

Aus dem Fachbereich Medizin der Johann Wolfgang Goethe-Universität
Frankfurt am Main

DR. SENCKENBERGISCHE ANATOMIE

Institut der Anatomie II

Direktor: Prof. Dr. Horst-Werner Korf

**Das Endocannabinoidsystem
im neuroendokrinen und autonomen Nervensystem der
Nagetiere**

Dissertation

zur

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

vorgelegt von

**Amir-Arsalan Jafarpour
aus Teheran**

Frankfurt am Main, 2010

Dekan:

Prof. Dr. Josef Pfeilschifter

Referent:

Prof. Dr. Horst-Werner Korf

Korreferent:

Prof. Dr. Dr. Gerd Geisslinger

Tag der mündlichen Prüfung:

20.10.2010

Zusammenfassung	1
Summary: An endocannabinoid system in the neuroendocrine and autonomic nervous system of rodents	3
1 Einleitung	5
1.1 Kurzer Abriss der evolutionären Entstehung und Bedeutung des photoneuroendokrinen Systems	5
1.2 Das Photoneuroendokrine System	8
1.2.1 Photorezeption	9
1.2.2 SCN als Rhythmusgenerator des photoneuroendokrinen Systems	10
1.2.3 Melatonin als Effektor des photoneuroendokrinen System	12
1.3 Die hypophysäre Pars tuberalis (PT) als Zielstruktur des photoneuroendokrinen System	15
1.4 Die hypothalamo-hypophysär-adrenale Achse (HPA-Achse) als Effektor des photoneuroendokrinen Systems	18
1.4.1 Hypothalamisch-Hypophysäre Organisation der HPA-Achse	18
1.4.2 ACTH und die Glukokortikoidbildung in der Nebenniere	21
1.4.3 Photoneuroendokrine Regulation der sympathischen Innervation der Nebenniere	22
1.5 Das Endocannabinoidsystem	24
1.5.1 Allgemeinhistorische Einführung	24
1.5.2 Die Biosynthese von Anandamid und 2-Arachidonoylglycerol	26
1.5.3 Der Abbau von Anandamid und 2-Arachidonoylglycerol	28
1.5.4 Signaltransduktionsmechanismen der CB-1- und CB-2- Rezeptoren	30
1.6 Endocannabinoide im neuroendokrinen und autonomen Nervensystem	32
1.7 Zielsetzung der Dissertation	37
2 Material-Methoden	38
2.1 Chemikalien, Reagenzien und Antikörper	38
2.2 Versuchstiere und Haltungsbedingungen	38
2.3 Gewebsentnahme	38
2.4 Antigen-Demaskierung	39
2.5 Immunhistochemie	43
2.5.1 ABC-Methode- Indirekte Antigendetektion	43
2.5.2 Immunfluoreszenz- Indirekte Antigendetektion	44

2.6	Mikroskopie	44
2.6.1	Lichtmikroskopie	44
2.6.2	Densitometrie	44
2.6.3	Konfokalmikroskopie	45
2.7	Proteinauftrennung und Proteindetektion	47
2.7.1	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese	47
2.7.2	Immunoblot	48
2.8	Statistische Auswertung	49
2.9	Kontrollen	49
3	Ergebnisse	50
3.1	Immunhistochemische Lokalisation und photoperiodische Untersuchung von NAPE-PLD in der Pars tuberalis der Ratte	50
3.2	Immunhistochemische Lokalisation und photoperiodische Untersuchung von FAAH in der Pars tuberalis der Ratte	52
3.3	Immunhistochemische Lokalisation und photoperiodische Untersuchung von COX-2 in der Pars tuberalis der Ratte	53
3.4	Immunhistochemische Lokalisation und photoperiodische Untersuchung von CB-1 Rezeptor in der Pars tuberalis der Ratte	54
3.5	Densitometrische Quantifizierung der photoperiodischen Variation in der Immunreaktion von NAPE-PLD, FAAH und COX-2 in der Pars tuberalis der Ratte	55
3.6	Densitometrische Quantifizierung der photoperiodischen Variation der Immunreaktion von CB-1 in der Pars tuberalis der Ratte	57
3.7	Kolokalisations-Analyse von Prolaktin und NAPE-PLD in der Adenohypophyse der Ratte	58
3.8	Kolokalisations-Analyse von Prolaktin und Abh4 in der Adenohypophyse der Ratte	60
3.9	Kolokalisations-Analyse von Prolaktin und FAAH in der Adenohypophyse der Ratte	62
3.10	Kolokalisations-Analyse von ACTH und NAPE-PLD in der Adenohypophyse der Ratte	63
3.11	Kolokalisations-Analyse von ACTH und Abh4 in der Adenohypophyse der Ratte	65
3.12	Kolokalisations-Analyse von ACTH und FAAH in der Adenohypophyse der Ratte	66

3.13	Kolokalisations-Analyse von CB-1 und CRF in der Eminentia mediana. Lokalisation von DAGL in der Eminentia mediana und Pars tuberalis _____	66
3.14	Immunhistochemische Lokalisation von FAAH und NAPE-PLD in der Nebenniere des Hamsters _____	69
3.15	Immunhistochemische Lokalisation von CB-1 in der Nebenniere des Hamsters und immunchemischer Nachweis von NAPE-PLD, DAGL, FAAH, CB-1. _____	71
3.16	Doppelmarkierung von FAAH, NAPE-PLD und densitometrische Quantifizierung von FAAH und NAPE-PLD in chromaffinen Zellen des Nebennierenmarks _____	72
3.17	Doppelmarkierung von Tyrosinhydroxylase (TH) und NAPE-PLD oder FAAH in der Nebenniere des Hamsters _____	74
3.18	Doppelmarkierung von CB-1 und Tyrosinhydroxylase (TH) in der Nebenniere von Hamster und Ratte _____	74
3.19	Doppelmarkierung von CB-1 und Tyrosinhydroxylase in Nebennieren von Hamstern, Ratten und Maus _____	75
3.19.1	Extraadrenale sympathische Innervation der Nebennierenrinde _____	77
3.19.2	Intradrenale sympathische Innervation der Nebennierenrinde _____	77
4	Diskussion _____	78
4.1	Ein Endocannabinoidsystem in der Pars tuberalis der Ratte _____	78
4.1.1	Funktionelle Implikation der Endocannabinoide in der Pars tuberalis der Ratte _____	83
4.2	Die hypothalamo-hypophysär-adrenale-Achse (HPA-Achse) beherbergt ein Endocannabinoidsystem _____	86
4.2.1	Funktionelle Implikation des Endocannabinoidsystems in der HPA-Achse _____	88
4.3	Ein Endocannabinoidsystem im sympathischen Nervensystem _____	98
4.3.1	Funktionelle Implikation des Endocannabinoidsystem im sympathischen Nervensystem der Nebenniere _____	100
4.4	Klinische Implikation der Endocannabinoide im sympathischen und im hypothalamisch-hypophysär-adrenalen System _____	104
	Literatur _____	110
	Danksagung _____	133
	Schriftliche Erklärung _____	134
	Tagungsbeitrag _____	135

Zusammenfassung

Leben bedeutet eine fortdauernde Anpassung an Umweltbedingungen durch ein hoch entwickeltes Informationsverarbeitungssystem. Diese Anpassung wird durch das neuroendokrine und autonome Nervensystem gewährleistet. Eine tages- und jahreszeitliche Organisation des neuroendokrinen und autonomen Systems findet durch das Photoneuroendokrine System (PNS) statt.

Erst in jüngster Zeit konnte gezeigt werden, dass neben peptidergen Substanzen auch lipiderge Signalmoleküle des Endocannabinoidsystems eine essentielle Rolle bei der interzellulären Kommunikation spielen. Hierbei zählen Anandamid (AEA) und 2-Arachidonoylglycerol (2-AG) zu den umfassend erforschten Endocannabinoiden.

Diese Endocannabinoiden werden bei Bedarf aus Membranlipiden synthetisiert. An der Anandamidbiosynthese ist eine spezifische Phospholipase D (NAPE-PLD) beteiligt, die den Vorläufer N-Arachidonoyl-Phosphatidyl-Ethanolamin (NAPE) in AEA umgewandelt. Zu einem geringen Teil kann Anandamid durch die α/β -Hydrolase 4 (Abh4) synthetisiert werden. Die Biosynthese von 2-AG findet hauptsächlich über das Intermediärprodukt 1,2-Diacylglycerol statt, welches durch eine spezifische Diacylglycerollipase zu 2-AG gespalten wird. Die Fettsäureamidhydrolase (FAAH) ist für den hydrolytischen Abbau von AEA und die Monoacylglycerollipase (MAGL) für den hydrolytischen Abbau von 2-AG verantwortlich. Am oxidativen Abbau von AEA und 2-AG sind die Cyclooxygenasen-1 und -2 (COX-1, COX-2) beteiligt.

2-AG und AEA wirken an spezifischen G-Protein gekoppelten Cannabinoidrezeptoren, CB-1 und CB-2. Zahlreiche Studien zeigen, dass diese Rezeptoren sowohl auf neuronalen als auch in endokrinen Zellen vorkommen.

Die vorliegende Arbeit beschäftigte sich mit der Frage, inwieweit Komponenten des Endocannabinoidsystems in Effektoren des photoneuroendokrinen Systems in Hamster, Ratte und Maus vorkommen. Mittels immunhistochemischer Verfahren wurden NAPE-PLD, FAAH, COX-1 und COX-2 und CB-1 Rezeptoren auf eine photoperiodische Variation untersucht.

Komponenten des Endocannabinoidsystems wurden nachgewiesen auf CRF-Axonterminalen der Eminentia mediana, in der Pars tuberalis der Hypophyse, in

kortikotropen und lactotropen Zellen der Adenohypophyse, in Glukokortikoid produzierenden Zellen der Nebenniere, im Nebennierenmark und in postganglionären sympathischen Nervenfasern von Ratte, Maus und Hamster.

Die Immunreaktion von CB-1 und COX-2 in der Pars tuberalis und die Immunreaktion für FAAH im Nebennierenmark zeigte eine photoperiodische Variation.

Das neuroendokrine und autonome Nervensystem gewährleistet bei hochkomplexen Wirbeltieren und dem Menschen eine Anpassung an die jeweiligen Umweltbedingungen. Ein Versagen der endocannabinoidergen Signaltransmission ist mit einem Verlust der Integrität des Organismus verbunden. In Bezug auf den Menschen kann eine Dysregulation des Endocannabinoidsystems die Entstehung von Erkrankungen, wie z.B. Adipositas und depressiven Erkrankungen fördern.

Summary: An endocannabinoid system in the neuroendocrine and autonomic nervous system of rodents

Life means a continuous adaptation to environmental conditions through a highly developed information processing system. The neuroendocrine and autonomic nervous systems ensure such adaptation. The photoneuroendocrine system provides a diurnal and seasonal organisation of the neuroendocrine and autonomic system.

Recent data indicated that beyond peptidergic substances also lipidergic signal molecules of the endocannabinoid system play an important role in intercellular communication. Anandamide (AEA) and 2-Arachidonoylglycerol (2-AG) are the best investigated endocannabinoids to date. Both endocannabinoids are synthesized on demand from membrane lipids. Anandamide is synthesized by a calcium dependent, selective phospholipase D (NAPE-PLD) from anandamide precursor N-arachidonoyl-phosphatidylethanolamine (NAPE). A small amount of anandamide is also synthesized by α/β -hydrolase 4 (Abh4). A specific diacylglycerol lipase converts an intermediate product 1, 2-diacylglycerol to 2-AG. The fatty acid amide hydrolase (FAAH) and monoacylglycerol lipase (MAGL) are mainly involved in hydrolytic breakdown of AEA and 2-AG. Cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 (COX-1, COX-2) are involved in oxidative metabolism of both endocannabinoids.

AEA and 2-AG activate specific G-protein coupled cannabinoid receptors, CB-1 and CB-2. Several studies have shown that neurons and endocrine cells express cannabinoid receptors.

This study was addressed to investigate whether components of the endocannabinoid system exist in effectors of the photoneuroendocrine system of hamster, mouse and rat.

To determine photoperiodic variation of the components, CB-1, NAPE-PLD, FAAH, COX-1 and COX-2 were studied by means of immunohistochemical methods. Components of the endocannabinoid system could be shown in the following structures: in CRF-axon terminals of the median eminence, in pars tuberalis, in corticotrophs and lactotrophs of the anterior pituitary gland, in glucocorticoid producing cells of the adrenal gland, in adrenal medulla and in postganglionic sympathetic nerve fibers of mouse, rat and hamster. Some components of the endocannabinoid system, like CB-1

and COX-2 in pars tuberalis and FAAH in adrenal medulla showed photoperiodic variation.

The photoneuroendocrine system enables an adaptation of highly complex vertebrates and humans to environmental conditions. A failure of the endocannabinoid system is coupled with a loss of integrity of an organism. Regarding humans, a dysfunction of the endocannabinoid system can promote a variety of diseases, e.g. obesity or depressive disorders.

1 Einleitung

1.1 Kurzer Abriss der evolutionären Entstehung und Bedeutung des photoneuroendokrinen Systems

Leben bedeutet eine fortdauernde Anpassung an aktuelle Umweltbedingungen. Diese ständige Angleichung an Außenreize wird durch ein hochentwickeltes Informationsverarbeitungssystem erreicht.

Es gilt für alle belebten Systeme die ständige Bemühung die Homöostase durch metabolische und replikatorische Prozesse aufrechtzuerhalten, um die Existenz durch Verringerung der Entropie zu sichern. Die Anpassung der hochkomplexen Wirbeltiere und des Menschen wird durch das neuroendokrine und das autonome System der Organismen gewährleistet. Beide Systeme koordinieren die effiziente Umsetzung von Informationen aus der Umwelt in physiologische Prozesse eines Organismus (Alberts 2008; Unsicker 1996).

Evolutionär betrachtet, entstand der multizelluläre Organismus, welcher die differenzierte Anpassung an die Umwelt ermöglicht, etwa zwei Milliarden Jahre nach dem Auftreten der ersten Zelle, und nach etwa 500 Millionen Jahren entstanden erste einfache Metazoen. Die *Hydra viridis*, eine Gattung aus dem Stamm der Nesseltiere, stellt einen modernen Vertreter dieser einfachen Metazoen dar. Die diploblastische *Hydra viridis*, die aus ekto- und endodermmales Gewebe besteht, verfügt über ein dichtes Netzwerk von Nervenfasern, die in der Lage sind physiologische Prozesse zu modulieren. Obwohl der Ursprung des Neurons noch nicht gesichert ist, wird gegenwärtig angenommen, dass sich das Neuron während des Aufkommens von diploblastische Organismen aus einer non-neuronalen, sekretorischen Zelle entwickelte (Lovejoy 2005).

Bei den Neuronen der *Hydra viridis* handelt es sich um multifunktionale Nervenzellen, die sowohl für die Sensorik als auch Motorik verantwortlich sind. Darüber hinaus besitzen Neurone der Nesseltiere auch neurosekretorische Fähigkeiten und synthetisieren eine Reihe von Neurotransmittern und Neurohormonen, welche auch bei höher entwickelten Metazoen, wie z.B. bei Chordatieren oder Gliederfüßern

vorkommen (Grimmelikhuijzen et al. 1996). Einige Forscher gehen davon aus, dass von dieser multimodalen Nervenzelle ausgehend eine Differenzierung in sensorische, motorische, neurosekretorische Neurone sowie Interneurone der höher entwickelten Tieren erfolgte (Lovejoy 2005).

Bei diploblastischen Organismen erfolgt die interzelluläre Kommunikation ausschließlich auf autokrinem oder parakrinem Wege. Außerdem verläuft die Informationsweiterleitung im Nervensystem dieser Lebewesen unidirektional, das heißt, dass sensorische Informationen aus der Umwelt auf die Zielzelle übermittelt werden, welche in parakriner oder autokriner Weise mit anderen Zellen kommuniziert. Ein sogenanntes „feed-back“, also eine Rückmeldung von der Zielzelle zum Neuron findet nicht statt. Diese Information, von der Zielzelle ausgehend zum Neuron, war biologisch erst durch das Aufkommen von triploblastische Organismen realisierbar. Das entscheidende Unterscheidungskriterium zwischen einem diploblastischen und einem triploblastische Organismus besteht darin, dass diploblastische Organismen kein vaskuläres System besitzen (Lovejoy 2005).

Daher ist das neuroendokrine System in seiner heutigen Form primär durch die Ausbildung eines Gefäßsystems möglich gewesen. Die Entwicklung des Gefäßsystems wurde phylogenetisch bei triploblastischen Organismen erreicht (Hartenstein and Mandal 2006). Solche Organismen sind durch symmetrische Körpermorphologie, ekto-, endo- und mesodermales Gewebe, ein Nervensystem mit synaptischen Formationen, sowie cephalische Integration von sensorischen Informationen gekennzeichnet. Triploblastische Organismen, wie z.B. die Vielzeller aus dem Stamm der Anneliden (Ringelwürmer), der Mollusken (Weichtiere), oder der Arthropoden (z.B. Insekten) weisen sowohl ein zentrales als auch ein peripheres Nervensystem auf. Neurosekretorische Zellen bilden im Gehirn dieser Tiere Zellcluster, deren Axonterminale u.a. im Neuropil, an Blutgefäßen und an peripher-endokrinen Organen enden (Hartenstein 2006).

Durch die Entstehung der triploblastisch-segmentierten Organismen gingen neurosekretorische Zellen der Peripherie mit den zugehörigen, segmentalen Ganglien eine Verbindung ein. Mit diesem Zusammenschluß der Zellen nahm das neuroendokrine System einen direkten Einfluss auf die neurosekretorischen Zellen der Peripherie, wie z.B. bei Insekten. Das sympathische Nervensystem wird bei Insekten unterteilt in drei

Untereinheiten: das somatogastrische, das ventroviscerale und das kaudoviscerale System. Diese Einheiten innervieren den Darm, die endokrine Organe wie Corpora allata, oder Corpora cardiaca, reproduktive Organe, sowie das Trachealsystem (Kim et al. 1998; Lovejoy 2005; Nassel 2002).

Obwohl Wirbeltiere evolutionär etwa 500 Mio. Jahre später als die Arthropoden entstanden sind, weist das neuroendokrine System beider Taxa Ähnlichkeiten in strukturellem Aufbau, Funktion und Ontogenese auf (Veelaert et al. 1998). Bei Wirbeltieren sind neurosekretorische Zellen im Hypothalamus lokalisiert, welche durch Sekretion in einer neurohemalen Schnittstelle Einfluss auf endokrine Zellen der Hypophyse nehmen. Die korrespondierenden Strukturen bei Arthropoden bilden die sog. Pars intercerebralis und Pars intermedia, die neurosekretorische Zellen enthalten und endokrine Zellen der Corpora cardiaca und Corpora allata innervieren (Pipa 1978; Siegmund and Korge 2001).

Im Gegensatz zu diploblastischen Organismen (z.B. Nesseltieren), entstand also bei triploblastischen Lebewesen durch den neuroendokrinen und autonomen Weg eine *neurohaemale* und *hämatoneurale* Informationsschleife, die Informationen aus der Umwelt an die Zielzelle bzw. an das entsprechende Organ weiterleitet und gleichzeitig eine Rückmeldung von Zielstrukturen an das zentrale Nervensystem ermöglicht (Lovejoy 2005).

Neuroendokrine und autonome Funktionen zeigen im Verlauf des Tages auch eine zeitliche Organisation. Diese zeitliche Anpassung an Tag und Nacht setzt ein System voraus, das externe Signale wahrnehmen und umsetzen kann. Somit werden die genetisch bedingten rhythmischen Prozesse der belebten Systeme an die jeweilige Photoperiode (Licht) angepasst. Das *photoneuroendokrine Nervensystem* ist hierbei das zentrale Element zur zeitlichen Organisation und Koordination von autonomen und endokrinen Ausgangsleistungen (Kalsbeek et al. 2006a; Korf et al. 2003; Moore 1997).

1.2 Das Photoneuroendokrine System

Von einzelligen Organismen bis zu den Säugetieren lässt sich eine zeitliche Anpassung an Umweltbedingungen finden. Diese zeitliche Koordination kann deshalb als ubiquitär angesehen werden (Dunlap 1999). Vergleichbare, molekulare Prozesse generieren bei unterschiedlichen Organismen rhythmische Prozesse, die von Millisekunden bis zu einer Vielzahl an Jahren dauern können (Dunlap 1999; Korf and Stehle 2002; Moore 1997).

Bei Säugetieren generiert und reguliert ein neuroendokrines Netzwerk einen an die Umwelt angepassten 24-Stunden-Rhythmus. Dieses Netzwerk wird als das photoneuroendokrine System (PNS) bezeichnet, welches zirkadiane Rhythmen mit dem externen „Zeitgeber“ Licht synchronisiert. Im Mittelpunkt des photoneuroendokrinen Systems stehen zum einen Elemente zur Vermittlung der Lichtinformation (Photorezeptoren), wie die Retina und der *retinohypothalamische Trakt*, zum anderen der Nucleus suprachiasmaticus (SCN) als circadianer Rhythmus-Generator, sowie das Pinealorgan mit dem Effektorhormon Melatonin (Korf et al. 2003).

Der zirkadiane Rhythmus (lat. *circa* „nahe bei“ und lat. *dies* „Tag“) ist ein endogener, genetisch-determinierter Rhythmus, der ohne einen externen „Zeitgeber“, wie z.B. Licht, selbstregulierend abläuft. Beispielsweise zeigen nachtaktive (nocturnale) Tiere unter konstanter Dunkeladaption einen annähernd 24-Rhythmus, der von einem sogenannten „Freilauf“ der inneren Rhythmik gekennzeichnet war. Eindrucksvoll wird der sog. „Freilauf“ der inneren Rhythmen an einer weiblichen Versuchsperson gezeigt, die einen Monat unter konstanter Dunkelheit verbrachte. Obwohl die Schlaf- und Wachphasen einen annähernd 24-h Rhythmus zeigten, variierten von Tag zu Tag die Schlaf- und Wachphasen. Die Schlafphase begann bei dieser Versuchsperson an einem Tag um Mitternacht und trat an einem anderem Tag in den späten Abendstunden ein (Moore 1997). Freilauf der inneren Rhythmik bedeutet also, dass keine Synchronisation an einen externen Zeitgeber, wie das Licht, stattfindet.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass das photoneuroendokrine System (PNS) durch seine Ausgangsleistungen einen an die natürlichen Licht- und Dunkelphasen angepassten Ablauf physiologischer Funktionen ermöglicht. Die

Ausgangsinformationen gelangen sowohl über *neurale* als auch durch *humorale* Wege zu Zielstrukturen. Eine wichtige neurale Ausgangskomponente stellt das autonome Nervensystem dar. Die Vermittler des humoralen Weges sind das Neurohormon Melatonin, als Signal der Nacht und das Kortikosteron/Kortisol als Signal des Tages (Buijs and Kalsbeek 2001; Okamura 2007).

Die einzelnen Elemente des PNS werden in den Abschnitten 1.2.1 bis 1.2.3 genauer beschrieben. Die endokrinen und autonomen Ausgangsleistungen werden in den Abschnitten 1.3, 1.4, 1.5. dargestellt.

1.2.1 Photorezeption

Ein entscheidendes Merkmal des PNS besteht darin, zirkadiane Rhythmen an die Umwelt anzupassen bzw. zu synchronisieren. Bei Säugetieren stellt Licht den wichtigsten Stimulus für eine solche Adaptation dar. Die Licht- bzw. Photoadaptation wird zum einen durch den Pupillenreflex und zum anderen durch direkte Stimulation des neuroendokrinen System, sowie Synchronisation der inneren Uhr mit Licht- und Dunkelphasen der Umgebung gewährleistet (Nayak et al. 2007).

Signale zu Synchronisation der inneren Uhr stammen aus der Retina. Bei dieser Umsetzung der Lichtinformation sind allerdings keine Zapfen- oder Stäbchenzellen beteiligt (Berson 2003; Berson et al. 2002; Lucas et al. 2001; Lucas et al. 1999). Erst durch Studien an Photopigmenten der Froschhaut, die eine hervorragende Photosensitivität besitzen, konnte das lichtsensible Molekül Melanopsin identifiziert werden (Provencio et al. 1998). Diese Photopigment Melanopsin wurde in der Ganglionzellschicht der Retina von Maus, Affe, und Mensch nachgewiesen (Provencio et al. 1998; Provencio et al. 2000; Provencio et al. 2002).

Weitere morphologische, molekularbiologische und elektrophysiologische Untersuchungen zeigten, dass Axone der melanopsinhaltigen, retinalen Ganglienzellen über den *retinohypothalamischen Trakt* in den SCN ziehen und die Neurone dieses Kerngebietes über die Freisetzung der Neurotransmitter Glutamat und *pituitary-adenylyl cyclase activating peptide* (PACAP) innervieren (Berson et al. 2002; Gooley et al. 2001; Hannibal and Fahrenkrug 2002; Hattar et al. 2002; Nayak et al. 2007).

Auf molekularer Ebene vollzieht sich die Synchronisation an die aktuelle Photoperiode durch die Ausschüttung von Glutamat und dem Neuromodulator PACAP aus den Nervenendigungen der melanosinhaltenen Ganglienzellen. Hieraus resultiert eine Induktion der Genexpression des Uhrgens Period (Per1). Nach Bindung von Glutamat an NMDA-Rezeptoren wird diese Genexpression eingeleitet. Dabei kommt es zu einem Anstieg der intrazellulären Calciumionen-Konzentration mit anschließender Phosphorylierung von Zyklisches-Adenosinmonophosphat-Response-Element-bindendem Protein (CREB-Protein) durch die mitogenaktivierte Proteinkinase (MAPK) (Crosio et al. 2000; Travnickova-Bendova et al. 2002).

1.2.2 SCN als Rhythmusgenerator des photoneuroendokrinen Systems

Forscher wussten bereits lange vor der Entdeckung des SCN, dass eine Anpassung an die Tag- und Nacht-Rhythmik gegeben ist. Schon im Jahre 1729 zeigte der französische Naturforscher und Astronom Jean Jaques Ortois de Marian durch ein simples Experiment, dass Pflanzen einen zirkadianen Rhythmus besitzen. Er stellte fest, dass die Mimose unter konstanter Dunkelheit ihre Blätter in einem zirkadianen Rhythmus öffnete und wieder verschloss (Ramsey et al. 2007).

Es vergingen ungefähr 200 Jahre (1906), bis eine rhythmische Veränderung der Körpertemperatur bei Affen festgestellt wurde. Zu der Gewissheit, dass auch beim Menschen innere Rhythmen vorkommen, gelangten die Forscher J. Aschoff und R. Weaver im Jahre 1962. Zehn Jahre später (1972) wurde schließlich eine Nervenansammlung im Hypothalamus der Säugetiere, der Nucleus suprachiasmaticus, als Ort der biologischen Uhr identifiziert und beschrieben (Moore and Eichler 1972; Stephan and Zucker 1972).

Heute verfügen wir über vielfach erforschtes Wissen, dass viele physiologische Prozesse, wie z.B. Schlaf- und Wachzustand, Ruhe- und Aktivitätsphasen, Hormonrhythmen, Essverhalten, Lipid- und Kohlenhydratstoffwechsel oder der Blutdruck, einen zirkadianen Rhythmus zeigen. (Kalsbeek et al. 2006b; Schibler and Sassone-Corsi 2002). Solche zirkadiane Rhythmen im Verhalten und Physiologie, werden im vorderen Hypothalamus innerhalb der Neurone des Nucleus suprachiasmaticus (SCN) generiert und koordiniert. Etwa 10000-20000 Neurone bilden

in ihrer Gesamtheit den SCN, der sich bilateral oberhalb der Sehnervkreuzung, etwa drei Zentimeter hinter den Augen im anterioren Hypothalamus befindet. Studien mit Läsion- und Transplantationsexperimenten brachten auch den funktionellen Beweis, dass der SCN tatsächlich als Rhythmusgenerator fungiert, denn bei Nagetieren, die entweder durch eine Läsion im anterioren Hypothalamus oder durch eine genetische Mutation ihre zirkadiane Periodizität verloren hatten, konnte durch eine Transplantation vom SCN-Gewebe die Rhythmizität des Oszillators wiederhergestellt werden (Antle and Silver 2005; Cermakian and Boivin 2003; Ralph et al. 1990; Sollars and Pickard 1995; Sujino et al. 2003)

Erst durch neuere Studien konnte gezeigt werden, dass der endogene Rhythmus der inneren Uhr durch einen Satz von Uhrengenen durch eine transkriptionale/translationale Rückkopplungsschleife erzeugt wird. Diese interagieren in stimulierenden und hemmenden Rückkopplungsschleifen, die zu wiederkehrenden Rhythmen von mRNA der Uhrengene und deren intrazellulären Proteinkonzentrationen führen (Abb.1). Das rhythmische Oszillieren der mRNAs und deren Proteinprodukte basiert zum einen auf Aktivatoren der Transkription und zum anderen auf Repressoren der Transkription. Eine zentrale Rolle bei der Aktivierung der Transkription spielen die Uhrenproteine *brain and muscle Arnt-like 1* (BMAL1) und *circadian locomotor output cycles kaput* (CLOCK). Eine Repression der Transkription wird durch die Heterodimerisierung der Uhrenproteine *Cryptochrome 1,2* (CRY 1,2) und *PER 1,2* erreicht (DeBruyne et al. 2007; Kume et al. 1999; Reppert and Weaver 2002).

Das im Zytoplasma heterodimerisierte BMAL1-CLOCK aktiviert nach der Translokation in den Zellkern die Transkription der Repressorgene *Cry1*, *Cry2*, *Per1* und *Per2*. Als Konsequenz steigen in der Zelle der *Cry*- und *Per*-mRNA-Gehalt und anschließend ihre Proteinkonzentration. Nach Erreichen einer kritischen Proteinkonzentration bilden CRY und PER das Heterodimer CRY-PER und werden in den Zellkern transloziert. Dort interagieren sie direkt mit CLOCK-BMAL1 und hemmen somit ihre eigene Transkription. Mit dieser Interaktion schließt sich die Rückkopplungsschleife zwischen Transkription und Translation (DeBruyne et al. 2007; Reppert and Weaver 2002).

Für die Generierung von zirkadianen Rhythmen sind auch posttranslationale Modifikationen der Uhrenproteine, wie Phosphorylierung und Ubiquitin-kontrollierte

Proteolyse, von Bedeutung. Ohne diese nachfolgenden Schritte der Proteinreifung und des Proteinabbaus würde der oben beschriebene Zyklus der Uhrengene nur einige Stunden dauern. An der Phosphorylierung sind die Caseinkinasen CK1- δ und CK1- ϵ beteiligt (Gallego and Virshup 2007). Sind PER1 oder PER2 an mehreren Stellen phosphoryliert, ist das PER-CRY Heterodimer geschützt vor der ubiquitin-kontrollierten Proteolyse. Hingegen hebt sich bei Abnahme der Phosphorylierung dieser Schutz auf und das PER-CRY-Heterodimer wird proteolytisch abgebaut. Der Abbau von PER-Proteinen erlaubt die erneute Aktivierung des CLOCK-BMAL1-Komplexes (Akashi et al. 2002; Eide et al. 2005; Keesler et al. 2000).

Eine rhythmische Expression und Translation der Uhrengene ist kein isoliertes Phänomen der SCN-Neurone. Jede Körperzelle benutzt die gleichen Transkription-Translations-Rückkopplungsschleifen, um rhythmische Prozesse zu generieren. Im Vergleich zu peripheren Oszillatoren besteht das besondere Merkmal von SCN-Neuronen darin, dass der SCN als Rhythmus-generierendes Element des PNS den peripheren Oszillatoren übergeordnet ist, denn ohne das Vorhandensein der zentralen Uhr, also z.B. nach einer Läsion im SCN, kommt es in peripheren Zellen zum Erlöschen der rhythmischen Oszillation (Okamura 2007; Sujino et al. 2003).

1.2.3 Melatonin als Effektor des photoneuroendokrinen System

Das Pinealorgan wird durch eine Reihe von Nervenfasern innerviert, wobei der Hauptweg der Innervation aus einer multisynaptischen Verbindung vom retinohypothalamischen Trakt zum SCN in Richtung Pinealorgan besteht. Vom SCN ziehen efferente Bahnen über die supraventriculäre Zone zum Nucleus paraventricularis, die als Neurotransmitter VP (Vasopressin) und γ -Aminobuttersäure (GABA) in ihren Nervenendigungen enthalten. Vom Nucleus paraventricularis verlaufen die Efferenzen über die Columna intermediolateralis des Rückenmarks zum Ganglion cervicale superius. Die noradrenergen postganglionären Fasern des Ganglion cervicale superius innervieren schließlich das Corpus Pineale. Der Rhythmus der Melatoninsynthese hängt grundlegend von zwei Faktoren ab: erstens vom endogenen Rhythmus des SCN, zweitens von den Licht-Dunkel-Zyklen, die den SCN synchronisieren (Moller and Baeres 2002; Simonneaux and Ribelayga 2003).

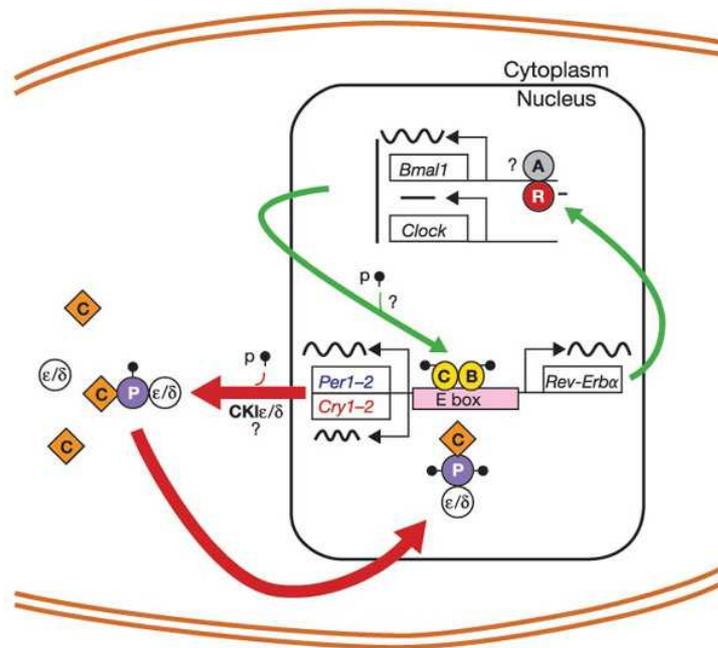


Abb. 1. Molekulare Mechanismen in der inneren Uhr im Hypothalamus bei Säugern.

Die beiden Transkriptionsfaktoren CLOCK und BMAL1 enthalten jeweils zwei basische Helix-Loop-Helix-PAS-Abschnitte (PAS steht für *Period-Arnt-Single minded*). Dieser Helix-Loop-Helix-PAS-Abschnitt ist für die Bindung von CLOCK und BMAL1 an die DNA verantwortlich (Bunger et al. 2000; Darlington et al. 1998; Hogenesch et al. 1998). Nach der Dimerisierung von CLOCK und BMAL1, aktiviert das entstandene Heterodimer CLOCK-BMAL1 regulatorische Sequenzen des sog. E-box-Enhancer-Element. Um eine Genexpression-stimulierende Wirkung zu erzielen aktiviert das CLOCK-BMAL1 Heterodimer neben der Transkription von *Per* und *Cry* auch die Transkription vom nukleären Orphanrezeptorgen *Rev-Erb-alpha* (Darlington et al. 1998; Hogenesch et al. 1998; Preitner et al. 2002). Das resultierende REV-ERB-alpha-Protein hemmt dann die Transkription von *Bmal-1* (Preitner et al. 2002; Ueda et al. 2002). Hieraus ergibt sich eine Abnahme der RNA-Konzentration von *Bmal1* mit gleichzeitigem Anstieg von RNA-Gehalt an *Per* und *Cry*. Nach der Translokation der *Cry*-Proteine in den Nucleus hemmen sie neben ihrer eigenen Transkription auch die Transkription von *Per* und *Rev-Erb-alpha*. Diese Deaktivierung von *Rev-Erb-alpha* führt zu einer Aktivierung der *Bmal1*-Transkription, des Weiteren stimuliert das *PER-2* Protein bei vorhandener Hemmung von *Rev-Erb-alpha* die *Bmal1*-Transkription (Preitner et al. 2002).

Die resultierenden *Per*- und *Cry*-Proteine werden in den Nucleus transloziert, die *Cry*-Proteine im Zellkern interagieren direkt mit CLOCK- oder BMAL1 und hemmen damit die Transkription (Kume et al. 1999; Okamura et al. 1999; Shearman et al. 2000; Vitaterna et al. 1999).

Die nächtliche Stimulation der Melatoninsynthese wird über die Freisetzung von Noradrenalin aus den Nervenendigungen der postganglionären Fasern des Ganglion cervicale superius initiiert.

Das freigesetzte Noradrenalin aktiviert β_1 -Adrenozeptoren der Pinealozyten, und bewirkt über die Aktivierung der Adenylat-Cylase einen Anstieg von zyklischem Adenosinmonophosphat (cAMP). Eine Zunahme der cAMP- Konzentration ist mit der Phosphorylierung des Schrittmacherenzym der Melatoninsynthese, der *Arylalkylamin-N-Azetyltransferase* (AA-NAT) verbunden.

Zur Melatoninsynthese wird die Aminosäure Tryptophan aus dem Blut aufgenommen und zu 5-Hydroxytryptamin (Serotonin) umgewandelt. In einem vorletzten Schritt katalysiert die AA-NAT die Bildung von Acetylserotonin, welches schließlich durch die *Hydroxyindol-O-Methyltransferase* (HIMOT) in Melatonin umgesetzt wird (Ganguly et al. 2002; Klein et al. 2002).

Das Zeithormon Melatonin ist ein lipophiles Indolaminderivat, welches nicht gespeichert und direkt ins Blut sezerniert wird. Die Hormonkonzentration im Plasma beträgt bei der Ratte während der Nacht 80-100 pg/ml und während des Tages 10-30 pg/ml, so dass eine Melatoninbestimmung im Plasma zu jeder Tageszeit die Dynamik der Melatoninsekretion widerspiegelt (Simonneaux and Ribelayga 2003).

Die Melatoninsekretion spiegelt nicht nur die Tagesrhythmik, sondern auch der Jahreszeiten wieder. Denn einerseits weist die Melatoninkonzentration einen 24-Stunden-Rhythmus mit nächtlichem Anstieg auf und andererseits ist die Amplitude und Dauer der nächtlichen Melatoninkonzentration während der kurzen Wintertage (*short days*) im Vergleich zu langen Sommertagen (*long days*) bei photoperiodischen Spezies deutlich erhöht (Morgan and Williams 1996). Damit ergänzt Melatonin die Information aus dem RHT, die dem SCN über PACAP und Glutamat übermittelt werden (Korf and von Gall 2006).

Das Neurohormon Melatonin beeinflusst zahlreiche physiologische Prozesse, wie z.B. zirkadiane Synchronisation, Blutdruckregulation, Onkogenese, physiologische Vorgänge der Retina und saisonale Anpassung der Reproduktion bei photoperiodischen

Nagetieren (Witt-Enderby and Li 2000). Gut untersucht ist die schlafinduzierende Wirkung von Melatonin beim Menschen. Dieser Effekt wird durch die reziproke Wirkung des Melatonins auf den SCN vermittelt (Benarroch 2008)

1.3 Die hypophysäre Pars tuberalis (PT) als Zielstruktur des photoneuroendokrinen System

Die Adenohypophyse der Säugetiere besteht aus drei Anteilen: Pars distalis (PD), Pars intermedia (PI) und Pars tuberalis (PT). Die Pars tuberalis besteht aus einer zwei- bis mehrschichtigen, glandulären Epithelschicht, die den Hypophysenstiel umfasst und ventral in die Eminentia mediana ausläuft. In ihren distalen Ausläufen geht die Pars tuberalis ohne klare Begrenzung in die Pars distalis und Pars intermedia über. Primäre Plexuskapillaren des portalen Gefäßsystems der Adenohypophyse, an denen die neurosekretorischen Nervenfasern der der Eminentia mediana enden, umschlingen die sekretorischen Zellen der Pars tuberalis (Wittkowski et al. 1999).

Morphologische und immunohistochemische Untersuchungen zeigen, dass die Pars tuberalis aus drei unterschiedlichen Zelltypen besteht: PT-spezifische Zellen, folliculäre Zellen und PD-ähnliche Zelltypen (Wittkowski et al. 1999). Die PT-spezifischen Zellen zeigen Charakteristika von Peptid sezernierenden Zellen, wobei das Sekretionsprodukt in den perivaskulären Raum freigesetzt wird (Merks et al. 1993).

Die Pars tuberalis bildet eine Schnittstelle zwischen dem endokrinen System und der inneren Uhr im Hypothalamus. Durch das Neurohormon Melatonin reguliert das PNS die endokrine Aktivität der Pars tuberalis (Bockers et al. 1995; Morgan and Mercer 1994; Ross and Morgan 2002; Wittkowski et al. 1992).

Studien mit radioaktiv markierten [¹²⁵I]-Iodomelatonin belegen, dass in der Pars tuberalis hochaffine Melatoninrezeptoren (MT) vorkommen (Williams et al. 1997; Williams and Morgan 1988). Nachfolgende Untersuchungen identifizierten den MT1-Rezeptor, der mit einer auffallend hohen Dichte in der PT vorkommt (Morgan and Mercer 1994; Roca et al. 1996).

Die molekularen Signaltransduktionsmechanismen zur physiologischen Umsetzung des Melatoninsignals in der PT sind nicht vollständig geklärt. Obwohl Melatonin akut über den membranständigen MT1-Rezeptor auf den cAMP-Signaltransduktionsweg hemmend

wirkt, sensibilisieren prolongierte Inkubationszeiten (6-24 Stunden) mit Melatonin die anschließende Stimulation von cAMP (Hazlerigg et al. 1993; von Gall et al. 2002). Möglicherweise ist dieser Unterschied zwischen der *akut-hemmenden* und *chronisch-stimulierenden* Wirkung von Melatonin auf die Tyrosinphosphorylierung der Adenylatcyclase zurückzuführen (Barrett et al. 2000). Aus diesem Grund wird von einigen Autoren angenommen, dass die Dauer der Melatoninstimulation bei gleichzeitigem Vorhandensein von stimulierenden Faktoren, wie z.B. *Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide* (PACAP) oder Adenosin, die Bildung von cAMP positiv beeinflusst (Barrett et al. 2002; von Gall et al. 2002).

Interessanterweise wird ein bestimmter Adenosinrezeptor, der G_s-gekoppelte A_{2b}-Rezeptor, in hoher Dichte in der PT exprimiert (Stehle et al. 1992). Bei der Stimulation dieser A_{2b}-Rezeptoren durch einen Agonisten (NECA), nahm die Intensität der Immunreaktion von pCREB und PER1 in der PT deutlich zu. Erstaunlicherweise bewirkte eine Vorinkubation der PT-Schnittkulturen mit Melatonin eine deutlich stärkere Zunahme der NECA-induzierten PER1-Immunreaktion. Daher wird von einigen Autoren postuliert, dass während der Nacht Melatonin die cAMP-Signaltransduktionskaskade hemmt und gleichzeitig den A_{2b}-Rezeptor sensibilisiert. Sobald Melatonin in den frühen Morgenstunden aus der Zirkulation verschwindet, entfällt der hemmende Effekt auf die cAMP-Signaltransduktionskaskade in den PT-Zellen und Adenosin bewirkt durch die Aktivierung des A_{2b}-Rezeptors eine Zunahme der intrazellulären cAMP-Konzentration (von Gall et al. 2002) und induziert die Phosphorylierung von CREB und die Bildung von PER1.

Elektronenmikroskopische Untersuchungen zur sekretorischen Aktivität zeigten, dass PT-Zellen beim Djungiarischen Hamster sensibel auf die Veränderung der Photoperiode reagieren (Wittkowski et al. 1988; Wittkowski et al. 1984). Dabei reflektiert Melatonin die abgelaufene, saisonale Zeit. Somit fungiert die PT als ein saisonaler Kalender, der die durch Melatonin kodierte Photoperiode an das endokrine System weitergibt (Barrett et al. 2003; Johnston 2004; Morgan and Williams 1996). Gegenwertig wird davon ausgegangen, dass die PT auf diesem Wege das saisonale Reproduktionsverhalten maßgeblich über Prolaktin und *Thyroid-Stimulierendes Hormon* (TSH) beeinflusst (Morgan and Williams 1996; Yasuo et al. 2009).

Über MT1 Rezeptoren der Pars tuberalis reguliert Melatonin die Prolaktinsekretion der mammotropen Zellen der Pars distalis. Während der langen Sommertage sollen hohe Konzentration des „Tuberalins“ aufgrund der geringen Konzentrationen des Melatonins, die Prolaktinsekretion erhöhen (Morgan and Williams 1996). Dass die Pars tuberalis essentiell an der Prolaktinsekretion beteiligt ist, zeigten Lincoln und Clarke durch eine Diskonnektion der hypothalamisch-hypophysären Achse. Hierbei wurde durch einen mikrochirurgischen Eingriff die Eminentia mediana vom Hypothalamus getrennt. Interessanterweise kam es nicht zu einem Stillstand der Prolaktinsekretion (Lincoln and Clarke 1994). Da die mammotropen Zellen der Pars distalis keine Melatoninrezeptoren aufweisen, erfolgt die saisonale Kontrolle der Prolaktinproduktion über Melatoninrezeptoren der Pars tuberalis (Helliwell and Williams 1994; Skinner and Robinson 1995).

Die Beschränkung der Melatoninrezeptoren auf die Pars tuberalis der Hypophyse bei adulten Tieren und die Unfähigkeit von Melatonin, die Genexpression von Prolaktin in Zellkulturen der Pars distalis zu initialisieren, unterstützen die Hypothese, dass die Prolaktinbildung über die Sekretion von „Tuberalin“ der PT-Zellen stimuliert wird (Morgan et al. 1994; Morgan and Mercer 1994; Stirland et al. 2001). Im Einklang mit dieser Hypothese, konnte bei PT-Zellen des Schafes die Sekretion eines „Tuberalin“ nachgewiesen werden, das eine Stimulation der mammotropen Zellen der Pars distalis bewirkte (Hazlerigg 1996, Morgan 1996). Diese Stimulation der Prolaktinsekretion über Tuberaline konnte ebenfalls beim Rind und Hamster festgestellt werden (Stirland et al. 2001).

Trotz intensiver Forschung ist die molekulare Charakterisierung des Tuberalins, welches an der interzellulären Kommunikation zwischen PT und mammotropen Zellen der Pars distalis beteiligt ist, bis heute nicht gelungen (Johnston 2004).

Neben Prolaktin sind an der Regulation des Reproduktionsverhaltens der Vögel und Säuger das *Triiodthyronin* (T3) und sein Prohomon *Thyroxin* (T4) beteiligt. T4 wird durch *Type II-Iodothyronine Deiodinase* (DIO2) zum bioaktiven T3 und durch *Type III-Iodothyronine Deiodinase* (DIO3) zum inaktiven reverse-T3 dejodiert. Die PT-Zellen der Säuger und Vögel exprimieren sowohl die TSH- β -Untereinheit als auch TSH-Rezeptoren. DIO2 und DIO3 kommen in der Ependymzellschicht des dritten Hirnventrikels vor. Durch pharmakologische und molekularbiologische Untersuchungen

bei Tieren, deren Reproduktion der saisonalen Photoperiode unterworfen ist, konnte gezeigt werden, dass die Expression von DIO2 unter langen Photoperioden signifikant höher ist als unter kurzen Photoperioden. (Ono et al. 2008; Yasuo et al. 2005; Yoshimura et al. 2003). Während kurzer Photoperioden war die Expression von DIO2 erniedrigt und die von DIO3 erhöht. Das bedeutet, dass die T3-Konzentration im 3.Ventrikel unter langer Photoperiode erhöht ist. Durch Applikation von T3 während kurzer Photoperiode, also während der nicht-reproduktiven Phase, erfolgte eine Sekretion des LHs (*luteinisierendes Hormon*), welches mit einer Volumenzunahme des Hodens einher ging (Yoshimura et al. 2003).

Erstaunlicherweise findet die Induktion der DIO-2 und TSH- β Expression in der Ependymzellschicht bzw. in der PT, in der Übergangsphase zwischen kurzer und langer Photoperiode statt. Es wird vermutet, dass TSH über Tanyzyten in die Ependymzellschicht des dritten Hirnventrikels gelangt. An der photoperiodischen Regulation von DIO2 und DIO3 und TSH- β ist Melatonin beteiligt (Nakao et al. 2008; Ono et al. 2008).

