1997-1998	Zivildienst im Diakonie-Krankenhaus Bad Kreuznach
-----------	---

## Studium und Promotion

10/1998-03/2005	Studium der Humanmedizin an der Johann Wolfgang Goethe-Universität, Frankfurt am Main:
09/2000	Ärztliche Vorprüfung
2000/2001, 2001/2002 und 2002/2003	Wissenschaftlicher Hilfsassistent im Kursus der makroskopischen Anatomie
09/2001	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
09/2001	Beginn der Dissertation unter Leitung von Prof. Dr. rer. nat. J. H. Stehle in der Dr. Senckenbergischen Anatomie, Institut für Anatomie II (Experimentelle Neurobiologie)
03/2002-02/2005	Stipendiat des Graduiertenkollegs „Neuronale Plastizität“ im Rahmen des Sonderforschungsbereichs 269 Molekulare und zelluläre Grundlagen neuronaler Prozesse“
04-08/2003, 2003/2004	Wissenschaftliche Hilfskraft im Kursus der Physiologie
04/2004	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
04/2004-03/2005	Praktisches Jahr:
1. Tertial	Chirurgie; Universitätsklinikum Frankfurt am Main und NYU Downtown Hospital (New York, USA)
2. Tertial	Innere Medizin; Universitätsklinikum Frankfurt am Main
3. Tertial	Neurologie, CHUV (Lausanne, Schweiz)
06/2005	Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

München, den 23.08.2005

(Johannes M. H. Hennings)