1.4 Die hypothalamo-hypophysär-adrenale Achse (HPA-Achse) als Effektor des photoneuroendokrinen Systems

1.4.1 Hypothalamisch-Hypophysäre Organisation der HPA-Achse

Die Steuerung von Hormonrhythmen gehört zu der essentiellen Ausgangsleistung der zentralen Uhr im Hypothalamus und gerade der zirkadiane Rhythmus der Glukokortikoidkonzentration wurde von den Pionieren der zirkadianen Neurobiologie bei der Erforschung der zentralen Uhr im Hypothalamus als experimentelle Kontrolle eingesetzt (Moore and Eichler 1972). Bei den meisten Säugetieren erreicht die Plasmakonzentration der Glukokortikoide kurz vor der Aufwachphase die höchste Konzentration und nimmt im Verlauf der aktiven Phase ab (Kalsbeek et al. 1996a; Kalsbeek et al. 1996b).

Neuroanatomische Studien über die efferenten Verbindungen der inneren Uhr zeigen, dass all diese Verbindungen in Richtung des medialen Hypothalamus ziehen. Die Zielstrukturen sind Interneurone im *medialen präoptischen Areal* (MPOA), im

dorsomedialen Hypothalamus (DMH) und im *subparaventriculären, hypothalamischen Nucleus (subPVN)* (Hoorneman and Buijs 1982). Trotz ihrer Spärlichkeit sind auch direkte Projektionen des SCN zu Neuronen im medialen Hypothalamus beschrieben, die Releasingfaktoren wie *Kortikotropin (CRF)*, *Thyreotropin (TRH)* und *Gonadotropin (GnrH)* synthetisieren (Buijs et al. 2003b; Kalsbeek and Buijs 2002; Kalsbeek et al. 2006b).

Das Neuropeptid Vasopressin wurde als erster Überträgerstoff identifiziert, der die vom SCN ausgehenden Informationen zu Interneuronen im DMH und subPVN weitergibt. Bei nachtaktiven Säugetieren innervieren vasopressinergen Efferenzen der inneren Uhr GABA-erge Interneurone in DMH und sub-PVN, die direkt zum PVN ziehen. Durch die vasopressinerge Stimulation der GABA-Interneurone wird direkt ein hemmender Effekt auf den Anstieg von Kortikosteron im Plasma bewirkt (Kalsbeek et al. 2008).

Bei tagaktiven Säugetieren kommen im DMH und subPVN statt GABAerger Interneurone stimulierende, glutamaterge Interneurone vor. Der Überträgerstoff der SCN-Efferenz, Vasopressin, führt über eine Stimulation dieser Interneurone zum Kortikosteronanstieg im Plasma (Kalsbeek et al. 2008). Beide Kerngebiete sind an der rhythmischen Kontrolle der Glukokortikoidbiosynthese der Nebennierenrinde beteiligt (Kalsbeek et al. 2006a; Kalsbeek et al. 2006b).

Die genaue Rolle von Vasopressin in efferenten Nervenendigungen des SCN konnte mit Hilfe einer umgekehrten Mikrodialyseuntersuchung gezielter aufgeklärt werden. Dabei wurden männlichen Wistar-Ratten etwa vier Stunden vor Beginn ihrer Aktivitätsphase ein synthetisches Vasopressin in den DMH/PVN infundiert, welches einen zirkadianen Anstieg von Kortikosteron verhinderte. Darüber hinaus bewirkte eine Infusion von einem Vasopressin-Antagonisten während der inaktiven Tagphase des Nagetieres einen Anstieg des Kortikosterons (Kalsbeek et al. 1996a; Kalsbeek et al. 1996b; Kalsbeek et al. 2008). Diese inhibitorische Wirkung von Vasopressin auf die Kortikosteronkonzentration während der Lichtphase ist ein Spezifikum von nachtaktiven Spezies. Bei tagaktiven Spezies zeigt sich ein umgekehrter Zusammenhang. Die mikrodialytische Infusion von Vasopressin in den PVN zeigte bei tagaktiven Spezies einen stimulierenden Effekt auf die Plasmakonzentration von Kortikosteron. Des weiteren hemmte die Applikation von einem Vasopressinrezeptor-Antagonisten den

frühmorgendlichen Anstieg von Kortikosteron bei beiden Spezies (Kalsbeek et al. 2008).

Der zentrale hypothalamische Regulator der hypophysär-adrenalen Achse ist das Liberin Kortikotropin-releasing-Hormon, bestehend aus 41-Aminosäuren (CRF oder CRH). CRF-Neurone befinden sich im Hypothalamus, in der preoptischen Region, im medialen preoptischen Subnucleus, sowie im periventrikulären und perifornikalen Areal. Die höchste Dichte von CRF-Neuronen kommt jedoch im PVN vor. An Hand der Zellmorphologie und des Neuropeptidgehalts wurde der PVN in zwei große Gruppen mit jeweils drei bzw. fünf Untergruppen eingeteilt. Die erste Gruppe bilden die magnozellulären Neurone, die wiederum in drei Untergruppen eingeteilt werden. Die magnozellularen Neurone machen anteilig etwa 20% der CRF-positiven Neurone aus und sind an der Biosynthese und Sekretion von AVP beteiligt (Swanson et al. 1986). Etwa 80% der CRF-Neurone befinden sich in der zweiten Gruppe, die aufgrund ihrer Zytoarchitektur als parvozelluläre Zellgruppe bezeichnet wird. Der parvozelluläre Anteil wird in fünf weitere Untergruppen unterteilt, deren Efferenzen in Richtung Rückenmark, Eminentia mediana und Neurohypophyse laufen (Swanson and Kuypers 1980; Swanson et al. 1986).

Ein Teil der Neurone im PVN synthetisiert sowohl das CRF-Peptid als auch das Arginin-Vasopressin (AVP) und sezerniert diese an der Außenzone der Eminentia mediana in den portalen Kreislauf der Adenohypophyse (Antoch et al. 1997; Chrousos 1992; Chrousos and Gold 1992; Tsigos and Chrousos 1994).

Über das Pfortadersystem wird CRF zur Adenohypophyse transportiert und stimuliert dort kortikotrope Zellen zur Sekretion von Adrenokortikotropes Hormon (ACTH), welches in den Blutkreislauf abgegeben wird. AVP hat einen synergistischen Effekt auf die ACTH-Sekretion, denn ohne CRF hat es eine geringe sekretionssteigernde Wirkung (Abou-Samra et al. 1987; Gillies et al. 1982).

Über membranständige G-Protein-gekoppelte Rezeptoren stimuliert CRF die Biosynthese von ACTH. Der CRF-1-Rezeptor ist an G_s-Protein gekoppelt, welches zur Aktivierung des cAMP-Signaltransduktionweges führt. Durch die Aktivierung des cAMPs kommt es zur Hemmung der Kaliumkanäle und einer nachfolgenden Depolarisation der spannungsabhängigen Kalziumkanäle. Dabei strömt vermehrt

Kalzium in die kortikotrope Zellen und induziert die Sekretion von ACTH in die systemische Zirkulation. Anders als CRF bewirkt AVP den Anstieg des intrazellulären Kalziums in kortikotropen Zellen über IP₃-sensitive Kalziumspeicher erreicht (Engler et al. 1999; Gutknecht et al. 2009; Lee and Tse 1997).

1.4.2 ACTH und die Glukokortikoidbildung in der Nebenniere

Das in die systemische Zirkulation freigesetzte Adrenokortikotrope Hormon (ACTH) gelangt über die Blutbahn an Fasciculatazellen der Nebennierenrinde und stimuliert über membranständige G-Protein gekoppelte Melanokortin-2-Rezeptoren (MC2R) die Aktivierung der Glukokortikoidbiosynthese. Diese Aktivierung resultiert in einem Anstieg von cAMP und Proteinkinase A, welche zur Expression von Enzymen führt, die an der Biosynthese von Steroidhormonen beteiligt sind (Lefkowitz et al. 1970a; Lefkowitz et al. 1970b).

Das Adrenokortikotrope Hormon weist bezüglich der Steroidbiosynthese sowohl eine akute als auch eine verlängerte Wirkung auf. Der akute Effekt besteht in der Mobilisierung des intrazellulären Cholesterols in der inneren Membran der Mitochondrien. An diesem Transport des Cholesterols ist das akute regulatorische Protein StAR beteiligt. Nach der Translokation in das Mitochondrium katalysiert die Cytochrom-P-450-Oxidase CYP11A die Umwandlung von Cholesterol zu Pregnenolon. Die bis zur Pregnenolonsynthese abgelaufene Phase stellt den ersten Schritt der Synthese aller Steroidhormone dar. In einer zweiten Phase, die von einer langsameren Kinetik gekennzeichnet ist, kommt es durch eine cAMP-vermittelte Aktivierung der Proteinkinase A zur Transkription einer Reihe von Subtypen der Cytochrome-P-450-Oxidase, die an der Synthese von Steroidhormonen beteiligt sind. Für die Synthese von Kortikosteron ist das Enzym 11-beta Hydroxylase verantwortlich, welches 11-Deoxykortisol in Glukokortikoide umwandelt (Cooray et al. 2008).

Es gibt unter den Säugern Unterschiede bezüglich der endogenen Glukokortikoide. Während beim Menschen das endogene Glukokortikoid hauptsächlich Kortisol darstellt, kommt bei Nagetieren ausschließlich Kortikosteron vor. Schafe, Schweine und Hunde produzieren beide Glukokortikoide in gleichen Maßen (Buckingham 2006).

Glukokortikoide zeigen eine Reihe physiologischer Wirkungen, die u.a. das Essverhalten und den Metabolismus betreffen. Ein auffälliges Merkmal der Glukortikoidfreisetzung bei nacht- und tagaktiven Säugetieren ist die Korrelation mit der Aktivphase. Diese Korrelation könnte als Vorbereitung des Organismus auf die aktiven Phasen, die mit erhöhter Zufuhr von Kohlenhydraten und Lipiden, Mobilisation von Energiereserven und Initialisierung der Nahrungssuche einhergehen (Buckingham 2006; Devenport et al. 1993; Hamelink et al. 1994; Nader et al. 2009).

Zusammenfassend können die Glukokortikoide im Gegensatz zu Melatonin als Signal des Tages bzw. der aktiven Phase (bei nachtaktiven Säugetieren) angesehen werden. Glukokortikoide induzieren, z.B. in den Hepatozyten die Expression von Uhrengenen. Dieser humorale Weg des PNS ist jedoch nicht allein für die Synchronisation von metabolischen Prozessen verantwortlich. Hierfür ist auch das Zusammenwirken von endokrinen und autonomen Ausgangsleistungen des PNS notwendig. Das Zusammenspiel von peripheren Oszillatoren auf der einen Seite und endokrin-autonomen Signalen auf der anderen Seite ist von großer Bedeutung für den hepatisch bedingten, zirkadianen Rhythmus der Glucosekonzentration im Plasma. Denn durch eine Denervierung der sympathischen Innervation der Leber erlischt der zirkadiane Rhythmus von Glucose im Plasma, ohne die rhythmische Expression von Uhrengenen zu beeinflussen (Balsalobre et al. 2000; Cailotto et al. 2005; Nader et al. 2009).

1.4.3 Photoneuroendokrine Regulation der sympathischen Innervation der Nebenniere

Das vegetative Nervensystem wird funktionell in das parasympathische und sympathische Nervensystem eingeteilt. Beide Systeme bestehen aus zentralen und peripheren Anteilen. Alle Afferenzen und Efferenzen des autonomen Nervensystems finden ihren Ziel- bzw. Ursprungsort im Hypothalamus. Anatomische Studien zeigen, dass der anteriore Hypothalamus mehr an der parasympathischen Koordination und der posteriore Hypothalamus überwiegend an der sympathischen Koordination beteiligt ist (Palkovits 1999).

Genauer betrachtet stammt die Mehrheit der efferenten, hypothalamisch-autonomen Fasern überwiegend aus vier Kerngebieten bzw. Arealen des Hypothalamus: PVN, Ncl.

arcuatus, perifornikales Areal und dorso-lateraler Hypothalamus. Der PVN und Ncl. arcuatus sind an der autonomen und endokrinen Regulation beteiligt, während der dorsolaterale Hypothalamus über eine neuronale Rückkopplungsschleife an vegetativen Reflexantworten beteiligt ist (Palkovits 1999).

Der PVN stellt nicht nur den wesentlichen Ursprungsort der autonomen Efferenzen, sondern bildet für die photoperiodische Adaptation der autonomen und endokrinen Funktionen die wesentliche Schaltstelle zwischen der zentralen Uhr im Hypothalamus und dem vegetativen Nervensystem. Über den dorsomedialen Hypothalamus synchronisiert der SCN autonome Funktionen mit Licht- und Dunkelphasen, indem er auf parasymphatische und sympathische Prä-Neurone des PVNs Einfluss nimmt. Entsprechend findet sich im SCN ebenso wie im PVN eine klare Differenzierung zwischen Neuronen mit einer Verbindung zu parasymphatischen bzw. zu sympathischen Prä-Neuronen des PVNs. Der subPVN ist nicht an der autonomen Regulation beteiligt; Verbindungen über den subPVN dienen eher der Koordination von neuroendokrinen Funktion, z.B. der Sekretion von CRF (siehe oben). Vom PVN projizieren sympathische Efferenzen zur Columna intermediolateralis des Rückenmarks und innervieren präganglionäre Neurone, die an der sympathischen Innervation der Nebenniere beteiligt sind (Buijs et al. 2003a).

Die Nebenniere erhält, im Vergleich zu anderen Organen und in Bezug zu ihrer Organgröße, eine viel intensivere autonome Innervation. Sie wird sowohl durch präganglionäre, als auch durch postganglionäre sympathische Fasern innerviert. Den größten Anteil bilden die präganglionären Fasern, die etwa 77%-88 % der sympathischen Innervation der Nebenniere bei Meerschweinchen und Ratte ausmachen. Die Perikaryen dieser präganglionären Neurone befinden sich in der Intermediärzone des Rückenmarks zwischen den Segmenten T3 bis L2. Die größte Zelldichte der präganglionären Neurone wurde zwischen T9 und T10 lokalisiert. Der Anteil der postganglionären Fasern liegt bei Nagetieren (Ratte und Meerschweinchen) zwischen 11 und 23 %. Zum größten Teil stammen diese Fasern aus dem Grenzstrang (Ratte 9,2%, Meerschweinchen 17,4%), während ein geringerer Teil aus dem Ganglion suprarenale (Ratte 2,6%, Meerschweinchen 5,6%) stammt. Über den N. splanchnicus

erreicht die Mehrheit der prä- bzw. postganglionären Fasern die Nebenniere (Kesse et al. 1988; Parker et al. 1993).

1.5 Das Endocannabinoidsystem

1.5.1 *Allgemeinhistorische Einführung*

Bevor ich in den folgenden Abschnitten das Endocannabinoidsystem auf molekularer Ebene erläutere, möchte ich zunächst einen kurzen Überblick über die medizinhistorische Bedeutung der Pflanze *Cannabis sativa* (C.sativa) geben, da die Entdeckung des endogenen Cannabinoidsystem ohne die medizinhistorische Bedeutung der Pflanze C. sativa nicht nachvollziehbar ist. Bei der Darstellung der medizinischen Bedeutung werden botanische Daten außer Acht gelassen.

Die ältesten medizinischen Schriften über die Verwendung von C. sativa als Heilmittel sind 3000-5000 Jahren alt und stammen aus dem antiken China, Ägypten, Mesopotamien und Indien. In dem ältesten chinesischen Arzneibuch *Henning pen ts'ao ching* ist der medizinische Nutzen von C. sativa in schriftlicher Form ca. 300 v.Chr. festgehalten worden. Die hier beschriebenen medizinischen Anwendungen sollen vom Kaiser *Shen Nung*, der vor ca. 5000 Jahren gelebt haben soll, überliefert worden sein (Hanus 2007; Russo 2007).

In einer Passage aus *Shen-nung pen ts'ao ching* heißt es: „*Protracted taking may make one fat, strong and never senile*“. Hier wird zum ersten Mal auf einen neuroprotektiven und neuroendokrinen Effekt von Cannabis hingewiesen.

Auch diverse Papyri der alten Ägypter beschreiben medizinische Anwendungen von C. sativa (Russo 2007) unter anderen bei:

- Papyrus Ramessum III* (ca. 1700 v. Chr.), Cannabis in der Glaukomtherapie,
- Ebers Papyrus* (ca. 1550vChr.), Cannabis bei gynäkologischen Beschwerden, Cannabis als Antiinfektivum (Wickelanwendung bei Entzündungen an den Fingern oder Zehen)
- Berlin Papyrus* (ca. 1300 v.Chr.), Cannabis bei Bilharziose oder Wurmerkankungen
- Chester Beatty VI Papyrus* (ca.1300 v. Chr.), Cannabis bei Harninkontinenz, Diarrhoe.

Überlieferungen anderer antiker Kulturen, wie z.B. der Sumerer, Akkadier, Babylonier, Assyrer, beschreiben folgende medizinische Indikationen von *C.sativa*: Impotenz, Neuralgien, Nierensteinleiden, Stauungslunge, Spastik, Depressionen und Angststörungen. Ähnlich wie im altertümlichen China, beschreiben die alten Inder einen neuroprotektiven Effekt von Cannabis. In einer alten Überlieferung ca. 1200 v. Chr. heißt es: „...it is claimed that man lives 300 years free from any disease and sign of old age“ (Russo 2007).

Im mittelalterlichen Persien verweist der nestorianisch-persische Arzt Sabuhr ibn Sahl (9. Jahrhundert n. Chr.) in *Dispensatorium Parvum* auf folgende Indikationen von *C.sativa*: Migräne, Schmerzen, Prophylaxe einer Fehlgeburt. Zu den einflussreichsten Ärzten des damaligen Persiens gehörten auch Abu Bakrr Muhammad Ebn Zakariya Al-Razi („Rhasas“, pers. Rasi 860-940 n.Chr.), sowie Abu Ali Al-Hussein Abdullah Ebn-e-Sina („Avicenna“, persisch Pur Sina, 980-1037 n. Chr.) . Ferner empfiehlt Avicenna in seinem Werk „*Kanon der Medizin*“ Cannabis zur Schmerztherapie, wie z.B. bei Cephalgien. Rhasas berichtet, dass die topische Anwendung von Cannabis das Haarwachstum stimuliert (Gorji and Khaleghi Ghadiri 2002; Russo 2007).

Aufgrund der oben beschriebenen, vielfältigen Indikationen war es ein notwendiger Schritt der molekularen Wissenschaft, aktive Komponenten dieser Pflanze zu charakterisieren und sie für die derzeitige medikamentöse Anwendung brauchbar zu machen. Erstaunlicherweise gelang die Isolierung und Charakterisierung der aktiven Hauptkomponente erst im Jahre 1964 durch Yehiel Gaoni und Raphael Mechoulam (Y. Gaoni and Mechoulam 1964).

Mit dieser Entdeckung wurde der Grundstein für die Erforschung des Endocannabinoidsystem gelegt. Im Jahre 1990 gelang das Klonen des ersten Cannabinoidrezeptors (CB-1) und drei Jahre später wurde erfolgreich der zweite Cannabinoidrezeptor (CB-2) geklont (Matsuda et al. 1990; Munro et al. 1993).

Durch die Charakterisierung der Cannabinoidrezeptoren konnten potentielle endogene Cannabinoide isoliert werden. Zu den am besten erforschten Endocannabinoiden gehören *Anandamid* (AEA) und *2-Arachidonoylglycerol* (2-AG) (Devane et al. 1992;

Mechoulam et al. 1995; Sugiura et al. 1995). Somit haben medizinische Aspekte, die schon seit früheren Epochen bekannt sind, nicht an Aktualität verloren, sondern werden zunehmend vertiefter erforscht (beispielsweise der neuroprotektive und analgetische Effekt von Cannabinoiden). Daraus resultiert zum einen, dass die moderne Medizin historische Überlieferungen bestätigt, und zum anderen, dass die molekulare Wissenschaft ein endogenes Cannabinoidsystem zeigt, welches im Organismus ubiquitär vorkommt und an interzellulärer Kommunikation über autokrine und parakrine Wege/Mechanismen teilnimmt. (Kreutz et al. 2009; Pagotto et al. 2006; Piomelli 2003; Russo 2004; Schomacher et al. 2008; Williamson and Evans 2000).

1.5.2 Die Biosynthese von Anandamid und 2-Arachidonoylglycerol

Die Endocannabinoide sind endogene Lipidderivate, die entweder in einer Amidbindung (Anandamid, N-Arachidonoyl-Ethanolamid) oder in einer Esterbindung (2- oder 1-Arachidonoyl-Glycerol, 2-AG, 1-AG) vorliegen. Diese Endocannabinoide werden durch enzymatische Umlagerungs- und Hydrolyseprozesse aus Membranlipiden synthetisiert. Neben Glykolipiden und Sterolen bestehen eukaryotische Zellmembranen aus Glycerolphospholipiden. Zu den Glycerolphospholipiden werden hauptsächlich Phosphatidylcholin, Phosphatidylethanolamin, Phosphatidylserin und Phosphatidylinositol gezählt. Diese dienen als Substrate für den Endocannabinoidhaushalt der Zelle (Astarita et al. 2008; Piomelli et al. 2007; van Meer et al. 2008). Es wird angenommen, dass Endocannabinoide bei Bedarf synthetisiert und unverzüglich abgebaut und nicht gespeichert werden. Dieser Modus operandi der Endocannabinoide wird als „on demand synthesis“ bezeichnet (Marsicano et al. 2003).

Die Enzymmaschinerie zur Biosynthese von Endocannabinoiden wird in neuronalen und endokrinen Zellen durch Kalzium in Gang gesetzt. Beispielsweise geht eine Depolarisation mit einer Aktivierung von spannungsabhängigen Kalziumkanälen und erhöhtem Kalziumeinstrom einher. Auch durch eine Ligandenbindung, z.B. von Dopamin an dem Dopaminrezeptor-2 (D2) kann eine Mobilisation von Kalzium aus intrazellulären Speichern erfolgen (Di Marzo et al. 1994; Giuffrida et al. 1999; Piomelli 2003).

Die Anandamidbiosynthese läuft in zwei aufeinander folgenden katalytischen Prozessen ab. In einem ersten Schritt wird durch eine Kalzium-aktivierte Transacyltransferase (NAC) die Arachidonsäure von der sn-1-Position des Phosphatidylcholin auf das primäre Amin des Phosphatidylethanolamin übertragen. Aus der Übertragung des Fettsäurestes auf Phosphatidylethanolamin entsteht *N-Arachidonoyl-Phosphatidylethanolamin* (NAPE). Bis heute ist es nicht gelungen diese Transacyltransferase molekular zu charakterisieren. Es wird davon ausgegangen, dass die NAC als Schrittmacherenzym die Geschwindigkeit der Anandamidbiosynthese bestimmt. Die NAC zeigt eine prominente Präferenz für die Biosynthese von NAPEs, die mehrfach ungesättigten Fettsäuren wie *Arachidonsäure* (C20:4) und *Cervonsäure* (22:6) enthalten. Entsprechend stellen NAPEs mit dieser Konstellation der mehrfach ungesättigten Fettsäuren Lipidvorläufer des Endocannabinoids Anandamid dar (Astarita et al. 2008; Okamoto et al. 2007).

In einem zweiten Schritt entsteht durch Abspaltung von Phosphorsäure mittels einer kalziumabhängigen, *NAPE-spezifischen Phospholipase D* (NAPE-PLD) aus NAPE Anandamid (AEA, N-Arachidonoylethanolamin). Obwohl dieser katalytische Schritt schon seit mehr als zwanzig Jahren bekannt ist, erfolgte die molekulare Charakterisierung der NAPE-PLD erst in jüngster Zeit. Die NAPE-PLD wird der Gruppe der Metallo- β -Lactam-Hydrolasen zugerechnet (Okamoto et al. 2004).

Die Biosynthese von Anandamid kann auch in Nebenwegen stattfinden. Es sind zwei Nebenwege beschrieben, die zum einen durch eine α/β -Hydrolase 4 (Abh4), zum anderen durch die katalytische Aktivität der *Phospholipase C* (PLC) initialisiert werden. Bei beiden Wegen sind bis hin zur AEA-Synthese noch weitere katalytische Prozesse nachgeschaltet. Diese Wege sind durch eine zeitliche Aktivierungssequenz gekennzeichnet. Während der Abh4-Nebenweg bei entsprechender Stimulation nach ca. 1h zur Biosynthese von Anandamid beiträgt, erhöht der PLC-Weg innerhalb von einer Minute die Biosynthese von Anandamid. Insgesamt trägt der oben beschriebene Hauptweg über NAC und NAPE-PLD zu 75% und die Nebenwege zu 25% des zellulären Anandamidhaushaltes bei (Ahn et al. 2008; Liu et al. 2008).

Für die Biosynthese der 2-AGs sind ebenfalls zwei Wege beschrieben. Der Hauptweg wird durch die PLC eingeleitet. Die PLC hydrolysiert Phosphatidylinositol zu dem Intermediärprodukt *1,2-Diacylglycerol* (DAGL), welches durch eine spezifische Diacylglycerollipase zu 2-Arachidonoylglycerol gespalten wird. (Bisogno et al. 2003; Piomelli 2003; Sugiura 2009).

Die *Phospholipase A1* (PLA1) und die Lyso-Phospholipase C sind am Alternativweg der 2-AG-Biosynthese beteiligt. Im initialen Schritt spaltet die PLA1 aus Phosphatidylinositol 2-Arachidonoyl-lysophospholipid, welches durch Lyso-Phospholipase C zu 2-AG hydrolysiert wird (Piomelli 2003; Sugiura 2009).

1.5.3 Der Abbau von Anandamid und 2-Arachidonoylglycerol

Beide Endocannabinoide werden sowohl durch einen hydrolytischen als auch durch einen oxidativen Abbau metabolisiert. Der hydrolytische Abbau ist bei AEA und 2-AG von entscheidender Bedeutung (Alexander and Kendall 2007).

An der Hydrolyse von Anandamid ist eine membrangebundene Serin-Hydrolase, die *Fettsäureamidhydrolase* (FAAH), beteiligt. FAAH hydrolysiert AEA zu Arachidonsäure und Ethanolamin. Obwohl schon 1985 festgestellt wurde, dass ein Membran-assoziiertes Enzym in Hepatozyten der Ratte gesättigte und einfach ungesättigte N-Acyl-Ethanolamine hydrolysiert, gelang die erste Aktivitätsbestimmung von FAAH im Jahre 1993 in Neuroblastomzellen. Im Jahre 1996 erfolgte die genaue Charakterisierung, das Klonen und Benennung des Enzyms (Ahn et al. 2008; Cravatt et al. 1996).

Die Fettsäureamidhydrolase besteht aus 579 Aminosäuren, mit einem Molekulargewicht von 63 kD. Eine bis zu 80% identische Aminosäuresequenz besteht zwischen Ratte, Maus, Mensch und Schwein.

In folgenden Genabschnitten zeigen Mensch, Maus und Schwein eine vollkommene Übereinstimmung: im NH₂-Terminus der transmembranen Domäne, in der Amidasesignatur-Domäne und in der der Polyprolinsequenz. Die Amidasesignatur-Domäne ist eine konservierte Genregion, die alle Enzyme der großen Amidasefamilie gemeinsam haben. Da diese Sequenz ausschließlich bei Bakterien und Pilzen vorkommt, ist FAAH das erste bei Säugern vorkommende Enzym der Amidasefamilie (Cravatt et al. 1996; Ueda 2002).

Zur Verankerung an Membranen besitzt die Fettsäureamidhydrolase eine Helix-Turn-Helix-Struktur bestehend aus den Aminosäuren 410-438 (α 18 und α 19), mit der sie sich in Zellmembranen integriert. In der Ultrastruktur weist das Enzym Zugangskanäle auf, die Wege der Substratzufuhr und des Produktabtransportes darstellen. So gelangen in direkter Nachbarschaft zu der Membran-Verankerungsstelle polare Stoffe, wie z.B. AEA zum katalytischen Kern des FAAH-Proteins. Nach Abbau werden durch weitere Kanäle hydrophobe Metabolite, wie Arachidonsäure, zur Membranseite und die hydrophilen Komponenten, wie Ethanolamin ins Zytosol abgegeben (McKinney and Cravatt 2005).

Die *Monoacylglycerollipase* (MAGL) ist im Wesentlichen für den hydrolytischen Abbau von 2-AG verantwortlich. MAGL wurde 1975 aus Adipozyten der Ratte isoliert. Etwa zwanzig Jahre später wurde MAGL geklont, und die genaue Aminosäuresequenz ermittelt. MAGL besteht aus 302 Aminosäuren (beim Menschen 303 Aminosäuren) und hat ein Molekulargewicht von 33 kDA. Die Aminosäuresequenzen bei Mensch und Nagetier sind zu 84%, bei Maus und Ratte zu 92% identisch. Das pH-Optimum zur effizienten katalytischen Aktivität liegt bei pH 8,0. Das Endocannabinoid 2-AG kann auch von FAAH, jedoch mit einer geringeren Affinität, abgebaut werden (Saario and Laitinen 2007).

Die Cyclooxygenasen sind am oxidativen Abbau von AEA und 2-AG beteiligt. Entweder greifen die *Cyclooxygenasen 1 und 2* (COX-1 und COX-2) beim Abbauprodukt der katabolischen Enzyme MAGL und FAAH, der Arachidonsäure, oder direkt an den Endocannabinoiden an (Fowler 2007).

Durch die Interaktion von COX-1 und COX-2 wird Arachidonsäure in das Eicosanoidsystem eingeschleust und dort zu Prostaglandinen, Prostacyclinen oder Thromboxanen abgebaut. Das Schrittmacherenzym dieser Kaskade ist der erste Schritt ihrer Biosynthese, die von der Aktivität von der *Prostaglandin-H2-Synthase* (PGH2-Synthase) abhängt (O'Donnell et al. 2009).

Die Cyclooxygenase-2 weist eine besondere katabolische Präferenz für AEA auf. COX-1 ist für den Abbau von AEA weniger effizient. Vermutlich ist der fehlende Argininrest des aktiven Zentrums der Cyclooxygenase-1 für diese geringe Affinität verantwortlich. Der direkte Abbau von AEA lässt eine Reihe unterschiedlicher Prostaglandin-Ethanolamide entstehen. Diese werden zur Stoffklasse der Prostaglandin-Ethanolamide subsumiert. Beim

oxidativem Abbau vom Anandamid durch COX-2 entstehen folgende Prostaglandine: Initial entsteht das Intermediär-Prostaglandin PGH₂, welches durch Angriff anderer Prostaglandin-Synthasen zu Prostaglandinen-D₂, -E₂, -F_{2α}, sowie -I₂ abgebaut werden. Da es bei FAAH Knock-Out Mäusen zu einem Anstieg der Prostaglandine-F_{2α}, -E₂, sowie -D₂ kommt, scheint COX-2 kompensatorisch FAAH zu ersetzen (Fowler 2007; Woodward et al. 2008b).

2-AG wird durch COX-2 ebenfalls zu diversen Prostaglandin-Glycerolestern umgebaut. Initial wird Prostaglandin-H₂-Glycerolester synthetisiert. Aus diesem Intermediärprodukt werden durch die katalytische Aktivität von unterschiedlichen Prostaglandin-Synthasen diverse Derivate des Prostaglandin-Glycerolesters gebildet (Woodward et al. 2008a; Woodward et al. 2008b).

1.5.4 Signaltransduktionsmechanismen der CB-1- und CB-2- Rezeptoren

Beide Cannabinoidrezeptoren sind Serpentinrezeptoren, die mit einem heterotrimeren G-Protein gekoppelt sind (G-Protein gekoppelte Rezeptoren). Diese werden unter der Familie der Rhodopsinrezeptoren subklassifiziert. Nach Bindung der Liganden AEA oder 2-AG an den extrazellulären Schleifen der CB-Rezeptoren, wird mittels des zytosolischen C-Terminus der intrazellulären Rezeptorschleife eine Konformationsänderung der heterotrimeren G-Proteine ausgelöst (Mukhopadhyay et al. 2002; Nie and Lewis 2001).

Die Konformationsänderung der heterotrimeren G-Proteine geht mit einer Modulation von Second-Messenger- und Third-Messenger-Systemen einher. Die meisten Cannabinoidrezeptoren reagieren sensibel auf Pertussistoxin und sind damit an die inhibitorischen G_{i/o}-Proteine gekoppelt (Demuth and Molleman 2006).

Second-Messenger:

Die Liganden induzierte Konformationsänderung der G-Proteine, löst einen Austausch von GDP gegen GTP aus. In der Folge dissoziiert das G-Protein in seine monomere α-Untereinheit G_{i/o} und sein β/γ-Dimer. Die G_{i/o}-Untereinheit hemmt die Adenylat-Cyclase und damit die nachfolgende Phosphorylierung der Proteinkinase A. Damit wird

die weitere Phosphorylierung durch die Proteinkinase A an Serin–Threoninresten anderer intrazellulärer Effektoren aufgehoben. Die Kopplung an inhibitorische $G_{i/o}$ -Proteine und die Hemmung der Adenylat-Cyclase sind Eigenschaften der Signaltransduktion, die sowohl CB-1 als auch CB-2 aufweisen (Deadwyler et al. 1995; Garcia et al. 1998).

Während Endocannabinoide in den meisten Fällen einen negativ-modulierenden Einfluss auf die Aktivität der Adenylat-Cyclase, PKA und Ionenkanäle haben, stimulieren sie jedoch den MAP-Kinase-Signalweg. Der MAP-Kinase-Weg reguliert eine Reihe von zellulären Funktionen, wie Zellproliferation, Zelldifferenzierung und Apoptose. Normalerweise erfolgt die Aktivierung des MAP-Kinase-Weges über membranständige Rezeptor-Tyrosin-Kinasen, die zur Induktion einer Kaskade von hintereinander geschalteten Proteinkinasen führt. Am unteren Ende der Enzymkaskade steht eine MAP-Kinase, die cytoplasmatische oder nukleäre Proteine durch Phosphorylierung aktiviert. Die Aktivierung beider Cannabinoidrezeptoren stimuliert diverse Kinasen des MAP-Kinase-Signalweges, wie z.B. ERK, JNK, p38-MAP-Kinase, p42/p44-MAP-Kinase, sowie die MAP-Kinase, und beeinflusst damit die Genexpression. Obwohl der genaue Signaltransduktionsweg nicht genau untersucht ist, wird davon ausgegangen, dass die Aktivierung der MAP-Kinase über den Phosphatidyl-Inositol-3-Kinase (PI3K)-Signalweg läuft (Demuth and Molleman 2006).

Ein anderer intrazellulärer Effektor des CB-1-Rezeptors ist das für die Zellphysiologie essentielle Kalzium. Durch die Aktivierung der Proteinkinase C, die an einer intrazellulären Schleife des CB-1-Rezeptor gebunden ist, kommt es zu einer direkten Inaktivierung der Kalziumkanäle vom N- oder P/Q-Typ und Aktivierung von Einwärtsgerichteten-Kaliumkanälen. Auch eine direkte Bindung von AEA und 2-AG an Ionenkanäle ist beschrieben worden (Evans et al. 2008; Garcia et al. 1998; Mato et al. 2009).

Für den CB-1-Rezeptor sind auch alternativ zur Hemmung der Adenylat-Cyclase stimulierende Effekte auf die Adenylat-Cyclase beschrieben worden, die eine Akkumulation des zyklischen Adenosinmonophosphats auslösen. Bei dieser Signaltransduktion sind die G_s - oder $G_{q/11}$ -stimulierenden G-Proteine beteiligt, die je

nach vorherrschender Isoform der Adenylat-Cyclase zu einem Anstieg von intrazellulärem c-AMP führen. Die Aktivierung der CB-1 Rezeptoren hat auf die Adenylat-Cyclase Isoformen 1,3,5,6 und 8 einen stimulierenden und auf die Isoformen 2,4,7 einen inhibitorischen Effekt (Busch et al. 2004; Felder and Glass 1998; Glass and Felder 1997; Maneuf et al. 1997).

Third-Messenger:

Die Aktivierung der MAP-Kinase ist mit der Expression von sog. *immediate-early-genes*, wie c-fos und c-jun, sowie mit der Expression von anderen Transkriptionsfaktoren wie Brain-derived-neurotrophic factor (BDNF) und krox-24 (zif268) verbunden. Die Transkriptionsfaktoren BDNF and krox-24 sind in besonderem Maße an der Regulierung der synaptischen Plastizität beteiligt (Berghuis et al. 2005; Bouaboula et al. 1995a; Bouaboula et al. 1995b; Derkinderen et al. 2003).

1.6 Endocannabinoide im neuroendokrinen und autonomen Nervensystem

Forschungen weisen darauf hin, dass lipiderge Signalmoleküle schon frühzeitig in der Entwicklungsgeschichte von Lebewesen an der interzellulären Kommunikation in autokriner und parakriner Weise beteiligt gewesen sind. Bereits bei Nesseltieren (z.B. *Hydra viridis* oder *Hydra vulgaris*) sind neben peptidergen auch lipiderge Signaltransmissionen zur Aufrechterhaltung der Homöostase vorhanden. Studien belegen, dass Endocannabinoide wie Anandamid und 2-AG auch bei Nesseltieren vorkommen (De Petrocellis et al. 1999; Kass-Simon and Pierobon 2007; Lovejoy 2005; McPartland et al. 2006).

Neurone und endokrine Zellen zeigen auf zellphysiologischer Ebene sehr viele Gemeinsamkeiten. Diese vergleichbaren Vorgänge beruhen höchstwahrscheinlich auf der phylogenetischen Abstammung der Neurone von endokrinen Zellen (Lovejoy 2005).

Eine besonders prominente Übereinstimmung besteht in der Regulation ihrer Ausgangsleistung, denn sowohl bei endokrinen Zellen als auch bei Neuronen ist die Signaltransmission durch den Prozess der kalziumabhängigen Exozytose bestimmt. Es werden Inhalte der Vesikel, die Neuropeptide oder Hormone enthalten, durch einen

intrazellulären Kalziumanstieg sezerniert (Tischler 2002; Travis and Wightman 1998; Unsicker 1996).

Neurone und endokrine Zellen exprimieren auch eine Reihe unterschiedlicher G-Protein gekoppelter Rezeptoren, deren Signaltransduktion entweder hemmend oder stimulierend auf die Exozytose wirken (Jiang and Bajpayee 2009; Sara 2009; Travis and Wightman 1998; Winzell and Ahren 2007). So exprimieren die β -Zellen des Pancreas G-Protein gekoppelte Glukagon- und Somatostatinrezeptoren und Glukagon führt zu einer Stimulation und Somatostatin zu einer Hemmung der Insulinsekretion (Winzell and Ahren 2007).

Zahlreiche Studien belegen auch, dass Cannabinoidrezeptoren sowohl in neuronalen als auch in endokrinen Zellen vorkommen (Pagotto et al. 2006; Piomelli 2003). Aus funktioneller Sicht hemmt diese lipiderge Signaltransduktion die Exozytose. Das bedeutet, dass G-Protein gekoppelte Cannabinoidrezeptoren in der Zellphysiologie von endokrinen und neuronalen Zellen einen neuen Aspekt darstellen. Sie erweitern das Repertoire der G-Protein gekoppelten Rezeptoren dieser Zellen und ermöglichen durch ihren einzigartigen Modus operandi eine Feinadjustierung des Sekretionsprozesses. Dabei wird die Biosynthese von Endocannabinoiden durch einen Anstieg des intrazellulären Kalziums aktiviert. Die Endocannabinoide wirken daraufhin in auto- oder parakriner Weise hemmend auf die Sekretionsvorgänge der endokrinen oder neuronalen Zellen (Di Marzo et al. 1994; Giuffrida et al. 1999; Juan-Pico et al. 2006; Nakata and Yada 2008; Piomelli 2003). Forschungen an β -Zellen des Pankreas zeigen, dass u.a. das Endocannabinoid AEA die Sekretion von Insulin in einem kalziumabhängigen Prozess hemmt (Juan-Pico et al. 2006; Nakata and Yada 2008). Solche CB1-vermittelte Signaltransduktion ist für Sekretionsprozesse weiterer endokriner Zellen, z.B. an lactotrophen und gonadotrophen Zellen der Adenohypophyse, beschrieben worden (Pagotto et al. 2006).

Darüber hinaus kommunizieren Neurone und endokrine Zellen in bidirektionaler Richtung auf humoralem und neuralem Weg. An der neuralen Interaktion ist das autonome Nervensystem beteiligt. Bei verschiedenen Säugetieren, wie Menschen und Nagetieren, modulieren CB-vermittelte, lipiderge Signaltransduktionsprozesse die postganglionär-sympathische Freisetzung des Noradrenalins (Ralevic 2003).

Bemerkenswerterweise zeigte die sympathische Innervation des Pinealorgans eine positive Immunreaktion für NAPE-PLD, FAAH, und CB-1. Auch die Pinealozyten weisen eine positive Immunfärbung für die genannten Komponenten des Endocannabinoidsystems auf. Sowohl in den Pinealozyten als auch in den sympathischen Fasern konnte eine photoperiodische Variation von NAPE-PLD, FAAH und CB-1 festgestellt werden (Koch et al. 2008).

Ein vergleichbares Beispiel ist die sympathische Innervation des weißen Fettgewebes. Dabei erlaubt das photoneuroendokrine System eine an die Photoperiode angepasste, sympathische Innervation der Adipozyten und ermöglicht somit eine Antizipation des Energiehaushaltes (Bartness and Bamshad 1998; Bartness et al. 2001; Bowers et al. 2005; Song and Bartness 2001). Die sympathische Innervation hemmt das in Adipozyten synthetisierte Leptin. Leptin ist ein endokrines, zirkadianes Signal der Adipozyten, welches vom Sekretionsprofil mit dem Neurohormon Melatonin vergleichbar ist (Kalsbeek et al. 2001; Rayner and Trayhurn 2001; Trayhurn 2003). Über sogenannte *Long-Leptin-Rezeptoren* (LepRb), die im Hypothalamus weit verbreitet sind, findet durch das Hormon Leptin eine Rückmeldung an das zentrale Nervensystem über den Energiehaushalt statt. Überraschenderweise sind an diesem Prozess lipiderge Signaltransduktionsprozesse in der efferenten Ausgangsleistung des PNS, d.h. in den sympathischen Fasern, in den Zielzellen (Adipozyten), sowie in zentralen Steuerzentren im Hypothalamus beteiligt. Denn Endocannabinoide, wie AEA, werden in postganglionär-sympathischen Fasern gebildet und hemmen CB-1-vermittelt die Noradrenalinsekretion. Ferner zeigen immunhistochemische Untersuchungen, dass NAPE-PLD, FAAH, DAGL und MAGL in Adipozyten vorkommen (Ishac et al. 1996; Koch et al. 2008; Myers et al. 2009).

Das von Adipozyten sezernierte Leptin gelangt über gefensterte Kapillaren der Eminentia mediana zu den Neuronen des Ncl. arcuatus. Dabei versetzt Leptin den Körper in eine katabole Stoffwechsellage, die mit einer Reduktion von Energiereserven und Nahrungsaufnahme einhergeht. Die katabole Stoffwechsellage wird dadurch erreicht, dass Leptin die Biosynthese der anabolen *Neuropeptide Y* (NPY) und des *Agouti-Related-Peptid* (AGRP) verhindert, die in Neuronen des ventromedialen Ncl. arcuatus synthetisiert werden. Aus dem ventromedialen N. arcuatus ziehen efferente Fasern zum SCN und zum lateralen hypothalamischen Areal und liefern über AGRP

und NPY Informationen über den Energiehaushalt. Über die Hemmung von AGRP und NPY, bewirkt Leptin eine verminderte Aktivität von *Melanin-Concentrating-Hormone* (MCH) und Orexin(Orx)-synthetisierenden Neuronen im lateralen hypothalamischen Areal. Dadurch wird der Stoffwechsel in eine katabole Lage versetzt (Myers et al. 2009; Yi et al. 2006).

Es ist jedoch bemerkenswert, dass eine intravenöse Injektion von Leptin mit einer Abnahme von AEA und 2-AG im Hypothalamus einher geht. Dieser Effekt von Leptin ist über den LepRb vermittelt, da Nagetiere mit defekten Leptinrezeptoren nicht mit einer Abnahme von Endocannabinoiden reagieren. Leptin reduziert hier die anabolen Effekte der Endocannabinoide, die sich in Nahrungsaufnahme und Aufbau von Energiereserven der Lebewesen äußern. Das bedeutet, dass Leptin nicht nur NPY und AGRP, sondern auch lipiderge Signaltransduktionsmechanismen (AEA, 2-AG) hemmt (Di Marzo et al. 2001; Kunos et al. 2008).

Die Leptin-induzierte Hemmung der lipidergen Signaltransduktion wird über das laterale hypothalamische Areal eingeleitet. Leptin steigert dort die afferent-GABAergen Innervation der Neurone. Dabei verhindert Leptin die Depolarisation der MCH-Neurone und unterbindet somit die Endocannabinoidbiosynthese. Aufgrund dieses Mechanismus kommt es zu keinem Anstieg von Endocannabinoiden im synaptischen Spalt und die GABAerge Innervation der MCH-Neurone überwiegt. Daraus resultiert eine Unterbrechung der MCH-Synthese und somit wird eine Umstellung auf eine anabole Stoffwechsellage verhindert. Denn diese Neurone sezernieren das anabol wirkende *Melanin-Concentrating-Hormone* (MCH) und durch eine Depolarisation würden die MCH-Neurone zur MCH-Synthese angeregt. Gleichzeitig würde auch eine Endocannabinoidbiosynthese stattfinden und diese würden dann im synaptischen Spalt freigesetzt zur retrograden Hemmung der GABA-ergen Signaltransmission führen (Jo et al. 2005).

Das Stoffwechsellhormon Leptin aktiviert in der Rückkopplung insbesondere das sympathische Nervensystem, und induziert über die noradrenrgere Innervation die Lipolyse im weißen Fettgewebe. Eine Stimulation der CB-1-vermittelten Signaltransduktion hebt wirkungsvoll die sympathische Innervation und damit den lipolytischen Effekt des Leptins auf (Buettner et al. 2008). Somit üben Leptin und Endocannabinoide einen gegensätzlichen Effekt auf die sympathische Innervation aus.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass lipiderge Signaltransduktionsmechanismen bei endokrinen und autonomen Prozessen auf zellphysiologischer Ebene eine wichtige Rolle spielen. Dabei koordiniert das photoneuroendokrine System als übergeordnetes System diese autonomen und endokrinen Vorgänge. Hinzu kommt, dass lipiderge Signalvermittlungen auch in zentralen Elementen des photoneuroendokrinen Systems, wie im Pinealorgan und SCN vorkommen und auch hier ihre funktionelle Bedeutung haben (Buettner et al. 2008; Koch et al. 2008).

1.7 Zielsetzung der Dissertation

Das Ziel dieser Arbeit bestand darin, die Komponenten des EC-Systems in Effektoren des photoneuroendokrinen Systems der Nagetiere nachzuweisen. Gleichzeitig wurde mittels immunohistochemischer Verfahren eine Variation der Immunreaktion von NAPE-PLD, FAAH, COX-1, COX-2 und CB-1 Rezeptoren bei unterschiedlichen Photoperioden und unterschiedlichen Nagetieren untersucht. Für diese vergleichende Betrachtung dienten Ratte, Maus und Hamster als Versuchstiere.

Zur Analyse der immunhistochemischen Ergebnisse wurden konventionelle Lichtmikroskopie und Konfokallasermikroskopie eingesetzt.

Folgende Fragestellungen wurden bearbeitet:

- 1.) Kommen auf- und abbauende Enzyme zur AEA-Synthese in der Pars tuberalis der Ratte vor? Exprimieren Zellen der Pars tuberalis CB-1 Rezeptoren?
Zeigen diese Enzyme und der CB-1 Rezeptor eine photoperiodische Variation?
- 2.) Sind NAPE-PLD, Abh4 und FAAH in der Pars distalis der Ratte mit Prolaktin kolokalisiert?
- 3.) Welche Teile der HPA-Achse besitzen Komponenten des Endocannabinoidsystems? Die Untersuchungen sollen an Eminentia mediana, kortikotrophen Zellen der Pars distalis der Ratte, sowie Nebennieren aller Nager erfolgen.
- 4.) Weisen postganglionäre sympathische Fasern der Nebenniere bei Hamster, Ratte und Maus Komponenten des Endocannabinoidsystem auf? Beinhaltet das Nebennierenmark der Nagetiere Komponenten des EC-Systems?
- 5.) Gibt es im Nebennierenmark des Hamsters bei unterschiedlichen Photoperioden Variationen in den Immunreaktionen von NAPE-PLD und FAAH?

2 Material-Methoden

2.1 Chemikalien, Reagenzien und Antikörper

Alle Feinchemikalien, Antikörpern und weitere Reagenzien sind tabellarisch aufgelistet (Tabelle 1-3). Entsprechend werden dort Hersteller, ggf. angewendete Konzentrationen angegeben.

2.2 Versuchstiere und Haltungsbedingungen

Alle Tierexperimente wurden gemäß der Richtlinien für Tierversuche nach der Maßgabe der Europäischen Gemeinschaft (Direktive/86/609/EEC) durchgeführt.

Als Versuchstiere wurden männliche Wistarratten, männliche C3H/J-Mäuse und männliche Goldhamster gewählt (Charles Liver, Sulzfeld). Alle Tiere wurden unter konstanter Temperatur (20°C) und definierten Beleuchtungsverhältnissen gehalten. Die Lichtphase (L) entsprach 230 μ W/cm², die Dunkelphase (D), Dunkellicht lag bei <5 μ W/cm². Futter und Wasser standen ad libitum zur Verfügung. Das Alter der Tiere lag zwischen 6 bis 8 Wochen. Die Ratten und Mäuse wurden unter Standard-Beleuchtungsverhältnissen, mit 12 h Licht und 12 h Dunkelheit (LD 12:12; Lichtphase: 10:00-22:00 Uhr) gehalten. Eine Gruppe der Hamster wurde unter verkürzter Photoperiode von 8 h Licht (LD 8:16, Lichtphase 10:00-18:00 Uhr) und die andere Gruppe unter verlängerte Photoperiode von 16 h (LD 16:8, Lichtphase 10:00-2:00 Uhr) gehalten. In den nachfolgenden Kapiteln werden die Zeitpunkte zu denen die Tiere getötet wurden als Zeitgeber-Zeit (Zeitgeber time, ZT) angegeben. ZT 12 bezeichnet bei Tieren unter LD 12:12 den Beginn der Dunkelheit.

2.3 Gewebsentnahme

Zur Gewebsentnahme wurden Ratten und Mäuse entsprechend ihrer aktuellen Beleuchtungsverhältnisse unter hellem Weißlicht oder Dunkelrotlicht in tiefer Isofluran-Narkose dekapitiert. Die Gewebsentnahmen bei den Hamstern erfolgte jeweils zur Mitte der Lichtphase, d.h. bei LD 16:8, nach acht Stunden und bei LD 8:16 nach vier Stunden. Für immunhistochemische Untersuchungen wurden die Tiere transkardial

perfusionsfixiert. Dazu wurden die Tiere mit 0,5g Chloralhydrat/kg Körpergewicht i.p. sediert und anschließend transkardial mit 4% PFA/PBS perfundiert. Kurz vor der transkardialen Perfusion wurde mit Heparin (2000 I.U./Tier) antikoaguliert. Heparin wurde in den linken Ventrikel injiziert. Das Gewebe wurde nach der Entnahme in einer PBS-Saccharoselösung mit aufsteigenden Saccharose-Konzentrationen (10%, 20%, 30%) kryoprotectiert. Anschließend wurden die Gehirne, Hypophysen und Nebennieren am Kryostat-Mikrotom in der koronalen Ebene geschnitten (20 µm). Die Schnitte wurden auf Objektträger (Super Frost Plus; Fa. Menzel-Gläser, Braunschweig) aufgefangen und bei -30°C gelagert.

2.4 Antigen-Demaskierung

Da die Fixierung des Gewebes mit Paraformaldehyd (PFA) zur Maskierung bestimmter Antigenstrukturen, wie z.B. G-Protein gekoppelter Rezeptoren führen kann, wurde zum Nachweis von CB-1-Rezeptoren vor der immunhistochemischen Reaktion eine Antigen-Demaskierung, d.h. eine Freilegung der Antigenstrukturen durchgeführt. Hierzu wurden die Schnitte in 0,01 M Zitratpuffer für 15 min in der Mikrowelle bei 700 Watt erhitzt. Nachdem die Schnitte abgekühlt waren, wurden sie kurz in 70% Ethanol transferiert und dann gemäß Protokoll für die Immunhistochemie behandelt. Für Immunfluoreszenz-Untersuchungen wurden die Schnitte nach der Demaskierung kurz in PBS/Triton gewaschen.

Tabelle 1: Liste der verwendeten Primärantikörper.

<i>Primärantikörper- - Antikörper -Tierspezies</i>	<i>Verdünnung</i>	<i>Firma</i>
FAAH, Kaninchen, polyklonal	1 : 100	Cayman Chemical, USA
NAPE-PLD, Kaninchen, polyklonal	1 : 250	Cayman Chemical, USA
Cannabinoid Receptor 1, Kaninchen, polyklonal	1 : 200	ABR Affinity BioReagents, USA
Cannabinoid Receptor 1, Meerschweinchen, polyklonal	1 : 500	Frontier Science, Japan
DAG1 α , Kaninchen, polyklonal	1 : 50	Frontier Science, Japan
COX-1, Kaninchen, polyklonal	1 : 250	Cayman Chemical, USA
COX-2, Kaninchen, polyklonal	1 : 250	Cayman Chemical, USA
ACTH, Schaf, polyklonal	1 : 200	Acris, Deutschland
Prolaktin, Ziege polyklonal,	1 : 100	Santa Cruz Biotechnology, USA
CRF, Kaninchen, polyklonal	1 : 400	Abcam, UK
Tyrosinhydroxylase, Maus, monoklonal	1 : 2000	ABR Affinity BioReagents, USA
Laminin-2, Ratte monoklonal	1 : 300	Sigma-Aldrich, USA

Tabelle 2: Liste der verwendeten Sekundärantikörper.

<i>Sekundärantikörper</i>	<i>Verdünnung</i>	<i>Firma</i>
<i>Antikörper - Tierspezies</i>		
Anti-Kaninchen IgG, biotinkonjugiert, Ziege	1 : 100	Sigma, USA
Alexa 488, Anti- Meerschweinchen IgG, Ziege	1 : 200	Invitrogen, Deutschland
Alexa 488, Anti-Maus- IgG, Ziege	1 : 200	Invitrogen, Deutschland
Alexa 488, Anti-Maus- IgG, Esel	1 : 200	Invitrogen, Deutschland
Alexa 488, Anti-Schaf-IgG, Esel	1 : 200	Invitrogen, Deutschland
Alexa 488, Anti-Ziege-IgG, Esel	1 : 200	Invitrogen, Deutschland
Cy3, Anti-Kaninchen-IgG, Esel	1 : 500	Invitrogen, Deutschland
Cy3, Anti-Kaninchen, IgG, Ziege	1 : 500	Invitrogen, Deutschland
Alexa 568, Anti-Kaninchen IgG, Ziege	1 : 500	Invitrogen, Deutschland
Alexa 568, Anti-Maus-IgG, Ziege	1 : 500	Invitrogen, Deutschland
Alexa 647, Anti-Rat IgG, Ziege	1 : 250	Invitrogen, Deutschland
Anti-Kaninchen IgG, Meerrettich-Peroxidase- konjugiert	1 : 20000	New England Biolabs, UK

Tabelle 3. Liste der verwendeten Reagenzien, Feinchemikalien und anderer Hilfsmittel

<i>Produkt</i>	<i>Firma</i>
Acrylamide/Bis-acrylamide 30%	Sigma-Aldrich
Ammoniumacetat	AppliChem
Ammoniumpersulphat	AppliChem
Chemiluminescence Reagent	Perkin Elmer
Dako, Fluorescence Mounting Medium	Dako
Diaminobenzidin (3,3' -) X 4 HCL	Sigma-Aldrich
Dithiothreitol (DTT)	Sigma-Aldrich
Eserserum	Sigma-Aldrich
Ethanol absolut	Sigma-Aldrich
Extravidin, Peroxidase Conjugate	Sigma-Aldrich
Glycine	Sigma-Aldrich
Kaliumdihydrogenphosphat	AppliChem
Methanol	Sigma-Aldrich
<i>N,N,N',N'</i> -Tetramethylethylenediamine, (TEMED)	Sigma-Aldrich
NaCl	Riedel-de Haen
Natriumhypochloritlösung	Roth
Natriumphosphat dibasisch	Ridel-de Haen
Paraformaldehyd	Merck
Phosphatase Inhibitor Cocktail Set II	Calbiochem
Protease-Inhibitor Complete Mini	Roche
Rinderalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich
Saccharose	AppliChem
Sodium Dodecyl Sulfate (SDS)	Biomol International
Tissue-Tek OCT-Einbettmittel	Sakura
Tris	Roth
Triton 100, Tween 20	AppliChem
Xylol	Sigma-Aldrich
Ziegenserum	Sigma-Aldrich

2.5 Immunhistochemie

2.5.1 ABC-Methode- Indirekte Antigendetektion

Die endogene Peroxidase wurde nach Lufttrocknung der Schnitte mit 1% H₂O₂ in Methanol für 10 min. blockiert. Nach kurzer Spülung in 70%-igem Ethanol für 2-3 min. erfolgte eine dreimalige Spülung der Schnitte mit Phosphat-gepuffertes Kochsalzlösung (0,02M, PBS-Puffer), der 0,3 % Triton zugesetzt war. Der PBS-Puffer (0,02M) setzte sich aus 9g NaCl/l, 2,72g Na₂HPO₄ /l und 0,54 g KH₂PO₄/l zusammen. Der pH-Wert wurde auf 7,4 eingestellt. Zur Blockierung der unspezifischen Hintergrundfärbung wurden die Schnitte für 30 min. mit dem natürlichen Non-Immuserum (1:20 in PBS 0,02M /Triton 0,3% plus 1% Rinderalbumin) der Spezies, aus der der Zweitantikörper stammt, inkubiert.

Der spezifische Primärantikörper wurde wie in Tabelle 1 angegeben in PBS/Triton/BSA verdünnt und auf die Schnitte gegeben. Die Schnitte wurden über Nacht in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur mit dem Primärantikörper inkubiert. Am nächsten Tag erfolgte ein dreimaliger Waschgang (3 X 10min) in PBS/Triton. Danach wurden die Schnitte mit einem Biotin-konjugierten Sekundärantikörper in entsprechender Verdünnung eine Stunde bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer inkubiert, erneut mit PBS/Triton gespült (3 X 10 min.) und mit Meerrettich-Peroxidase-gekoppelten Extravidin für eine Stunde in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur behandelt. Aufgrund der hohen Affinität des Avidin zu Biotin kommt es während dieser Phasen zu einer Bindung des Enzymkomplexes mit dem Sekundärantikörper. Ungebundene Extravidin-Enzymkomplexe werden danach in einem zweimaligen Waschgang in Phosphatpuffer (0,1M) entfernt. Die Schnitte werden dann in Tris Puffer (0,05M) für 10 min. gespült. Die Farbreaktion erfolgte durch Auflösen von 0,1 g Diaminobenzidin (DAB) in 200 ml Tris-Puffer. Nach dreimaligem Spülen wurden die Schnitte dann in der aufsteigenden Alkoholreihe dehydriert und anschließend mit Entellan eingedeckelt.

2.5.2 Immunfluoreszenz- Indirekte Antigendetektion

Die Schnitte wurden luftgetrocknet und kurz in PBS gespült und zur Blockierung der unspezifischen Bindung mit dem Non-Immuneserum der Tierspezies inkubiert, aus der der Sekundärantikörper gewonnen wurde. Anschließend wurden sie mit dem Primärantikörper in entsprechender Verdünnung in der Feuchtkammer über Nacht inkubiert (Tabelle 1). Für Doppelt- oder Dreifachmarkierung wurden sie simultan mit mehreren Primärantikörpern in PBS 0,02M/Triton/1% BSA in einer feuchten Kammer über Nacht inkubiert.

Am nächsten Tag wurden sie mit PBS/Triton gespült (3 X 10 min.) und mit dem Sekundärantikörper für 1h inkubiert. Danach wurden ungebundene Sekundärantikörper durch Spülen in PBS/Triton-Pufferbad entfernt. Die Schnitte wurden für 5 min. in Aqua dest. überführt und mit Fluoreszenz-Eindeckmedium (DAKO) ein gedeckelt. Die Lagerung der Schnitte erfolgte im Kühlschrank.

2.6 Mikroskopie

2.6.1 Lichtmikroskopie

Zur homogenen Ausleuchtung der Bilder wurde das Lichtmikroskop (Axiolab, ZEISS) geköhleret. Initial wurden Leuchtfeldblende und Aperturblende voll aufgedreht. Danach wurde die Leuchtfeldblende verkleinert und mit dem Kondensortrieb vorsichtig auf und ab bewegt, bis ein scharfes Bild der Leuchtfeldblende oder ein Stück davon am Rande zu sehen war, das mit der Zentrierschrauben am Kondensator zentriert wurde. Die Bilder wurden mit Axio-Vision (Zeiss) aufgenommen und digitalisiert.

2.6.2 Densitometrie

Die lichtmikroskopischen, digitalisierten Bilder wurden mit dem Bildanalysesystem Image J (NIH) ausgewertet. Die Intensität der spezifischen Signale der Immunfärbung in der PT der Ratte, sowie im Nebennierenmark des Hamsters wurde in Graustufen ermittelt. Die Graustufenskala wird eingeteilt in 0 bis 255, wobei 0 für schwarz und 255 für hell steht. Pro Versuchsgruppe wurden mindestens drei Tieren mit jeweils 3 Gewebsschnitten zufällig ausgewählt und entsprechend der Intensität quantifiziert. Da

bei der Signalintensität auch unspezifische Hintergrundsignale erfasst werden, wurde das Hintergrundsignal heraus berechnet.

2.6.3 Konfokalmikroskopie

Konfokale Laser Scanning Mikroskopie (LSM) zeichnet sich durch ein hohes räumliches und zeitliches Auflösungsvermögen aus. Insbesondere die axiale Auflösung ist gegenüber dem Lichtmikroskop deutlich verbessert. Diese Eigenschaft macht es möglich, optische Schnitte von der Probe aufzuzeichnen und damit dreidimensionale Objekte am Computer rekonstruieren. Für die Aufnahme der Bilder wurde das LSM 500 (Zeiss) mit Argon- und Helium/Neon-Laser verwendet.

Als Lichtquelle dient ein Lasermodul und die Signale werden in einem Scankopf, der am Mikroskopstativ montiert ist, aufgenommen. Die Signalverarbeitung übernimmt eine Elektronik-Box, während das System über einen PC gesteuert wird. Zur Entstehung eines konfokalen LSM-Bildes soll zunächst die Fluoreszenzmarkierung in einem definierten Bereich der Probe angeregt werden. Dazu wird monochromatisches Licht aus dem Lasermodul über eine Lichtleitfaser in den Scankopf eingekoppelt. Hier wird der Strahl mittels eines Kollimators parallelisiert und durch den Hauptfarbteiler in den Strahlengang des Mikroskops eingespiegelt. Das Objektiv fokussiert den Anregungsstrahl auf einen kleinen Bereich der Probe.

Die räumliche Ausdehnung dieses Anregungs-Volumens steht in direkten Zusammenhang mit dem Auflösungsvermögen des Systems. Je größer die numerische Apertur des Objektivs, desto kleiner ist das fokale Volumen und höher die Auflösung. Während die Position in lateraler Richtung (X,Y-Richtung) über die beiden Scanspiegel geregelt werden kann, wird über den Fokustrieb des Mikroskops in vertikaler Richtung verschoben.

Die aktuelle Z-Position markiert die Fokusebene des Systems. Beleuchtet nun das Laserlicht eine bestimmte Stelle der Probe, dann fokussiert das Objektiv das Anregungslicht in die Fokusebene des Objektivs.

Zur Erzeugung scharfer Bilder befindet sich eine spezielle Lochblende, das sog. Pinhole, im Strahlengang. Fluoreszenzlicht aus der Fokusebene, welches das Pinhole

passiert, wird anschließend mit einem Photomultiplier (PMT) detektiert. Dabei misst der Detektor die Fluoreszenzintensität als eine Funktion der Zeit, und somit entsteht sequentiell, Pixel für Pixel, ein LSM-Bild. Das eigentliche Bild entsteht erst durch die Zuordnung der vom Detektor gemessenen Intensität zu dem Ort der Probe.

2.6.3.1 Der Strahlengang und Bildaufnahme bei der LSM

Zum Detektieren der Fluoreszenzfarbstoffe wurden folgende Strahlengänge zur Analyse der **doppelmarkierten Schnitte** gewählt:

Anregungsspektrum 488 nm: Zur Trennung der Anregung und Emission wurde als Haupt-Farb-Teiler (HFT) 488 nm gewählt. Dabei wurde das Laserlicht mit dem Anregungsspektrum 488 nm auf die Probe fokussiert. Das emittierte Fluoreszenzlicht passiert diesen Haupt-Farb-Teiler. Hiernach erfolgte die Einengung des emittieren Lichtes mit dem Band-Pass Emissionsfilter, welches ein spektrales Spektrum von 505-550 nm zur Detektion passieren lässt.

Anregungsspektrum 546nm, 568 nm, Cy3: Zur Fokussierung der Anregung wurde hier als HFT 543nm gewählt. Zur Auftrennung des emittierenden Lichtes wurde hier zusätzlich ein Neben-Farb-Teiler für 545 nm eingestellt. Hierdurch werden Emissionen, mit einer Wellenlänge von mehr als 545 nm durchgelassen und zur genauen Einengung des spektralen Bereichs zum Emissionsfilter weitergeleitet. Als Emissionsfilter wurde Long-Pass 585 nm eingestellt, welches Emissionen über 585 nm zur Detektion passieren lässt.

Der Strahlengang zum Nachweis der **Dreifachfluoreszenz** wurde folgendermaßen arrangiert:

Anregungsspektrum 488:

HFT 488 nm und NFT 545 nm, BP 505-550 nm als Emissionsfilter.

Anregungsspektrum 546, 568:

HFT 543 nm, NFT 545 nm, LP-Emissionsfilter 585 nm.

Anregungsspektrum 647 nm:

HFT 603 nm, LP-Emissionsfilter 650 nm.

Alle Bilder wurden in Multi-Track-Modus, d.h., jedes der unterschiedlichen Emissionsspektren wurde einzeln in sequentieller Bildfolge aufgenommen. Dabei wurden entsprechend der oben beschriebenen Strahlengänge die unterschiedlichen Tracks eingestellt. Zur Erstellung der dreidimensionalen Bilder wurde die obere und untere Stapelgrenze in *Z Setting Menü* bestimmt und gleichzeitig das optimale Z-Intervall eingestellt. Anschließend erfolgten die Aufnahme des Z-Stapels und Auswertung der Bilder.

Vor der Kollokalisations-Analyse wurde der optimale Pinhole-Durchmesser für alle Kanäle eingestellt. Die Bilder wurden anschließend mit der LSM-Software oder mit der frei-erhältlichen WCIF-Image (www.uhnresearch.ca/facilities/wcif/fdownload.html) ausgewertet. Zur quantitativen Ermittlung der Kollokalisierung wurde der Manders-Quotient herangezogen (Manders et al. 1993). Zur Ermittlung der Überlappungskoeffizienten der einzelnen Kanäle wurde eine modifizierte Einzelkanalanalyse nach Manders durchgeführt.

2.7 Proteinauftrennung und Proteindetektion

2.7.1 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Die denaturierten Proteine der Gewebshomogenate bilden zusammen mit dem SDS negativ geladene Komplexe. Durch Anlegen eines elektrischen Feldes werden diese Proteine aufgetrennt. Dabei verhalten sich Proteingröße und Laufgeschwindigkeit umgekehrt proportional.

Die Acrylamidkonzentration im Gel ist entscheidend für die Auftrennung der Proteine. So sind Acrylamid-Konzentrationen von 5-8 % für die Auftrennungen von Proteinen mit einem Molekulargewicht zwischen 25-250 Kilodalton (kD), und von 15 % für Proteine mit dem Molekulargewicht zwischen 6-60 kD notwendig.

Das Gewebe wurde in 0,01M Ammoniumacetat-Puffer pH 6,8 mit Protein- und Phosphatasen-Inhibitoren aufgefangen und mittels Ultraschall (Sonoplus, HD 70, Bandelin, Berlin) homogenisiert. Anschließend wurde die Proteinkonzentration nach Bradford bestimmt.

Die Proteine wurden dann mit dem „Loading“-Puffer, bestehend aus 1M Tris-HCL, pH 6,8, Glycerol, SDS, Bromphenolblau und 1M DTT (Dithiothreitol) für 5 min. erhitzt und auf ein Polyacrylamidgel aufgetragen. Entsprechend der erwarteten Proteingrößen wurden die Acrylamidkonzentrationen angepasst. Dementsprechend wurden aus Aqua dest, Acrylamid, 1,5 M Tris (pH 8,8), 10% SDS, 10% APS und TEMED die Gele mit verschiedenen Acrylamidkonzentrationen gegossen. Nach der Polymerisierung der Gele wurde das Auffanggel gegossen.

Die Auftrennung der Proteine geschah mittels Elektrophorese, wobei die Taschen der Sammelgele mit etwa 10 µl Proteinlösung aufgefüllt wurden. Zur Ermittlung des Molekulargewicht wurde ein biotinylierter Proteinmarker (New England Biolabs, Beverly, MA, USA) verwendet. Die Trennkammer wurde mit dem Elektrophoresepuffer aufgefüllt (0,4 M Glycin, 1,0% SDS, 0,05 M Tris-HCl, pH 8,9). Initial wurde eine Spannung von 80 V für 20 min. angelegt, danach von 160 V für 90 min.

2.7.2 Immunoblot

Die aufgetrennten Proteine wurden auf Nitrozellulosemembranen (BioRad, München) übertragen. Dabei wurde die Transfereinheit mit einem Transferpuffer (1 Liter bestehend aus 5,82g Tris, 2,93g Glycin, 200 ml Methanol und 3,75 ml 10% SDS) befeuchtet und schichtweise aufgebaut. Die Transfereinheit wurde in die gefüllte Blottkammer eingesetzt.

Die Proteine wandern im elektrischen Feld zur Anode und somit vom Gel auf die Membran (20 min.; 20 Volt). Nach dem Blotten werden die Membranen dreimal in Tris-gepufferter Salzlösung (TBST; 50mM Tris; 0,15 M NaCl; 0,01% Tween 20; pH 7,5) jeweils 10 min. gewaschen. Anschließend wurden unspezifische Bindungsstellen mit 10% Trockenmilchlösung für ca. 90 min. blockiert. Um die Milchlösung zu entfernen, wird dreimal in TBST für 10 min. gespült.

Der Primärantikörper wurde in TBST und 5% Rinderalbumin verdünnt (NAPE-PLD 1:500, CB1 1:300, FAAH 1:500, DAGLalpha 1:100). Die Inkubation erfolgte auf einem Schüttler bei 4°C über Nacht. Am nächsten Tag wurden die Membranen dreimal in TBST, jeweils 10 min. gewaschen. Der HRP-konjugierte Zweitantikörper wurde in

einer TBST/2,5%-Trockenmilchlösung (1:20.000) verdünnt und die Membranen in dieser Lösung 1-2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Die Detektion erfolgte mittels der Chemolumineszenz, wobei durch HRP und H₂O₂, die Oxidation des Chemolumineszenz-Substrates erfolgt. Die Lichtemission wurde durch die Exposition gegen ein Röntgenfilm (Kodak, Biomax MR, Stuttgart) sichtbar gemacht.

2.8 Statistische Auswertung

Zur statistischen Überprüfung der Nullhypothese, wurde der Faktor p ermittelt. Ein signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen Gruppen wurde bei $p < 0,05$ angenommen. Alle Analysen wurden mit dem Statistikprogramm GraphPad Prism (GraphPad, San Diego, CA, USA) durchgeführt. Der Student t-Test wurde beim Vergleich zweier Gruppen verwendet. Bei mehreren Gruppen wurde eine Einweganalyse der Varianz (one-way analysis of variance, ANOVA) mit einem Zusatztest nach Bonferroni durchgeführt. Die Daten wurden als Mittelwert mit Standardfehler des Mittelwertes (\pm SEM) angegeben. Für deskriptive Zwecke wurde das arithmetische Mittel bestimmt und mit der Standardabweichung (\pm SD) angegeben.

2.9 Kontrollen

Die Spezifität der Primärantikörper wurde in den folgenden Studien gezeigt: (Benito et al. 2003; Boon et al. 2003; Erdmann et al. 2008; Hayashi et al. 2004; Koch et al. 2008; Sewry et al. 1996; Yoshida et al. 2006). Darüber hinaus erfolgten Präabsorptionsexperimente mit den jeweiligen Peptiden. Es folgten immunohistochemische Markierungen an Gewebe von CB1-Knockout- und FAAH-Knockout-Mäusen. Des Weiteren wurde nach Auftrennung der Proteine im Immunoblot die Bindung der Primärantikörper überprüft.

3 Ergebnisse

3.1 Immunhistochemische Lokalisation und photoperiodische Untersuchung von NAPE-PLD in der Pars tuberalis der Ratte

Bei den Bildern der Abb. 2 handelt es sich um repräsentative Immunfärbungen der Schnitte zu den jeweiligen Zeitpunkten, an denen die Ratten dekapitiert wurden.

Die Licht- und Dunkelphase betrug jeweils 12 h (LD 12:12), die Zeit von ZT 00 bis ZT 12 war die Lichtperiode. Die perinukleäre Immunreaktivität für NAPE-PLD ist über den ganzen Verlauf der Pars tuberalis festzustellen (siehe Pfeile).

NAPE-PLD

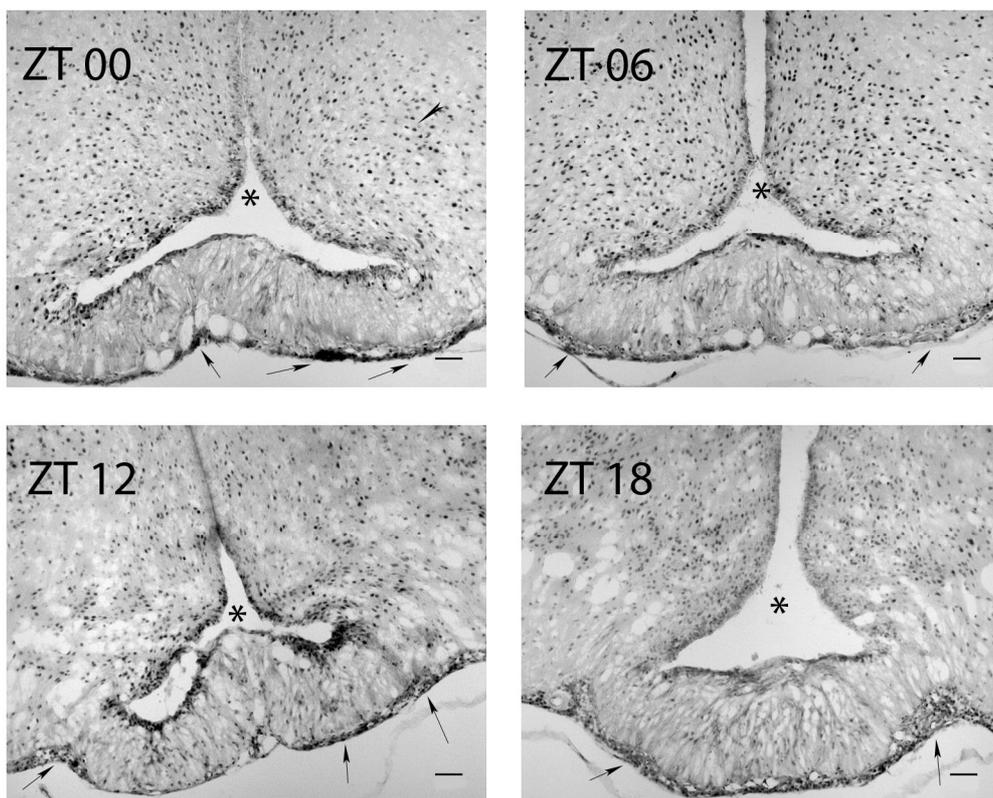


Abb. 2: Lokalisation von NAPE-PLD in Pars tuberalis der Ratte

ZT Zeitgeber; → in Richtung Pars tuberalis; Pfeilspitze in ZT 00 zeigt in Richtung Neurone des Ncl. arcuatus der linken Seite; * befindet sich im dritten Hirnventrikel; Maßstab entspricht in allen Bildern 50 µm.

Gelegentlich ist die Immunreaktivität der Zellen in der Pars tuberalis in Cluster-Formation angeordnet (siehe z.B. ZT 00, Pfeile). Die Intensität der Immunreaktion zum ZT 00 ist signifikant höher als zu den restlichen Zeitpunkten (Vgl. Abb. 6.A).

Die Neurone des paarigen Ncl. arcuatus (Pfeilspitzen ZT 00) weisen ebenfalls eine starke Immunreaktion auf. Entsprechend kann die gleiche subzelluläre Verteilung wie in den Zellen der Pars tuberalis festgestellt werden.

FAAH

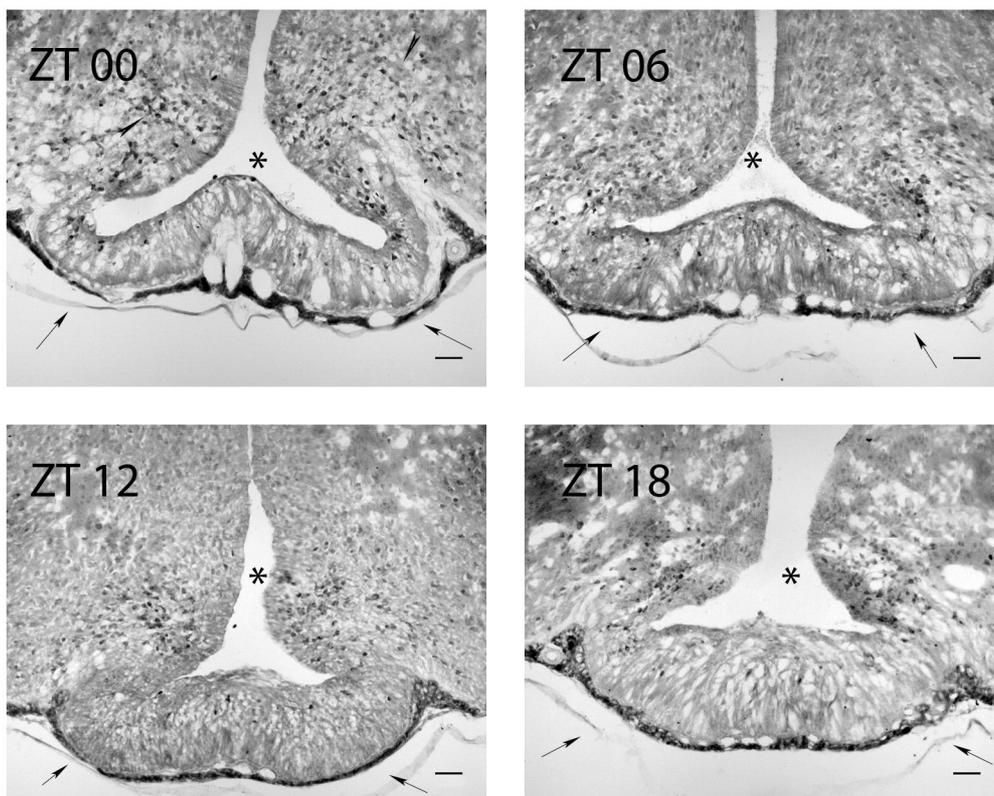


Abb. 3: Lokalisation von FAAH in Pars tuberalis der Ratte

ZT, Zeitgeber; → in Richtung Pars tuberalis; Pfeilspitze in ZT 00 zeigt in Richtung auf Neurone des Ncl. arcuatus beider Seiten; * befindet sich dritten Hirnventrikel; Maßstab entspricht in allen Bildern 50 µm.

3.2 Immunhistochemische Lokalisation und photoperiodische Untersuchung von FAAH in der Pars tuberalis der Ratte

Die Abb. 3 gibt eine repräsentative Immunfärbung der Pars tuberalis zu den jeweiligen Zeitpunkten wieder. Die Zeit von ZT 00 bis ZT 12 ist die Lichtperiode. Die FAAH-Immunreaktion ist überwiegend im Zytoplasma der Zellen in der Pars tuberalis lokalisiert. Auffällig ist eine deutliche Cluster-Formation der FAAH-positiven Zellen in der Pars tuberalis, die sich in unmittelbarer Umgebung der Gefäße befinden. Die Intensität der Immunreaktion ist zu jedem Zeitpunkt gleich (Vgl. Abb. 6.B). Entsprechend zeigen auch die Neurone des Ncl. arcuatus (Pfeilspitze, ZT 00) eine zytoplasmatische Immunfärbung.

3.3 Immunhistochemische Lokalisation und photoperiodische Untersuchung von COX-2 in der Pars tuberalis der Ratte

Die Abb. 4 zeigt Immunfärbungen für COX-2 zu den untersuchten Zeitpunkten. Die Lichtphase begann um ZT 00 und endete zu ZT 12 (LD 12:12). In Zellen der Pars tuberalis sowie in den Neuronen des Ncl. arcuatus (Pfeilspitze ZT 00) ist die Immunreaktion der COX-2 im Zytoplasma lokalisiert. Besonders viele Zellen der Pars tuberalis, die eine positive COX-2- Immunfärbung zeigen, formieren sich um vaskuläre Strukturen. Die Intensität der Immunreaktion ist im Verlauf der Photoperiode zum ZT 12 am niedrigsten zum ZT 18 am höchsten (Vgl. Abb. 6.C). Ebenfalls prominent erscheint die Immunreaktion in der Ependymzellschicht des dritten Hirnventrikels.

COX-2

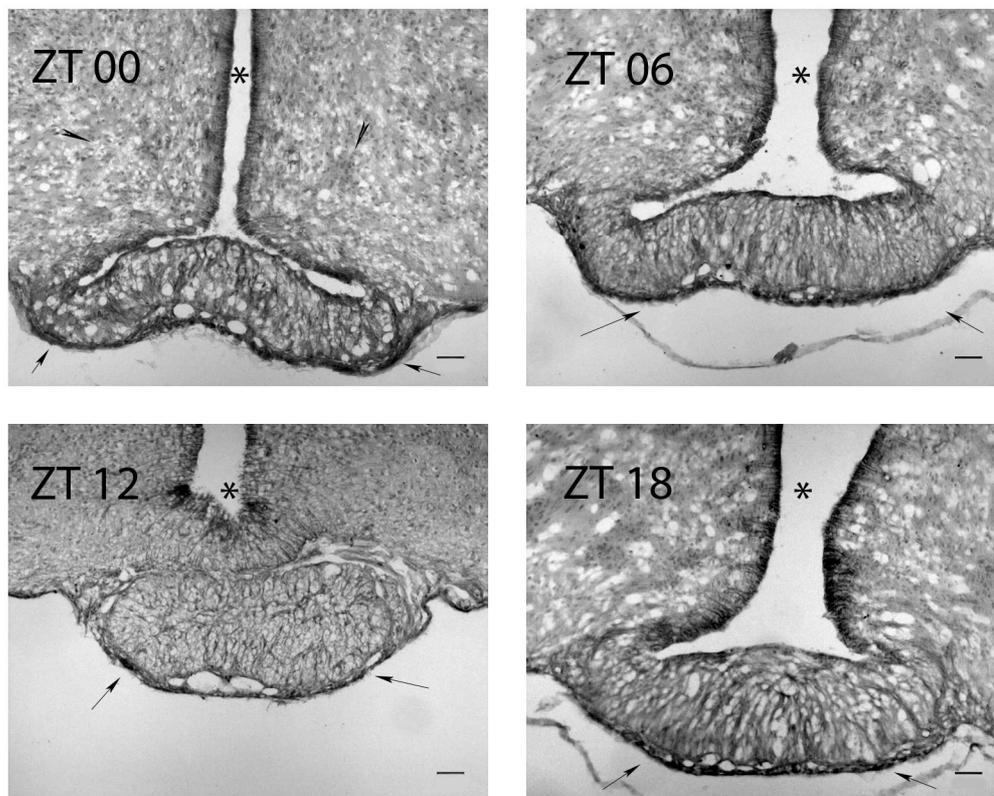


Abb. 4: Lokalisation von COX-2 in Pars tuberalis der Ratte

ZT Zeitgeber; → in Richtung Pars tuberalis; Pfeilspitze in ZT 00 zeigt in Richtung auf Neurone des Ncl. arcuatus beider Seiten; * befindet sich dritten Hirnventrikel; Maßstab entspricht in allen Bildern 50 µm.

3.4 Immunhistochemische Lokalisation und photoperiodische Untersuchung von CB-1 Rezeptor in der Pars tuberalis der Ratte

Die Bilder der Abb. 5 stellen repräsentative Immunfärbungen zu den jeweiligen Zeitpunkten dar, an denen die Ratten dekapitiert wurden. Die Tiere wurden unter 12 h Lichtphase und 12h Dunkelheit gehalten. Die Immunreaktion in Zellen der Pars tuberalis ist im Zytoplasma lokalisiert. Die CB-1-immunreaktiven Zellen der Pars tuberalis sind überwiegend in großen Cluster-Formation angeordnet, die besonders im kaudalen Abschnitt (Pfeile) der Pars tuberalis zu finden sind. Die Nervenendigungen der neurosekretorischen Neurone in der Außenzone der Eminentia Mediana zeigen ebenfalls prominente Immunreaktionen (Pfeilspitzen). Die schwächste Immunfärbung ist zu den Zeitpunkten ZT 00 und ZT 12 zu verzeichnen. Die Intensität der Immunreaktion ist zum ZT 06 und ZT 18 am höchsten (Abb. 7.A).

CB-1 Rezeptor

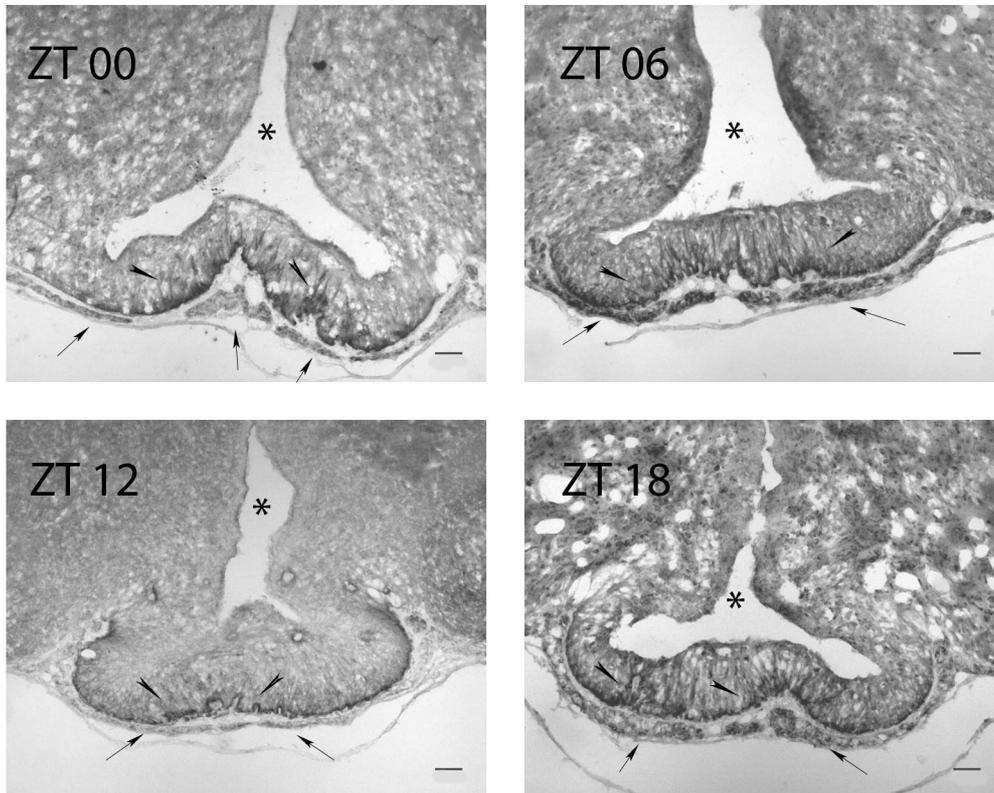


Abb. 5: CB-1 Rezeptor in Pars tuberalis der Ratte

ZT Zeitgeber; → in Richtung Pars tuberalis; Pfeilspitzen zeigen Terminale der neurosekretorischen Neurone in der Außenzone der Eminentia mediana; * befindet sich im dritten Hirnventrikel; Maßstab entspricht in allen Bildern 50 µm.

3.5 Densitometrische Quantifizierung der photoperiodischen Variation in der Immunreaktion von NAPE-PLD, FAAH und COX-2 in der Pars tuberalis der Ratte

Die Intensität der NAPE-PLD -Immunreaktion (Abb. 6.A) wurde semi-quantitativ nach der Dekapitation in Zellen der Pars tuberalis für jeden einzelnen Zeitpunkt ermittelt. Die densitometrisch erfasste Immunreaktion wird in absoluten Werten der optischen Dichte wiedergegeben. Die Intensität der Immunreaktion ist zum ZT 00 am stärksten (vgl. Abb. 2, ZT 00).

Entsprechend wird für FAAH (Abb. 6.B) die absolute optische Dichte der Immunreaktion zu den jeweiligen Zeitpunkten der Dekapitation wiedergegeben. Die

optische Dichte variiert zu keinem Zeitpunkt der Gewebsentnahme (vgl. Abb. 3). Die optische Dichte der COX-2 (Abb. 6.C) wurde zu vier Zeitpunkten ermittelt. Die absoluten Werte der Dichtemessung zeigen zu ZT 12 die niedrigste und zu ZT 18 die höchste Intensität (vgl. Abb. 4 zum ZT 00).

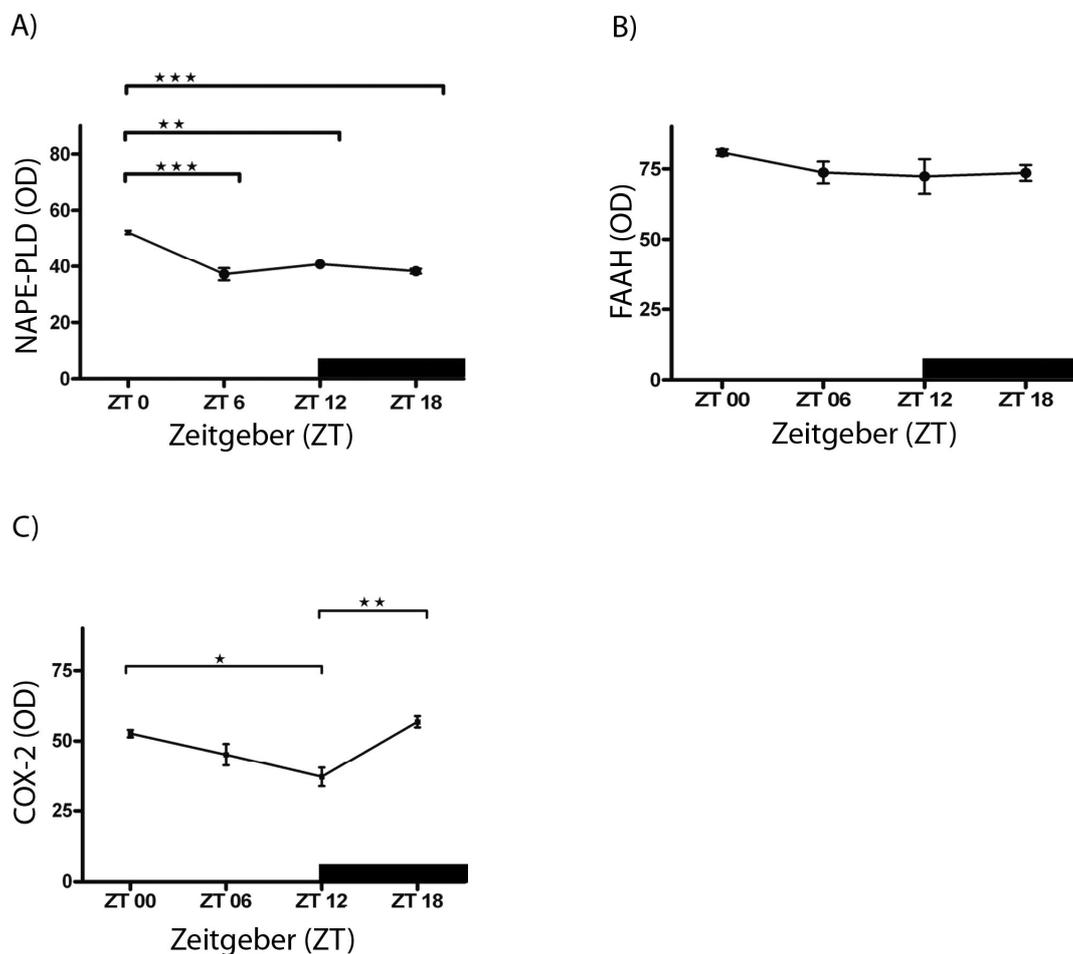


Abb. 6: Einfluss der Photoperiode auf die Immunreaktion von NAPE-PLD, FAAH, COX-2 in der Pars tuberalis der Ratte

ZT, Zeitgeber; OD, optische Dichte; Daten sind als Mittelwert \pm SEM mit * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ Signifikanzniveau dargestellt, ANOVA, Balken an der Abszisse entspricht Dunkelheit.

3.6 Densitometrische Quantifizierung der photoperiodischen Variation der Immunreaktion von CB-1 in der Pars tuberalis der Ratte

Die Intensität der CB1-Immunreaktion (Abb. 7.A) wurde in der Pars tuberalis densitometrisch ermittelt. Die absoluten Werte der optischen Dichte werden zu vier Zeitpunkten angegeben. Die Immunreaktion ist zum ZT 00 und ZT 12 nicht signifikant unterschiedlich. Die optische Dichte nimmt signifikant vom ZT 06 zum ZT 12 ab. Eine Zunahme der optischen Dichte der CB1-Immunreaktion ist vom ZT 00 zum ZT 06 zu verzeichnen.

Die Korrelation (Abb. 7.B) der NAPE-PLD-Immunreaktion zur CB-1-Immunfärbung wurde in der Pars tuberalis ermittelt. Der Pearson-Korrelationskoeffizient (r) beträgt zum ZT 00 -0,89; zum ZT 06 -0,42, zum ZT 12 (r) -0,76, und zum ZT 18 -0,9018.

Die gesamte Korrelation im Verlauf des ganzen Licht- und Dunkelzyklus (LD 12:12) beträgt (r) -0,40.

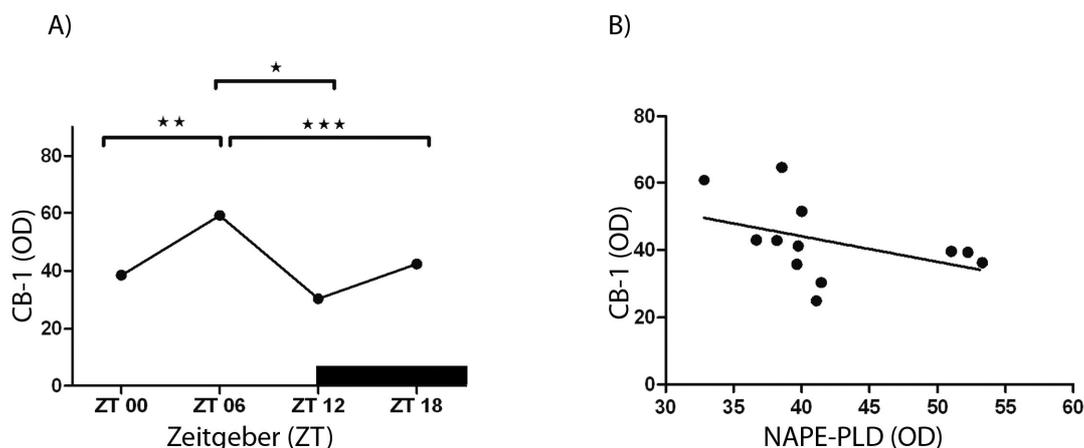


Abb. 7: Einfluss der Photoperiode auf die Immunreaktion von CB-1 und Korrelation zwischen NAPE und CB-1 in der PT der Ratte

ZT, Zeitgeber; OD, optische Dichte; Daten sind als Mittelwert \pm SEM mit * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ Signifikanzniveau dargestellt, ANOVA, Balken an der Abszisse entspricht Dunkelheit.

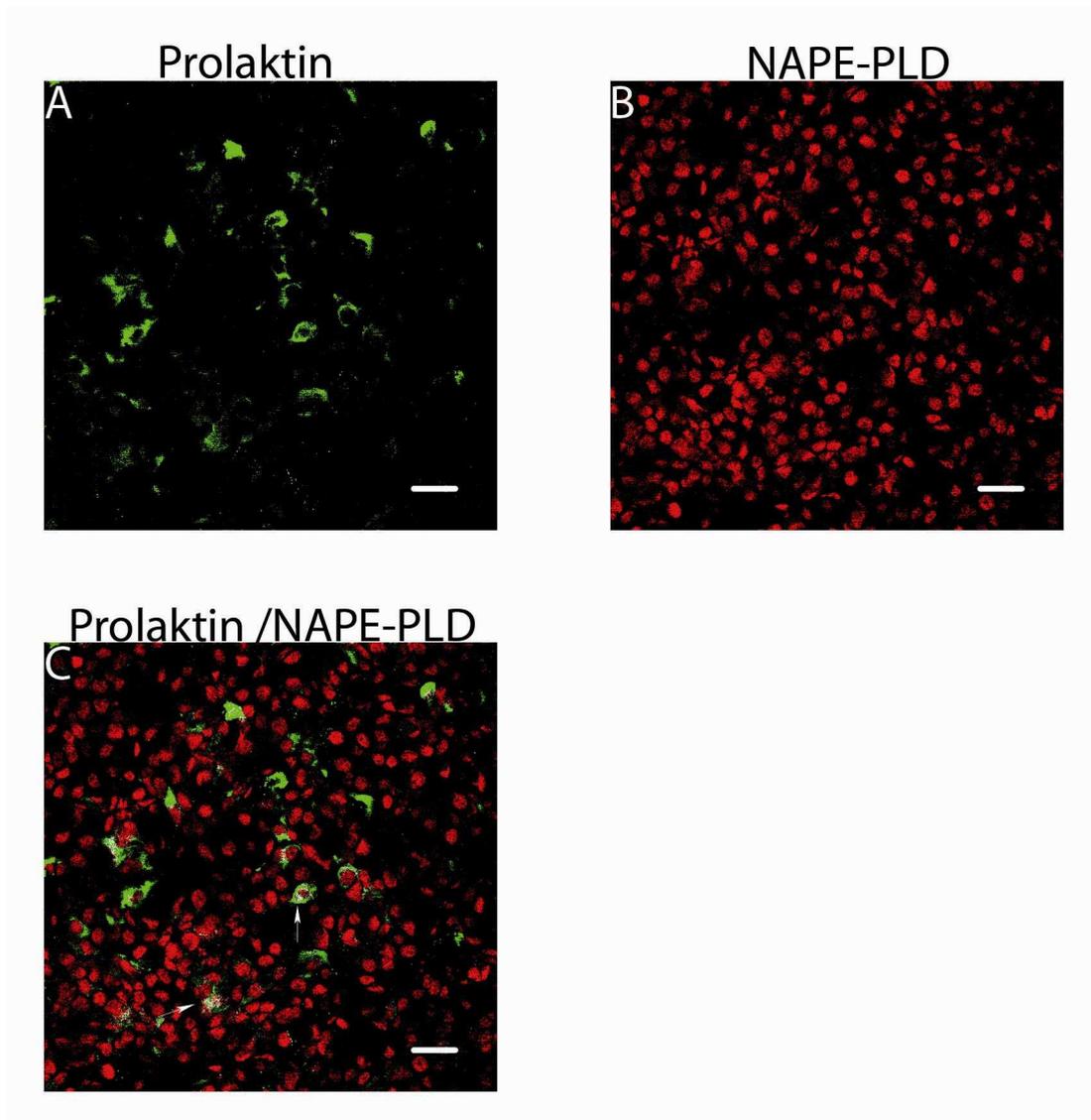


Abb. 8: Doppelimmunmarkierung von Prolaktin und NAPE-PLD in lactotrophen Zellen der Pars distalis der Ratte. Prolaktin ist im grünen Kanal und NAPE-PLD im roten Kanal dargestellt. Maßstab in allen Bildern entspricht 20 μm .

3.7 Kolokalisations-Analyse von Prolaktin und NAPE-PLD in der Adenohypophyse der Ratte

Die Adenohypophysen (Abb. 8.A-C) der Ratten wurden zum gleichen Zeitpunkt entnommen und in koronale Schnitte zerlegt. Anschließend wurde eine simultane Doppelmarkierung vorgenommen. Eine repräsentative Immunreaktion von Prolaktin, welche zytoplasmatisch ist, wird hier im grünen Kanal wiedergegeben. Im roten Kanal

ist die Immunfluoreszenz für NAPE-PLD wiedergegeben. Diese Immunreaktion weist eine prominente perinukleäre Färbung auf. Die Pfeile (Abb. 8.C) zeigen auf eine

Kolokalisation von NAPE-PLD und Prolaktin hin. Diese Kolokalisation ist in weißer Falschfarbe dargestellt. Der Überlappungskoeffizient nach Manders (Abb. 10.D) beträgt $3,8 \pm 0,7\%$ für NAPE-PLD und Prolaktin.

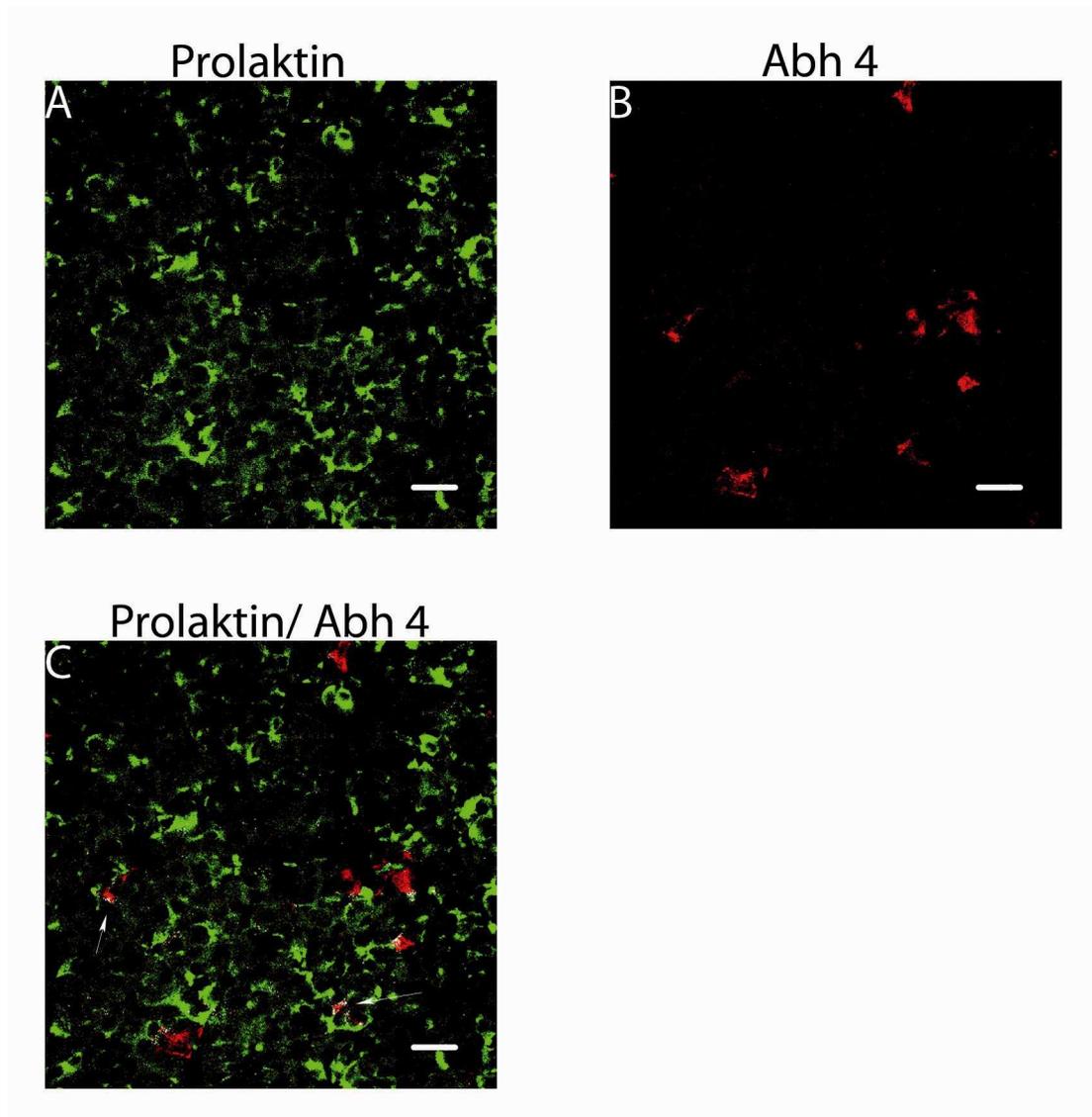


Abb. 9: Doppelimmunmarkierung von Prolaktin und Abh4 in lactotrophen Zellen. Prolaktin ist im grünen und Abh 4 in rotem Kanal dargestellt. Maßstab entspricht in allen Bildern 20 μm .

3.8 Kolokalisations-Analyse von Prolaktin und Abh4 in der Adenohypophyse der Ratte

Die zum gleichen Zeitpunkt entnommenen Adenohypophysen wurden in koronale Schnitte zerlegt (Abb. 9.A-C). Anschließend erfolgte die simultane Markierung von Prolaktin und Abh4. Das Prolaktin ist in grünem Kanal wiedergegeben. Die Immunreakation von Abh4 wird in rot wiedergegeben. Die Immunfärbung von Abh4 in adenohypophysären Zellen zeigt eine zytoplasmatische Reaktion. Pfeile in Abb. 9.C weisen exemplarisch auf eine Kolokalisation von Prolaktin und Abh4 hin, die in weißer

Falschfarbe wiedergegeben ist. Der Überlappungskoeffizient nach Manders (Abb. 10.D) beträgt $11,4 \pm 3\%$ für Abh4 und Prolaktin.

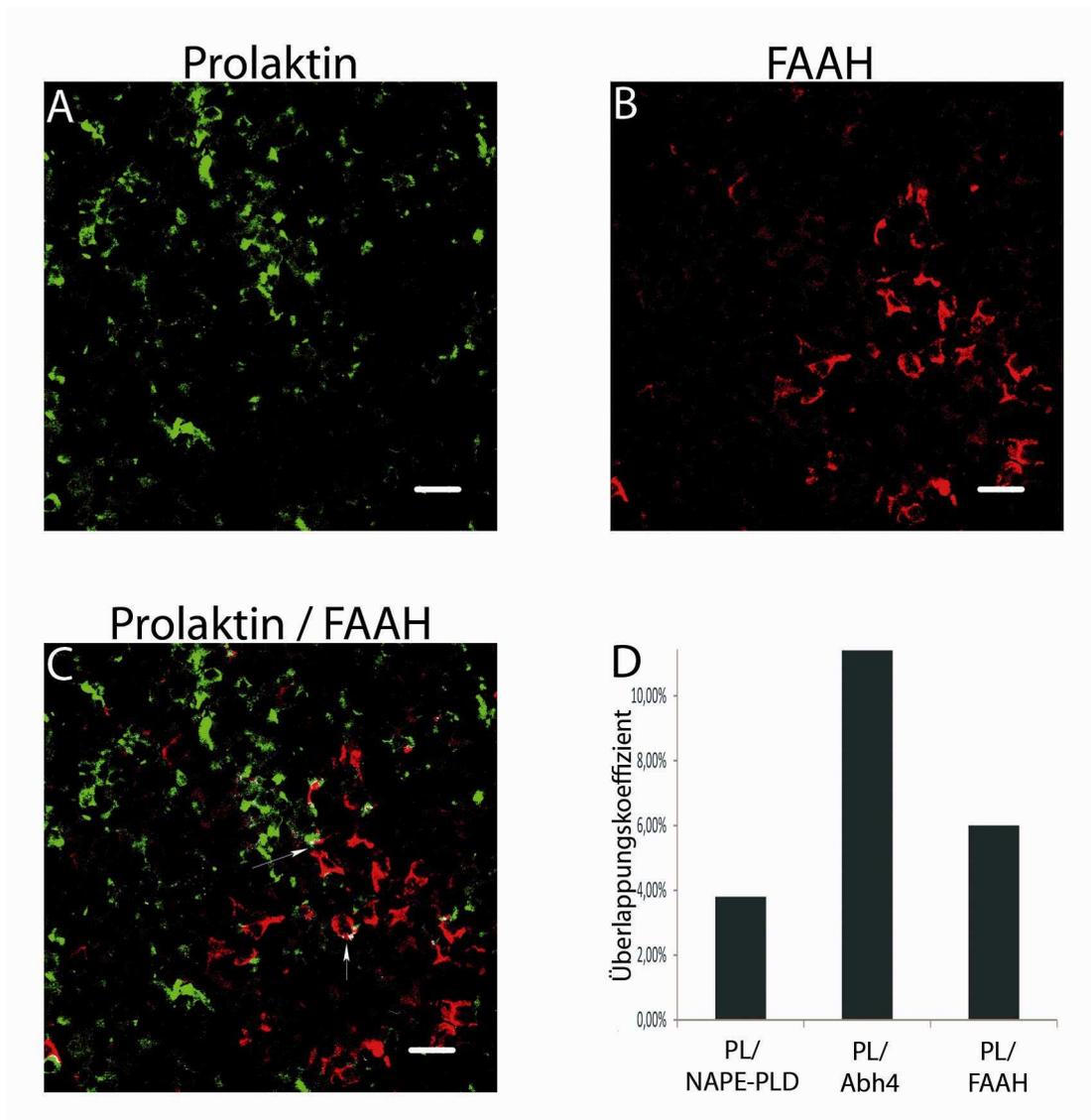


Abb. 10: Doppelmarkierung von Prolaktin und FAAH in lactotrophen Zellen. Prolaktin ist im grünen und FAAH im roten Kanal dargestellt. Maßstab entspricht in allen Bildern 20 μm , PL steht für Prolaktin.

3.9 Kolokalisations-Analyse von Prolaktin und FAAH in der Adenohypophyse der Ratte

Abb. 10.A-C zeigt eine simultane Immunfluoreszenzfärbung von Prolaktin und FAAH. Prolaktin ist im grünen Kanal (Abb. 10.A), die zytoplasmatische FAAH-Immunfärbung im roten Kanal dargestellt.

Die Abb. 10.C gibt die Kolokalisations-Analyse der beiden Marker wieder. Die weißen Pfeile zeigen exemplarisch auf die Kolokalisation hin, die in weißer Falschfarbe dargestellt wird. Der Überlappungskoeffizient nach Manders beträgt $6 \pm 3\%$ für Prolaktin.

Das Diagramm in Abb. 10.D fasst die Überlappungskoeffizienten von NAPE-PLD, Abh4 und FAAH in lactotrophen Zellen der Adenohypophyse zusammen.

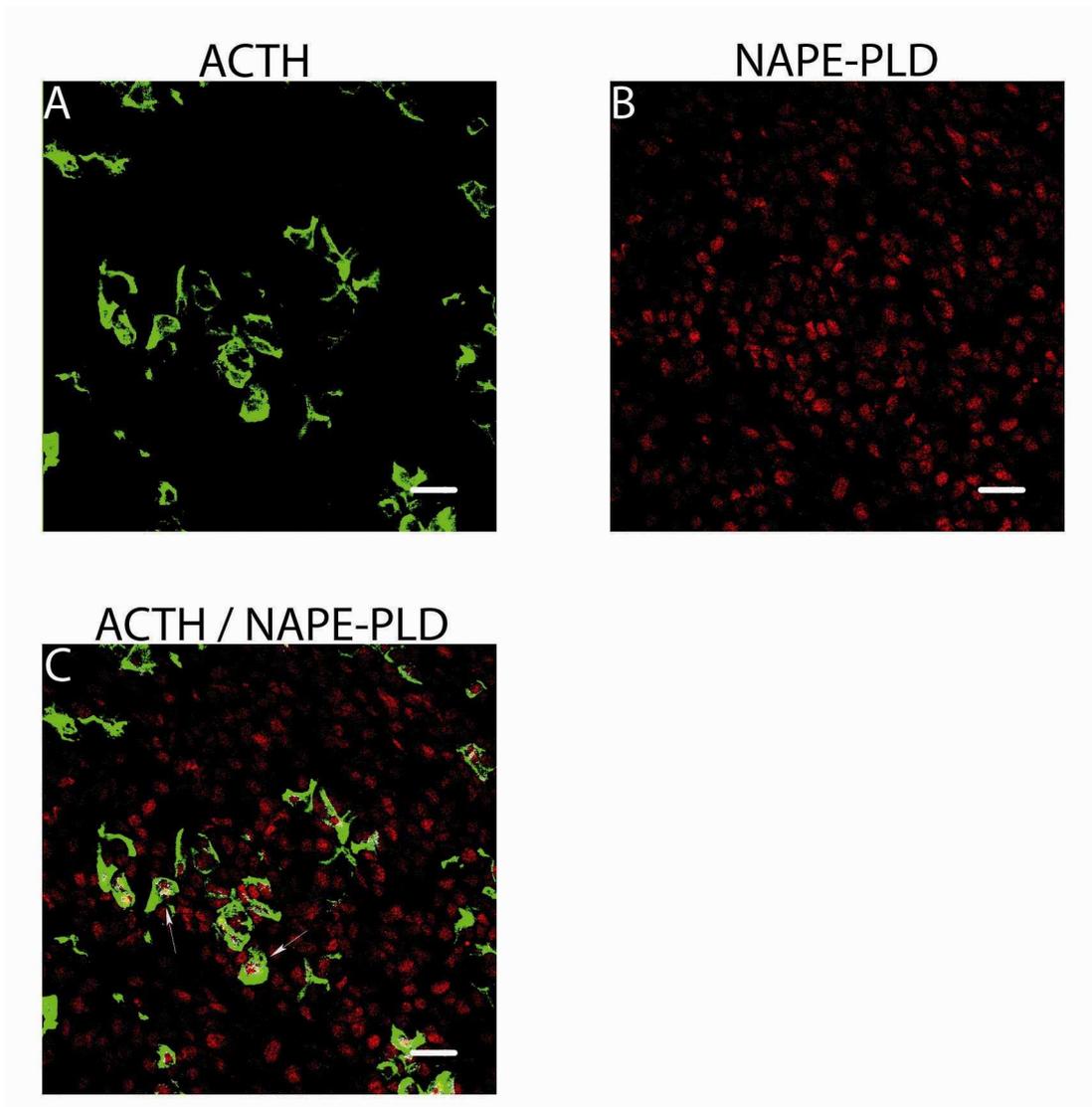


Abb. 11: Doppelimmunmarkierung von NAPE-PLD und ACTH in kortikotrophen Zellen. ACTH ist im grünen und FAAH im roten Kanal dargestellt. Maßstab entspricht in allen Bildern 20 μ m.

3.10 Kolokalisations-Analyse von ACTH und NAPE-PLD in der Adenohypophyse der Ratte

Adenohypophysen (Abb. 11.A-C) der Ratten wurden zum gleichen Zeitpunkt entnommen und in koronale Schnitte zerlegt. Anschließend erfolgte eine simultane Immunfluoreszenzfärbung. Die Immunreaktion für ACTH der kortikotrophen Zellen ist im grünen Kanal, die Immunreaktion von NAPE-PLD im roten Kanal dargestellt. Diese weist eine prominente, perinukleäre Lokalisation auf.

Die Kolo-kalisation ist in weißer Falschfarbe wiedergegeben (Pfeile in Abb. 10.C). Der Überlappungskoeffizient nach Manders beträgt $5,4 \pm 2,5\%$ für NAPE-PLD und ACTH (Abb. 13.D).

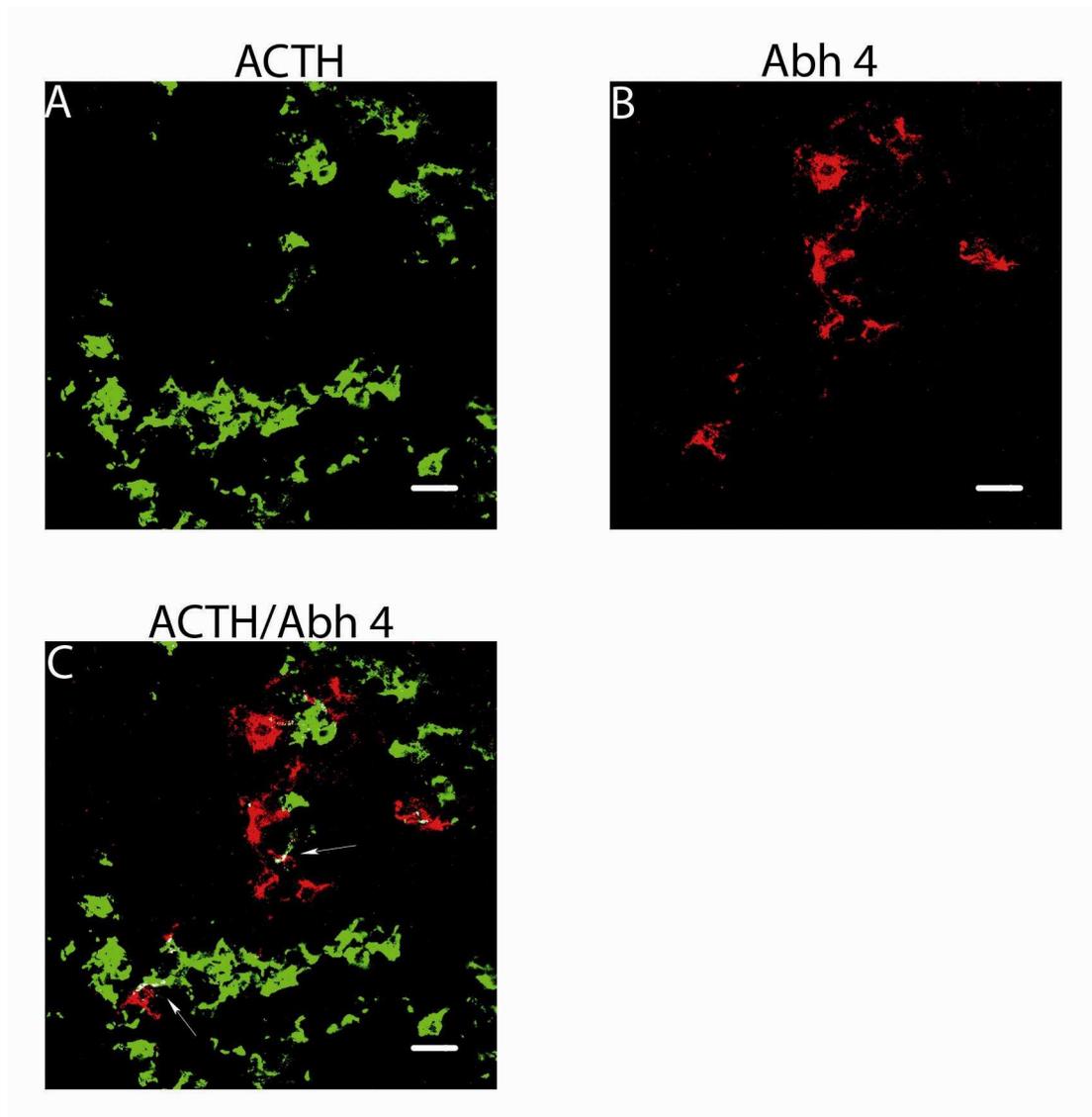


Abb.12:Doppelimmunmarkierung von ACTH und Abh4 in kortikotrophen Zellen. ACTH ist im grünen und Abh4 im roten Kanal dargestellt. Maßstab entspricht in allen Bildern 20 μm .

3.11 Kolokalisations-Analyse von ACTH und Abh4 in der Adenohypophyse der Ratte

Adenohypophysen (Abb. 12.C) wurden zum gleichen Zeitpunkt entnommen und in koronale Schnitte zerlegt. Die Immunreaktion von ACTH der kortikotrophen Zellen ist im grünen Kanal, die für Abh4 im roten Kanal dargestellt. Diese ist hauptsächlich im Zytoplasma lokalisiert. Die Abb. 12.C gibt die Kolokalisation von ACTH und Abh4 in weißer Falschfarbe (Pfeile) wieder. Der Überlappungskoeffizient nach Manders beträgt $3,1 \pm 0,4\%$ für ACTH und Abh4 (Abb. 13.D).

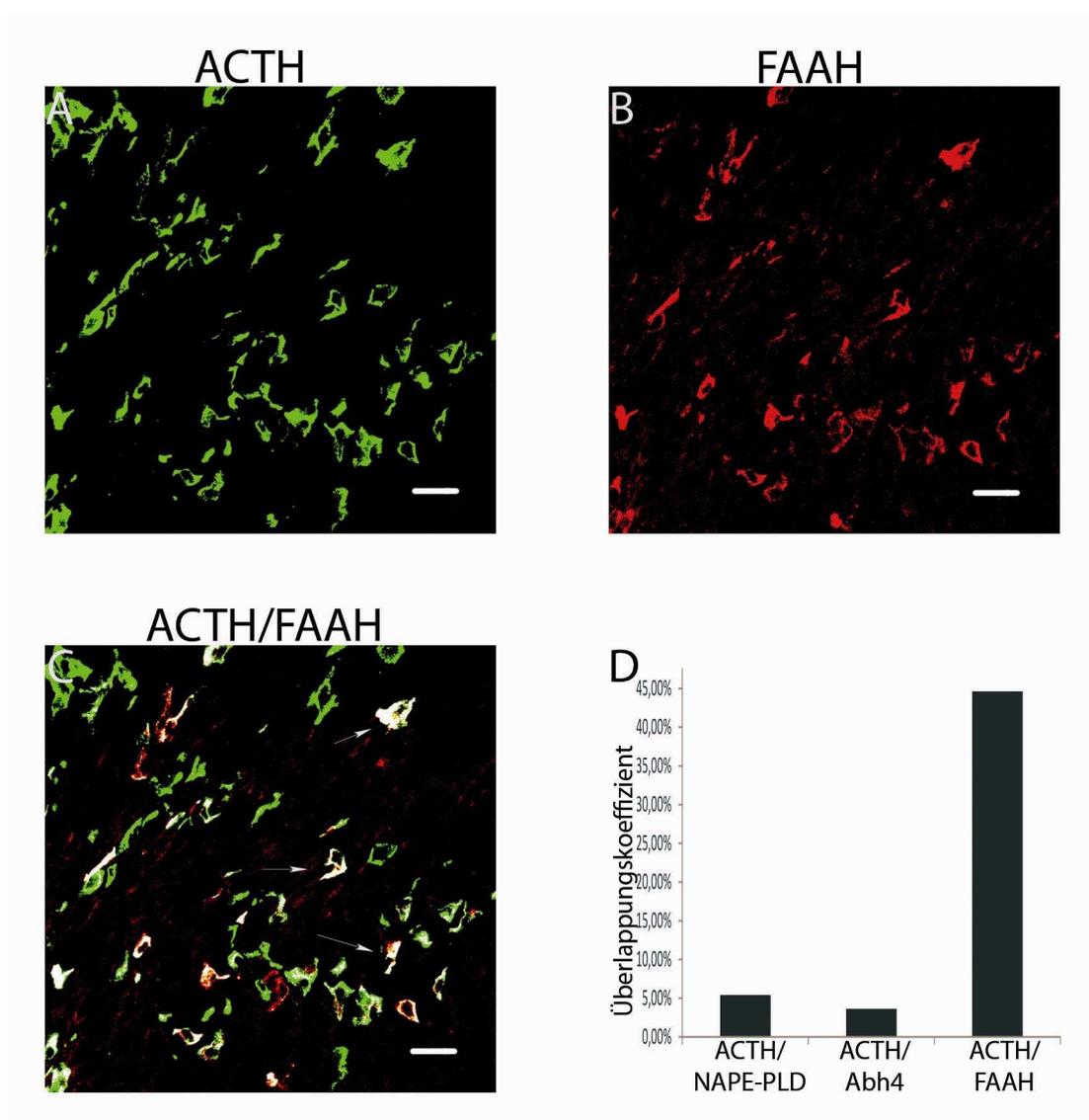


Abb.13: Doppelimmunmarkierung von FAAH und ACTH in kortikotrophen Zellen. ACTH ist im grünen und Abh4 in rotem Kanal dargestellt. Maßstab entspricht in allen Bildern 20 μm .

3.12 Kolokalisations-Analyse von ACTH und FAAH in der Adenohypophyse der Ratte

Abb. 13 zeigt eine Doppelimmunreaktion für ACTH und FAAH. Die ACTH-Immunreaktion ist im grünen Kanal (Abb. 13.A) und die FAAH-Immunreaktion im roten Kanal (Abb. 13.B) wiedergegeben. In adenohypophysialen Zellen ist die Immunreaktion von FAAH rein zytoplasmatisch. Abb. 13.C. gibt die Kolokalisation von FAAH und ACTH in weißer Falschfarbe wieder. Der Überlappungskoeffizient nach Manders beträgt $44,6\% \pm 2\%$ für FAAH und ACTH (Abb. 13.D). Das Diagramm (Abb. 13.D) gibt eine Zusammenfassung der Überlappungskoeffizienten von NAPE-PLD, Abh4 und FAAH in kortikotrophen Zellen der Adenohypophyse wieder.

3.13 Kolokalisations-Analyse von CB-1 und CRF in der Eminentia mediana.

Lokalisation von DAGL in der Eminentia mediana und Pars tuberalis

Sekretorische Nervenendigungen (Abb. 15.A-A2), die eine Immunreaktion für CRF aufweisen (Abb. 15.A, A1), setzen an Gefäßen der Außenzone der Eminentia mediana an (Doppelpfeil, Abb. 15.A2). Diese Axonterminale weisen eine CB-1-Immunreaktion auf. In den Aufnahmen sind auch Zellen der Pars tuberalis zu erkennen, die eine zytoplasmatische CB-1-Immunfärbung zeigen (Pfeilspitzen Abb. 15.A-A1).

Nervenendigungen von neurosekretorischen Fasern in der Außenzone der Eminentia mediana werden durch die DAGL-Immunfärbung (Pfeile in Abb. 15.B) markiert. Auch die Zellen der Pars tuberalis sind immunreaktiv für DAGL (Pfeilspitzen in Abb.15. B). Die Abbildungen (Abb. 14.A) geben eine simultane Dreifachmarkierung in der Eminentia mediana/Pars tuberalis wieder. Die Axone der CRF-Neurone (rot, Abb. 14.A-A3) setzen direkt an Gefäßen (*blau, Abb. 14.A) der Außenzone der Eminentia mediana an (Pfeile). Die Kolokalisation von CRF und CB-1 ist in weißer Falschfarbe wiedergegeben (Abb. 14.A1-A2). Auch Zellen der Pars tuberalis sind immunreaktiv für CB-1 (Pfeilspitzen).

Der Überlappungskoeffizient (Abb. 14.A3) nach Manders beträgt $79 \pm 2,1\%$ für CRF und CB-1. Die modifizierte Einzelkanalanalyse nach Manders ergab, dass $82,7 \pm 5,2\%$ der CRF-Fasern mit CB-1 und $59,1 \pm 8,6\%$ der CB-1-immunoreaktiven Fasern mit CRF kolokalisiert ist (Abb. 14.A3).

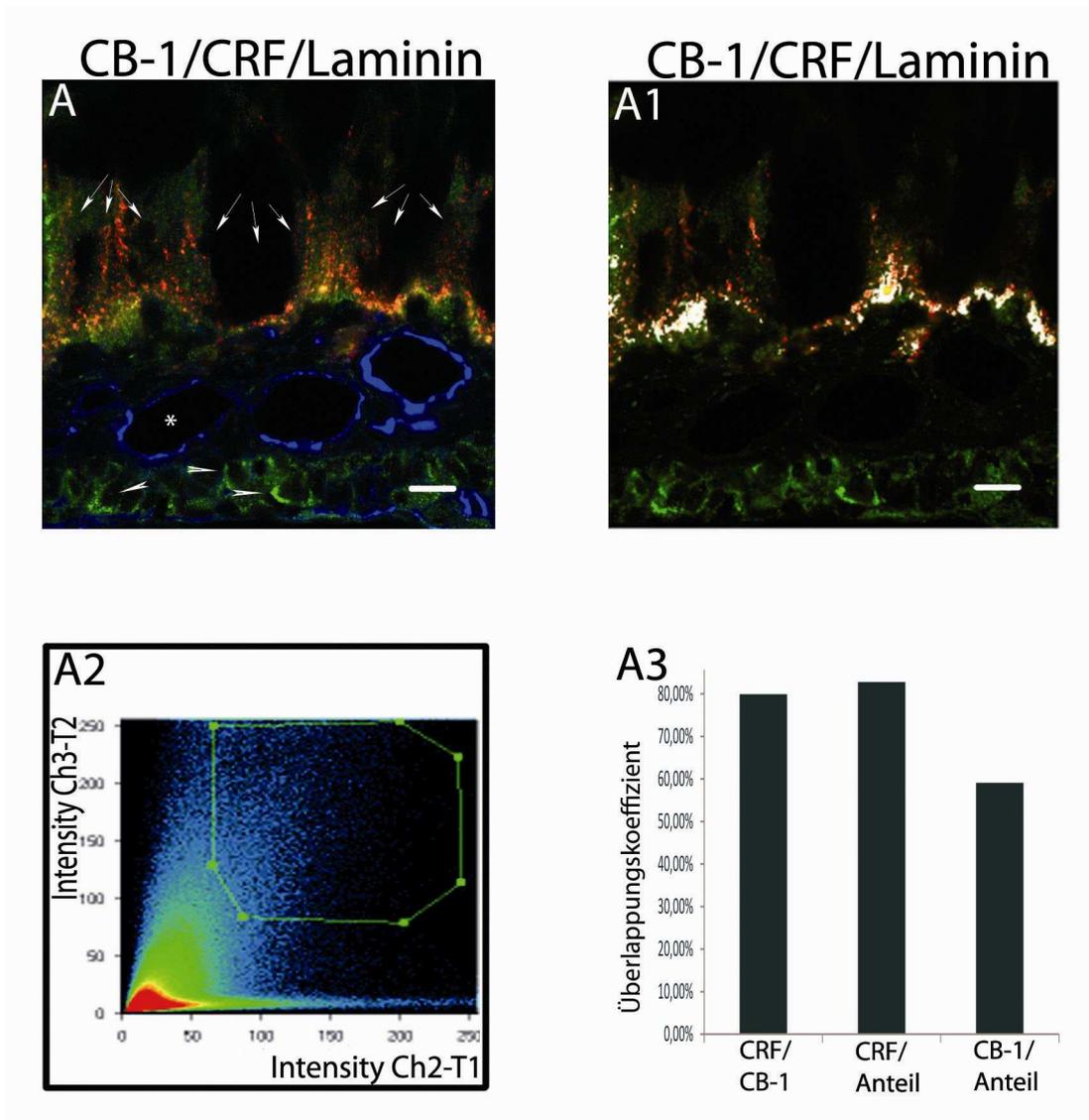


Abb.14: CB-1-Immunreaktion in CRF-immunreaktiven Nervenendigungen der Eminentia mediana. CRF ist in rot, CB-1 in grün dargestellt. In blauer Farbe ist Laminin wiedergegeben. Maßstab entspricht in allen Bildern 10 µm. Pfeile zeigen auf die Außenzone der Eminentia mediana. Pfeilspitzen zeigen auf Zellen der Pars tuberalis. * befindet sich in einem Gefäßlumen.

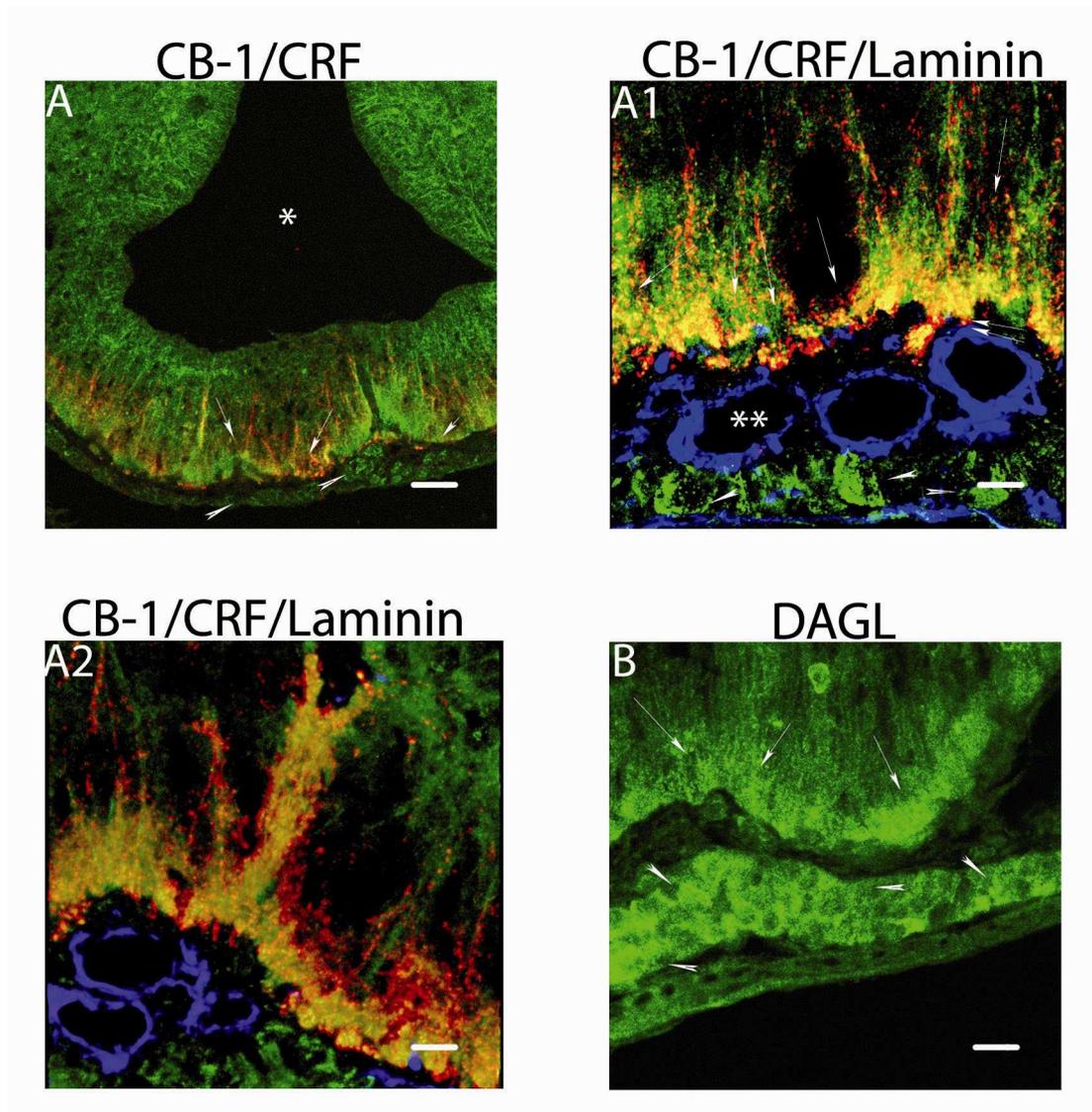


Abb. 15: CB-1/CRF, DAGL und Laminin in der Eminentia mediana. CRF ist in rot, CB-1, DAGL in grün dargestellt und Laminin in blau wiedergegeben. Maßstab entspricht A 20 μm , A1, A2, B 10 μm , * dritter Hirnventrikel, ** Gefäße der Eminentia mediana, Pfeile zeigen auf die Außenzone der Eminentia mediana, Doppelpfeile (A1) auf CRF-immunreaktive Nervenendigungen der Eminentia mediana, die eine positive Immunreaktion für CB-1 zeigen. Pfeilspitzen zeigen auf Zellen der Pars tuberalis.

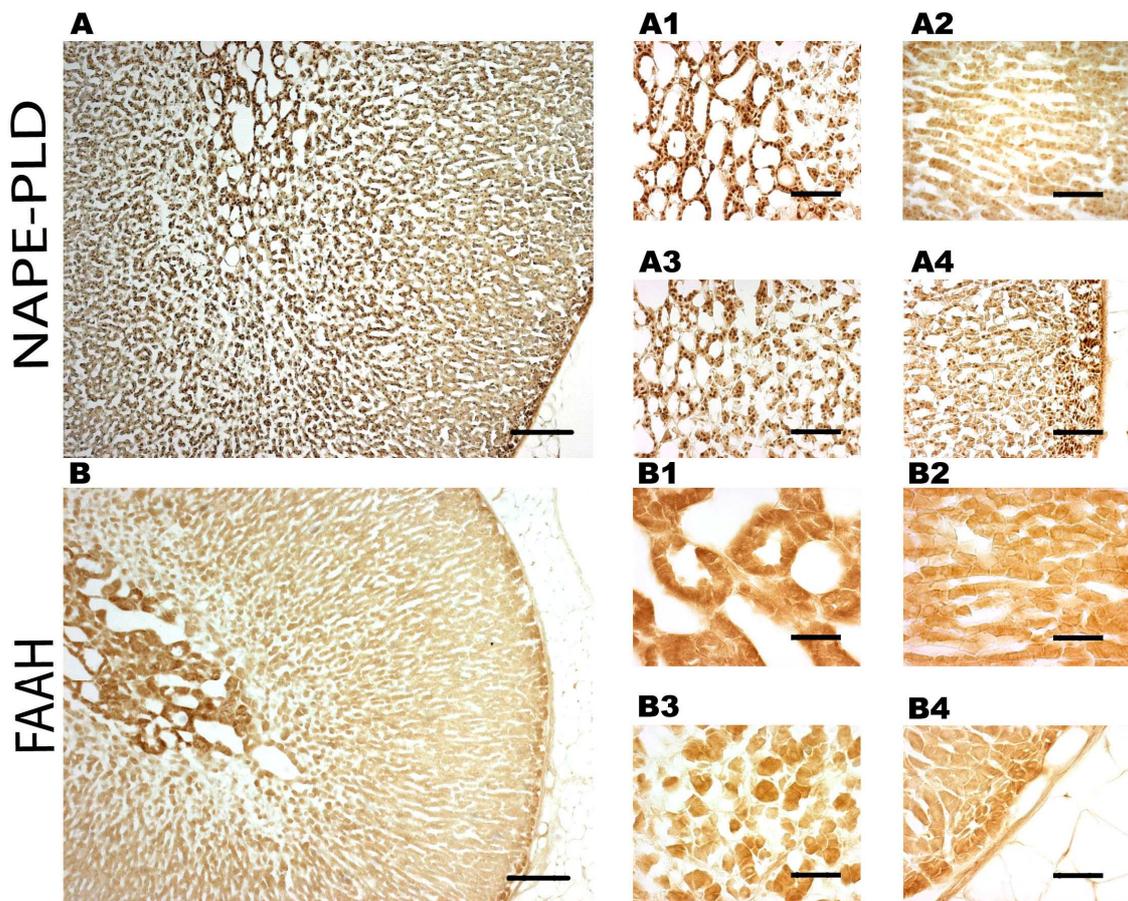


Abb. 16: Immunreaktion von FAAH und NAPE-PLD in der Nebenniere des Hamsters. Maßstab in A , B, B1-B4 200 μm , in A1-A4 100 μm .

3.14 Immunhistochemische Lokalisation von FAAH und NAPE-PLD in der Nebenniere des Hamsters

Die Nebennieren wurden nach transkardialer Perfusion (Abb. 16.A-B4) entnommen, kryoprotectiert und auf koronarer Ebene geschnitten. Die Immunreaktion von NAPE-PLD ist in Nebennierenmark (Abb. 16.A, A1), Zona reticularis (Abb. 16.A3), Zona fasciculata (Abb. 16.A2), sowie Zona glomerulosa (Abb. 16.A4) zu finden. Am prominentesten erscheint die Immunfärbung in chromaffinen Zellen des Nebennierenmarks, sowie in der Zona glomerulosa. Die Immunreaktion ist hauptsächlich um den Zellkern lokalisiert (Abb. 16.A-A4).

Chromaffine Zellen des Nebennierenmarks (Abb.16.B) zeigen eine intensive FAAH-Immunfärbung. Ebenso weist die Zona glomerulosa eine prominente Immunfärbung auf (Abb. 16.B4). Sowohl Fasciculatazellen (Abb. 16.B2) als auch die Reticulariszellen (Abb. 16.B3) weisen eine schwächere FAAH-Immunreaktion auf. Die Immunreaktion ist hauptsächlich zytoplasmatisch (Abb. 16.B-B4).

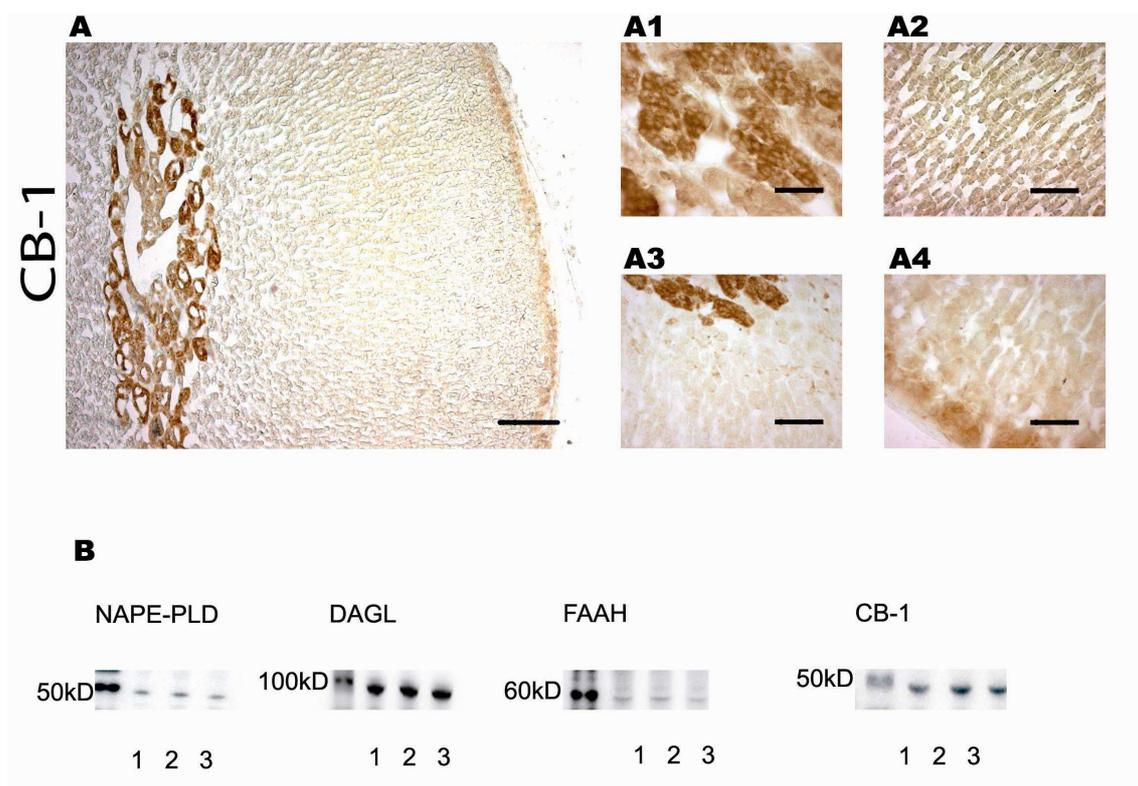


Abb. 17: Lokalisation von CB-1 in der Nebenniere des Hamster und Immunoblot der Komponenten des Endocannabinoidsystems. Maßstab in A, A1 und A4 200 μm , in A2 und A3 100 μm ; kD, Kilodalton.

3.15 Immunhistochemische Lokalisation von CB-1 in der Nebenniere des Hamsters und immunochemischer Nachweis von NAPE-PLD, DAGL, FAAH, CB-1.

Nach Entnahme der Nebennieren wurden sie in koronale Schnitte zerlegt. Eine CB-1-Immunreaktion ist in chromaffinen Zellen des Nebennierenmarks (Abb. 17.A, A1), in Zona reticularis (Abb. 17.A3), Zona fasciculata (Abb. 17.A2) und Zona glomerulosa (Abb. 17.A4) zu finden. Die chromaffinen Zellen und Glomerulosazellen weisen die prominentesten Färbungen auf. Die Immunreaktion ist hauptsächlich im Zytoplasma lokalisiert. Ein immunochemischer Nachweis wurde an drei unterschiedlichen Nebennieren (1, 2, 3) geführt. Der primäre NAPE-PLD Antikörper erkennt eine Proteinbande bei ca.45-50 kD. DAGL wird in Nebennieren-Homogenaten der Hamster bei einem Molekulargewicht von ca. 95-100 kD detektiert. Bei einem Proteingewicht von ca. 55-60 kD erfolgt die Immunreaktion von FAAH. CB-1-Protein wird bei einem Molekulargewicht von ca. 45-50 kD erkannt.

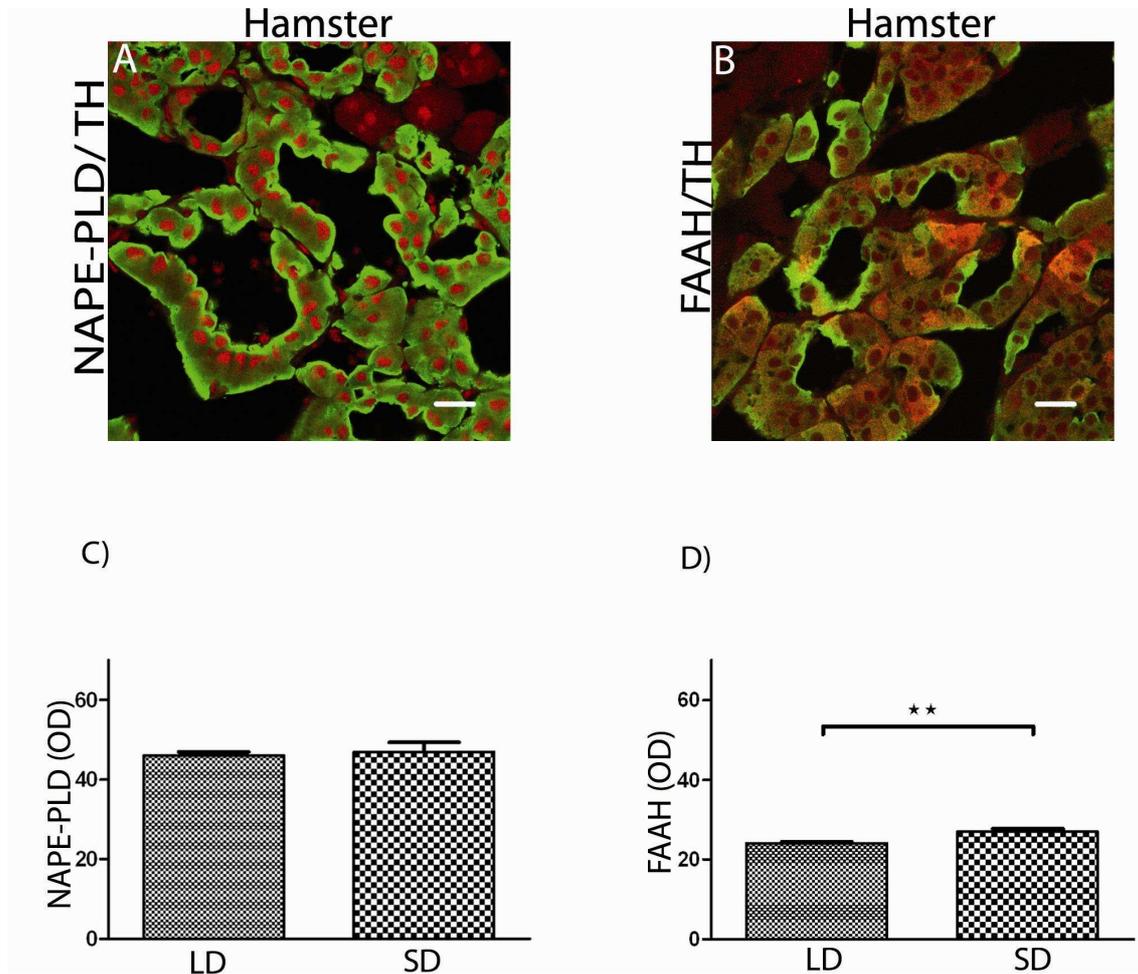


Abb. 18: Einfluss der Photoperiode auf die Immunreaktion von FAAH und NAPE-PLD in chromaffinen Zellen der Nebenniere. LD long day; SD short day; OD, optische Dichte; Daten sind als Mittelwert \pm SEM dargestellt; ** $p < 0,01$ Signifikanzniveau, Student's t-test, Maßstab 20 μm .

3.16 Doppelmarkierung von FAAH, NAPE-PLD und densitometrische Quantifizierung von FAAH und NAPE-PLD in chromaffinen Zellen des Nebennierenmarks

Die Immunreaktion für TH und NAPE-PLD (Abb. 18.A) bzw. FAAH (Abb. 18.B) sind in chromaffinen Zellen des Nebennierenmarks kolokalisiert. Die Immunreaktion von FAAH (rot) weist ein granuläres Erscheinungsbild im Zytoplasma auf (Abb. 18.B). Die Immunfärbung von NAPE-PLD (rot) ist überwiegend perinukleär lokalisiert (Abb. 18. A). Die Nebennieren der Hamster (Abb.18 C.D) wurden nach Exposition langer

Photoperioden (LD 16:8), sowie nach Adaption an kurzen Photoperioden entnommen. Die optische Dichte der Immunreaktion von FAAH und NAPE-PLD wurde in chromaffinen Zellen des Nebennierenmarks von Hamstern, die unter Langtag- (LD; 16:8) oder unter Kurztag (SD; 8:16)-Bedingungen gehalten wurden, bestimmt. Unter SD zeigt die FAAH-Immunreaktion eine signifikant höhere Intensität (Abb. 18.D). NAPE-PLD Immunreaktion zeigt unter den verschiedenen Photoperioden keine Veränderung (Abb. 18.C).

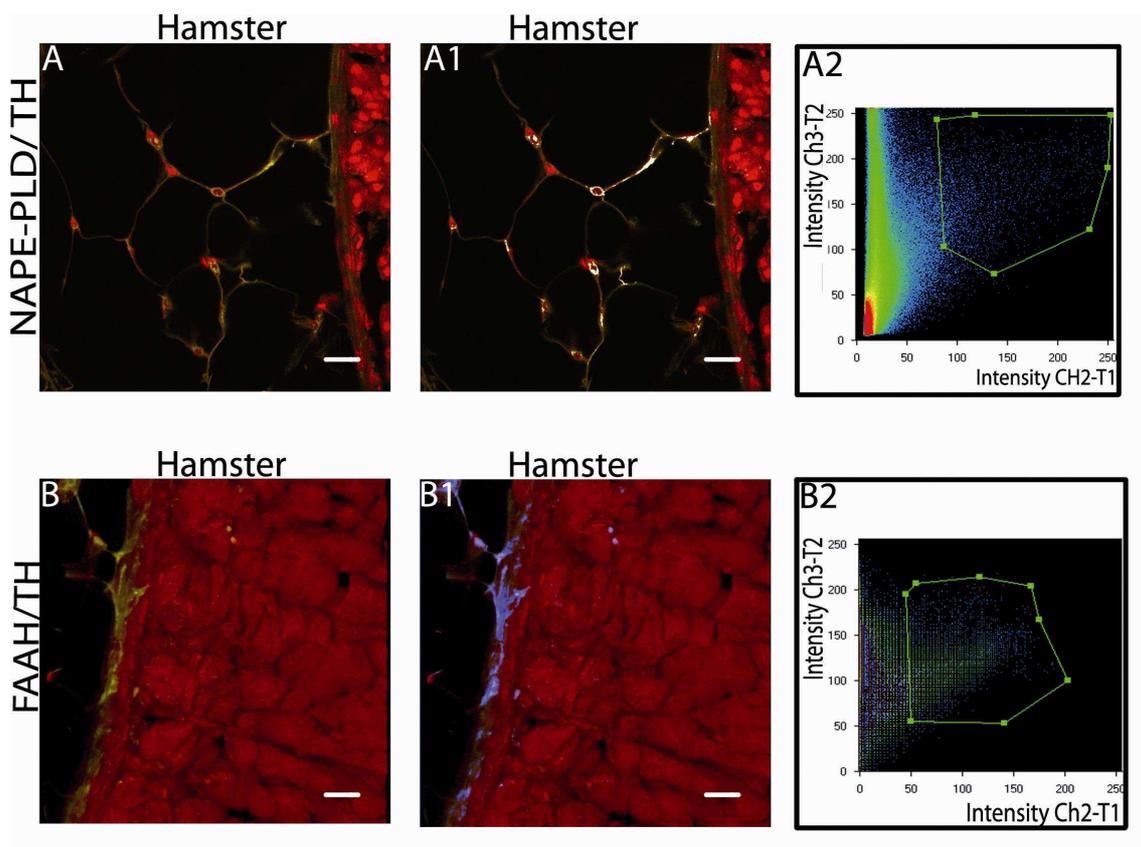


Abb. 19: Immunreaktion für NAPE-PLD und FAAH in der sympathischen Innervation der Nebenniere. Maßstab in A und A1 20 μ m, in B, B1 10 μ m, TH in grün, NAPE-PLD bzw. FAAH in rot dargestellt. Kolokalisation in blau bzw. weiß gezeigt.

3.17 Doppelmarkierung von Tyrosinhydroxylase (TH) und NAPE-PLD oder FAAH in der Nebenniere des Hamsters

Koronale Gewebsschnitte der Nebennieren (Abb. 19.A-B2) wurden simultan für TH und NAPE-PLD markiert. TH-immunreaktive, sympathische Fasern (grün) ziehen durch das Fettgewebe und penetrieren die Organkapsel. Adipozyten sind perikapsulär an ihren Zellkernen zu erkennen (Abb. 19.A1, A2); ihre Zellkörper werden umrahmt von TH- und NAPE-PLD-immunreaktiven (rot), sympathischen Fasern. Eine Kolokalisation von TH und NAPE-PLD ist in weißer Falschfarbe dargestellt. Die Bildaufnahme erfolgte nach einer dreidimensionalen Rekonstruktion (Abb. 19.A, A1). Abb. 19.B-B2 zeigt eine simultane Doppelimmunfärbung für FAAH (rot) und TH (grün). Sympathische Nervenfasern, die eine TH-Immunreaktion (grün) zeigen, penetrieren nach dem Passieren des Kapselfettes die Organkapsel (Abb. 19.B, B1). Die Kolokalisation wird in blau wiedergegeben. Die Bildaufnahme erfolgte nach dreidimensionaler Rekonstruktion.

3.18 Doppelmarkierung von CB-1 und Tyrosinhydroxylase (TH) in der Nebenniere von Hamster und Ratte

Abb.20 A-B2 zeigt eine simultane Doppelimmunfluoreszenz an koronalen Schnitten der Nebenniere. Nach Durchbohren der Organkapsel innervieren TH-immunreaktive, sympathische Fasern (grün) die Nebennierenrinde (Abb. 20 A, A1). Diese sympathischen Fasern weisen eine Immunreaktion für CB-1 auf. Die Kolokalisation von CB-1 und TH ist in blau wiedergegeben (Abb. 20.A1, A2). Es werden Gefäße, Bindegewebe und Zellen der Nebennierenrinde innerviert. Fasciculata- und Glomeruolsazellen weisen eine intensive, zytoplasmatische CB-1-Immunreaktion auf (rot). Die Aufnahme erfolgte nach einer dreidimensionalen Bildrekonstruktion.

Abb.20 B-B2 zeigt koronale Schnitte, an denen eine simultane Doppelmarkierung für CB-1 und TH vorgenommen wurde. TH-positive, sympathische Fasern (Abb. 20.B, B1) innervieren nach der Penetration der Organkapsel die Nebennierenrinde. Die Kolokalisation ist in weißer Falschfarbe dargestellt (Abb. 20.B1, B2). Die Bildaufnahme erfolgte nach dreidimensionaler Rekonstruktion.

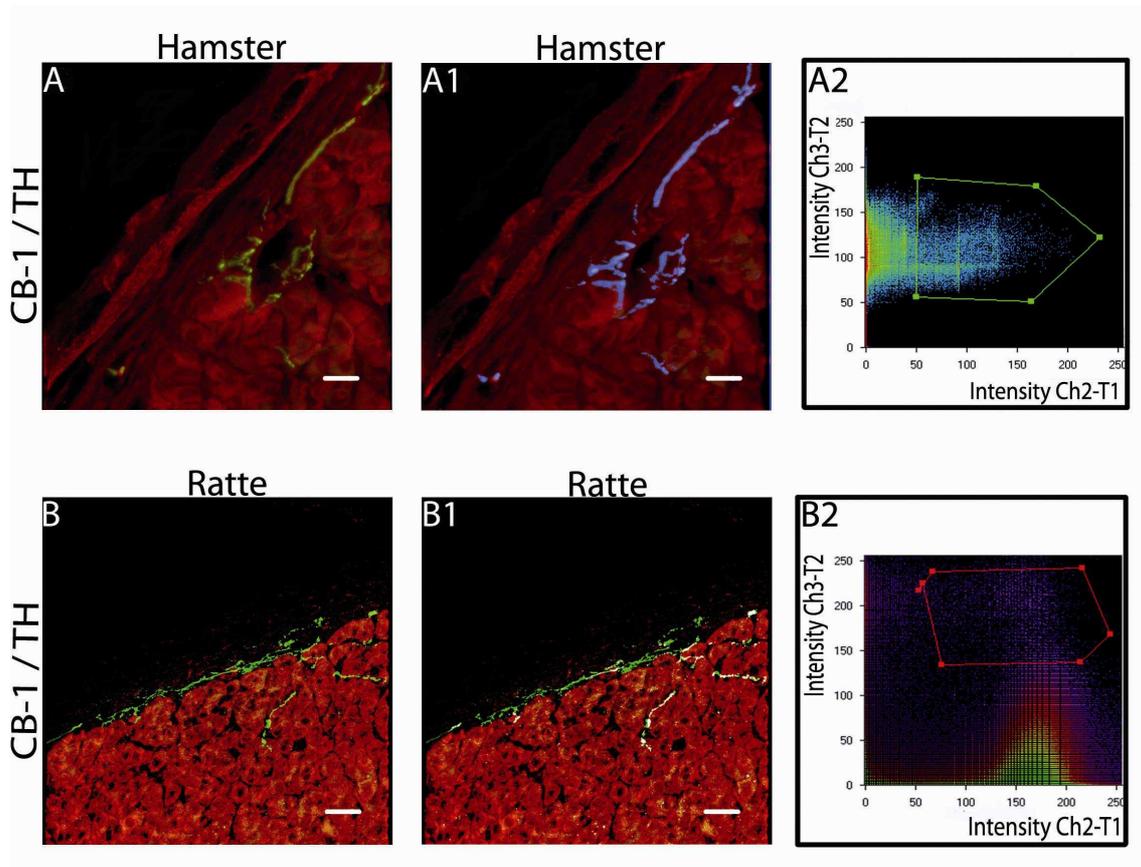


Abb. 20: Immunreaktion für CB-1 in der sympathischen Innervation der Nebenniere von Hamster und Ratte. Maßstab in A, A1 10 μ m und in B, B1 20 μ m. TH ist in grün und CB-1 in rot dargestellt. Kolokalisation in blauer oder weißer Falschfarbe gezeigt.

3.19 Doppelmarkierung von CB-1 und Tyrosinhydroxylase in Nebennieren von Hamstern, Ratten und Maus

Abb.21 A, A1 zeigt koronale Schnitte der Maus-Nebenniere, an denen eine simultane Doppelmarkierung durchgeführt wurde. Die TH-positiven sympathischen Fasern (grün) ziehen vom Kortex in die Nebennierenrinde und bilden dort ein dichtes Nervengeflecht. Es werden Zona glomerulosa, Zona fasciculata (Abb. 21.A, A1) und Zona reticularis (nicht dargestellt) innerviert. Diese TH- immunreaktiven, sympathischen Fasern enthalten auch eine CB-1-Immunreaktion (Abb. 21.A1, A2). Die Aufnahme der Bilder erfolgte nach dreidimensionaler Bildrekonstruktion. Endokrine Zellen der Zona fasciculata und Zona glomerulosa zeigen eine prominente CB-1-Immunreaktion (rot)

(Abb. 21.A, A1). Die chromaffinen Zellen des Nebennierenmarks (Abb. 21.B-D) aller untersuchten Nager (B, Hamster; C, Ratte; D, Maus) zeigen eine Kolokalisation von TH und CB-1-Immunreaktion. Die CB-1 Immunreaktion ist bei allen Nagern im Zytoplasma lokalisiert. Alle chromaffinen Zellen weisen eine vergleichbare Verteilung von CB-1-Immunreaktivität auf. Bei Ratte und Maus zeigen einige chromaffine ein stärkeres CB-1-Immunsignal. besonders immunreaktiv für CB-1. Diese Immunreaktion ist überwiegend zytoplasmatisch. Die Zona reticularis der Nebennieren zeigt eine schwache CB-1 Immunfärbung (Abb. 21.A, B, C).

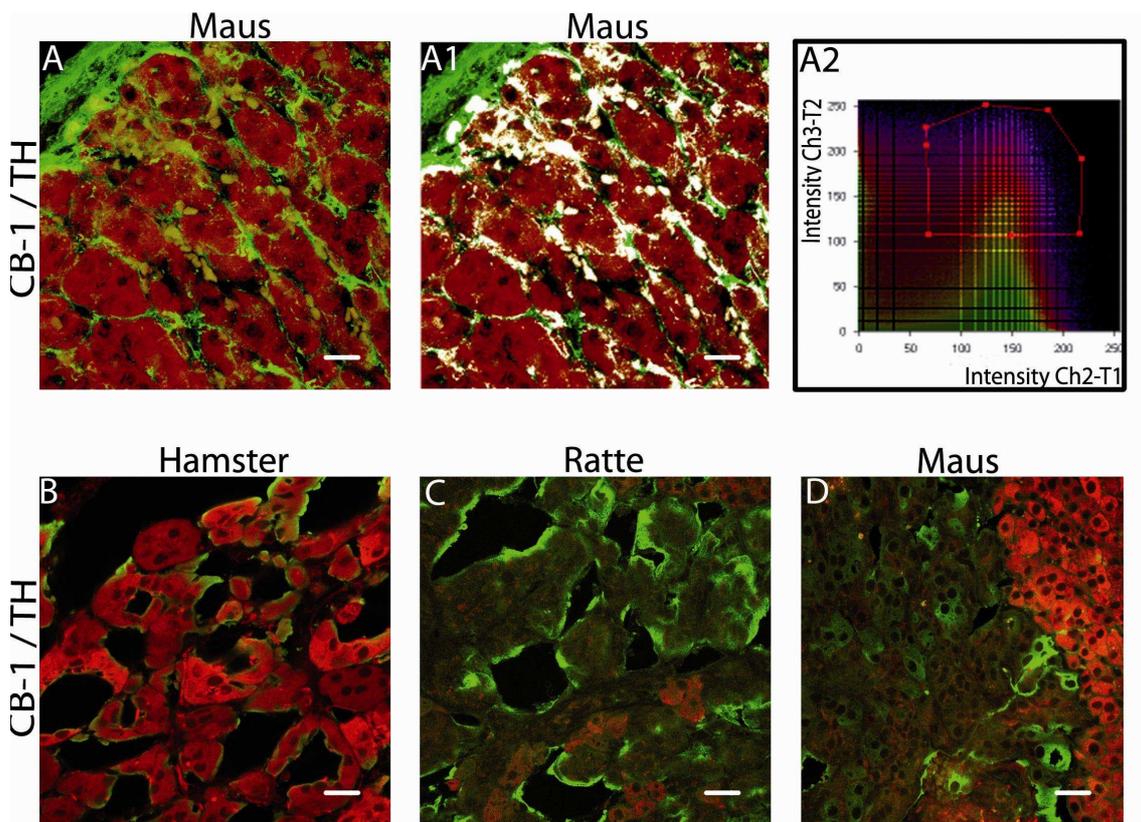


Abb. 21: CB-1 in der sympathischen Innervation in der ZG und der ZF der Maus und in chromaffinen Zellen aller Nager. Maßstab in A, A1 entspricht 10µm und in B-D 20 µm; TH ist in grün und CB-1 in rot und Kolokalisation in weiß dargestellt.

3.19.1 Extraadrenale sympathische Innervation der Nebennierenrinde

Ausgehend von der Organkapsel ziehen sympathische Fasern, die durch TH-Immunreaktion (grün) dargestellt sind, in Richtung Nebennierenmark (*). Diese sympathischen Nervenfasern bildet um Zellen der Nebennierenrinde ein dichtes Nervenfasergeflecht, welches einem „Bienenwabennmuster“ ähnelt (Abb.22 A, A1, B, B1). Zur besseren Orientierung ist die CB-1-Immunreaktion in rot wiedergegeben worden.

3.19.2 Intradrenale sympathische Innervation der Nebennierenrinde

Sowohl subkapsulär (Abb. 22.A, A1) als auch in der Nebennierenrinde (Pfeilspitzen) befinden sich Zellen, die eine TH-positive Immunfärbung aufweisen.

Die Morphologie dieser Zellen entspricht chromaffinen Zellen des Nebennierenmarks (*). Wie in der konfokalen Bildgebung (Abb. 22.C, C1) zu sehen ist, befinden sich zwischen Mark und Außenzone der Nebennierenrinde Inseln solcher chromaffiner Zellen (Pfeilspitzen).

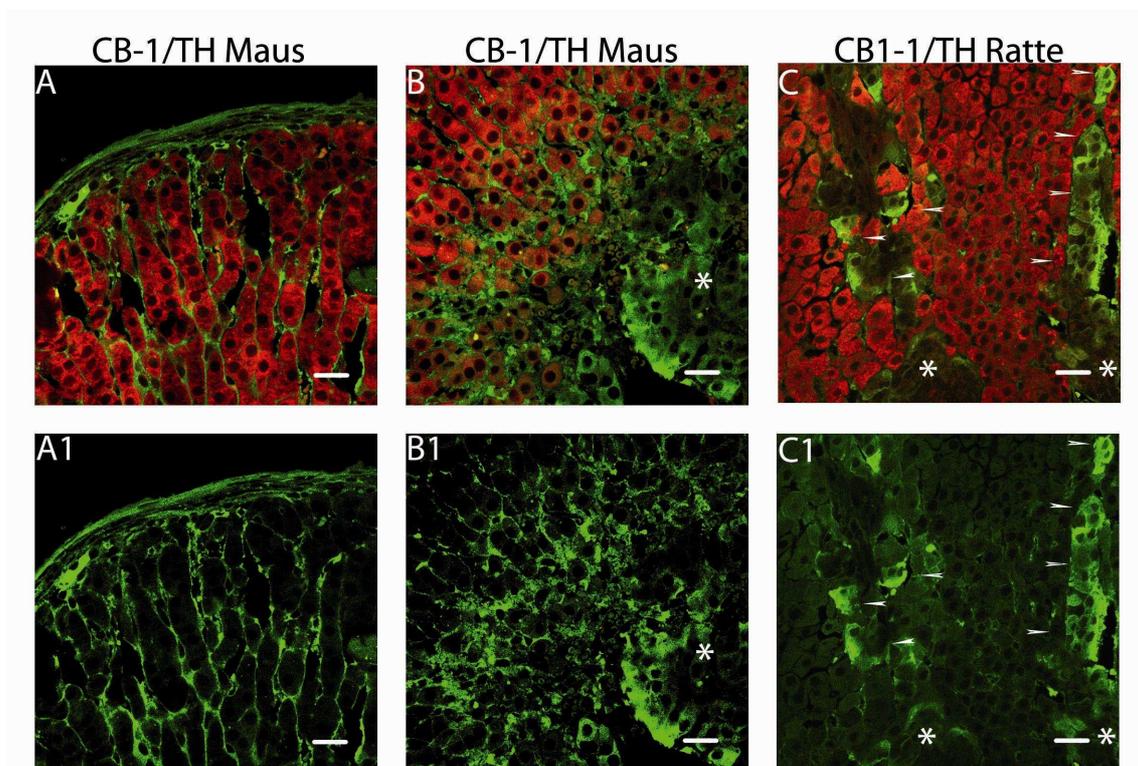


Abb. 22: Besonderheiten der sympathischen Innervation der Nebenniere bei Nagern. Maßstab entspricht in allen Bildern 20 μm , TH ist in grün und CB-1 in rot dargestellt; * Nebennierenmark.

4 Diskussion

4.1 Ein Endocannabinoidsystem in der Pars tuberalis der Ratte

Die Pars tuberalis ist eine wichtige Zielstruktur des photoneuroendokrinen Systems, und adaptiert in Abhängigkeit zur Photoperiode die endokrinen Vorgänge der Säugetiere. Das Neurohormon Melatonin, welches während der Nacht die höchsten Konzentrationen aufweist, koordiniert die rhythmische Expression der Uhrgene (Ross and Morgan 2002; Stirling et al. 2001) und beeinflusst über die Synchronisation der Uhrgene die zeitliche Organisation der Expression vielfältiger Gene, die an spezifischen Zellfunktionen beteiligt sind (Okamura 2007). Diese zeitliche Organisation der physiologischen Vorgänge wird über die sogenannten clock-controlled-genes (ccg) gewährleistet. Die ccgs können DNA-bindende D-box-, E-box- oder RORE-Elemente enthalten, an denen Uhrenproteine binden und die Expression anderer Gene auslösen (Aizawa et al. 2007; Drolet et al. 1991; Ono et al. 2008; Yasuo et al. 2009).

Um zu erforschen, ob auf- und abbauende Enzyme zur AEA-Biosynthese in der Pars tuberalis vorkommen, wurden mittels immunhistochemischer Untersuchungen die Enzyme NAPE-PLD, FAAH und COX-2 nachgewiesen. Als Komponente der lipidergen Signaltransduktion wurde der CB1-Rezeptor ebenso mit immunhistochemischen Methoden untersucht. Darüber hinaus wurden die oben genannten Enzyme und der CB1-Rezeptor in der Pars tuberalis auf eine zeitliche Organisation unter gleichen Licht- und Dunkelzyklen (LD 12:12) analysiert.

Die Ergebnisse der Untersuchung zeigen, dass die endokrinen Zellen der Pars tuberalis eine Immunreaktivität für NAPE-PLD, FAAH, COX-2, sowie für CB-1 Rezeptoren aufweisen (Abb. 2-5). Die intrazelluläre Immunfärbung bezüglich der NAPE-PLD ist überwiegend perinukleär, während das Zytoplasma eine schwache Intensität der Färbung zeigt. Diese Lokalisation der NAPE-PLD Immunreaktion steht im Einklang mit anderen Studien, die an neuronalem und endokrinen Gewebe durchgeführt wurden (Cristino et al. 2006; Egertova et al. 2003; Egertova et al. 2008; Starowicz et al. 2008). Eine elektronenmikroskopische Untersuchung bezüglich der subzellulären Verteilung, lokalisierte NAPE-PLD überwiegend membran-gebunden am glatten endoplasmatischen Retikulum (gER). Die direkte Nachbarschaft zum glatten endoplasmatischen Retikulum gewährleistet der kalzium-sensitiven NAPE-PLD

einerseits einen direkten Zugang zum intrazellulären Kalziumspeicher und andererseits zu Glykophospholipiden, die im gER synthetisiert werden. Diese Glykophospholipide sind essentielle Substrate der Anandamidbiosynthese (Nyilas et al. 2008). Unter konstantem Licht-Dunkel-Zyklus (LD 12:12) nimmt zum ZT 00, also zu Beginn der Lichtphase, die Intensität der Immunfärbung von NAPE-PLD dramatisch zu. Das könnte auf eine erhöhte Biosynthese von NAPE-PLD zu diesem Zeitpunkt hinweisen. Unter gleichen Bedingungen verändert sich die Immunreaktivität von NAPE-PLD in Pinealozyten signifikant über drei Zeitpunkte (Koch et al. 2008).

Die immunhistochemische Markierung von FAAH in Zellen der PT entspricht der NAPE-PLD-Verteilung, wobei die perinukleäre Immunreaktion etwas schwächer ausfällt. Die intrazelluläre Lokalisation der FAAH in der PT bestätigt vorherige immunhistochemische und elektronenmikroskopische Untersuchungen an neuronalem Gewebe, die eine Assoziation mit der zytoplasmatischen Membranseite des endoplasmatischen Retikulum (47,2-49,8%) und mit der Außenmembran der Mitochondrien (15,8-37,4%) sowie eine Integration in die Plasmamembran (11,9-23,7%) offenbarten (Gulyas et al. 2004). Dabei ermöglicht eine hydrophobe Kappe des FAAH-Proteins mit einer Helix-Turn-Helix-Struktur ($\alpha 18$ und $\alpha 19$, Aminosäuren 410-438), die durch eine Analyse der Röntgenkristallstruktur gezeigt werden konnte, die Integration in Zellmembranen (McKinney and Cravatt 2005). Überraschenderweise befindet sich ein nicht zu unterschätzender Anteil von FAAH frei im Zytosol (11,9-23,7%) (Gulyas et al. 2004). Im Verlauf der Photoperiode (LD 12:12) zeigt die Immunreaktion von FAAH weder in der PT noch in den Pinealozyten eine Variation.

Die Quantifizierung der Immunreaktion gibt bestenfalls einen Hinweis auf die Proteinmenge im Gewebe bzw. in der Zelle. Andere Parameter wie z.B. die Aktivität des Enzyms können nicht erfasst werden. Die Aktivität der FAAH, kann z.B. durch hormonelle Faktoren beeinflusst werden (Maccarrone et al. 2003a; Maccarrone et al. 2003b; Maccarrone et al. 2003c; Maccarrone et al. 2005; Maccarrone et al. 2004; Rossi et al. 2007). Beispielsweise erhöht das gonadotrophe Hormon Follitropin (Follikel-Stimulierendes-Hormon, FSH) über spezifische FSH-Rezeptoren (FSH-R) die Aktivität der FAAH und zum anderen induziert es eine erhöhte Transkription und Translation der FAAH. Eine Zunahme der Aktivität des FAAH-Proteins erfolgt über FSHR/cAMP/Proteinkinase A (PKA)-Signaltransduktionskaskade, bei welcher die PKA

die FAAH durch Phosphorylierung aktiviert. Andererseits aktiviert FSH über den Phosphatidyl-3-kinase-Signalweg die Cytochrom-P450-Aromatase (ARO), die irreversibel Androgene zu Östrogen umwandelt. In der Promoterregion des Faah-Gens befindet sich ein Östrogen-Response-Element, das bei Anstieg von Östrogen zu erhöhten Faah-Expressionsrate führt. Neben dem Hauptweg über Östrogen könnte auch der PKA/P-CREB-Signalkaskade die Faah-Expression steuern (Rossi et al. 2007).

Allein die Expression von Östrogenrezeptoren kann die Faah-Transkription unterdrücken, ohne das Östrogen vorhanden ist. Ebenso hemmt die Expression von Glukokortikoidrezeptoren die Faah-Expressionsrate (Waleh et al. 2002).

Im Gegensatz zur FAAH zeigt COX-2 während der Photoperiode eine signifikante Veränderung der Immunreaktion zum ZT 12 und ZT 18, also zu Beginn und in der Mitte der subjektiven Nacht, die durch erhöhte Melatoninkonzentration gekennzeichnet ist. Die Pars tuberalis als Effektor des PNS steht unter besonderem endokrinen Einfluss des Melatonins. Das Neurohormon Melatonin induziert die COX-2-Biosynthese und aktiviert das COX2-Prostaglandinsystem (COX-2-PG). Entsprechend geht eine Entfernung des Pinealorgans mit einer Deaktivierung des COX-2-Prostaglandinsystems einher (Konturek et al. 2008).

Die CB1-Immunreaktivität variiert über die Photoperiode (LD 12:12). Diese photoperiodische Variation der CB-1 Immunfärbung könnte eine Desensitisierung der CB1-Rezeptoren andeuten, die durch eine photoperiodische Veränderung der Endocannabinoidkonzentration verursacht sein könnte.

Eine Desensitisierung bzw. Rezeptorinaktivierung stellt einen Sicherheitsmechanismus der Zelle dar. Die Desensitisierung kann akut mittels einer Internalisierung von Rezeptoren oder chronisch durch eine Downregulation mit konsekutiver Abnahme der Rezeptordichte einhergehen (Ferguson 2001). Grundsätzlich unterscheiden sich die Mechanismen zur Regulation und Adaption der G-protein-gekoppelten Rezeptoren unter akuter und chronischer Stimulation durch Liganden. Jedoch zeigen G-Protein-gekoppelte Rezeptoren unter chronischer und akuter Stimulation eine Abnahme der Rezeptordichte, die z.B. durch immunhistochemische Methoden analysiert werden kann (Bernard et al. 2006). Die CB1-Immunreaktion korreliert über die gesamte

Photoperiode negativ mit der NAPE-PLD Immunreaktivität. Eine streng-negative Korrelation ist zu den Zeitpunkten ZT 00, ZT 12, und ZT 18 nachweisbar. Diese Befunde deuten daraufhin, dass eine vermehrte Anandamidbiosynthese zu einer akuten Desensibilisierung der CB1-Rezeptoren geführt haben könnte.

Die akute Rezeptorinaktivierung ist ein allgemeingültiges Phänomen der G-Proteingekoppelten Serpentinrezeptoren. Die G-Proteine sind an Signaltransduktionsmechanismen von mehr als 1000 unterschiedlichen Rezeptoren beteiligt (Farfel et al. 1999; Iiri et al. 1998). Die heterotrimeren G-Proteine sind zusammengesetzt aus einer monomeren α -Untereinheit, welche an ein β - γ -Dimer gebunden ist. Jede Untereinheit wird durch eine separate Gensequenz kodiert. Gegegenwärtig sind 16 α -, 5 β - und 12 γ -Untereinheiten bekannt (Oldham and Hamm 2008).

Die unterschiedlichen Untertypen der G-Proteine, die über die α -Untereinheit benannt werden (wie G_s, G_q, G_i, G_t...), regulieren verschiedene intrazellulären Effektoren, z.B. die Adenylat-Cyclase, Enzyme, Ionenkanäle usw. Von der Ligandenbindung bis hin zur Aktivierung der Effektoren sind es also drei wesentliche Schritte, die mehr als tausend mögliche Signalwege der Zelle aktivieren können (Barak et al. 2003a; Barak et al. 2003b).

Die Desensibilisierung der Rezeptoren erscheint biologisch vorteilhaft, da die Deaktivierung direkt am proximalen Ort der Signaltransduktion ansetzt. Eine Hemmung der Signaltransduktion in distalen Abschnitten der Kaskade setzt andere, divergente biochemische Schritte voraus (Barak et al. 2003b). Es ist also durchaus möglich, dass die Rezeptordichte die Aktivität der Zelle bestimmt, und z.B. bei Neuronen die Neurotransmitterfreisetzung moduliert (Bernard et al. 2003).

In vitro Studien an embryonalen, humanen Nierenzellen (HEK 293) haben gezeigt, dass sowohl THC als auch der CB-Rezeptor-Agonist WIN 55,212-2 eine akute Desensibilisierung von CB-1-Rezeptoren bewirken. Anandamid und THC bewirken in primären Neuronenkulturen eine höhere Desensibilisierung als synthetische Agonisten, wie WIN 55,212-2, CP 55940 oder 2-AG (Wu et al. 2008).

An der Internalisierung sollen Caveolae oder Clathrin, beta-Arrestin-2 und GRK3 beteiligt sein. Nach der Aktivierung durch Liganden phosphoryliert GRK3 Serin-Reste der CB1-Rezeptoren an Positionen 426 und 430 und β -Arrestin-2 induziert eine

Abkopplung von gekoppelten G-Proteinen, welche die Internalisierung des Rezeptors einleitet (Daigle et al. 2008; Jin et al. 1999).

Da die CB-1-Rezeptordichte in der Pars tuberalis zu jedem Zeitpunkt in negativer Korrelation zur NAPE-PLD Immunreaktivität steht, ist anzunehmen, dass sich die Endocannabinoidkonzentration in umgekehrter Weise zur CB-1 Dichte verhält. D.h. zu den Zeitpunkten ZT00 und ZT 12 befinden sich hohe und zu den Zeitpunkten ZT 06 und ZT 18 niedrige Konzentrationen der Endocannabinoide in der Pars tuberalis.

In Bezug zur photoperiodischen Variation des CB1-Proteins zeigen vorhergehende Studien vergleichbare Ergebnisse. Auffällig ist der Zeitpunkt ZT12, also Beginn der Dunkelphase, an dem in Pinealozyten und Pars tuberalis die niedrigste CB-1-Immunoreaktivität nachweisbar ist (Koch et al. 2008). Auch in der Pons der Ratte zeigen die CB1-mRNA und CB1-Proteine photoperiodisch-abhängige Variationen (Martinez-Vargas et al. 2003).

Unter vergleichbaren photoperiodischen Bedingungen sind AEA- und 2-AG-Konzentrationen in unterschiedlichen Regionen des zentralen Nervensystems im Liquor cerebrospinalis ermittelt worden. Beide Endocannabinoide zeigen eine photoperiodische Variation. Diese Veränderungen von AEA und 2-AG sind aber in jeder untersuchten Struktur unterschiedlich. Beispielsweise sind die höchsten AEA-Konzentrationen im Liquor zu Beginn der Nacht zu verzeichnen, während im Pons mit Anbeginn der Nacht die AEA-Konzentrationen niedrig sind, danach aber mit einer Plateauphase von mehr als drei Stunden relativ stabil bleiben und zu Beginn der Lichtphase wieder abnehmen. (Murillo-Rodriguez et al. 2006; Valenti et al. 2004) .

Da die Endocannabinoide in diversen neuronalen, neuroendokrinen und autonomen Signaltransmissionen involviert sind und diese vom photoneuroendokrinen System ebenfalls beeinflusst werden, scheint die gewebs- bzw. zellspezifische, sowie die unterschiedliche zeitliche Regulation des Endocannabinoidsystem ihre physiologische Berechtigung zu haben. So zeigt der vesikuläre Glutamattransporter photoperiodische Veränderungen, die mit einer hohen Aktivität während der Lichtperiode und dem Anfang der Nachtphase verbunden sind. Diese rhythmische Aktivität des vesikulären Glutamat-Transportes kommt bei Per2-Knock-Out-Mäusen zum Stillstand (Darna et al. 2009; Yelamanchili et al. 2006). Bemerkenswerterweise spielen Endocannabinoide u.a. für die glutamaterge Signaltransmission eine besondere Rolle. Zahlreiche

Untersuchungen an neokortikalen, hippocampalen, hypothalamischen und cerebellären Neuronen belegen, dass Endocannabinoide, wie z.B. 2-AG an der retrograden Hemmung der Glutamatfreisetzung beteiligt sind (Katona and Freund 2008). Glutamat und 2-AG spielen u.a. im Hippocampus bezüglich der synaptischen Plastizität eine wichtige Rolle. Interessanterweise zeigen sowohl 2-AG als auch elektrophysiologische Parameter der synaptischen Regulierung, wie z.B. Spike-Potentiale der Langzeit-Potenzierung (long-term potentiation, LTP) im Hippocampus Intensitätsunterschiede zwischen Tag und Nacht (Barnes et al. 1977; Chaudhury et al. 2005; Citri and Malenka 2008; Raghavan et al. 1999; Slanina et al. 2005; Valenti et al. 2004).

4.1.1 Funktionelle Implikation der Endocannabinoide in der Pars tuberalis der Ratte

Die zweite Fragestellung der Dissertation beschäftigt sich u.a. mit der Kolokalisation des Endocannabinoidsystems in definierte Zellen des Hypophysenvorderlappens z.B. lactotrophen Zellen.

Die Kolokalisations-Analyse der lactotrophen Zellen offenbart einen Überlappungsquotienten von $5,4 \pm 2,5\%$ für NAPE-PLD und Prolaktin, von $6 \pm 3\%$ für Prolaktin und FAAH, sowie von $11,4 \pm 3\%$ für Abh4 und Prolaktin.

Immunhistochemische und molekularbiologische Untersuchungen vorheriger Studien an der Pars distalis der Adenohypophyse zeigen, dass CB1-mRNA in der Adenohypophyse exprimiert wird und CB-1 mit Prolaktin kolokalisiert ist (Gonzalez et al. 1999). Eine in-vivo Applikation von Endocannabinoiden, wie AEA und 2-AG, geht mit einer Abnahme von Prolaktin im Serum bzw. Plasma der untersuchten Tiere einher (Fernandez-Ruiz et al. 1997; Olah et al. 2008).

Ein hypothetisches Model wäre, dass AEA in Pars tuberalis gebildet wird und die Prolaktinfreisetzung der lactotrophen Zellen der Pars distalis hemmt. Hierzu müsste allerdings eine weitestgehende Überlappung von FAAH und Prolaktin vorhanden sein. Aber FAAH und Prolaktin sind nur in 6% der lactotrophen Zellen kolokalisiert. Daher scheint AEA nicht der endokrinen/parakrinen Kommunikation zwischen Zellen der Pars tuberalis und lactotrophen Zellen der Pars distalis zu dienen. Vielmehr könnte AEA, welches in lactotrophen Zellen eher über Nebenwege (Abh4) gebildet wird, an der

autokrinen Regulation der Prolaktinfreisetzung beteiligt sein (Olah et al. 2008; Simon and Cravatt 2006). Anandamid hemmt über CB1-Rezeptoren der lactotrophen Zellen die Prolaktinfreisetzung. In die Signaltransduktionsmechanismen sind $G_{i/o}$ -Proteine, erniedrigte cAMP-Konzentration und Hemmung der spannungsabhängigen Kalziumkanäle von N- und P-Typ einbezogen (Ho et al. 2000; Olah et al. 2008; Scorticati et al. 2003).

Das Endocannabinoid Anandamid scheint die Prolaktinfreisetzung aber auch indirekt im mediobasalen Hypothalamus über Dopamin zu modulieren (Scorticati et al. 2003). Ein wesentlicher hypothalamischer Einflussfaktor, der sowohl bei Mensch als auch bei Nagetieren die Prolaktinsekretion moduliert, ist nämlich Dopamin. Das Katecholamin Dopamin wird u.a. von drei unterschiedlichen Neuronengruppen im mediobasalen Hypothalamus gebildet. Die erste Gruppe bildet das sog. tuberoinfundibuläre dopaminerge System (TIDA), die zweite Neuronengruppe wird von den tuberohypophysialen Neuronen gebildet (THDA). Die Perikaryen beider Neuronengruppen befindet sich im Ncl. arcuatus, wobei die THDA-Perikaryen im rostralen Bereich angeordnet sind. Die dritte Neuronengruppe, die periventriculäre Neuronengruppe (PHDA), ist im Ncl. Periventricularis lokalisiert. Die TIDA-Neurone befindet sich im Ncl. arcuatus und projizieren mit ihren Axonen zur Außenzone der Eminentia mediana. Von Axonterminalen wird Dopamin ins Pfortadersystem der Adenohypophyse abgegeben und mit dem Blut zu lactotrophen Zellen der Pars distalis transportiert (Ben-Jonathan et al. 2008).

Hingegen wird das Dopamin der THDA- und PHDA-Neurone entweder über kurze Portalgefäße von der Neurohypophyse aus transportiert oder gelangt per diffusionem durch die Pars intermedia zu lactotrophen Zellen der Hypophyse. Dopamin aktiviert an lactotrophen Zellen der Adenohypophyse den G-Protein-gekoppelten Dopamin-2-Rezeptor (D2R). Die Signaltransduktion an D2R ist gekoppelt an die $G_{i/o}$ α -Untereinheit, welche durch Modulation weiterer intrazellulärer Messengersysteme die Prolaktinfreisetzung hemmt (Ben-Jonathan et al. 2008).

Die Aktivität der dopaminergen Neurone, wie z.B. der TIDA-Neurone, steht unter der inhibitorischen Kontrolle von GABAergen Interneuronen des Ncl. arcuatus (Lee and Pan 2001). Die intracerebroventrikuläre Applikation von Anandamid senkt die GABAerge Signaltransmission. Entsprechend kommt es zu einer Erhöhung der

Dopaminkonzentration im mediobasalen Hypothalamus. Diese hohe Dopaminkonzentration korreliert mit einer konsekutiven Hemmung der Prolaktinsekretion (Ho et al. 2000; Olah et al. 2008; Scorticati et al. 2003).

Inwieweit die Endocannabinoide der Pars tuberalis als Tuberaline in Frage kommen, kann die vorliegende Arbeit nicht beantworten. Dazu müssten Nagetiere mit saisonal-abhängigem Fortpflanzungsverhalten unter Langtag- (LD 16:8) und Kurztag-Bedingungen (LD 8:16) untersucht werden. Außerdem geht die heute gängige Hypothese davon aus, dass es sich bei dem Tuberalin um ein stimulierendes Sekretionsprodukt der Pars tuberalis handelt, welches die lactotrophen Zellen der Pars distalis zur Prolaktinsekretion anregt. Melatonin soll sich hemmend auf diesen Faktor auswirken, so dass die geringe Melatoninkonzentration während der Sommerzeit (short-days) zu einer erhöhten Sekretion des Tuberalins führen. Hieraus resultiert eine höhere Prolaktinkonzentration, die bei saisonal-abhängigen Tieren das Reproduktionsverhalten bestimmt (Lincoln 2002; Lincoln and Clarke 2002; Morgan 2000; Morgan and Williams 1996).

Jedoch zeigen meine Daten, dass Komponenten des Endocannabinoidsystems in der Pars tuberalis im Verlauf der Photoperiode variieren. So weist die CB-1-Immunoreaktivität eine periodische Schwankung während eines 24h-Zyklus auf. Unter gleichen photoperiodischen Bedingungen wie diese Experimente, zeigen männliche Ratten einen Tiefpunkt der Prolaktinkonzentration bei ZT 06 und die höchsten Konzentration bei ZT 18 (Claustrat et al. 2008), zu diesen Zeitpunkten ergibt sich eine signifikante Veränderung der CB1-Expression.

4.2 Die hypothalamo-hypophysär-adrenale-Achse (HPA-Achse) beherbergt ein Endocannabinoidsystem

Die HPA-Achse ist ein Effektor des photoneuroendokrinen Systems und enthält neurosekretorische Neurone des PVNs, welche das Liberin CRF und das Neuropeptid AVP zur Stimulation der ACTH-Sekretion freisetzen. ACTH stimuliert endokrin die Glukokortikoidfreisetzung in der Zona fasciculata der Nebenniere. Die höchsten Konzentrationen des Kortisols/Kortikosterons sind zu Beginn der aktiven Phasen der Säuger zu verzeichnen (bei nachtaktiven Tieren während der Nacht und bei tagaktiven Tieren während des Tages) (Kalsbeek et al. 1996a; Kalsbeek et al. 1996b).

Mit der dritten Fragestellung meiner Forschungsarbeit sollten durch immunhistochemische Verfahren die Eminentia mediana, Pars distalis und Nebennieren auf das Vorhandensein von auf- und abbauenden Enzymen der Anandamidbiosynthese sowie CB-1 Rezeptoren untersucht werden.

Die Eminentia mediana wird anatomisch in drei Zonen gegliedert: die innere Zone, die Außenzone und die Pars tuberalis. Die innere Zone ist aus neuralem und glialem Gewebe zusammengesetzt. Durch diese Zone ziehen die neurosekretorischen Bahnen zum Hypophysenhinterlappen. Die Außenzone der Eminentia mediana zeigt eine radiale Anordnung der Tanyzytenfortsätze, Nervenfasern und Blutgefäße. Nervenendigungen der hypophysiotrophen Neurone befinden sich in der Außen- und Innenzone in direkter Nachbarschaft zu einem gefensterten Kapillarbett, das aus der A. hypophysialis superior gespeist wird. Die Außenzone der Eminentia mediana ist durch eine reiche Vaskularisierung gekennzeichnet. Die Kapillaren der Eminentia mediana drainieren das Blut in ein zweites sinusoidales Kapillarbett der Adenohypophyse. Dieser portaler Kreislauf der Hypophyse verbindet neurosekretorische Zentren im Gehirn mit der Hypophyse und erlaubt dem photoneuroendokrinen System, endokrine Vorgänge zu koordinieren (Baroncini et al. 2007; Prevot et al. 2000; Unsicker 1996).

Diese Arbeit bestätigt immunhistochemische Daten vorheriger Studien, dass die Außenzone der Eminentia mediana, an der Axone neurosekretorischer Neurone enden, eine CB1- Immunreaktivität aufweist. Jedoch konnte diese CB-1-Immunreaktion bisher

keinem definiertem Axontyp zugeordnet werden (Wittmann et al. 2007). Durch eine Kolokalisations-Analyse konnte eine Überlappung der CB1-Immunreaktivität mit dem Steuerhormon CRF von $79 \pm 2,1\%$ festgestellt werden.

Desweiteren ergab die Untersuchung der kortikotrophen Zellen der Pars distalis eine 46%-ige ($\pm 2\%$) Überlappung von ACTH mit FAAH, eine 5,4%-ige ($\pm 2,5\%$) Überlappung von ACTH mit NAPE-PLD, sowie eine 3,1%-ige ($\pm 0,4\%$) Kolokalisation von ACTH und Abh4. Die Lokalisation der Immunreaktion von FAAH und NAPE-PLD entspricht immunhistochemischen Daten, die an Neuronen und endokrinen Zellen erhoben wurden. Entsprechend weist NAPE-PLD eine prominente, perinukleäre Färbung auf, während FAAH im gesamten Zytoplasma gleichmäßig verteilt ist. (Cristino et al. 2006; Egertova et al. 2008; Starowicz et al. 2008). Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen demonstrierten eine Kolokalisation von CB1 mit ACTH, sowie eine Koexpression von CB-1- und CRF-1-Rezeptoren (Hermann and Lutz 2005; Pagotto et al. 2001).

Bei Ratte und Maus zeigen die Glukokortikoid produzierenden Zellen der Zona fasciculata eine prominente CB1-Immunreaktivität, während die Zellen der Zona fasciculata des Hamsters eine schwache Immunreaktivität aufweisen. Jedoch konnten beim Hamster in der Zona fasciculata NAPE-PLD und FAAH immunhistochemisch nachgewiesen werden. Zudem sind schon während der Embryonalentwicklung der Nagetiere CB1-mRNA und CB1-Protein in der Nebenniere nachzuweisen (Buckley et al. 1998). Auch Studien an humanen Geweben zeigen, dass die Nebenniere sowohl CB1- als auch CB-2-Rezeptoren besitzt (Galiegue et al. 1995). Eine Massenspektrometrische Analyse der Nebennieren von Mäusen zeigt eine deutlich höhere AEA Konzentration (ca. 80-100 pmol/g) im Vergleich zu 2-AG (ca. 4-8 pmol/g) (Matias et al. 2008).

Bei der Untersuchung von Nebennieren der Nagetiere ergab sich ein interessanter Nebenbefund. Die Zona glomerulosa erscheint bei allen Nagern in der Immunfärbung besonders prominent in Bezug auf die untersuchten Komponenten des Endocannabinoidsystems.

4.2.1 Funktionelle Implikation des Endocannabinoidsystems in der HPA-Achse

Aus einer Reihe von Studien wird ersichtlich, dass eine systemische Anwendung von Cannabinoiden stimulierend auf die HPA-Achse wirkt. Sowohl in Tierversuchen als auch bei Versuchspersonen geht eine exogene Applikation von THC oder das Rauchen von Marijuana mit einer erhöhten Plasmakonzentration von ACTH und Kortisol einher. Die erhöhten Konzentrationen von ACTH und Glukokortikoiden waren erst nach 30-60 min Verzögerung festzustellen. Nachfolgende Studien zeigten einen schnellen Anstieg von ACTH und Glukokortikoiden, der innerhalb von 20 Minuten eintrat. Die gleiche stimulierende Wirkung von THC auf ACTH war auch nach einer intraventrikulären Applikation zu verzeichnen (Murphy et al. 1998).

Eine intraperitoneale Applikation von AEA und die nachfolgende immunhistochemische Untersuchung der parvozellulären Neurone des Ncl. paraventricularis der Ratte zeigte eine deutliche Zunahme der FOS-Immunreaktivität. Innerhalb von 90 min. erreichten Kortikosteron und ACTH die Höchstkonzentration. Diese Reaktionen der HPA-Achse waren jedoch nach Applikation eines CB1-Antagonisten nicht reversibel (Wenger et al. 1997).

Jedoch sind die Daten einer systemischen Applikation von exogenen oder endogenen Cannabinoiden schwierig zu interpretieren. Das Endocannabinoid Anandamid zeigt hinsichtlich der zellphysiologischen Wirkung dosisabhängige, biphasische Effekte. In einer niedrigen Konzentration, wie sie in der eben erwähnten Studie eingesetzt wurde, zeigt das Anadamid eher einen stimulierenden Effekt (Sulcova et al. 1998).

Bei dem Phytocannabinoid THC scheinen Dosiseffekte keine wesentliche Rolle zu spielen. Das lipophile THC gelangt nach systemischer Applikation (intravenös) über die Bluthirnschranke ins Zentralnervensystem. Es verändert dort den extrazellulären Neurotransmitterhaushalt. Dabei kommt es zu einer Zunahme der Glutamat- und Dopaminkonzentration und einer Konzentrationsabnahme von GABA. Erstaunlicherweise war die Applikation eines CB1-Antagonisten nicht mit einer Umkehrung des THC-Effektes auf die Neurotransmitter verbunden (Pistis et al. 2002; Sulcova et al. 1998).

In einer nachfolgenden Studie konnte gezeigt werden, dass THC intracerebroventrikulär appliziert mit einer Erhöhung der Kortikosteron- und ACTH-Konzentration im Plasma

verbunden war. Ferner untersuchten die Autoren dieser Studie die alleinige Wirkung des CB1-Antagonisten (SR-141716A). Unvorhergesehen stellte sich heraus, dass der alleinige Einsatz des Antagonisten auch mit einer Zunahme von ACTH und Kortikosteron verbunden war (Manzanares et al. 1999).

Durch die systemische Anwendung von THC verschieben sich also die extrazellulären Konzentrationen der Neurotransmitter wie Glutamat und GABA in umgekehrten Zusammenhang. Diese Neurotransmitter sind u.a. Signalmoleküle der afferenten Innervation der Neurone im Ncl. paraventricularis. Daher ist sehr wahrscheinlich, dass die Erhöhung von Glutamat und die Abnahme von GABA nach systemischer Applikation von Cannabinoiden zu einer Überaktivität der HPA-Achse führen (Wittmann et al. 2005). Hinzukommt, dass der Einsatz des CB1-Antagonisten eine negativ modulierende Wirkung der Endocannabinoide auf die HPA-Achse offenbart (Manzanares et al. 1999).

Ergebnisse neuester Studien unterstützen die Annahme, dass Endocannabinoide generell-hemmend auf die Aktivität der HPA-Achse wirken. Experimente an CB1-Knock-Out-Mäusen (CB-1-KO) bestätigen diese Annahme. Beim Fehlen der CB-1-Signaltransduktion kommt es sowohl unter normalen Bedingungen als auch unter Stress zu einer erhöhten Aktivität der HPA-Achse. Entsprechend zeigt eine Studie, dass der hemmende Effekt der Endocannabinoide auf ACTH und Kortikosteron auf zentraler Ebene passiert, da die Stimulation von Hypophysenkulturen von CB1-KO und Wildtyp mit CRF nicht mit Unterschieden in der ACTH-Sekretion einherging. Desweiteren blieben Stimulationsversuche mit dem Cannabinoidrezeptor-Agonist WIN 55,212-2 bezüglich der ACTH-Freisetzung in Kultur, bei KO und WT ohne Effekte (Barna et al. 2004).

Aufgrund dieser Daten ist es durchaus möglich, dass die CB-1-vermittelte Dämpfung der HPA-Achse auf der Ebene der PVN-Neurone stattfindet. Bezüglich des PVNs wird gegenwertig ein sog. negativer *Rapid-Feedback-Mechanismus* der Glukortikoide diskutiert, der über Endocannabinoide vermittelt wird. Zwei wesentliche Faktoren sind an dieser Rückkopplungsschleife beteiligt. Bei diesem schnellen Feedbackmechanismus sind einerseits die synaptische Signaltransmission der Endocannabinoide und andererseits der non-genomische Effekt der membrangebundenen Glukortikoidrezeptoren beteiligt (Abb. 23). Dieser Endocannabinoid-vermittelte Feedback-Mechanismus der

Glukokortikoide spielt bei der Hemmung der afferenten Innervation des Ncl. paraventricularis eine besondere Rolle (Di et al. 2003; Di et al. 2009).

Immunhistochemische und elektronenmikroskopische Studien zeigen, dass afferente Innervationen der magno- und parvozellulären Neurone des PVNs eine hohe Dichte an CB-1 Rezeptoren aufweisen. Die afferenten Innervationen des PVN stammen sowohl aus extra- als auch aus intrahypothalamischen Strukturen (Buijs et al. 1999; Wittmann et al. 2007; Wittmann et al. 2005)

Entsprechend sind diese afferenten Verbindungen in einem komplexen Regelkreis von hemmenden (GABA) und stimulierende (Glutamat) Signalen verwickelt, die auf CRH- und AVP-Neurone des PVN zusammentreffen und den ultradianen Rhythmus des Kortikosterons/Kortisols regulieren. Denn die sekretorischen Neuropeptide AVP, CRF, ACTH zeigen in stressfreien Zuständen im venösen Blut ein ultradianes Oszillationsmuster, das durch stimulierende Signale aus dem SCN, Locus coeruleus (LC) und mesokortikolimbischem System getriggert wird. Inhibitorische Signale, die zusammen mit den stimulierenden Eingangssignalen für diese ultradiane Oszillation der CRH- und AVP-Neurone verantwortlich sind, gehen vom Hippocampus, Präfrontalkortex, Ncl. arcuatus, sowie Kortisol/Kortikosteron aus. Der zirkadiane Anstieg des Kortikosterons im Plasma entsteht durch die Zunahme der Amplitude dieser Oszillationen (Chrousos 1998; Windle et al. 1998).

An den afferenten Fasern formieren sich die CB-1 Rezeptoren dicht an Glutamatergen und GABAergen Nervenendigungen (Wittmann et al. 2007). Die präsynaptische Lokalisation der CB1-Rezeptoren im Hypothalamus ist kein isoliertes Phänomen. Es ist ein generelles Erscheinungsbild der CB-1-Lokalisation, welches sowohl an Glutamatergen, GABAergen, als auch bei einer Vielfalt von projizierenden Neurone des Neokortex, Hippocampus, Cerebellum vorkommt (Kawamura et al. 2006; Lafourcade et al. 2007).

Auch cholinerge, noradrenerge und serotoninerge Fasern weisen eine präsynaptische Formation der CB-1-Rezeptoren auf (Balazsa et al. 2008; Degroot et al. 2006; Oropeza et al. 2007).

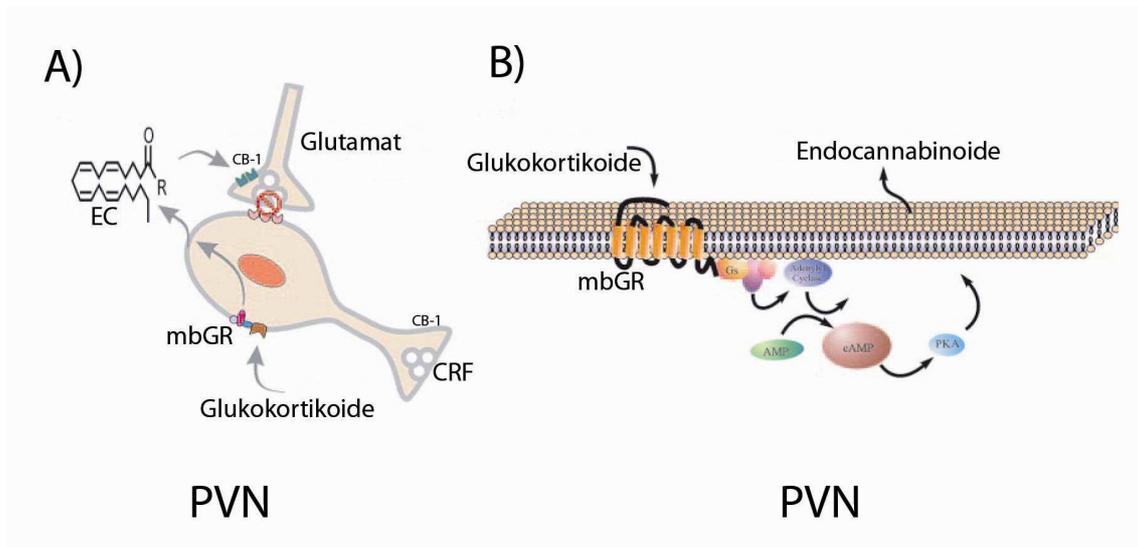


Abb. 23. Endocannabinoide in der schnellen Rückkopplung der Glukokortikoide.

Glukokortikoidfeedback auf Ebene des Ncl. paraventricularis (A, B). Glukokortikoide aus der systemischen Zirkulation binden an membrangebundene Glukokortikoidrezeptoren (mbGR) (B) und induzieren durch Stimulation von cAMP und PKA die Biosynthese von Endocannabinoiden. Diese hemmen retrograd die glutamaterge Innervation der CRF-Neurone (A). [Modifiziert nach (Tasker et al. 2006)].

Glukokortikoide können in Zielzellen unterschiedlichen Ursprungs, sowohl auf transkriptionaler Ebene (genomischer Effekt) als auch auf non-genomischer Ebene, eine Reihe von elektrophysiologischen, metabolischen und sekretorischen Effekten hervorrufen.

Genomische Effekte werden über intrazellulären Glukokortikoidrezeptoren mittels der Regulation von Transkriptionsfaktoren umgesetzt (Schmidt et al. 2000). Obwohl eine schnelle genomische Aktivierung (7min) berichtet worden ist, brauchen Glukokortikoide in der Regel mehr als eine Stunde, um auf transkriptionaler Ebene zu wirken (Groner et al. 1983; Joels and De Kloet 1992). Im Gegensatz zu den genomischen Effekten offenbaren sich non-genomische Wirkungen der Glukokortikoide innerhalb von Sekunden oder Minuten (French-Mullen 1995; Hyde et al. 2004; Malcher-Lopes et al. 2006). Somit bedarf die Sekretionshemmung der Steuerhormone CRF und AVP keiner vorgeschalteten, transkriptionalen Prozesse. Die Zeitspanne der schnellen Rückkopplung der Glukokortikoide auf die zentralen Steuerneurone ist so

gering, dass sie ohne eine Beeinflussung der Proteinbiosynthese abläuft (Keller-Wood et al. 1984).

Die zellulären Mechanismen der schnellen Rückkopplung sind nicht gut erforscht. Gegenwertig wird davon ausgegangen, dass es bei der non-genomischen Regulation der Rückkopplung zu einer direkten oder indirekten Hemmung des Aktionspotentials kommt, und somit zu einer verminderten Sekretion der peptidergen Steuerhormone CRF und AVP aus den parvozellulären Neurone des Ncl. paraventricularis (Kasai and Yamashita 1988).

Wie Patch-Clamp-Untersuchungen an organotypischen hypothalamischen Sliceulturen gezeigt haben, induzieren Glukokortikoide bei parvo- und magnozellularen Neuronen eine akute (1min) Hemmung der postsynaptischen Potentiale, die für eine Abnahme der afferent-glutamatergen Innervation dieser Neurone spricht (Di et al. 2005; Di et al. 2003; Di et al. 2009; Malcher-Lopes et al. 2006).

Durch RT-PCR-Analyse der einzelnen Neurone konnten die glukokortikoid-sensiblen Neurone identifiziert werden. Hierbei handelt es sich um CRF-, TRH-, AVP- und Oxytozin-Neurone der parvozellulären Gruppe, sowie um AVP- und Oxytozin-Neurone der magnozellularen Neuronengruppe des Ncl. paraventricularis. Die glukokortikoid-induzierte Hemmung der synaptischen Erregung konnte durch einen CB1-Anatagonisten verhindert werden. Hieraus folgt, dass der präsynaptische Effekt durch einen G-Protein-gekoppelten Mechanismus getriggert wird, der wiederum darauf beruht, dass postsynaptisch Signalmoleküle gebildet und in den synaptischen Spalt freigesetzt werden. Diese hemmen dann retrograd über präsynaptische G-Protein-gekoppelte Rezeptoren die Gultamatfreisetzung an den afferenten Nervenendigungen (Abb. 23) (Di et al. 2003; Di et al. 2009; Di and Tasker 2008; Malcher-Lopes et al. 2006).

Eine massenspektrometrische Analyse ergab, dass beim Einsatz der Glukokortikoide im Ncl. supraopticus und Ncl. paraventricularis die Endocannabinoide AEA und 2-AG gebildet werden. Durch den Einsatz eines CB1-Antagonisten konnte die Glutamatfreisetzung unterbunden werden (Di et al. 2005; Di et al. 2003; Malcher-Lopes et al. 2006). Diese Befunde demonstrieren, dass Glukokortikoide die Freisetzung der Endocannabinoide induzieren, die retrograd zu einer Hemmung der synaptischen Erregung der PVN-Neurone führen(Abb. 23).

Ergebnisse mehrerer Laboratorien lassen vermuten, dass das Endocannabinoid 2-AG im zentralen Nervensystem an der Regulierung der retrograden Signaltransmission stärker involviert ist als Anandamid (Sugiura et al. 2006). Elektrophysiologische Untersuchungen zeigen, dass durch pharmakologische Manipulation des 2-AG-Metabolismus die Neurotransmission deutlichen Veränderungen unterworfen ist (Hashimotodani et al. 2007; Hashimotodani et al. 2008; Melis et al. 2004), während beim Eingreifen in den Anandamid-Metabolismus die Neurotransmission unbeeinflusst bleibt (Hashimotodani et al. 2007; Kim and Alger 2004). Des Weiteren zeigt eine Unterbindung des Abbaus von 2-AG eine vermehrte Anreicherung von 2-AG in Regionen, die mit der CB-1-Verteilung korrespondieren. Die Akkumulation des 2-AGs korrelierte auch mit einer intensiveren, CB1-vermittelten Signaltransmission (Palomaki et al. 2007).

Hingegen veränderte sich die CB-1-Rezeptoraktivität im Zentralnervensystem bei einer pharmakologischen Blockierung der FAAH nicht. Darüber hinaus zeigen CB-1 Rezeptoren und das 2-AG aufbauende Enzym DAGL eine gemeinsame phylogenetische Abstammung. Eine solche evolutionäre Beziehung besteht nicht zwischen CB1-Protein und den Anandamid metabolisierenden Enzymen (Bisogno et al. 2003; McPartland et al. 2007). Laut den Studien kommen die auf- und abbauenden Enzyme des 2-AGs in entgegengesetzter Konformation vor, d.h., DAGL ist in der Postsynapse lokalisiert und MAGL, das abbauende Enzym, befindet sich kolokalisiert mit CB-1 in der Präsynapse (Gulyas et al. 2004; Katona et al. 2006; Lafourcade et al. 2007; Matyas et al. 2008; Uchigashima et al. 2007).

Die Kolokalisations-Analyse der CB1-Rezeptoren in der Außenzone der Eminentia mediana zeigt einen Überlappungsquotient von $79 \pm 2,1\%$, wobei $82 \pm 5,2\%$ der CRF-Fasern mit CB1-Rezeptoren kolokalisiert sind und etwa $59,1 \pm 8,6\%$ der gesamten CB-1 Rezeptoren mit CRF. Das bedeutet, dass bei Sekretionsprozessen der meisten CRF-Fasern CB1-vermittelte Signaltransduktionsmechanismen beteiligt sind. Molekularbiologische Untersuchungen bestätigen, dass CB1-mRNA von PVN-Neuronen transkribiert wird.

Welche Bedeutung könnte die Lokalisation von CB-1 auf Axonterminalen der CRF-Neurone haben? Eine mögliche Antwort auf diese Frage gibt eine Forschungsgruppe

aus Japan. Sie zeigt, dass bei einer Depolarisation, unter Beteiligung von Phospholipase C, vermehrt 2-AG gebildet wird (Oka et al. 2007). In der vorliegenden Arbeit wird gezeigt, dass DAGL auch in Nervenendigungen der Eminentia mediana vorkommt. Hinzu kommt, dass PVN-Neurone 2-AG synthetisieren und auch CB1-mRNA transkribieren, wobei CRF mit CB1 kolokalisiert ist. So ist anzunehmen, dass eine Depolarisation zu einer vermehrten Biosynthese von 2-AG in Axonterminalen der CRF-Neurone führt. Im Gegensatz zu den dendritischen Fortsätzen der parvozellulären Neurone, an denen retrograd 2-AG in den synaptischen Spalt abgegeben wird, kommt es wahrscheinlich an den Nervenendigungen der CRF-Neurone über CB-1-Rezeptoren zu einer autokrinen Hemmung der CRF-Sekretion (siehe Abb. 25) (Cota et al. 2003; Di and Tasker 2008; Gabr et al. 1994; Oka et al. 2007). Auf der Ebene der PVN-Neurone hemmt also 2-AG durch synaptische Kommunikation die afferent-glutamaterge Innervation, im Sinne eines *Glukokortikoid-Endocannabinoid-Feedback-Mechanismus*, während an den Axonterminalen der PVN-Neurone eine autoregulatorische Hemmung der CRF-Sekretion durch 2-AG stattfindet (s. Abb. 25).

Ob der oben beschriebene, über Endocannabinoide vermittelte Feedback-Mechanismus, auch in der Adenohypophyse vorkommt, ist bis heute nicht geklärt. Offensichtlich könnte ein Glukokortikoid-Feedback auch über die Hypophyse vermittelt werden. Dabei besteht eine negative Rückkopplung der Glukokortikoide auf die CRF-induzierte ACTH-Sekretion. Dementsprechend bewirkt eine systemische Applikation von Glukokortikoiden innerhalb von 5-30 Minuten eine Hemmung der ACTH-Freisetzung. (Hinz and Hirschelmann 2000). In vitro Studien an ACTH-produzierenden Zellen (AtT-20) zeigen, dass Dexamethason und ein synthetischer Agonist des Glukokortikoidrezeptors (RU 28362) die ACTH Sekretion bei einer CRF-Stimulation hemmt. Allerdings kann in diesem Zusammenhang nicht von einem *Rapid-Feedback* ausgegangen werden, da der Zeitraum der Experimente zwischen 45-120 Minuten lag (Woods et al. 1992). Eine andere Möglichkeit besteht darin, dass andere Rezeptortypen beteiligt sein können. Wie eine aktuelle Studie zeigt, sind an dem schnellen Glukokortikoidfeedback Mineralkortikoidrezeptoren beteiligt. Jedoch kommen Mineralkortikoidrezeptoren in PVN und Hypophyse nur in geringerer Dichte vor (Atkinson et al. 2008).

Da Endocannabinoide wie AEA und 2-AG in der Pars tuberalis vorkommen und FAAH zu $44,6 \pm 6\%$ mit ACTH kolokalisiert ist, ist es durchaus möglich, dass von der PT aus ein parakriner Effekt der Endocannabinoide auf die kortikotrophen Zellen der Adenohypophyse ausgeübt wird. Überraschenderweise zeigt eine weitere Studie an CB1-KO-Mäusen, dass es bei einer Aufhebung der CB1-Signaltransduktion auch zu einer Stimulierung der HPA-Achse kommt. Im Gegensatz zu der Studie von Barner et al. (2004) demonstrieren diese Experimente eine Beteiligung der Adenohypophyse an dieser Aktivierung, da eine Stimulation der primären, adenohypophysialen Zellkulturen der CB1-KO-Mäusen mit CRF oder Forskolin zu einer höheren ACTH-Freisetzung als beim Wildtyp führte (Cota et al. 2007). Ein besonders Merkmal dieser Studie besteht darin, dass die ACTH- und Glukokortikoidsekretion sowohl beim Wildtyp als auch bei CB1-Knock-Out unter gleichen photoperiodischen Bedingungen wie bei meiner Arbeit gemessen wurden. Interessanterweise zeigen CB1-KO-Tiere im Vergleich zum Wildtyp beim Beginn der Dunkelheit signifikant höhere Konzentrationen von ACTH und Kortikosteron im Plasma (Cota et al. 2007).

Hieraus kann zum einen geschlossen werden, dass der hemmende Tonus der CB-1-vermittelten Signaltransduktion nicht mehr gegeben ist. Zum anderen muss das Endocannabinoidsystem beim Wildtyp zum ZT 12 eine besonders hohe Aktivität aufweisen. Entsprechend konnte zum ZT 12, also zu Beginn der Dunkelheit eine signifikante Abnahme der CB1-Immunoreaktivität in Pars tuberalis festgestellt werden. Somit dürfen höhere Konzentrationen von Endocannabinoiden in portalen Gefäßen vorhanden sein, und diese können parakrin und CB-1-vermittelt die ACTH-Sekretion der kortikotrophen Zellen modulieren (s. Abb. 24). Eine Schlüsselrolle in der Aktivierung der Endocannabinoidsynthese könnten CRF-Rezeptoren in der Pars tuberalis spielen, die in hoher Dichte vorkommen (De Souza et al. 1985; De Souza et al. 1984; Millan et al. 1986).

Über die CRF-Rezeptor-Signaltransduktion könnte es aufgrund des intrazellulären Kalziumanstiegs zu einer Induktion der Endocannabinoidsynthese kommen, die dann distal auf die kortikotrophen Zelle wirken.

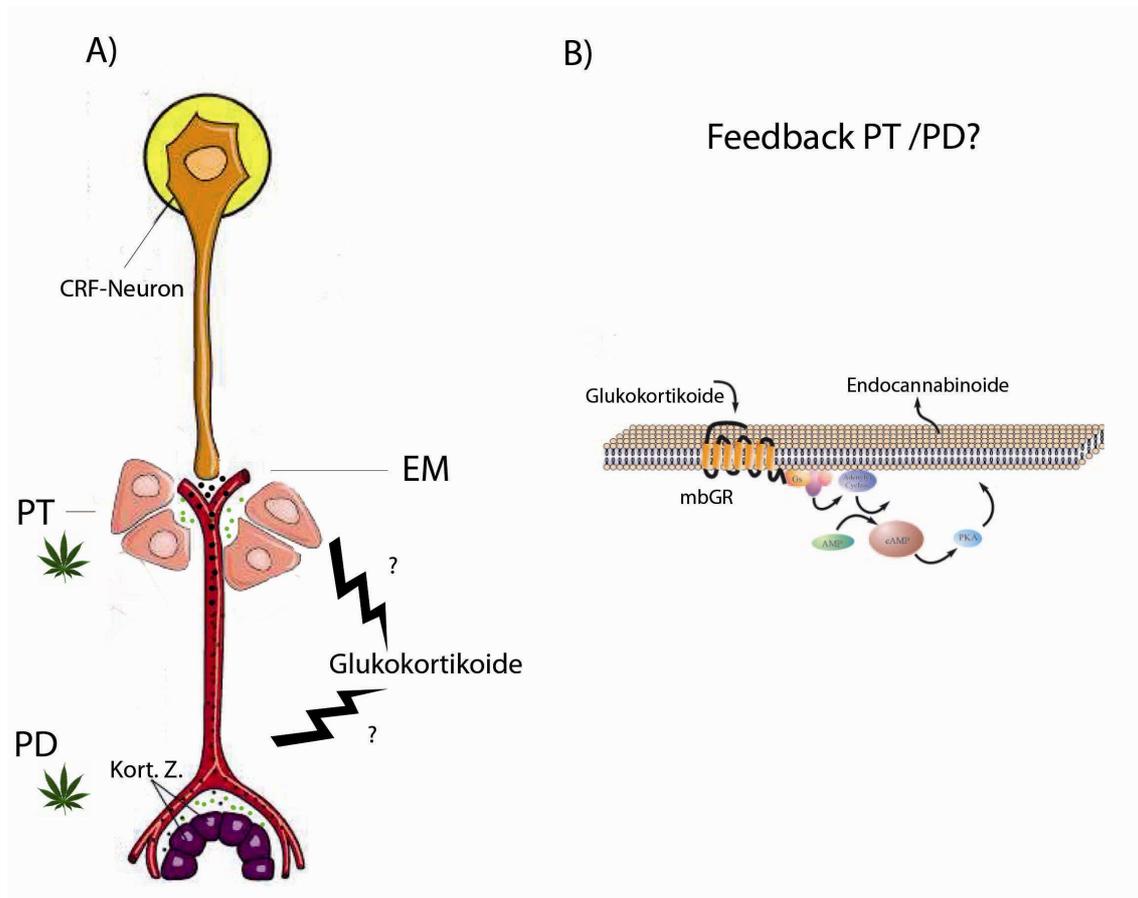


Abb. 24. Hypothetischer Feedback der Glukokortikoide über die Hypophyse.

Neben den CRF-Neuronen des Ncl. paraventricularis (A), könnten Glukokortikoide über membrangebundene Glukokortikoid- oder Mineralokortikoidrezeptoren in der Pars tuberalis oder Pars distalis die Biosynthese von Endocannabinoiden induzieren (A,B). Die dort gebildeten Endocannabinoiden könnten parakrin/endokrin (grüne Punkte in A) zu einer Hemmung der ACTH-Freisetzung in kortikotrophen Zellen (Kort.Z.) führen (A). EM, Eminentia mediana; PT, Pars tuberalis, PD, Pars distalis. [B Modifiziert nach (Tasker et al. 2006) und A nach Encyclopaedia Britannica].

Entsprechend zeigen Kolokalisations-Analysen weiterer Studien, dass CB1-Rezeptoren in kortikotrophen Zellen häufiger vorkommen als in anderen endokrinen Zelltypen der Adenohypophyse (de Miguel et al. 1998; Gutknecht et al. 2009; Pagotto et al. 2001).

Da die NAPE-PLD-Immunreaktivität negativ mit der CB-1 Immunreaktion korreliert, könnte AEA das relevante Endocannabinoid sein. Jedoch kann das Endocannabinoid 2-AG nicht ausgeschlossen werden. Denn einerseits zeigt die Pars tuberalis eine positive Immunfärbung für DAGL, andererseits hat 2-AG neben AEA eine hohe Affinität zu CB-1 Rezeptoren (Alexander and Kendall 2007).

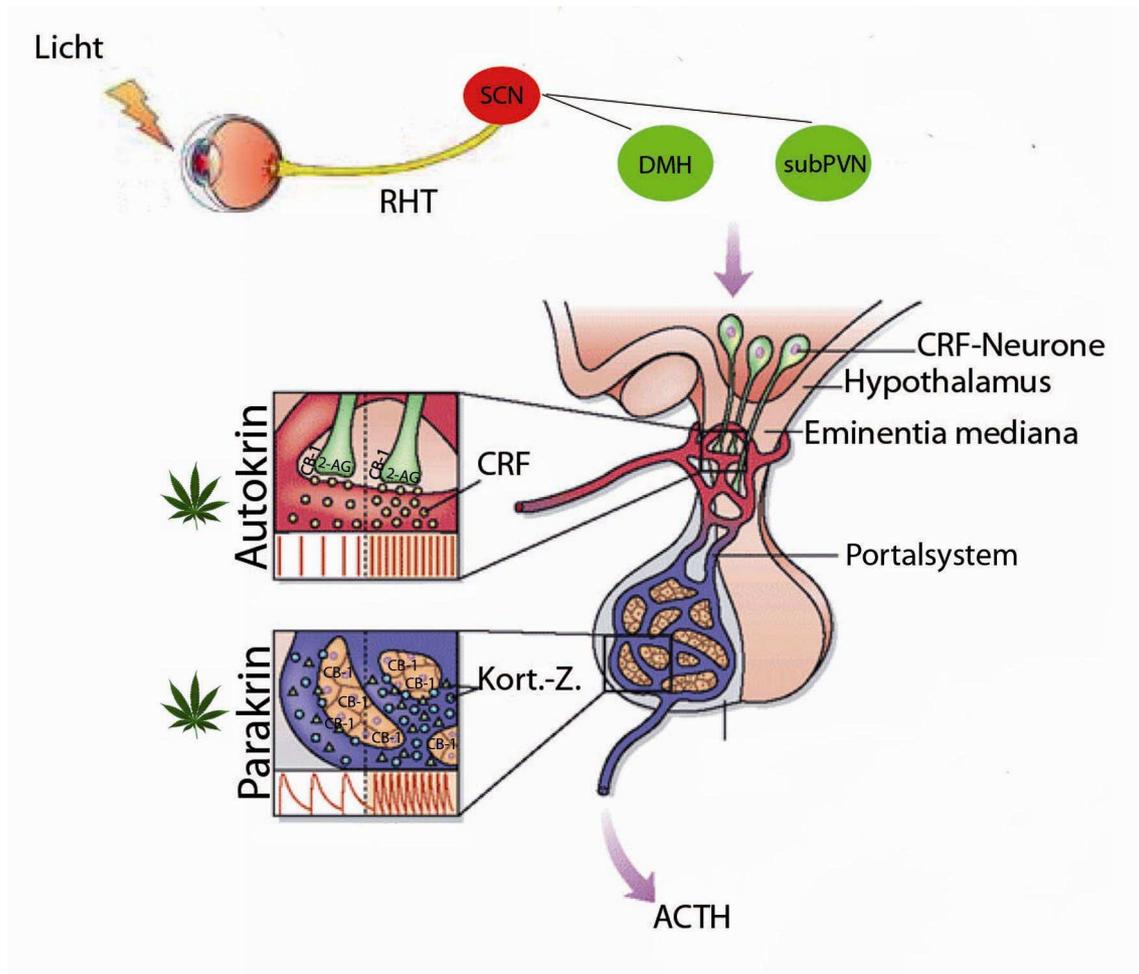


Abb. 25: Hypothetisches Modell des Endocannabinoidsystem in Eminentia mediana /Adenohypophyse und seiner Wirkung auf die HPA-Achse.

Das PNS koordiniert über DMH und subPVN die Sekretion von CRF in der Außenzone der Eminentia mediana. Dabei kommt es nach der Depolarisation in den Axonterminalen der CRF-Neurone zur Biosynthese von 2-AG, welches autokrin die Sekretion von CRF moduliert. CRF würde die Biosynthese von AEA oder 2-AG in der PT stimulieren und diese könnten dann parakrin auf die kortikotropen Zellen der Adenohypophyse regulierend wirken [Abbildung modifiziert nach (Sisk and Foster 2004)].

Bisher konzentrierten sich alle Studien bezüglich der HPA-Achse auf die hypothalamisch-hypophysäre Ebene. Aber wie diese Arbeit zeigt, sind auch die Glukokortikoid produzierenden Zellen der Zona fasciculata immunreaktiv für CB-1. Diese CB-1 Immunreaktivität ist bei der Maus und Ratte am prominentesten.

Die Sekretion wird sowohl bei endokrinen als auch bei neurosekretorischen Zellen durch kalziumabhängige Exozytose gesteuert. Endocannabinoide könnten durch die Hemmung des Kalziumeinstroms die Exozytose und damit die Sekretion von Glukokortikoiden hemmen (Nakata and Yada 2008; Suudhof 2008).

4.3 Ein Endocannabinoidsystem im sympathischen Nervensystem

Die vierte und fünfte Fragestellung meiner Dissertation widmet sich der Lokalisation von Komponenten des Endocannabinoidsystem in postganglionären sympathischen Nervenfasern der Nagetiere, die an der Innervation der Nebennierenrinde beteiligt sind. Daraufhin wurde das Nebennierenmark des Hamsters als Model für ein „sympathisches Ganglion“ unter unterschiedlichen Photoperioden auf Veränderungen der Immunreaktivität von FAAH und NAPE-PLD untersucht.

Das sympathische Nervensystem stellt einen Ausgangsweg des photoneuroendokrinen Systems dar. Zum einen wird das sympathische Nervensystem u.a. über efferente Verbindungen der zentralen Uhr im Hypothalamus zum PVN reguliert, zum anderen moduliert das Neurohormon Melatonin die sympathische Ausgangsleistung. Die Nebenniere erhält in Bezug zu ihrer Organgröße eine sehr intensive autonome Innervation. An der sympathischen Innervation sind sowohl prä- als auch postganglionäre Fasern beteiligt (Mutoh et al. 2003; Niijima et al. 1993; Toth et al. 1997).

Die postganglionären sympathischen Fasern sind überwiegend an der Innervation der Nebennierenrinde beteiligt. Etwa 50% der postganglionären Fasern der Zona glomerulosa sind noradrenerg und immunreaktiv für die Tyrosinhydroxylase. Von diesen Fasern formieren sich 80% um Arteriolen, Kapillaren und im Bindegewebe, während 20% in direkter Assoziation zu Glomerulosazellen stehen (Kleitman and Holzwarth 1985; Toth et al. 1997).

Bei allen Nagern konnte das Vorkommen von CB1-Rezeptoren in TH-immunreaktiven, postganglionären sympathischen Fasern der Nebennierenrinde immunhistochemisch gesichert werden. Exemplarisch erfolgte der Nachweis von FAAH und NAPE-PLD in den postganglionären sympathischen Fasern des Hamsters. Daher kann die vorliegende Studie Daten von Koch et al. (2008) bestätigen, die CB1, NAPE-PLD und FAAH in postganglionären sympathischen Innervation des Pinealorgans der Ratte zeigen (Koch et al. 2008).

Die präganglionären Fasern sind hauptsächlich an der Innervation des Nebennierenmarks beteiligt. Sie sind cholinerg und vermitteln ihre Wirkung sowohl über muskarinische als auch nikotinische Azetylcholinrezeptoren. Neben der

Freisetzung von Katecholaminen in die systemische Zirkulation, induziert die cholinerge Stimulation über PKA und PKC die Transkription von Phenyläthanolamin-N-Methyltransferase-mRNA (PNMT). PNMT ist für die Umwandlung von Noradrenalin zu Adrenalin verantwortlich (Evinger et al. 1994). Neuere Studien zeigen, dass der Kotransmitter PACAP synergistisch mit Acetylcholin über die Aktivierung von PAC1-Rezeptoren zur Sekretion und Biosynthese von adrenalen Katecholaminen beiträgt (Lamouche et al. 1999; Lamouche and Yamaguchi 2001; Lamouche and Yamaguchi 2003)

Das Nebennierenmark, auch als sympathisches „Paraganglion“ bezeichnet, besteht aus chromaffinen Zellen, Satellitenzellen und Ganglienzellen. Chromaffine Zellen bestehen aus zwei Populationen, die je nach Inhalt ihrer Granula in noradrenerge Zellen (20%, Durchmesser der Granula, Spezies abhängig zwischen 184-495 nm) und adrenerge Zellen (80%; Durchmesser der Granula, Spezies abhängig, zwischen 50-350 nm) unterschieden werden. Sie sind modifizierte postganglionäre Neurone und besitzen Eigenschaften von Neuronen und endokrinen Zellen und sind im Nebennierenmark in Clusterformation oder in kurzen Trabekeln zwischen den Satellitenzellen angeordnet. Die Satellitenzellen, die den Schwannschen Zellen vergleichbar sind, befinden sich mit ihren spindelförmigen Zellkörpern und dünnen zytoplasmatischen Zellausläufern zwischen den chromaffinen Zellen. Sie ummanteln auch Nervenendigungen. Aufgrund ihrer Morphologie werden zwei Typen von Ganglienzellen unterschieden. Beide Typen haben phänotypische Merkmale eines Neurons und innervieren sowohl Zellen der Nebennierenrinde als auch die chromaffinen Zellen. Sie sind entweder cholinerg oder noradrenerg und können durch Kotransmitter wie NPY, VIP oder NO die Signaltransmission modulieren (Diaz-Flores et al. 2008; Mravec 2005).

Die vorliegende Studie zeigt, dass die chromaffinen Zellen des Nebennierenmarks bei allen Nagern immunreaktiv für den CB-1 Rezeptor sind. Das Nebennierenmark des Hamsters zeigt auch eine deutliche Immunreaktion für NAPE-PLD und FAAH. Die intrazelluläre Verteilung der Immunreaktion des CB1-Rezeptors, der FAAH, und der NAPE-PLD bestätigen immunhistochemische Befunde anderer Studien (Cristino et al. 2006; Egertova et al. 2008; Starowicz et al. 2008). Die Quantifizierung der Immunreaktion für NAPE-PLD und FAAH im Nebennierenmark des Syrischen Hamsters ergab für FAAH einen signifikanten Unterschied zwischen Tieren, die im

Langtag oder im Kurztag gehalten wurden. Daher scheint FAAH bei photoperiodischen Bedingungen, die der Winterzeit entsprechen, vermehrt synthetisiert oder weniger abgebaut zu werden.

4.3.1 Funktionelle Implikation des Endocannabinoidsystem im sympathischen Nervensystem der Nebenniere

Nach heutigem Kenntnisstand innervieren die postganglionären sympathischen Fasern in der Nebennierenrinde Gefäße und Zellen der Zona glomerulosa. Morphologische und neurochemische Untersuchungen belegen eine stimulierende Wirkung von Noradrenalin auf das Aldosteronssystem. Über axonale Varikositäten wird Dopamin aufgenommen und zu einem großen Anteil zu Noradrenalin umgewandelt. Noradrenalin erreicht zusammen mit dem Kostransmitter ATP die Zielzellen, und moduliert auf diesem Wege die Aldosteronbiosynthese (Szalay et al. 1998).

Pharmakologische und elektrophysiologische Studien an der Ratte und Maus stellten eine Hemmung der Noradrenalinfreisetzung aus den postganglionären sympathischen Fasern durch Anandamid und Agonisten fest. Dieser Effekt beruht auf einen präsynaptischen, CB-1-vermittelten Mechanismus. Daher kann Anandamid, welches in den postganglionären sympathischen Fasern gebildet wird in autokriner Weise über präsynaptische CB-1-Rezeptoren die Aktivität der postganglionären sympathischen Nervenfasern der Nebenniere beeinflussen. Interessanterweise zeigen in einem vergleichbaren, experimentellen Modell (siehe Koch et al. 2008), Komponenten des Endocannabinoidsystem in postganglionären sympathischen Fasern, photoperiodische Variationen der Immunreaktivität (Ishac et al. 1996; Koch et al. 2008; Trendelenburg et al. 2000).

Die Glukokortikoidbiosynthese ist ein besonderes Beispiel dafür, wie das PNS auf neuralem (Sympathikus) und humoralem Weg (Melatonin und ACTH) die Funktion dieses Organs beeinflusst. In erster Linie erbrachte die Pionierleistung von Akira Nijima den funktionellen Beweis, dass Licht die Aktivität der autonomen Ausgangsleistung des PNS erhöht. Ein Lichtimpuls bewirkt eine Aktivitätszunahme der

sympathischen Innervation verbunden mit einer Aktivitätsabnahme der vagalen Innervation von Pankreas, Leber, Milz und Nebenniere. Diese lichtinduzierten Veränderungen sind nach einer Läsion im SCN nicht mehr zu verzeichnen (Niiijima et al. 1993). Inwieweit Melatonin als Effektor des PNS an dieser Modulation der autonomen Funktion beteiligt ist, zeigt eine nachfolgende Studie von Tatsushi Mutoh et al. (2003). Melatonin hemmt die lichtinduzierte Aktivierung der autonomen Funktion. Dieser Effekt wird über den SCN vermittelt (Mutoh et al. 2003) und wirkt sich auch auf die Glukokortikoidbiosynthese aus. Ein 30 Minuten dauernder Lichtimpuls während der Nacht, der zur Absenkung des Melatoninspiegel führt, führt bei Nagetieren nach ca. 60-120 Minuten zu einer Aktivitätszunahme des N. splanchnicus und einen signifikanten Anstieg des Kortikosterons im Plasma.

Interessanterweise induziert der Lichtimpuls die Exprimierung einer Reihe von Genen, wie z.B. Per1 oder Transkriptionsfaktoren, die an der Regulation von Schlüsselenzymen der Glukokortikoidbiosynthese beteiligt sind. Nach einer Läsion im SCN kam es nicht mehr zu einem Anstieg von Kortikosterons oder der Induktion der Genexpression (Ishida et al. 2005).

Eine Transsektion des N. splanchnicus bei Nagetieren geht ebenfalls mit einer Abnahme des Kortikosterons während der aktiven Nachtphase einher. Hingegen ist diese Durchtrennung des Nervens mit einer Zunahme des Kortikosterons während des Tages, also während der inaktiven Phase der Nagetiere verbunden. Pharmakologische Experimente bestätigten, dass die operative Denervierung mit einer Desensibilisierung der ACTH-Wirkung auf die Glukokortikoidbiosynthese einhergeht (Ulrich-Lai et al. 2006; Ulrich-Lai and Engeland 2002).

Nur bei nachtaktiven Tieren steigen sowohl Kortikosteron als auch Melatonin während der Nacht an. Dabei moduliert die sympathische Innervation die adrenokortikale ACTH-Sensitivität. In der inaktiven Phase (tagsüber bei nachtaktiven Tieren) wirkt sie desensibilisierend auf die ACTH-vermittelte Kortikosteronbildung. Während in der aktiven Phase der Tiere die sympathische Innervation zu einer Sensibilisierung der ACTH-vermittelten Kortikosteronsekretion führt (Dijkstra et al. 1996; Jasper and Engeland 1994). Außerdem weisen zahlreiche Studien darauf hin, dass ACTH kein rhythmisches Sekretionsprofil zeigt und der zirkadiane Rhythmus von Glukokortikoiden auch ohne die Adenohypophyse persistiert. So blieb nach einer Entfernung der

Hypophyse und gleichzeitiger Implantation von ACTH-Pellets bei Ratten der zirkadiane Rhythmus von Kortikosteron erhalten (Bornstein et al. 2008; Engeland and Arnhold 2005; Kalsbeek et al. 1996a; Kalsbeek et al. 1996b; Ulrich-Lai et al. 2006).

Weiterhin konnte erwiesen werden, dass postganglionäre sympathische Fasern nicht an der Sensitivierung der ACTH-Wirkung während der Dunkelheit beteiligt sind. Die Abnahme des Kortikosterons im Plasma durch Denervierung wird überraschenderweise durch Entfernung des Nebennierenmarks aufgehoben. Dementsprechend scheint das Nebennierenmark an der Desensibilisierung der ACTH-Wirkung beteiligt zu sein. (Ulrich-Lai et al. 2006).

Wie in Abbildung 22 zu sehen ist, strahlen TH-positive, chromaffine Zellen radiär in den Kortex. Eine ähnliche Anordnung ist auch bei Menschen beschrieben worden. Damit befinden sich chromaffine Zellen und Glukokortikoid-produzierende Zellen in direkter Nachbarschaft und können sich gegenseitig parakrin beeinflussen. Entsprechend können u.a. Glukokortikoide die Expression von PNMT regulieren. Hinzukommt, dass eine Ex-vivo-Perfusion von Nebennieren mit einer Adrenalinlösung zu einer vermehrten Freisetzung von Kortikosteron führt (Bornstein et al. 1994; Mokuda et al. 1992)

Agonisten der Cannabinoidrezeptoren erniedrigen bei einer elektrischen Stimulation des N. splanchnicus die sympathische Ausgangsleitung und damit die AdrenalinKonzentration im Plasma. In einer Ex-vivo-Stimulation der Nebennieren konnte die Adrenalinfreisetzung durch Agonisten der Cannabinoidrezeptoren gehemmt werden (Niederhoffer et al. 2001). Möglicherweise ist während der aktiven Nachtphase das Endocannabinoidsystem in der sympathisch-adrenomedullären Einheit geringer aktiv, so dass vermehrt Katecholamine freigesetzt werden können, und dadurch die ACTH-Wirkung auf die Glukokortikoidbiosynthese sensitiviert wird. Tatsächlich zeigten sich bei den Denervierungsversuchen eine Abnahme der adrenalen Konzentrationen des cAMP (Engeland and Arnhold 2005).

Photoperiodische Bedingungen, die den kurzen Wintertagen ähnlich und zu erhöhten Melatoninkonzentration während der Nacht führen, scheinen beim Syrischen Hamster Auswirkungen auf den Abbau der Endocannabinoide zu haben. Das Neurohormon Melatonin koordiniert die zeitliche Adaption an jahreszeitlichen Veränderungen. Für viele Tiere der gemäßigten und nördlichen Klimazonen bedeuten Winterkonditionen

eine ernsthafte Umstellung des Energiehaushaltes. Beispielsweise zeigen Zwerghamster (*Phodopus sungorus* und *Phodopus campbelli*), die keinen richtigen Winterschlaf haben, sondern in eine Art Winterstarre fallen, eine Umstellung des Essverhaltens. Während der kurzen Wintertage nimmt ihr Körpergewicht und Körperfettanteil ab. Diese Spezies sind die besten natürlichen Beispiele für einen saisonal bedingten Gewichtsverlust. Diese zyklische Gewichtsveränderungen sind antizipatorisch zu verstehen und nicht als Reaktion auf einen Stimulus. Der sibirische Hamster (*Phodopus sungorus*) wird bei Laborbedingungen, die langen Sommertagen entsprechen, adipös und zeigt eine Reduktion des Körpergewichtes unter experimentellen Voraussetzungen, die kurzen Wintertagen entsprechen (Bowers et al. 2005; Mercer 1998; Mercer and Tups 2003; Morgan et al. 2003; Paul et al. 2007).

Bei allen Säugetieren ist das weiße Fettgewebe die hauptsächliche Quelle an gespeicherter Energie. Sobald die benötigte Energie nicht mehr aus zirkulierenden oder gespeicherten Kohlenhydraten umgesetzt werden kann, werden Lipide aus dem weißen Fettgewebe mobilisiert und durch die Lipolyse der Triglyzeride zu Glycerol und freien Fettsäuren abgebaut. Neben anderen Faktoren, wie z.B. Glukagon oder ACTH, ist das sympathische Nervensystem an der Regulation der Lipolyse beteiligt. Sowohl Adrenalin als auch Noradrenalin stimulieren die Lipolyse über adrenerge β_{1-3} -Rezeptoren und hemmen den Triglyceridabbau über α_2 -Adrenorezeptoren (Bartness and Bamshad 1998). Während einer positiven Energiebilanz ist die Nahrungsaufnahme größer als der Energieumsatz und Lipide werden im weißen Fettgewebe gespeichert. Bei einer negativen Energiebilanz werden die Lipide aus weißem Fettgewebe mobilisiert und zu braunem Fett- und Muskelgewebe und anderen Geweben zur Oxidation transportiert (Bowers et al. 2005). In dieser Forschungsarbeit konnte gezeigt werden, dass FAAH im Nebennierenmark unter photoperiodischen Bedingungen, einen signifikanten Unterschied in der Immunfärbung von Winter- zur Sommerzeit zeigt. Dieser Unterschied könnte auf den hohen Melatoninspiegel zu Kurztagbedingungen, also zur Winterzeit beruhen und damit die hohe Aktivität des Endocannabinoidsystems widerspiegeln.

4.4 Klinische Implikation der Endocannabinoide im sympathischen und im hypothalamisch-hypophysär-adrenalen System

Sowohl die hypothalamisch-hypophysär-adrenale Achse als auch das autonome Nervensystem sind an der täglichen Adaption und Beibehaltung der Homöostase beteiligt. Zum einen werden beide Systeme durch das photoneuroendokrine System antizipatorisch und zeitlich an den Tag angepasst. Und zum anderen agieren Kortisol, Noradrenalin und Adrenalin als Mediatoren des Streßsystems (Buijs et al. 2003b; Kalsbeek et al. 2006a; McEwen 1998; McEwen 2000).

Obwohl zahlreiche Arbeitsgruppen sich mit dem Thema „Streß“ beschäftigen, gibt es seit der Entdeckung des „Streßsystems“ keine einheitliche Definition von Streß (Pacak and Palkovits 2001). Ich werde zunächst auf die früheste, wissenschaftlich-dokumentierte Definition von Hans Selye eingehen und nachfolgend eine moderne Definition von Bruce S. McEwen beschreiben. Beide Definitionen ermöglichen es die Rolle der Endocannabinoide im Streßsystem besser einordnen zu können.

Das biologische Konzept, dass der Hypothalamus auf die endokrine Sekretion der Adenohypophyse eine starke Kontrolle ausübt, gewann seine allgemeine Akzeptanz in den 30iger Jahren des letzten Jahrhunderts. Zu dieser Zeit entstanden auch Konzepte zur Homöostase (Walter Cannon), sowie das Streßkonzept von Hans Selye. Die sich komplementär verhaltenden Konzepte bewirkten ein schnelles Vorankommen auf dem Gebiet der Stressforschung (Lovejoy 2005).

Hans Selye beschrieb 1936 ein Syndrom, welches nach physikalischen, chemischen und traumatischen Verletzungen an Ratten auftrat. Er bezeichnet das Syndrom als ein „general adaption syndrome“, welches er in drei Stadien einteilte. In der ersten Stufe kam es nach 6-48 Stunden u.a. zu einer Abnahme der Thymus-, Milz- und Lebergröße. Ebenfalls betroffen war die Nebenniere mit einer Abnahme der „cortical lipoids“ und Abnahme der „chromaffin substance“. Des Weiterem kam es u.a. zu einem Pleura- und Peritonealguss, Verlust des Muskeltonus, Abnahme der Körpertemperatur und Erosionen im Gastrointestinaltrakt (besonders im Magen). In einem zweiten Stadium, also nach 48h, sind die Nebennieren wieder vergrößert und die chromaffinen Zellen

zeigen Vakuolisierungen. Es kam zu einem Verschwinden der Pleura- und Peritonealergüsse, aber die reproduktiven Vorgänge kamen zum Stillstand. Kleine Dosen der Chemikalien oder kleine Traumata zeigten nach Durchlaufen der zweiten Phase keine nennenswerten Reaktionen, so dass das Tier habituiert erschien. Jedoch fiel die Ratte in eine Erschöpfungsphase (dritte Phase), sobald die Reizungen über 1 bis 3 Monate fortgesetzt wurden (Selye 1936).

Das von Hans Selye geprägte „general adaption syndrome“ findet in der Moderne seine Anerkennung, die von Bruce S. McEwen fortgesetzt und erweitert wurde. McEwen bezeichnet diese Adaption als Allostase. Für die tägliche Adaption sind neben anderen Mediatoren, wie z.B. Zytokine und Neurotransmitter, die Stresshormone Kortisol und Adrenalin von entscheidender Bedeutung. Während Homöostase das Ziel darstellt, umfasst die Allostase Veränderungen, die ablaufen, um die Homöostase beizubehalten. Die Sekretion solcher Mediatoren der Allostase, wie Kortisol und Adrenalin, als Reaktion auf Stressoren wie z.B. Schlafdefizit, Diät usw., beschleunigen die Adaptation und sind allgemein als nützlich anzusehen (McEwen 2004).

Zu den zentralen Komponenten des Stresssystems gehören CRF- und AVP-sezernierende Neurone des Hypothalamus, CRF-Neurone und noradrenerge Neurone des Hirnstamms (Locus caeruleus/NE-System) und sowie die kortikotropen Zellen der Adenohypophyse. Die peripheren Anteile sind die Zona fasciculata der Nebenniere, das efferente sympathisch-adrenomedulläre System, sowie das parasympathische Nervensystem (Chrousos and Gold 1992; Habib et al. 2001). Wie in den vorherigen Abschnitten dargestellt wurde, spielen in diesen Strukturen Endocannabinoide als Signalsubstanzen eine prominente Rolle (Cota 2008; Cota et al. 2003; Cota et al. 2007; Ishac et al. 1996; Pagotto et al. 2006)

Das Stresssystem interagiert auch mit drei weiteren Komponenten des zentralen Nervensystems: dem mesolimbischen/mesokortikalen dopaminergen System, dem Amygdala-Hippocampus-Komplex und Ncl. arcuatus- POMC-System. Alle drei Komponenten des Zentralnervensystems werden während einer Stressreaktion aktiviert und beeinflussen reziprok die Aktivität des Stresssystems. Hinzukommt, dass das die

Aktivierung des Stresssystem gleichzeitig auch thermo- und appetit-regulatorische Zentren des ZNS beeinflusst. Es besteht auch eine Interaktion zwischen dem Reproduktionssystem, Immunsystem, sowie anderen neuroendokrinen Systemen (Chrousos 1992; Chrousos and Gold 1992). Auch in diesen Zentren haben Endocannabinoide ihre funktionelle Bedeutung (Campolongo et al. 2009; Solinas et al. 2008).

Es gibt drei wesentliche Dysfunktionen dieses Adaptationssystem bzw. der Allostase, die zu pathologischen Zuständen führen können. *Erstens*, die Allostase und damit die Stressmediatoren wie Kortisol und Adrenalin sind weiterhin in höheren Konzentrationen vorzufinden, obwohl die Stressphase schon längst vorbei ist. *Zweitens*, es findet keine adäquate Reaktion statt, d.h. die Allostase ist nicht aktiviert. *Drittens*, die Allostase wird durch viele unterschiedliche Stressoren überbeansprucht. Jeder dieser Dysfunktionen der Allostase kann zu einem sog. „Allostatic load oder Overload“ führen, welcher mit verherrenden Folgen für den Körper verbunden ist (McEwen 1998; McEwen 2004).

An Hand von folgenden Beispielen wird die Dysfunktion des Adaptationssystems erläutert. Glukokortikoide beschleunigen die Konversion von Proteinen und Lipiden zu nützlichen Kohlenhydraten. Dieser Prozess garantiert dem Körper Energie und ermöglicht eine lange aktive Phase. Glukokortikoide wirken auch zentral, indem sie den Appetit anregen, die lokomotorische Aktivität und die Nahrungssuche stimulieren, sowie die Gedächtnisfunktion positiv beeinflussen (McEwen 2000). Diese Wirkung der Glukokortikoide ist z.B. nützlich bei sportlicher Aktivität. Hingegen kann eine chronische Erhöhung der Glukokortikoide zusammen mit Insulin z.B. durch andauernden Schlafmangel, bei mangelnder Aktivität und gleichzeitig falscher Ernährung u.a. zu einer vermehrten Bildung von atherosklerotische Plaques der Koronararterien führen (Bodis et al. 2009; Brindley and Rolland 1989; Kyrou et al. 2006a). D.h. die allostatiche Reaktion könnte nicht deaktiviert werden und es kommt zu einer pathologischen Manifestation im Organismus. Ein anderes Beispiel ist die depressive Störung. Stressvolle Lebensereignisse können Depressionen auslösen, die wiederum mit kardiovaskulären, metabolischen und immunologischen Dysfunktionen einhergehen können. Eine Dysregulation der Kortisolsekretion ist ein prominentes

Phänomen der depressiven Erkrankung. Die Konsequenzen der Hyperkortisolämie sind Osteoporose, abdominale Fettleibigkeit, sowie Atrophie des Hippocampus und Überaktivität der Amygdala (Sheline 2003; Sheline et al. 2003; Starkman et al. 2003). Bemerkenswerterweise sind Depressionen, Osteoporose, metabolische und immunologische Dysfunktionen mit einer Dysregulation des Endocannabinoidsystem verbunden (Di Marzo 2008; Kyrou et al. 2006b).

Wie es scheint, ist das Endocannabinoidsystem bei der Adaptation bzw. beim Prozess der Allostase koregulatorisch mit den Stressmediatoren Kortisol und Katecholaminen an der Aufrechterhaltung der Homöostase beteiligt (Cota et al. 2007; Ishac et al. 1996; Niederhoffer et al. 2001). Auffallenderweise ist sowohl eine Dysregulation des Endocannabinoid- als auch des Stresssystems assoziiert mit den gleichen Krankheitsbildern, wie z.B. Osteoporose, Adipositas, depressive Erkrankung (Charmandari et al. 2005; Di Marzo 2008; Kyrou et al. 2006a; Kyrou et al. 2006b).

Es wäre durchaus zu erwägen, dass das Endocannabinoidsystem als ein gemeinsam agierendes System mit dem Stresssystem einzustufen ist. Zum einen können Glukokortikoide und Katecholamine die Biosynthese von Endocannabinoiden induzieren und zum anderen modulieren Endocannabinoide die Sekretion von Katecholaminen und Glukokortikoiden. Das bedeutet, dass ein Versagen dieser Interaktion zu pathologischen Manifestationen bzw. zu einem „Allostatic load/overload“ führen kann. Diesbezüglich zeigt die neueste Forschung, dass Endocannabinoide womöglich eine zentrale Rolle bei der Allostase spielen (Patel and Hillard 2008).

Neben dem Gesundheitszustand und den Lebensumständen hängt es auch vom Individuum ab, wie es mit stressvoll empfundenen Situationen umgeht. Das entscheidene Kriterium ist eine erfolgreiche Habituation. Wie Untersuchungen an Probanden zeigen, steigen die Kortisolkonzentrationen bei Versuchspersonen, wenn sie zum ersten Mal in der Öffentlichkeit reden müssen. Nach wiederholten öffentlichen Auftritten, war bei den meisten Probanden kein Anstieg der Kortisolkonzentration mehr zu verzeichnen. Das bedeutet, eine erfolgreiche Habituation hat bei diesen Personen stattgefunden. Jedoch erlebten weiterhin 10% der untersuchten Personen, Sprechen in der Öffentlichkeit als ein stressvolles Ereignis und ihre Kortisolkonzentrationen normalisierten sich nicht (McEwen 1998).

Endocannabinoide scheinen beim Prozess der Habituation eine wichtige Rolle zu spielen. Denn wiederholte, stressvolle Situationen führten bei männlichen Mäusen in zentralinnervierten Arealen, die an der Verarbeitung von Stress beteiligt sind, zu einer Abnahme von c-fos mit gleichzeitiger Zunahme von 2-AG. Durch die Applikation eines CB1-Antagonisten kam es zu einer „Dishabituation“, d.h. nach repetitiven, stressreichen Situationen kam es nicht zu einer Abnahme der c-fos-Expression (Patel and Hillard 2008; Patel et al. 2005).

Endocannabinoide sind an der Hemmung von Neurotransmittersystemen beteiligt, so dass möglicherweise die Aktivierung des Endocannabinoidsystems beim chronischen Stress retrograd die Glutamatfreisetzung drosselt. Denn sobald die retrograd-lipiderge Signaltransmission, z.B. durch eine pharmakologische oder genomische Manipulation, unterbunden wird, kommt es zu einer Überaktivierung des Stresssystems und somit kann eine Habituation nicht erfolgreich stattfinden (Katona et al. 2006; Patel and Hillard 2008; Patel et al. 2005; Rademacher et al. 2008).

Ein Versagen der Habituation ist u.a. assoziiert mit der Entstehung von affektiven Störungen, insbesondere der depressiven Erkrankung (Major Depression). Patienten mit einer „major depression“ berichten viel häufiger von stressvollen Lebensereignissen als nicht erkrankte Personen. Dennoch entwickeln nur wenige Menschen, die stressvollen Lebensumständen ausgesetzt sind, eine Depression (Brilman and Ormel 2001; Ilgen and Hutchison 2005).

Die Weltgesundheitsorganisation (WHO) stuft die depressiven Erkrankungen derzeit als die vierthäufigste Erkrankung weltweit ein. Die WHO geht davon aus, dass die Anzahl der depressiv erkrankten Personen stark zunimmt und im Jahre 2020 den zweiten Platz der weltweit häufigsten Erkrankungen einnehmen wird (WHO 2009).

Depressive Personen zeigen, auf endokriner Ebene betrachtet, eine heterogene Dysregulation der HPA-Achse. Während Personen mit saisonal-bedingten Depressionen (Seasonal Affective Disorder, SAD) eine Hypokortisolämie aufweisen, zeigen Patienten mit der „major depression“ bzw. psychotischen Depression eine deutliche Hyperkortisolämie (Deuschle et al. 1997; Tsigos and Chrousos 2002; Young et al. 2001).

Interessanterweise ist bei der „major depression“ das zirkadiane Muster der ACTH- und Kortisolsekretion nicht gestört. Allerdings besteht eine deutlich erhöhte ACTH und Kortisolsekretion zu den jeweiligen Messpunkten. Außerdem kommt es zu einer Entkopplung von ACTH und Kortisolproduktion. Somit scheint ein zentraler, sowie ein peripherer Prozess an diesem pathophysiologischen Vorgang beteiligt zu sein (Carroll et al. 2007).

Die Entkopplung von ACTH und Kortisol, sowie die erhöhten ACTH- und Kortisolkonzentrationen, lassen vermuten, dass ein endogenes System, welches grundsätzlich eine abdämpfende Wirkung hat, insuffizient agiert. Demzufolge sind die 2-AG Konzentration bei Patienten mit einer „major depression“ signifikant erniedrigt. Es liegt nahe, dass das Endocannabinoidsystem als ein *endoprotektives System* versagt. Dieses Versagen ist dann u.a. mit endokrinen Entgleisungen gekoppelt (Hill et al. 2008).

Die vorliegende Arbeit zeigt, dass lipiderge Signaltransduktionsmechanismen an CRF-Axonterminalen der Eminentia mediana, an kortikotrophe Zellen der Adenohypophyse, an Glukokortikoid produzierenden Zellen der Zona fasciculata, sowie im sympathisch-adrenomedullärem System der Nebenniere vorkommen. Daher kann die Konzentration der zukünftigen Forschung auf diese genannten Ebenen (einschließlich der Nebenniere), unter Berücksichtigung der lipidergen Signaltransmission, evtl. neue therapeutische Interventionen ermöglichen.

Weiterführende Studien müssen zunächst die physiologische Rolle der Endocannabinoide auf zentraler Ebene vertiefter und differenzierter untersuchen. Gleichzeitig ist auch die Erforschung der lipidergen Signaltransmission in der Nebenniere von zentraler Bedeutung, da möglicherweise ein konkreteres Wissen helfen kann, spezifische, peripher wirkende Medikamente zu entwickeln.

Literatur

- Abou-Samra AB, Harwood JP, Catt KJ, Aguilera G. 1987. Mechanisms of action of CRF and other regulators of ACTH release in pituitary corticotrophs. *Ann N Y Acad Sci* 512:67-84.
- Ahn K, McKinney MK, Cravatt BF. 2008. Enzymatic pathways that regulate endocannabinoid signaling in the nervous system. *Chem Rev* 108(5):1687-1707.
- Aizawa S, Hoshino S, Sakata I, Adachi A, Yashima S, Hattori A, Sakai T. 2007. Diurnal change of thyroid-stimulating hormone mRNA expression in the rat pars tuberalis. *J Neuroendocrinol* 19(11):839-846.
- Akashi M, Tsuchiya Y, Yoshino T, Nishida E. 2002. Control of intracellular dynamics of mammalian period proteins by casein kinase I epsilon (CKIepsilon) and CKIdelta in cultured cells. *Mol Cell Biol* 22(6):1693-1703.
- Alberts B. 2008. *Molecular Biology of The Cell*. . New York: Garland Science, Taylor & Francis Group.
- Alexander SP, Kendall DA. 2007. The complications of promiscuity: endocannabinoid action and metabolism. *Br J Pharmacol* 152(5):602-623.
- Antle MC, Silver R. 2005. Orchestrating time: arrangements of the brain circadian clock. *Trends Neurosci* 28(3):145-151.
- Antoch MP, Song EJ, Chang AM, Vitaterna MH, Zhao Y, Wilsbacher LD, Sangoram AM, King DP, Pinto LH, Takahashi JS. 1997. Functional identification of the mouse circadian Clock gene by transgenic BAC rescue. *Cell* 89(4):655-667.
- Astarita G, Ahmed F, Piomelli D. 2008. Identification of biosynthetic precursors for the endocannabinoid anandamide in the rat brain. *J Lipid Res* 49(1):48-57.
- Atkinson HC, Wood SA, Castrique ES, Kershaw YM, Wiles CC, Lightman SL. 2008. Corticosteroids mediate fast feedback of the rat hypothalamic-pituitary-adrenal axis via the mineralocorticoid receptor. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 294(6):E1011-1022.
- Balazsa T, Biro J, Gullai N, Ledent C, Sperlagh B. 2008. CB1-cannabinoid receptors are involved in the modulation of non-synaptic [3H]serotonin release from the rat hippocampus. *Neurochem Int* 52(1-2):95-102.
- Balsalobre A, Brown SA, Marcacci L, Tronche F, Kellendonk C, Reichardt HM, Schutz G, Schibler U. 2000. Resetting of circadian time in peripheral tissues by glucocorticoid signaling. *Science* 289(5488):2344-2347.
- Barak LS, Oakley RH, Shetzline MA. 2003a. G protein-coupled receptor desensitization as a measure of signaling: modeling of arrestin recruitment to activated CCK-B receptors. *Assay Drug Dev Technol* 1(3):409-424.
- Barak LS, Wilbanks AM, Caron MG. 2003b. Constitutive desensitization: a new paradigm for g protein-coupled receptor regulation. *Assay Drug Dev Technol* 1(2):339-346.
- Barna I, Zelena D, Arszovszki AC, Ledent C. 2004. The role of endogenous cannabinoids in the hypothalamo-pituitary-adrenal axis regulation: in vivo and in vitro studies in CB1 receptor knockout mice. *Life Sci* 75(24):2959-2970.
- Barnes CA, McNaughton BL, Goddard GV, Douglas RM, Adamec R. 1977. Circadian rhythm of synaptic excitability in rat and monkey central nervous system. *Science* 197(4298):91-92.

- Baroncini M, Allet C, Leroy D, Beauvillain JC, Francke JP, Prevot V. 2007. Morphological evidence for direct interaction between gonadotrophin-releasing hormone neurones and astroglial cells in the human hypothalamus. *J Neuroendocrinol* 19(9):691-702.
- Barrett P, Choi WS, Morris M, Morgan P. 2000. A role for tyrosine phosphorylation in the regulation and sensitization of adenylate cyclase by melatonin. *FASEB J* 14(11):1619-1628.
- Barrett P, Messenger S, Schuster C, Moar KM, Mercer JG, Morgan PJ. 2002. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide acts as a paracrine regulator of melatonin-responsive cells of the ovine pars tuberalis. *Endocrinology* 143(6):2366-2375.
- Barrett P, Schuster C, Mercer J, Morgan PJ. 2003. Sensitization: a mechanism for melatonin action in the pars tuberalis. *J Neuroendocrinol* 15(4):415-421.
- Bartness TJ, Bamshad M. 1998. Innervation of mammalian white adipose tissue: implications for the regulation of total body fat. *Am J Physiol* 275(5 Pt 2):R1399-1411.
- Bartness TJ, Song CK, Demas GE. 2001. SCN efferents to peripheral tissues: implications for biological rhythms. *J Biol Rhythms* 16(3):196-204.
- Ben-Jonathan N, LaPensee CR, LaPensee EW. 2008. What can we learn from rodents about prolactin in humans? *Endocr Rev* 29(1):1-41.
- Benarroch EE. 2008. Suprachiasmatic nucleus and melatonin: reciprocal interactions and clinical correlations. *Neurology* 71(8):594-598.
- Benito C, Nunez E, Tolon RM, Carrier EJ, Rabano A, Hillard CJ, Romero J. 2003. Cannabinoid CB2 receptors and fatty acid amide hydrolase are selectively overexpressed in neuritic plaque-associated glia in Alzheimer's disease brains. *J Neurosci* 23(35):11136-11141.
- Berghuis P, Dobszay MB, Wang X, Spano S, Ledda F, Sousa KM, Schulte G, Ernfors P, Mackie K, Paratcha G, Hurd YL, Harkany T. 2005. Endocannabinoids regulate interneuron migration and morphogenesis by transactivating the TrkB receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(52):19115-19120.
- Bernard V, Brana C, Liste I, Lockridge O, Bloch B. 2003. Dramatic depletion of cell surface m2 muscarinic receptor due to limited delivery from intracytoplasmic stores in neurons of acetylcholinesterase-deficient mice. *Mol Cell Neurosci* 23(1):121-133.
- Bernard V, Decossas M, Liste I, Bloch B. 2006. Intraneuronal trafficking of G-protein-coupled receptors in vivo. *Trends Neurosci* 29(3):140-147.
- Berson DM. 2003. Strange vision: ganglion cells as circadian photoreceptors. *Trends Neurosci* 26(6):314-320.
- Berson DM, Dunn FA, Takao M. 2002. Phototransduction by retinal ganglion cells that set the circadian clock. *Science* 295(5557):1070-1073.
- Bisogno T, Howell F, Williams G, Minassi A, Cascio MG, Ligresti A, Matias I, Schiano-Moriello A, Paul P, Williams EJ, Gangadharan U, Hobbs C, Di Marzo V, Doherty P. 2003. Cloning of the first sn1-DAG lipases points to the spatial and temporal regulation of endocannabinoid signaling in the brain. *J Cell Biol* 163(3):463-468.

- Bockers TM, Niklowitz P, Bockmann J, Fauteck JD, Wittkowski W, Kreutz MR. 1995. Daily melatonin injections induce cytological changes in pars tuberalis-specific cells similar to short photoperiod. *J Neuroendocrinol* 7(8):607-613.
- Bodis J, Boncz I, Kriszbacher I. 2009. Permanent stress may be the trigger of an acute myocardial infarction on the first work-day of the week. *Int J Cardiol*.
- Boon K, Edwards JB, Siu IM, Olschner D, Eberhart CG, Marra MA, Strausberg RL, Riggins GJ. 2003. Comparison of medulloblastoma and normal neural transcriptomes identifies a restricted set of activated genes. *Oncogene* 22(48):7687-7694.
- Bornstein SR, Engeland WC, Ehrhart-Bornstein M, Herman JP. 2008. Dissociation of ACTH and glucocorticoids. *Trends Endocrinol Metab* 19(5):175-180.
- Bornstein SR, Gonzalez-Hernandez JA, Ehrhart-Bornstein M, Adler G, Scherbaum WA. 1994. Intimate contact of chromaffin and cortical cells within the human adrenal gland forms the cellular basis for important intraadrenal interactions. *J Clin Endocrinol Metab* 78(1):225-232.
- Bouaboula M, Bourrie B, Rinaldi-Carmona M, Shire D, Le Fur G, Casellas P. 1995a. Stimulation of cannabinoid receptor CB1 induces krox-24 expression in human astrocytoma cells. *J Biol Chem* 270(23):13973-13980.
- Bouaboula M, Poinot-Chazel C, Bourrie B, Canat X, Calandra B, Rinaldi-Carmona M, Le Fur G, Casellas P. 1995b. Activation of mitogen-activated protein kinases by stimulation of the central cannabinoid receptor CB1. *Biochem J* 312 (Pt 2):637-641.
- Bowers RR, Gettys TW, Prpic V, Harris RB, Bartness TJ. 2005. Short photoperiod exposure increases adipocyte sensitivity to noradrenergic stimulation in Siberian hamsters. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 288(5):R1354-1360.
- Brilman EI, Ormel J. 2001. Life events, difficulties and onset of depressive episodes in later life. *Psychol Med* 31(5):859-869.
- Brindley DN, Rolland Y. 1989. Possible connections between stress, diabetes, obesity, hypertension and altered lipoprotein metabolism that may result in atherosclerosis. *Clin Sci (Lond)* 77(5):453-461.
- Buckingham JC. 2006. Glucocorticoids: exemplars of multi-tasking. *Br J Pharmacol* 147 Suppl 1:S258-268.
- Buckley NE, Hansson S, Harta G, Mezey E. 1998. Expression of the CB1 and CB2 receptor messenger RNAs during embryonic development in the rat. *Neuroscience* 82(4):1131-1149.
- Buettner C, Muse ED, Cheng A, Chen L, Scherer T, Poci A, Su K, Cheng B, Li X, Harvey-White J, Schwartz GJ, Kunos G, Rossetti L. 2008. Leptin controls adipose tissue lipogenesis via central, STAT3-independent mechanisms. *Nat Med* 14(6):667-675.
- Buijs RM, Kalsbeek A. 2001. Hypothalamic integration of central and peripheral clocks. *Nat Rev Neurosci* 2(7):521-526.
- Buijs RM, la Fleur SE, Wortel J, Van Heyningen C, Zuiddam L, Mettenleiter TC, Kalsbeek A, Nagai K, Nijima A. 2003a. The suprachiasmatic nucleus balances sympathetic and parasympathetic output to peripheral organs through separate preautonomic neurons. *J Comp Neurol* 464(1):36-48.

- Buijs RM, van Eden CG, Goncharuk VD, Kalsbeek A. 2003b. The biological clock tunes the organs of the body: timing by hormones and the autonomic nervous system. *J Endocrinol* 177(1):17-26.
- Buijs RM, Wortel J, Van Heerikhuize JJ, Feenstra MG, Ter Horst GJ, Romijn HJ, Kalsbeek A. 1999. Anatomical and functional demonstration of a multisynaptic suprachiasmatic nucleus adrenal (cortex) pathway. *Eur J Neurosci* 11(5):1535-1544.
- 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(7):1009-1017.
- Busch L, Sterin-Borda L, Borda E. 2004. Expression and biological effects of CB1 cannabinoid receptor in rat parotid gland. *Biochem Pharmacol* 68(9):1767-1774.
- Cailotto C, La Fleur SE, Van Heijningen C, Wortel J, Kalsbeek A, Feenstra M, Pevet P, Buijs RM. 2005. The suprachiasmatic nucleus controls the daily variation of plasma glucose via the autonomic output to the liver: are the clock genes involved? *Eur J Neurosci* 22(10):2531-2540.
- Campolongo P, Roozendaal B, Trezza V, Hauer D, Schelling G, McGaugh JL, Cuomo V. 2009. Endocannabinoids in the rat basolateral amygdala enhance memory consolidation and enable glucocorticoid modulation of memory. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106(12):4888-4893.
- Carroll BJ, Cassidy F, Naftolowitz D, Tatham NE, Wilson WH, Iranmanesh A, Liu PY, Veldhuis JD. 2007. Pathophysiology of hypercortisolism in depression. *Acta Psychiatr Scand Suppl*(433):90-103.
- Cermakian N, Boivin DB. 2003. A molecular perspective of human circadian rhythm disorders. *Brain Res Brain Res Rev* 42(3):204-220.
- Charmandari E, Tsigos C, Chrousos G. 2005. Endocrinology of the stress response. *Annu Rev Physiol* 67:259-284.
- Chaudhury D, Wang LM, Colwell CS. 2005. Circadian regulation of hippocampal long-term potentiation. *J Biol Rhythms* 20(3):225-236.
- Chrousos GP. 1992. Regulation and dysregulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. The corticotropin-releasing hormone perspective. *Endocrinol Metab Clin North Am* 21(4):833-858.
- Chrousos GP. 1998. Ultradian, circadian, and stress-related hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity--a dynamic digital-to-analog modulation. *Endocrinology* 139(2):437-440.
- Chrousos GP, Gold PW. 1992. The concepts of stress and stress system disorders. Overview of physical and behavioral homeostasis. *JAMA* 267(9):1244-1252.
- Citri A, Malenka RC. 2008. Synaptic plasticity: multiple forms, functions, and mechanisms. *Neuropsychopharmacology* 33(1):18-41.
- Claustrat B, Valatx JL, Harthe C, Brun J. 2008. Effect of constant light on prolactin and corticosterone rhythms evaluated using a noninvasive urine sampling protocol in the rat. *Horm Metab Res* 40(6):398-403.
- Cooray SN, Chan L, Metherell L, Storr H, Clark AJ. 2008. Adrenocorticotropin resistance syndromes. *Endocr Dev* 13:99-116.
- Cota D. 2008. The role of the endocannabinoid system in the regulation of hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity. *J Neuroendocrinol* 20 Suppl 1:35-38.

- Cota D, Marsicano G, Tschop M, Grubler Y, Flachskamm C, Schubert M, Auer D, Yassouridis A, Thone-Reineke C, Ortman S, Tomassoni F, Cervino C, Nisoli E, Linthorst AC, Pasquali R, Lutz B, Stalla GK, Pagotto U. 2003. The endogenous cannabinoid system affects energy balance via central orexigenic drive and peripheral lipogenesis. *J Clin Invest* 112(3):423-431.
- Cota D, Steiner MA, Marsicano G, Cervino C, Herman JP, Grubler Y, Stalla J, Pasquali R, Lutz B, Stalla GK, Pagotto U. 2007. Requirement of cannabinoid receptor type 1 for the basal modulation of hypothalamic-pituitary-adrenal axis function. *Endocrinology* 148(4):1574-1581.
- Cravatt BF, Giang DK, Mayfield SP, Boger DL, Lerner RA, Gilula NB. 1996. Molecular characterization of an enzyme that degrades neuromodulatory fatty-acid amides. *Nature* 384(6604):83-87.
- Cristino L, de Petrocellis L, Pryce G, Baker D, Guglielmotti V, Di Marzo V. 2006. Immunohistochemical localization of cannabinoid type 1 and vanilloid transient receptor potential vanilloid type 1 receptors in the mouse brain. *Neuroscience* 139(4):1405-1415.
- Crosio C, Cermakian N, Allis CD, Sassone-Corsi P. 2000. Light induces chromatin modification in cells of the mammalian circadian clock. *Nat Neurosci* 3(12):1241-1247.
- Daigle TL, Kwok ML, Mackie K. 2008. Regulation of CB1 cannabinoid receptor internalization by a promiscuous phosphorylation-dependent mechanism. *J Neurochem* 106(1):70-82.
- Darlington TK, Wager-Smith K, Ceriani MF, Staknis D, Gekakis N, Steeves TD, Weitz CJ, Takahashi JS, Kay SA. 1998. Closing the circadian loop: CLOCK-induced transcription of its own inhibitors *per* and *tim*. *Science* 280(5369):1599-1603.
- Darna M, Schmutz I, Richter K, Yelamanchili SV, Pendyala G, Holtje M, Albrecht U, Ahnert-Hilger G. 2009. Time of day-dependent sorting of the vesicular glutamate transporter to the plasma membrane. *J Biol Chem* 284(7):4300-4307.
- de Miguel R, Romero J, Munoz RM, Garcia-Gil L, Gonzalez S, Villanua MA, Makriyannis A, Ramos JA, Fernandez-Ruiz JJ. 1998. Effects of cannabinoids on prolactin and gonadotrophin secretion: involvement of changes in hypothalamic gamma-aminobutyric acid (GABA) inputs. *Biochem Pharmacol* 56(10):1331-1338.
- De Petrocellis L, Melck D, Bisogno T, Milone A, Di Marzo V. 1999. Finding of the endocannabinoid signalling system in Hydra, a very primitive organism: possible role in the feeding response. *Neuroscience* 92(1):377-387.
- De Souza EB, Insel TR, Perrin MH, Rivier J, Vale WW, Kuhar MJ. 1985. Corticotropin-releasing factor receptors are widely distributed within the rat central nervous system: an autoradiographic study. *J Neurosci* 5(12):3189-3203.
- De Souza EB, Perrin MH, Insel TR, Rivier J, Vale WW, Kuhar MJ. 1984. Corticotropin-releasing factor receptors in rat forebrain: autoradiographic identification. *Science* 224(4656):1449-1451.
- Deadwyler SA, Hampson RE, Mu J, Whyte A, Childers S. 1995. Cannabinoids modulate voltage sensitive potassium A-current in hippocampal neurons via a cAMP-dependent process. *J Pharmacol Exp Ther* 273(2):734-743.
- DeBruyne JP, Weaver DR, Reppert SM. 2007. CLOCK and NPAS2 have overlapping roles in the suprachiasmatic circadian clock. *Nat Neurosci* 10(5):543-545.

- Degroot A, Kofalvi A, Wade MR, Davis RJ, Rodrigues RJ, Rebola N, Cunha RA, Nomikos GG. 2006. CB1 receptor antagonism increases hippocampal acetylcholine release: site and mechanism of action. *Mol Pharmacol* 70(4):1236-1245.
- Demuth DG, Molleman A. 2006. Cannabinoid signalling. *Life Sci* 78(6):549-563.
- Derkinderen P, Valjent E, Toutant M, Corvol JC, Enslen H, Ledent C, Trzaskos J, Caboche J, Girault JA. 2003. Regulation of extracellular signal-regulated kinase by cannabinoids in hippocampus. *J Neurosci* 23(6):2371-2382.
- Devane WA, Hanus L, Breuer A, Pertwee RG, Stevenson LA, Griffin G, Gibson D, Mandelbaum A, Etinger A, Mechoulam R. 1992. Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. *Science* 258(5090):1946-1949.
- Devenport L, Doughty D, Heiberger B, Burton D, Brown R, Stith R. 1993. Exercise endurance in rats: roles of type I and II corticosteroid receptors. *Physiol Behav* 53(6):1171-1175.
- Di Marzo V. 2008. Targeting the endocannabinoid system: to enhance or reduce? *Nat Rev Drug Discov* 7(5):438-455.
- Di Marzo V, Fontana A, Cadas H, Schinelli S, Cimino G, Schwartz JC, Piomelli D. 1994. Formation and inactivation of endogenous cannabinoid anandamide in central neurons. *Nature* 372(6507):686-691.
- Di Marzo V, Goparaju SK, Wang L, Liu J, Batkai S, Jarai Z, Fezza F, Miura GI, Palmiter RD, Sugiura T, Kunos G. 2001. Leptin-regulated endocannabinoids are involved in maintaining food intake. *Nature* 410(6830):822-825.
- Di S, Boudaba C, Popescu IR, Weng FJ, Harris C, Marcheselli VL, Bazan NG, Tasker JG. 2005. Activity-dependent release and actions of endocannabinoids in the rat hypothalamic supraoptic nucleus. *J Physiol* 569(Pt 3):751-760.
- Di S, Malcher-Lopes R, Halmos KC, Tasker JG. 2003. Nongenomic glucocorticoid inhibition via endocannabinoid release in the hypothalamus: a fast feedback mechanism. *J Neurosci* 23(12):4850-4857.
- Di S, Maxson MM, Franco A, Tasker JG. 2009. Glucocorticoids regulate glutamate and GABA synapse-specific retrograde transmission via divergent nongenomic signaling pathways. *J Neurosci* 29(2):393-401.
- Di S, Tasker JG. 2008. Rapid synapse-specific regulation of hypothalamic magnocellular neurons by glucocorticoids. *Prog Brain Res* 170:379-388.
- Diaz-Flores L, Gutierrez R, Varela H, Valladares F, Alvarez-Arguelles H, Borges R. 2008. Histogenesis and morphofunctional characteristics of chromaffin cells. *Acta Physiol (Oxf)* 192(2):145-163.
- Dijkstra I, Binnekade R, Tilders FJ. 1996. Diurnal variation in resting levels of corticosterone is not mediated by variation in adrenal responsiveness to adrenocorticotropin but involves splanchnic nerve integrity. *Endocrinology* 137(2):540-547.
- Drolet DW, Scully KM, Simmons DM, Wegner M, Chu KT, Swanson LW, Rosenfeld MG. 1991. TEF, a transcription factor expressed specifically in the anterior pituitary during embryogenesis, defines a new class of leucine zipper proteins. *Genes Dev* 5(10):1739-1753.
- Dunlap JC. 1999. Molecular bases for circadian clocks. *Cell* 96(2):271-290.

- Egertova M, Cravatt BF, Elphick MR. 2003. Comparative analysis of fatty acid amide hydrolase and cb(1) cannabinoid receptor expression in the mouse brain: evidence of a widespread role for fatty acid amide hydrolase in regulation of endocannabinoid signaling. *Neuroscience* 119(2):481-496.
- Egertova M, Simon GM, Cravatt BF, Elphick MR. 2008. Localization of N-acyl phosphatidylethanolamine phospholipase D (NAPE-PLD) expression in mouse brain: A new perspective on N-acylethanolamines as neural signaling molecules. *J Comp Neurol* 506(4):604-615.
- Eide EJ, Kang H, Crapo S, Gallego M, Virshup DM. 2005. Casein kinase I in the mammalian circadian clock. *Methods Enzymol* 393:408-418.
- Engeland WC, Arnhold MM. 2005. Neural circuitry in the regulation of adrenal corticosterone rhythmicity. *Endocrine* 28(3):325-332.
- Engler D, Redei E, Kola I. 1999. The corticotropin-release inhibitory factor hypothesis: a review of the evidence for the existence of inhibitory as well as stimulatory hypophysiotropic regulation of adrenocorticotropin secretion and biosynthesis. *Endocr Rev* 20(4):460-500.
- Erdmann G, Schutz G, Berger S. 2008. Loss of glucocorticoid receptor function in the pituitary results in early postnatal lethality. *Endocrinology* 149(7):3446-3451.
- Evans RM, Wease KN, MacDonald CJ, Khairy HA, Ross RA, Scott RH. 2008. Modulation of sensory neuron potassium conductances by anandamide indicates roles for metabolites. *Br J Pharmacol* 154(2):480-492.
- Evinger MJ, Ernsberger P, Regunathan S, Joh TH, Reis DJ. 1994. A single transmitter regulates gene expression through two separate mechanisms: cholinergic regulation of phenylethanolamine N-methyltransferase mRNA via nicotinic and muscarinic pathways. *J Neurosci* 14(4):2106-2116.
- Farfel Z, Bourne HR, Iiri T. 1999. The expanding spectrum of G protein diseases. *N Engl J Med* 340(13):1012-1020.
- Felder CC, Glass M. 1998. Cannabinoid receptors and their endogenous agonists. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 38:179-200.
- Ferguson SS. 2001. Evolving concepts in G protein-coupled receptor endocytosis: the role in receptor desensitization and signaling. *Pharmacol Rev* 53(1):1-24.
- Fernandez-Ruiz JJ, Munoz RM, Romero J, Villanua MA, Makriyannis A, Ramos JA. 1997. Time course of the effects of different cannabimimetics on prolactin and gonadotrophin secretion: evidence for the presence of CB1 receptors in hypothalamic structures and their involvement in the effects of cannabimimetics. *Biochem Pharmacol* 53(12):1919-1927.
- French-Mullen JM. 1995. Cortisol inhibition of calcium currents in guinea pig hippocampal CA1 neurons via G-protein-coupled activation of protein kinase C. *J Neurosci* 15(1 Pt 2):903-911.
- Fowler CJ. 2007. The contribution of cyclooxygenase-2 to endocannabinoid metabolism and action. *Br J Pharmacol* 152(5):594-601.
- Gabr RW, Gladfelter WE, Birkle DL, Azzaro AJ. 1994. In vivo microdialysis of corticotropin releasing factor (CRF): calcium dependence of depolarization-induced neurosecretion of CRF. *Neurosci Lett* 169(1-2):63-67.
- Galiegue S, Mary S, Marchand J, Dussossoy D, Carriere D, Carayon P, Bouaboula M, Shire D, Le Fur G, Casellas P. 1995. Expression of central and peripheral

- cannabinoid receptors in human immune tissues and leukocyte subpopulations. *Eur J Biochem* 232(1):54-61.
- Gallego M, Virshup DM. 2007. Post-translational modifications regulate the ticking of the circadian clock. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8(2):139-148.
- Ganguly S, Coon SL, Klein DC. 2002. Control of melatonin synthesis in the mammalian pineal gland: the critical role of serotonin acetylation. *Cell Tissue Res* 309(1):127-137.
- Garcia DE, Brown S, Hille B, Mackie K. 1998. Protein kinase C disrupts cannabinoid actions by phosphorylation of the CB1 cannabinoid receptor. *J Neurosci* 18(8):2834-2841.
- Gillies GE, Linton EA, Lowry PJ. 1982. Corticotropin releasing activity of the new CRF is potentiated several times by vasopressin. *Nature* 299(5881):355-357.
- Giuffrida A, Parsons LH, Kerr TM, Rodriguez de Fonseca F, Navarro M, Piomelli D. 1999. Dopamine activation of endogenous cannabinoid signaling in dorsal striatum. *Nat Neurosci* 2(4):358-363.
- Glass M, Felder CC. 1997. Concurrent stimulation of cannabinoid CB1 and dopamine D2 receptors augments cAMP accumulation in striatal neurons: evidence for a Gs linkage to the CB1 receptor. *J Neurosci* 17(14):5327-5333.
- Gonzalez S, Manzanares J, Berrendero F, Wenger T, Corchero J, Bisogno T, Romero J, Fuentes JA, Di Marzo V, Ramos JA, Fernandez-Ruiz J. 1999. Identification of endocannabinoids and cannabinoid CB(1) receptor mRNA in the pituitary gland. *Neuroendocrinology* 70(2):137-145.
- Gooley JJ, Lu J, Chou TC, Scammell TE, Saper CB. 2001. Melanopsin in cells of origin of the retinohypothalamic tract. *Nat Neurosci* 4(12):1165.
- Gorji A, Khaleghi Ghadiri M. 2002. History of headache in medieval Persian medicine. *Lancet Neurol* 1(8):510-515.
- Grimmelikhuijzen CJ, Leviev I, Carstensen K. 1996. Peptides in the nervous systems of cnidarians: structure, function, and biosynthesis. *Int Rev Cytol* 167:37-89.
- Groner B, Hynes NE, Rahmsdorf U, Ponta H. 1983. Transcription initiation of transfected mouse mammary tumor virus LTR DNA is regulated by glucocorticoid hormones. *Nucleic Acids Res* 11(14):4713-4725.
- Gulyas AI, Cravatt BF, Bracey MH, Dinh TP, Piomelli D, Boscia F, Freund TF. 2004. Segregation of two endocannabinoid-hydrolyzing enzymes into pre- and postsynaptic compartments in the rat hippocampus, cerebellum and amygdala. *Eur J Neurosci* 20(2):441-458.
- Gutknecht E, Van der Linden I, Van Kolen K, Verhoeven KF, Vauquelin G, Dautzenberg FM. 2009. Molecular mechanisms of corticotropin-releasing factor receptor-induced calcium signaling. *Mol Pharmacol* 75(3):648-657.
- Habib KE, Gold PW, Chrousos GP. 2001. Neuroendocrinology of stress. *Endocrinol Metab Clin North Am* 30(3):695-728; vii-viii.
- Hamelink CR, Currie PJ, Chambers JW, Castonguay TW, Coscina DV. 1994. Corticosterone-responsive and -unresponsive metabolic characteristics of adrenalectomized rats. *Am J Physiol* 267(3 Pt 2):R799-804.
- Hannibal J, Fahrenkrug J. 2002. Melanopsin: a novel photopigment involved in the photoentrainment of the brain's biological clock? *Ann Med* 34(5):401-407.
- Hanus LO. 2007. Discovery and isolation of anandamide and other endocannabinoids. *Chem Biodivers* 4(8):1828-1841.

- Hartenstein V. 2006. The neuroendocrine system of invertebrates: a developmental and evolutionary perspective. *J Endocrinol* 190(3):555-570.
- Hartenstein V, Mandal L. 2006. The blood/vascular system in a phylogenetic perspective. *Bioessays* 28(12):1203-1210.
- Hashimotodani Y, Ohno-Shosaku T, Kano M. 2007. Presynaptic monoacylglycerol lipase activity determines basal endocannabinoid tone and terminates retrograde endocannabinoid signaling in the hippocampus. *J Neurosci* 27(5):1211-1219.
- Hashimotodani Y, Ohno-Shosaku T, Maejima T, Fukami K, Kano M. 2008. Pharmacological evidence for the involvement of diacylglycerol lipase in depolarization-induced endocannabinoid release. *Neuropharmacology* 54(1):58-67.
- Hattar S, Liao HW, Takao M, Berson DM, Yau KW. 2002. Melanopsin-containing retinal ganglion cells: architecture, projections, and intrinsic photosensitivity. *Science* 295(5557):1065-1070.
- Hayashi M, Araki S, Kohyama J, Shioda K, Fukatsu R, Tamagawa K. 2004. Brainstem and basal ganglia lesions in xeroderma pigmentosum group A. *J Neuropathol Exp Neurol* 63(10):1048-1057.
- Hazlerigg DG, Gonzalez-Brito A, Lawson W, Hastings MH, Morgan PJ. 1993. Prolonged exposure to melatonin leads to time-dependent sensitization of adenylate cyclase and down-regulates melatonin receptors in pars tuberalis cells from ovine pituitary. *Endocrinology* 132(1):285-292.
- Helliwell RJ, Williams LM. 1994. The development of melatonin-binding sites in the ovine fetus. *J Endocrinol* 142(3):475-484.
- Hermann H, Lutz B. 2005. Coexpression of the cannabinoid receptor type 1 with the corticotropin-releasing hormone receptor type 1 in distinct regions of the adult mouse forebrain. *Neurosci Lett* 375(1):13-18.
- Hill MN, Miller GE, Ho WS, Gorzalka BB, Hillard CJ. 2008. Serum endocannabinoid content is altered in females with depressive disorders: a preliminary report. *Pharmacopsychiatry* 41(2):48-53.
- Hinz B, Hirschelmann R. 2000. Rapid non-genomic feedback effects of glucocorticoids on CRF-induced ACTH secretion in rats. *Pharm Res* 17(10):1273-1277.
- Ho BY, Stadnicka A, Prather PL, Buckley AR, Current LL, Bosnjak ZJ, Kwok WM. 2000. Cannabinoid CB1 receptor-mediated inhibition of prolactin release and signaling mechanisms in GH4C1 cells. *Endocrinology* 141(5):1675-1685.
- Hogenesch JB, Gu YZ, Jain S, Bradfield CA. 1998. The basic-helix-loop-helix-PAS orphan MOP3 forms transcriptionally active complexes with circadian and hypoxia factors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(10):5474-5479.
- Hoorneman EM, Buijs RM. 1982. Vasopressin fiber pathways in the rat brain following suprachiasmatic nucleus lesioning. *Brain Res* 243(2):235-241.
- Hyde GN, Seale AP, Grau EG, Borski RJ. 2004. Cortisol rapidly suppresses intracellular calcium and voltage-gated calcium channel activity in prolactin cells of the tilapia (*Oreochromis mossambicus*). *Am J Physiol Endocrinol Metab* 286(4):E626-633.
- Iiri T, Farfel Z, Bourne HR. 1998. G-protein diseases furnish a model for the turn-on switch. *Nature* 394(6688):35-38.
- Ilgen MA, Hutchison KE. 2005. A history of major depressive disorder and the response to stress. *J Affect Disord* 86(2-3):143-150.

- Ishac EJ, Jiang L, Lake KD, Varga K, Abood ME, Kunos G. 1996. Inhibition of exocytotic noradrenaline release by presynaptic cannabinoid CB1 receptors on peripheral sympathetic nerves. *Br J Pharmacol* 118(8):2023-2028.
- Ishida A, Mutoh T, Ueyama T, Bando H, Masubuchi S, Nakahara D, Tsujimoto G, Okamura H. 2005. Light activates the adrenal gland: timing of gene expression and glucocorticoid release. *Cell Metab* 2(5):297-307.
- Jasper MS, Engeland WC. 1994. Splanchnic neural activity modulates ultradian and circadian rhythms in adrenocortical secretion in awake rats. *Neuroendocrinology* 59(2):97-109.
- Jiang M, Bajpayee NS. 2009. Molecular mechanisms of go signaling. *Neurosignals* 17(1):23-41.
- Jin W, Brown S, Roche JP, Hsieh C, Celver JP, Kooor A, Chavkin C, Mackie K. 1999. Distinct domains of the CB1 cannabinoid receptor mediate desensitization and internalization. *J Neurosci* 19(10):3773-3780.
- Jo YH, Chen YJ, Chua SC, Jr., Talmage DA, Role LW. 2005. Integration of endocannabinoid and leptin signaling in an appetite-related neural circuit. *Neuron* 48(6):1055-1066.
- Joels M, De Kloet ER. 1992. Coordinative mineralocorticoid and glucocorticoid receptor-mediated control of responses to serotonin in rat hippocampus. *Neuroendocrinology* 55(3):344-350.
- Johnston JD. 2004. Photoperiodic regulation of prolactin secretion: changes in intrapituitary signalling and lactotroph heterogeneity. *J Endocrinol* 180(3):351-356.
- Juan-Pico P, Fuentes E, Bermudez-Silva FJ, Javier Diaz-Molina F, Ripoll C, Rodriguez de Fonseca F, Nadal A. 2006. Cannabinoid receptors regulate Ca(2+) signals and insulin secretion in pancreatic beta-cell. *Cell Calcium* 39(2):155-162.
- 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):109-118.
- Kalsbeek A, Fliers E, Romijn JA, La Fleur SE, Wortel J, Bakker O, Endert E, Buijs RM. 2001. The suprachiasmatic nucleus generates the diurnal changes in plasma leptin levels. *Endocrinology* 142(6):2677-2685.
- Kalsbeek A, Palm IF, La Fleur SE, Scheer FA, Perreau-Lenz S, Ruiters M, Kreier F, Cailotto C, Buijs RM. 2006a. SCN outputs and the hypothalamic balance of life. *J Biol Rhythms* 21(6):458-469.
- Kalsbeek A, Perreau-Lenz S, Buijs RM. 2006b. A network of (autonomic) clock outputs. *Chronobiol Int* 23(3):521-535.
- Kalsbeek A, van der Vliet J, Buijs RM. 1996a. Decrease of endogenous vasopressin release necessary for expression of the circadian rise in plasma corticosterone: a reverse microdialysis study. *J Neuroendocrinol* 8(4):299-307.
- Kalsbeek A, van Heerikhuizen JJ, Wortel J, Buijs RM. 1996b. A diurnal rhythm of stimulatory input to the hypothalamo-pituitary-adrenal system as revealed by timed intrahypothalamic administration of the vasopressin V1 antagonist. *J Neurosci* 16(17):5555-5565.
- Kalsbeek A, Verhagen LA, Schallij I, Foppen E, Saboureau M, Bothorel B, Buijs RM, Pevet P. 2008. Opposite actions of hypothalamic vasopressin on circadian corticosterone rhythm in nocturnal versus diurnal species. *Eur J Neurosci* 27(4):818-827.

- Kasai M, Yamashita H. 1988. Inhibition by cortisol of neurons in the paraventricular nucleus of the hypothalamus in adrenalectomized rats; an in vitro study. *Neurosci Lett* 91(1):59-64.
- Kass-Simon G, Pierobon P. 2007. Cnidarian chemical neurotransmission, an updated overview. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 146(1):9-25.
- Katona I, Freund TF. 2008. Endocannabinoid signaling as a synaptic circuit breaker in neurological disease. *Nat Med* 14(9):923-930.
- Katona I, Urban GM, Wallace M, Ledent C, Jung KM, Piomelli D, Mackie K, Freund TF. 2006. Molecular composition of the endocannabinoid system at glutamatergic synapses. *J Neurosci* 26(21):5628-5637.
- Kawamura Y, Fukaya M, Maejima T, Yoshida T, Miura E, Watanabe M, Ohno-Shosaku T, Kano M. 2006. The CB1 cannabinoid receptor is the major cannabinoid receptor at excitatory presynaptic sites in the hippocampus and cerebellum. *J Neurosci* 26(11):2991-3001.
- Keesler GA, Camacho F, Guo Y, Virshup D, Mondadori C, Yao Z. 2000. Phosphorylation and destabilization of human period I clock protein by human casein kinase I epsilon. *Neuroreport* 11(5):951-955.
- Keller-Wood M, Shinsako J, Dallman MF. 1984. Interaction between stimulus intensity and corticosteroid feedback in control of ACTH. *Am J Physiol* 247(4 Pt 1):E489-494.
- Kesse WK, Parker TL, Coupland RE. 1988. The innervation of the adrenal gland. I. The source of pre- and postganglionic nerve fibres to the rat adrenal gland. *J Anat* 157:33-41.
- Kim J, Alger BE. 2004. Inhibition of cyclooxygenase-2 potentiates retrograde endocannabinoid effects in hippocampus. *Nat Neurosci* 7(7):697-698.
- Kim MY, Lee BH, Kwon D, Kang H, Nassel DR. 1998. Distribution of tachykinin-related neuropeptide in the developing central nervous system of the moth *Spodoptera litura*. *Cell Tissue Res* 294(2):351-365.
- Klein DC, Ganguly S, Coon S, Weller JL, Obsil T, Hickman A, Dyda F. 2002. 14-3-3 Proteins and photoneuroendocrine transduction: role in controlling the daily rhythm in melatonin. *Biochem Soc Trans* 30(4):365-373.
- Kleitman N, Holzwarth MA. 1985. Catecholaminergic innervation of the rat adrenal cortex. *Cell Tissue Res* 241(1):139-147.
- Koch M, Habazettl I, Dehghani F, Korf HW. 2008. The rat pineal gland comprises an endocannabinoid system. *J Pineal Res* 45(4):351-360.
- Konturek PC, Konturek SJ, Burnat G, Brzozowski T, Brzozowska I, Reiter RJ. 2008. Dynamic physiological and molecular changes in gastric ulcer healing achieved by melatonin and its precursor L-tryptophan in rats. *J Pineal Res* 45(2):180-190.
- Korf HW, Stehle JH. 2002. The circadian system: circuits-cells-clock genes. *Cell Tissue Res* 309(1):1-2.
- Korf HW, von Gall C. 2006. Mice, melatonin and the circadian system. *Mol Cell Endocrinol* 252(1-2):57-68.
- Korf HW, Von Gall C, Stehle J. 2003. The circadian system and melatonin: lessons from rats and mice. *Chronobiol Int* 20(4):697-710.
- Kreutz S, Koch M, Bottger C, Ghadban C, Korf HW, Dehghani F. 2009. 2-Arachidonoylglycerol elicits neuroprotective effects on excitotoxically lesioned

- dentate gyrus granule cells via abnormal-cannabidiol-sensitive receptors on microglial cells. *Glia* 57(3):286-294.
- Kume K, Zylka MJ, Sriram S, Shearman LP, Weaver DR, Jin X, Maywood ES, Hastings MH, Reppert SM. 1999. mCRY1 and mCRY2 are essential components of the negative limb of the circadian clock feedback loop. *Cell* 98(2):193-205.
- Kunos G, Osei-Hyiaman D, Liu J, Godlewski G, Batkai S. 2008. Endocannabinoids and the control of energy homeostasis. *J Biol Chem* 283(48):33021-33025.
- Kyrou I, Chrousos GP, Tsigos C. 2006a. Stress, visceral obesity, and metabolic complications. *Ann N Y Acad Sci* 1083:77-110.
- Kyrou I, Valsamakis G, Tsigos C. 2006b. The endocannabinoid system as a target for the treatment of visceral obesity and metabolic syndrome. *Ann N Y Acad Sci* 1083:270-305.
- Lafourcade M, Elezgarai I, Mato S, Bakiri Y, Grandes P, Manzoni OJ. 2007. Molecular components and functions of the endocannabinoid system in mouse prefrontal cortex. *PLoS ONE* 2(1):e709.
- Lamouche S, Martineau D, Yamaguchi N. 1999. Modulation of adrenal catecholamine release by PACAP in vivo. *Am J Physiol* 276(1 Pt 2):R162-170.
- Lamouche S, Yamaguchi N. 2001. Role of PAC(1) receptor in adrenal catecholamine secretion induced by PACAP and VIP in vivo. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 280(2):R510-518.
- Lamouche S, Yamaguchi N. 2003. PACAP release from the canine adrenal gland in vivo: its functional role in severe hypotension. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 284(2):R588-597.
- Lee AK, Tse A. 1997. Mechanism underlying corticotropin-releasing hormone (CRH) triggered cytosolic Ca²⁺ rise in identified rat corticotrophs. *J Physiol* 504 (Pt 2):367-378.
- Lee TY, Pan JT. 2001. Involvement of central GABAergic neurons in basal and diurnal changes of tuberoinfundibular dopaminergic neuronal activity and prolactin secretion. *Life Sci* 68(17):1965-1975.
- Lefkowitz RJ, Roth J, Pastan I. 1970a. Effects of calcium on ACTH stimulation of the adrenal: separation of hormone binding from adenyl cyclase activation. *Nature* 228(5274):864-866.
- Lefkowitz RJ, Roth J, Pricer W, Pastan I. 1970b. ACTH receptors in the adrenal: specific binding of ACTH-125I and its relation to adenyl cyclase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 65(3):745-752.
- Lincoln GA. 2002. Neuroendocrine regulation of seasonal gonadotrophin and prolactin rhythms: lessons from the Soay ram model. *Reprod Suppl* 59:131-147.
- Lincoln GA, Clarke IJ. 1994. Photoperiodically-induced cycles in the secretion of prolactin in hypothalamo-pituitary disconnected rams: evidence for translation of the melatonin signal in the pituitary gland. *J Neuroendocrinol* 6(3):251-260.
- Lincoln GA, Clarke IJ. 2002. Noradrenaline and dopamine regulation of prolactin secretion in sheep: role in prolactin homeostasis but not photoperiodism. *J Neuroendocrinol* 14(1):36-44.
- Liu J, Wang L, Harvey-White J, Huang BX, Kim HY, Luquet S, Palmiter RD, Krystal G, Rai R, Mahadevan A, Razdan RK, Kunos G. 2008. Multiple pathways involved in the biosynthesis of anandamide. *Neuropharmacology* 54(1):1-7.

- Lovejoy DA. 2005. *Neuroendocrinology. An integrated Approach*. West Sussex John Wiley & Sons
- Lucas RJ, Freedman MS, Lupi D, Munoz M, David-Gray ZK, Foster RG. 2001. Identifying the photoreceptive inputs to the mammalian circadian system using transgenic and retinally degenerate mice. *Behav Brain Res* 125(1-2):97-102.
- Lucas RJ, Freedman MS, Munoz M, Garcia-Fernandez JM, Foster RG. 1999. Regulation of the mammalian pineal by non-rod, non-cone, ocular photoreceptors. *Science* 284(5413):505-507.
- Maccarrone M, Bari M, Di Rienzo M, Finazzi-Agro A, Rossi A. 2003a. Progesterone activates fatty acid amide hydrolase (FAAH) promoter in human T lymphocytes through the transcription factor Ikaros. Evidence for a synergistic effect of leptin. *J Biol Chem* 278(35):32726-32732.
- Maccarrone M, Cecconi S, Rossi G, Battista N, Pauselli R, Finazzi-Agro A. 2003b. Anandamide activity and degradation are regulated by early postnatal aging and follicle-stimulating hormone in mouse Sertoli cells. *Endocrinology* 144(1):20-28.
- Maccarrone M, Di Rienzo M, Finazzi-Agro A, Rossi A. 2003c. Leptin activates the anandamide hydrolase promoter in human T lymphocytes through STAT3. *J Biol Chem* 278(15):13318-13324.
- Maccarrone M, Frilde E, Bisogno T, Bari M, Cascio MG, Battista N, Finazzi-Agro A, Suris R, Mechoulam R, Di Marzo V. 2005. Up-regulation of the endocannabinoid system in the uterus of leptin knockout (ob/ob) mice and implications for fertility. *Mol Hum Reprod* 11(1):21-28.
- Maccarrone M, Gasperi V, Fezza F, Finazzi-Agro A, Rossi A. 2004. Differential regulation of fatty acid amide hydrolase promoter in human immune cells and neuronal cells by leptin and progesterone. *Eur J Biochem* 271(23-24):4666-4676.
- Malcher-Lopes R, Di S, Marcheselli VS, Weng FJ, Stuart CT, Bazan NG, Tasker JG. 2006. Opposing crosstalk between leptin and glucocorticoids rapidly modulates synaptic excitation via endocannabinoid release. *J Neurosci* 26(24):6643-6650.
- Manders E, Verbeek F, Aten J. 1993. Measurement of co-localization of objects in dual-colour confocal images. *Journal of Microscopy* 169:375-382.
- Maneuf YP, Crossman AR, Brotchie JM. 1997. The cannabinoid receptor agonist WIN 55,212-2 reduces D2, but not D1, dopamine receptor-mediated alleviation of akinesia in the reserpine-treated rat model of Parkinson's disease. *Exp Neurol* 148(1):265-270.
- Manzanares J, Corchero J, Fuentes JA. 1999. Opioid and cannabinoid receptor-mediated regulation of the increase in adrenocorticotropin hormone and corticosterone plasma concentrations induced by central administration of delta(9)-tetrahydrocannabinol in rats. *Brain Res* 839(1):173-179.
- Marsicano G, Goodenough S, Monory K, Hermann H, Eder M, Cannich A, Azad SC, Cascio MG, Gutierrez SO, van der Stelt M, Lopez-Rodriguez ML, Casanova E, Schutz G, Zieglgansberger W, Di Marzo V, Behl C, Lutz B. 2003. CB1 cannabinoid receptors and on-demand defense against excitotoxicity. *Science* 302(5642):84-88.

- Martinez-Vargas M, Murillo-Rodriguez E, Gonzalez-Rivera R, Landa A, Mendez-Diaz M, Prospero-Garcia O, Navarro L. 2003. Sleep modulates cannabinoid receptor 1 expression in the pons of rats. *Neuroscience* 117(1):197-201.
- Matias I, Petrosino S, Racioppi A, Capasso R, Izzo AA, Di Marzo V. 2008. Dysregulation of peripheral endocannabinoid levels in hyperglycemia and obesity: Effect of high fat diets. *Mol Cell Endocrinol* 286(1-2 Suppl 1):S66-78.
- Mato S, Alberdi E, Ledent C, Watanabe M, Matute C. 2009. CB1 cannabinoid receptor-dependent and -independent inhibition of depolarization-induced calcium influx in oligodendrocytes. *Glia* 57(3):295-306.
- Matsuda LA, Lolait SJ, Brownstein MJ, Young AC, Bonner TI. 1990. Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. *Nature* 346(6284):561-564.
- Matyas F, Urban GM, Watanabe M, Mackie K, Zimmer A, Freund TF, Katona I. 2008. Identification of the sites of 2-arachidonoylglycerol synthesis and action imply retrograde endocannabinoid signaling at both GABAergic and glutamatergic synapses in the ventral tegmental area. *Neuropharmacology* 54(1):95-107.
- McEwen BS. 1998. Protective and damaging effects of stress mediators. *N Engl J Med* 338(3):171-179.
- McEwen BS. 2000. The neurobiology of stress: from serendipity to clinical relevance. *Brain Res* 886(1-2):172-189.
- McEwen BS. 2004. Protection and damage from acute and chronic stress: allostasis and allostatic overload and relevance to the pathophysiology of psychiatric disorders. *Ann N Y Acad Sci* 1032:1-7.
- McKinney MK, Cravatt BF. 2005. Structure and function of fatty acid amide hydrolase. *Annu Rev Biochem* 74:411-432.
- McPartland JM, Matias I, Di Marzo V, Glass M. 2006. Evolutionary origins of the endocannabinoid system. *Gene* 370:64-74.
- McPartland JM, Norris RW, Kilpatrick CW. 2007. Tempo and mode in the endocannabinoid system. *J Mol Evol* 65(3):267-276.
- Mechoulam R, Ben-Shabat S, Hanus L, Ligumsky M, Kaminski NE, Schatz AR, Gopher A, Almog S, Martin BR, Compton DR, et al. 1995. Identification of an endogenous 2-monoglyceride, present in canine gut, that binds to cannabinoid receptors. *Biochem Pharmacol* 50(1):83-90.
- Melis M, Perra S, Muntoni AL, Pillolla G, Lutz B, Marsicano G, Di Marzo V, Gessa GL, Pistis M. 2004. Prefrontal cortex stimulation induces 2-arachidonoylglycerol-mediated suppression of excitation in dopamine neurons. *J Neurosci* 24(47):10707-10715.
- Mercer JG. 1998. Regulation of appetite and body weight in seasonal mammals. *Comp Biochem Physiol C Pharmacol Toxicol Endocrinol* 119(3):295-303.
- Mercer JG, Tups A. 2003. Neuropeptides and anticipatory changes in behaviour and physiology: seasonal body weight regulation in the Siberian hamster. *Eur J Pharmacol* 480(1-3):43-50.
- Merks T, Schulze-Bonhage A, Wittkowski W. 1993. Photoperiod-dependent changes in exocytotic activity in the hypophyseal pars tuberalis of the Djungarian hamster, *Phodopus sungorus*. *Cell Tissue Res* 273(2):287-291.

- Millan MA, Jacobowitz DM, Hauger RL, Catt KJ, Aguilera G. 1986. Distribution of corticotropin-releasing factor receptors in primate brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83(6):1921-1925.
- Mokuda O, Sakamoto Y, Kawagoe R, Ubukata E, Shimizu N. 1992. Epinephrine augments cortisol secretion from isolated perfused adrenal glands of guinea pigs. *Am J Physiol* 262(6 Pt 1):E806-809.
- Moller M, Baeres FM. 2002. The anatomy and innervation of the mammalian pineal gland. *Cell Tissue Res* 309(1):139-150.
- Moore RY. 1997. Circadian rhythms: basic neurobiology and clinical applications. *Annu Rev Med* 48:253-266.
- Moore RY, Eichler VB. 1972. Loss of a circadian adrenal corticosterone rhythm following suprachiasmatic lesions in the rat. *Brain Res* 42(1):201-206.
- Morgan PJ. 2000. The pars tuberalis: the missing link in the photoperiodic regulation of prolactin secretion? *J Neuroendocrinol* 12(4):287-295.
- Morgan PJ, Barrett P, Howell HE, Helliwell R. 1994. Melatonin receptors: localization, molecular pharmacology and physiological significance. *Neurochem Int* 24(2):101-146.
- Morgan PJ, Mercer JG. 1994. Control of seasonality by melatonin. *Proc Nutr Soc* 53(3):483-493.
- Morgan PJ, Ross AW, Mercer JG, Barrett P. 2003. Photoperiodic programming of body weight through the neuroendocrine hypothalamus. *J Endocrinol* 177(1):27-34.
- Morgan PJ, Williams LM. 1996. The pars tuberalis of the pituitary: a gateway for neuroendocrine output. *Rev Reprod* 1(3):153-161.
- Mravec B. 2005. A new focus on interoceptive properties of adrenal medulla. *Auton Neurosci* 120(1-2):10-17.
- Mukhopadhyay S, Shim JY, Assi AA, Norford D, Howlett AC. 2002. CB(1) cannabinoid receptor-G protein association: a possible mechanism for differential signaling. *Chem Phys Lipids* 121(1-2):91-109.
- Munro S, Thomas KL, Abu-Shaar M. 1993. Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. *Nature* 365(6441):61-65.
- Murillo-Rodriguez E, Desarnaud F, Prospero-Garcia O. 2006. Diurnal variation of arachidonylethanolamine, palmitoylethanolamide and oleoylethanolamide in the brain of the rat. *Life Sci* 79(1):30-37.
- Murphy LL, Munoz RM, Adrian BA, Villanua MA. 1998. Function of cannabinoid receptors in the neuroendocrine regulation of hormone secretion. *Neurobiol Dis* 5(6 Pt B):432-446.
- Mutoh T, Shibata S, Korf HW, Okamura H. 2003. Melatonin modulates the light-induced sympathoexcitation and vagal suppression with participation of the suprachiasmatic nucleus in mice. *J Physiol* 547(Pt 1):317-332.
- Myers MG, Jr., Munzberg H, Leininger GM, Leshan RL. 2009. The geometry of leptin action in the brain: more complicated than a simple ARC. *Cell Metab* 9(2):117-123.
- Nader N, Chrousos GP, Kino T. 2009. Circadian rhythm transcription factor CLOCK regulates the transcriptional activity of the glucocorticoid receptor by acetylating its hinge region lysine cluster: potential physiological implications. *FASEB J*.
- Nakao N, Ono H, Yamamura T, Anraku T, Takagi T, Higashi K, Yasuo S, Katou Y, Kageyama S, Uno Y, Kasukawa T, Iigo M, Sharp PJ, Iwasawa A, Suzuki Y,

- Sugano S, Niimi T, Mizutani M, Namikawa T, Ebihara S, Ueda HR, Yoshimura T. 2008. Thyrotrophin in the pars tuberalis triggers photoperiodic response. *Nature* 452(7185):317-322.
- Nakata M, Yada T. 2008. Cannabinoids inhibit insulin secretion and cytosolic Ca²⁺ oscillation in islet beta-cells via CB1 receptors. *Regul Pept* 145(1-3):49-53.
- Nassel DR. 2002. Neuropeptides in the nervous system of *Drosophila* and other insects: multiple roles as neuromodulators and neurohormones. *Prog Neurobiol* 68(1):1-84.
- Nayak SK, Jegla T, Panda S. 2007. Role of a novel photopigment, melanopsin, in behavioral adaptation to light. *Cell Mol Life Sci* 64(2):144-154.
- Nie J, Lewis DL. 2001. The proximal and distal C-terminal tail domains of the CB1 cannabinoid receptor mediate G protein coupling. *Neuroscience* 107(1):161-167.
- Niederhoffer N, Hansen HH, Fernandez-Ruiz JJ, Szabo B. 2001. Effects of cannabinoids on adrenaline release from adrenal medullary cells. *Br J Pharmacol* 134(6):1319-1327.
- Nijijima A, Nagai K, Nagai N, Akagawa H. 1993. Effects of light stimulation on the activity of the autonomic nerves in anesthetized rats. *Physiol Behav* 54(3):555-561.
- Nyilas R, Dudok B, Urban GM, Mackie K, Watanabe M, Cravatt BF, Freund TF, Katona I. 2008. Enzymatic machinery for endocannabinoid biosynthesis associated with calcium stores in glutamatergic axon terminals. *J Neurosci* 28(5):1058-1063.
- O'Donnell VB, Maskrey B, Taylor GW. 2009. Eicosanoids: generation and detection in mammalian cells. *Methods Mol Biol* 462:5-23.
- Oka S, Arai S, Waku K, Tokumura A, Sugiura T. 2007. Depolarization-induced rapid generation of 2-arachidonoylglycerol, an endogenous cannabinoid receptor ligand, in rat brain synaptosomes. *J Biochem* 141(5):687-697.
- Okamoto Y, Morishita J, Tsuboi K, Tonai T, Ueda N. 2004. Molecular characterization of a phospholipase D generating anandamide and its congeners. *J Biol Chem* 279(7):5298-5305.
- Okamoto Y, Wang J, Morishita J, Ueda N. 2007. Biosynthetic pathways of the endocannabinoid anandamide. *Chem Biodivers* 4(8):1842-1857.
- Okamura H. 2007. Suprachiasmatic nucleus clock time in the mammalian circadian system. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 72:551-556.
- Okamura H, Miyake S, Sumi Y, Yamaguchi S, Yasui A, Muijtjens M, Hoeijmakers JH, van der Horst GT. 1999. Photic induction of mPer1 and mPer2 in cry-deficient mice lacking a biological clock. *Science* 286(5449):2531-2534.
- Olah M, Milloh H, Wenger T. 2008. The role of endocannabinoids in the regulation of luteinizing hormone and prolactin release. Differences between the effects of AEA and 2AG. *Mol Cell Endocrinol* 286(1-2 Suppl 1):S36-40.
- Oldham WM, Hamm HE. 2008. Heterotrimeric G protein activation by G-protein-coupled receptors. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9(1):60-71.
- Ono H, Hoshino Y, Yasuo S, Watanabe M, Nakane Y, Murai A, Ebihara S, Korf HW, Yoshimura T. 2008. Involvement of thyrotropin in photoperiodic signal transduction in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(47):18238-18242.

- Oropeza VC, Mackie K, Van Bockstaele EJ. 2007. Cannabinoid receptors are localized to noradrenergic axon terminals in the rat frontal cortex. *Brain Res* 1127(1):36-44.
- Pacak K, Palkovits M. 2001. Stressor specificity of central neuroendocrine responses: implications for stress-related disorders. *Endocr Rev* 22(4):502-548.
- Pagotto U, Marsicano G, Cota D, Lutz B, Pasquali R. 2006. The emerging role of the endocannabinoid system in endocrine regulation and energy balance. *Endocr Rev* 27(1):73-100.
- Pagotto U, Marsicano G, Fezza F, Theodoropoulou M, Grubler Y, Stalla J, Arzberger T, Milone A, Losa M, Di Marzo V, Lutz B, Stalla GK. 2001. Normal human pituitary gland and pituitary adenomas express cannabinoid receptor type 1 and synthesize endogenous cannabinoids: first evidence for a direct role of cannabinoids on hormone modulation at the human pituitary level. *J Clin Endocrinol Metab* 86(6):2687-2696.
- Palkovits M. 1999. Interconnections between the neuroendocrine hypothalamus and the central autonomic system. Geoffrey Harris Memorial Lecture, Kitakyushu, Japan, October 1998. *Front Neuroendocrinol* 20(4):270-295.
- Palomaki VA, Lehtonen M, Savinainen JR, Laitinen JT. 2007. Visualization of 2-arachidonoylglycerol accumulation and cannabinoid CB1 receptor activity in rat brain cryosections by functional autoradiography. *J Neurochem* 101(4):972-981.
- Parker TL, Kesse WK, Mohamed AA, Afework M. 1993. The innervation of the mammalian adrenal gland. *J Anat* 183 (Pt 2):265-276.
- Patel S, Hillard CJ. 2008. Adaptations in endocannabinoid signaling in response to repeated homotypic stress: a novel mechanism for stress habituation. *Eur J Neurosci* 27(11):2821-2829.
- Patel S, Roelke CT, Rademacher DJ, Hillard CJ. 2005. Inhibition of restraint stress-induced neural and behavioural activation by endogenous cannabinoid signalling. *Eur J Neurosci* 21(4):1057-1069.
- Paul MJ, George NT, Zucker I, Butler MP. 2007. Photoperiodic and hormonal influences on fur density and regrowth in two hamster species. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 293(6):R2363-2369.
- Piomelli D. 2003. The molecular logic of endocannabinoid signalling. *Nat Rev Neurosci* 4(11):873-884.
- Piomelli D, Astarita G, Rapaka R. 2007. A neuroscientist's guide to lipidomics. *Nat Rev Neurosci* 8(10):743-754.
- Pipa RL. 1978. Locations and central projections of neurons associated with the retrocerebral neuroendocrine complex of the cockroach *Periplaneta americana* (L.). *Cell Tissue Res* 193(3):443-455.
- Pistis M, Ferraro L, Pira L, Flore G, Tanganelli S, Gessa GL, Devoto P. 2002. Delta(9)-tetrahydrocannabinol decreases extracellular GABA and increases extracellular glutamate and dopamine levels in the rat prefrontal cortex: an in vivo microdialysis study. *Brain Res* 948(1-2):155-158.
- Preitner N, Damiola F, Lopez-Molina L, Zakany J, Duboule D, Albrecht U, Schibler U. 2002. The orphan nuclear receptor REV-ERBalpha controls circadian transcription within the positive limb of the mammalian circadian oscillator. *Cell* 110(2):251-260.

- Prevot V, Bouret S, Stefano GB, Beauvillain J. 2000. Median eminence nitric oxide signaling. *Brain Res Brain Res Rev* 34(1-2):27-41.
- Provencio I, Jiang G, De Grip WJ, Hayes WP, Rollag MD. 1998. Melanopsin: An opsin in melanophores, brain, and eye. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(1):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(2):600-605.
- Provencio I, Rollag MD, Castrucci AM. 2002. Photoreceptive net in the mammalian retina. This mesh of cells may explain how some blind mice can still tell day from night. *Nature* 415(6871):493.
- Rademacher DJ, Meier SE, Shi L, Ho WS, Jarrahian A, Hillard CJ. 2008. Effects of acute and repeated restraint stress on endocannabinoid content in the amygdala, ventral striatum, and medial prefrontal cortex in mice. *Neuropharmacology* 54(1):108-116.
- Raghavan AV, Horowitz JM, Fuller CA. 1999. Diurnal modulation of long-term potentiation in the hamster hippocampal slice. *Brain Res* 833(2):311-314.
- Ralevic V. 2003. Cannabinoid modulation of peripheral autonomic and sensory neurotransmission. *Eur J Pharmacol* 472(1-2):1-21.
- Ralph MR, Foster RG, Davis FC, Menaker M. 1990. Transplanted suprachiasmatic nucleus determines circadian period. *Science* 247(4945):975-978.
- Ramsey KM, Marcheva B, Kohsaka A, Bass J. 2007. The clockwork of metabolism. *Annu Rev Nutr* 27:219-240.
- Rayner DV, Trayhurn P. 2001. Regulation of leptin production: sympathetic nervous system interactions. *J Mol Med* 79(1):8-20.
- Reppert SM, Weaver DR. 2002. Coordination of circadian timing in mammals. *Nature* 418(6901):935-941.
- Roca AL, Godson C, Weaver DR, Reppert SM. 1996. Structure, characterization, and expression of the gene encoding the mouse *Mella* melatonin receptor. *Endocrinology* 137(8):3469-3477.
- Ross AW, Morgan PJ. 2002. The pars tuberalis as a target of the central clock. *Cell Tissue Res* 309(1):163-171.
- Rossi G, Gasperi V, Paro R, Barsacchi D, Cecconi S, Maccarrone M. 2007. Follicle-stimulating hormone activates fatty acid amide hydrolase by protein kinase A and aromatase-dependent pathways in mouse primary Sertoli cells. *Endocrinology* 148(3):1431-1439.
- Russo EB. 2004. Clinical endocannabinoid deficiency (CECD): can this concept explain therapeutic benefits of cannabis in migraine, fibromyalgia, irritable bowel syndrome and other treatment-resistant conditions? *Neuro Endocrinol Lett* 25(1-2):31-39.
- Russo EB. 2007. History of cannabis and its preparations in saga, science, and sobriquet. *Chem Biodivers* 4(8):1614-1648.
- Saario SM, Laitinen JT. 2007. Monoglyceride lipase as an enzyme hydrolyzing 2-arachidonoylglycerol. *Chem Biodivers* 4(8):1903-1913.
- Sara SJ. 2009. The locus coeruleus and noradrenergic modulation of cognition. *Nat Rev Neurosci* 10(3):211-223.
- Schibler U, Sassone-Corsi P. 2002. A web of circadian pacemakers. *Cell* 111(7):919-922.

- Schmidt BM, Gerdes D, Feuring M, Falkenstein E, Christ M, Wehling M. 2000. Rapid, nongenomic steroid actions: A new age? *Front Neuroendocrinol* 21(1):57-94.
- Schomacher M, Muller HD, Sommer C, Schwab S, Schabitz WR. 2008. Endocannabinoids mediate neuroprotection after transient focal cerebral ischemia. *Brain Res* 1240:213-220.
- Scorticati C, Mohn C, De Laurentiis A, Vissio P, Fernandez Solari J, Seilicovich A, McCann SM, Rettori V. 2003. The effect of anandamide on prolactin secretion is modulated by estrogen. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(4):2134-2139.
- Selye H. 1936. A Syndrome produced by Diverse Nocuous Agents. *Nautre* 138(32):32-32.
- Sewry CA, Philpot J, Sorokin LM, Wilson LA, Naom I, Goodwin F, D'Alessandro M, Dubowitz V, Muntoni F. 1996. Diagnosis of merosin (laminin-2) deficient congenital muscular dystrophy by skin biopsy. *Lancet* 347(9001):582-584.
- Shearman LP, Sriram S, Weaver DR, Maywood ES, Chaves I, Zheng B, Kume K, Lee CC, van der Horst GT, Hastings MH, Reppert SM. 2000. Interacting molecular loops in the mammalian circadian clock. *Science* 288(5468):1013-1019.
- Sheline YI. 2003. Neuroimaging studies of mood disorder effects on the brain. *Biol Psychiatry* 54(3):338-352.
- Sheline YI, Gado MH, Kraemer HC. 2003. Untreated depression and hippocampal volume loss. *Am J Psychiatry* 160(8):1516-1518.
- Siegmund T, Korge G. 2001. Innervation of the ring gland of *Drosophila melanogaster*. *J Comp Neurol* 431(4):481-491.
- Simon GM, Cravatt BF. 2006. Endocannabinoid biosynthesis proceeding through glycerophospho-N-acyl ethanolamine and a role for alpha/beta-hydrolase 4 in this pathway. *J Biol Chem* 281(36):26465-26472.
- Simonneaux V, Ribelayga C. 2003. Generation of the melatonin endocrine message in mammals: a review of the complex regulation of melatonin synthesis by norepinephrine, peptides, and other pineal transmitters. *Pharmacol Rev* 55(2):325-395.
- Sisk CL, Foster DL. 2004. The neural basis of puberty and adolescence. *Nat Neurosci* 7(10):1040-1047.
- Skinner DC, Robinson JE. 1995. Melatonin-binding sites in the gonadotroph-enriched zona tuberalis of ewes. *J Reprod Fertil* 104(2):243-250.
- Slanina KA, Roberto M, Schweitzer P. 2005. Endocannabinoids restrict hippocampal long-term potentiation via CB1. *Neuropharmacology* 49(5):660-668.
- Solinas M, Goldberg SR, Piomelli D. 2008. The endocannabinoid system in brain reward processes. *Br J Pharmacol* 154(2):369-383.
- Sollars PJ, Pickard GE. 1995. Vasoactive intestinal peptide efferent projections of the suprachiasmatic nucleus in anterior hypothalamic transplants: correlation with functional restoration of circadian behavior. *Exp Neurol* 136(1):1-11.
- Song CK, Bartness TJ. 2001. CNS sympathetic outflow neurons to white fat that express MEL receptors may mediate seasonal adiposity. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 281(2):R666-672.
- Starkman MN, Giordani B, Gebarski SS, Scheingart DE. 2003. Improvement in learning associated with increase in hippocampal formation volume. *Biol Psychiatry* 53(3):233-238.

- Starowicz KM, Cristino L, Matias I, Capasso R, Racioppi A, Izzo AA, Di Marzo V. 2008. Endocannabinoid dysregulation in the pancreas and adipose tissue of mice fed with a high-fat diet. *Obesity (Silver Spring)* 16(3):553-565.
- Stehle JH, Rivkees SA, Lee JJ, Weaver DR, Deeds JD, Reppert SM. 1992. Molecular cloning and expression of the cDNA for a novel A2-adenosine receptor subtype. *Mol Endocrinol* 6(3):384-393.
- Stephan FK, Zucker I. 1972. Circadian rhythms in drinking behavior and locomotor activity of rats are eliminated by hypothalamic lesions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 69(6):1583-1586.
- Stirland JA, Johnston JD, Cagampang FR, Morgan PJ, Castro MG, White MR, Davis JR, Loudon AS. 2001. Photoperiodic regulation of prolactin gene expression in the Syrian hamster by a pars tuberalis-derived factor. *J Neuroendocrinol* 13(2):147-157.
- Sugiura T. 2009. Physiological roles of 2-arachidonoylglycerol, an endogenous cannabinoid receptor ligand. *Biofactors* 35(1):88-97.
- Sugiura T, Kishimoto S, Oka S, Gokoh M. 2006. Biochemistry, pharmacology and physiology of 2-arachidonoylglycerol, an endogenous cannabinoid receptor ligand. *Prog Lipid Res* 45(5):405-446.
- Sugiura T, Kondo S, Sukagawa A, Nakane S, Shinoda A, Itoh K, Yamashita A, Waku K. 1995. 2-Arachidonoylglycerol: a possible endogenous cannabinoid receptor ligand in brain. *Biochem Biophys Res Commun* 215(1):89-97.
- Sujino M, Masumoto KH, Yamaguchi S, van der Horst GT, Okamura H, Inouye ST. 2003. Suprachiasmatic nucleus grafts restore circadian behavioral rhythms of genetically arrhythmic mice. *Curr Biol* 13(8):664-668.
- Sulcova E, Mechoulam R, Fride E. 1998. Biphasic effects of anandamide. *Pharmacol Biochem Behav* 59(2):347-352.
- Suudhof TC. 2008. Neurotransmitter release. *Handb Exp Pharmacol*(184):1-21.
- Swanson LW, Kuypers HG. 1980. The paraventricular nucleus of the hypothalamus: cytoarchitectonic subdivisions and organization of projections to the pituitary, dorsal vagal complex, and spinal cord as demonstrated by retrograde fluorescence double-labeling methods. *J Comp Neurol* 194(3):555-570.
- Swanson LW, Sawchenko PE, Lind RW. 1986. Regulation of multiple peptides in CRF parvocellular neurosecretory neurons: implications for the stress response. *Prog Brain Res* 68:169-190.
- Szalay KS, Orso E, Juranyi Z, Vinson GP, Vizi ES. 1998. Local non-synaptic modulation of aldosterone production by catecholamines and ATP in rat: implications for a direct neuronal fine tuning. *Horm Metab Res* 30(6-7):323-328.
- Tasker JG, Di S, Malcher-Lopes R. 2006. Minireview: rapid glucocorticoid signaling via membrane-associated receptors. *Endocrinology* 147(12):5549-5556.
- Tischler AS. 2002. Chromaffin cells as models of endocrine cells and neurons. *Ann N Y Acad Sci* 971:366-370.
- Toth IE, Vizi ES, Hinson JP, Vinson GP. 1997. Innervation of the adrenal cortex, its physiological relevance, with primary focus on the noradrenergic transmission. *Microsc Res Tech* 36(6):534-545.
- Travis ER, Wightman RM. 1998. Spatio-temporal resolution of exocytosis from individual cells. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 27:77-103.

- 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 U S A* 99(11):7728-7733.
- Trayhurn P. 2003. Leptin--a critical body weight signal and a "master" hormone? *Sci STKE* 2003(169):PE7.
- Trendelenburg AU, Cox SL, Schelb V, Klebroff W, Khairallah L, Starke K. 2000. Modulation of (3)H-noradrenaline release by presynaptic opioid, cannabinoid and bradykinin receptors and beta-adrenoceptors in mouse tissues. *Br J Pharmacol* 130(2):321-330.
- Tsigos C, Chrousos GP. 1994. Physiology of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in health and dysregulation in psychiatric and autoimmune disorders. *Endocrinol Metab Clin North Am* 23(3):451-466.
- Uchigashima M, Narushima M, Fukaya M, Katona I, Kano M, Watanabe M. 2007. Subcellular arrangement of molecules for 2-arachidonoyl-glycerol-mediated retrograde signaling and its physiological contribution to synaptic modulation in the striatum. *J Neurosci* 27(14):3663-3676.
- Ueda HR, Chen W, Adachi A, Wakamatsu H, Hayashi S, Takasugi T, Nagano M, Nakahama K, Suzuki Y, Sugano S, Iino M, Shigeyoshi Y, Hashimoto S. 2002. A transcription factor response element for gene expression during circadian night. *Nature* 418(6897):534-539.
- Ueda N. 2002. Endocannabinoid hydrolases. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 68-69:521-534.
- Ulrich-Lai YM, Arnhold MM, Engeland WC. 2006. Adrenal splanchnic innervation contributes to the diurnal rhythm of plasma corticosterone in rats by modulating adrenal sensitivity to ACTH. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 290(4):R1128-1135.
- Ulrich-Lai YM, Engeland WC. 2002. Adrenal splanchnic innervation modulates adrenal cortical responses to dehydration stress in rats. *Neuroendocrinology* 76(2):79-92.
- Unsicker K. 1996. *Autonomic-Endocrine Interactions*. Burnstock G, editor. Amsterdam B.V.: Harwood Academic Publishers. 474 p.
- Valenti M, Vigano D, Casico MG, Rubino T, Steardo L, Parolaro D, Di Marzo V. 2004. Differential diurnal variations of anandamide and 2-arachidonoyl-glycerol levels in rat brain. *Cell Mol Life Sci* 61(7-8):945-950.
- van Meer G, Voelker DR, Feigenson GW. 2008. Membrane lipids: where they are and how they behave. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9(2):112-124.
- Veelaert D, Schoofs L, De Loof A. 1998. Peptidergic control of the corpus cardiacum-corpora allata complex of locusts. *Int Rev Cytol* 182:249-302.
- 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 U S A* 96(21):12114-12119.
- von Gall C, Garabette ML, Kell CA, Frenzel S, Dehghani F, Schumm-Draeger PM, Weaver DR, Korf HW, Hastings MH, Stehle JH. 2002. Rhythmic gene expression in pituitary depends on heterologous sensitization by the neurohormone melatonin. *Nat Neurosci* 5(3):234-238.

- Wenger T, Jamali KA, Juaneda C, Leonardelli J, Tramu G. 1997. Arachidonyl ethanolamide (anandamide) activates the parvocellular part of hypothalamic paraventricular nucleus. *Biochem Biophys Res Commun* 237(3):724-728.
- WHO. 2009. Depression.
- Williams LM, Lincoln GA, Mercer JG, Barrett P, Morgan PJ, Clarke IJ. 1997. Melatonin receptors in the brain and pituitary gland of hypothalamo-pituitary disconnected Soay rams. *J Neuroendocrinol* 9(8):639-643.
- Williams LM, Morgan PJ. 1988. Demonstration of melatonin-binding sites on the pars tuberalis of the rat. *J Endocrinol* 119(1):R1-3.
- Williamson EM, Evans FJ. 2000. Cannabinoids in clinical practice. *Drugs* 60(6):1303-1314.
- Windle RJ, Wood SA, Shanks N, Lightman SL, Ingram CD. 1998. Ultradian rhythm of basal corticosterone release in the female rat: dynamic interaction with the response to acute stress. *Endocrinology* 139(2):443-450.
- Winzell MS, Ahren B. 2007. G-protein-coupled receptors and islet function-implications for treatment of type 2 diabetes. *Pharmacol Ther* 116(3):437-448.
- Witt-Enderby PA, Li PK. 2000. Melatonin receptors and ligands. *Vitam Horm* 58:321-354.
- Wittkowski W, Bergmann M, Hoffmann K, Pera F. 1988. Photoperiod-dependent changes in TSH-like immunoreactivity of cells in the hypophysial pars tuberalis of the Djungarian hamster, *Phodopus sungorus*. *Cell Tissue Res* 251(1):183-187.
- Wittkowski W, Bockmann J, Kreutz MR, Bockers TM. 1999. Cell and molecular biology of the pars tuberalis of the pituitary. *Int Rev Cytol* 185:157-194.
- Wittkowski W, Hewing M, Hoffmann K, Bergmann M, Fechner J. 1984. Influence of photoperiod on the ultrastructure of the hypophysial pars tuberalis of the Djungarian hamster, *Phodopus sungorus*. *Cell Tissue Res* 238(1):213-216.
- Wittkowski WH, Schulze-Bonhage AH, Bockers TM. 1992. The pars tuberalis of the hypophysis: a modulator of the pars distalis? *Acta Endocrinol (Copenh)* 126(4):285-290.
- Wittmann G, Deli L, Kallo I, Hrabovszky E, Watanabe M, Liposits Z, Fekete C. 2007. Distribution of type 1 cannabinoid receptor (CB1)-immunoreactive axons in the mouse hypothalamus. *J Comp Neurol* 503(2):270-279.
- Wittmann G, Lechan RM, Liposits Z, Fekete C. 2005. Glutamatergic innervation of corticotropin-releasing hormone- and thyrotropin-releasing hormone-synthesizing neurons in the hypothalamic paraventricular nucleus of the rat. *Brain Res* 1039(1-2):53-62.
- Woods MD, Shipston MJ, Mullens EL, Antoni FA. 1992. Pituitary corticotrope tumor (AtT20) cells as a model system for the study of early inhibition by glucocorticoids. *Endocrinology* 131(6):2873-2880.
- Woodward DF, Carling RW, Cornell CL, Fliri HG, Martos JL, Pettit SN, Liang Y, Wang JW. 2008a. The pharmacology and therapeutic relevance of endocannabinoid derived cyclo-oxygenase (COX)-2 products. *Pharmacol Ther* 120(1):71-80.
- Woodward DF, Liang Y, Krauss AH. 2008b. Prostaglandin-ethanolamides and their pharmacology. *Br J Pharmacol* 153(3):410-419.

-
- Wu DF, Yang LQ, Goschke A, Stumm R, Brandenburg LO, Liang YJ, Hollt V, Koch T. 2008. Role of receptor internalization in the agonist-induced desensitization of cannabinoid type 1 receptors. *J Neurochem* 104(4):1132-1143.
- Y. Gaoni, Mechoulam R. 1964. Isolation, Structure, and Partial Synthesis of an Active Constituent of Hashish. *J Am Chem Soc* 86(8):1646-1647.
- Yasuo S, Watanabe M, Nakao N, Takagi T, Follett BK, Ebihara S, Yoshimura T. 2005. The reciprocal switching of two thyroid hormone-activating and -inactivating enzyme genes is involved in the photoperiodic gonadal response of Japanese quail. *Endocrinology* 146(6):2551-2554.
- Yasuo S, Yoshimura T, Ebihara S, Korf HW. 2009. Melatonin transmits photoperiodic signals through the MT1 melatonin receptor. *J Neurosci* 29(9):2885-2889.
- Yelamanchili SV, Pendyala G, Brunk I, Darna M, Albrecht U, Ahnert-Hilger G. 2006. Differential sorting of the vesicular glutamate transporter 1 into a defined vesicular pool is regulated by light signaling involving the clock gene *Period2*. *J Biol Chem* 281(23):15671-15679.
- Yi CX, van der Vliet J, Dai J, Yin G, Ru L, Buijs RM. 2006. Ventromedial arcuate nucleus communicates peripheral metabolic information to the suprachiasmatic nucleus. *Endocrinology* 147(1):283-294.
- Yoshida T, Fukaya M, Uchigashima M, Miura E, Kamiya H, Kano M, Watanabe M. 2006. Localization of diacylglycerol lipase- α around postsynaptic spine suggests close proximity between production site of an endocannabinoid, 2-arachidonoyl-glycerol, and presynaptic cannabinoid CB1 receptor. *J Neurosci* 26(18):4740-4751.
- Yoshimura T, Yasuo S, Watanabe M, Igo M, Yamamura T, Hirunagi K, Ebihara S. 2003. Light-induced hormone conversion of T4 to T3 regulates photoperiodic response of gonads in birds. *Nature* 426(6963):178-181.

Danksagung

Die vorliegende Dissertation wurde in der experimentellen Neurobiologie am Institut der Anatomie II der Dr. Senckenbergische Anatomie, an der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main unter der Leitung von Prof. Dr. Horst-Werner Korf angefertigt.

Für meine Dissertation schulde ich sehr vielen Menschen einen herzlichen Dank. Im besonderem danke ich meinem Lehrer und Doktorvater Herrn Prof. Dr. Horst-Werner Korf für die Überlassung des Themas, die Bereitstellung des Arbeitsplatzes sowie die umfassende und intensive Betreuung meiner Arbeit.

Herrn PD Dr. Faramarz Dehghani und Frau Prof. Dr. Shinobu Yasuo danke ich für die vielen hilfreichen Diskussionen und für die Unterstützung bei der Bild- und Datenverarbeitung.

Natürlich danke ich auch den restlichen Mitgliedern der Arbeitsgruppe, die mir stets in administrativen und labortechnischen Angelegenheiten zur Seite standen namentlich: Dorothea von Meltzer, Iris Habazettl Gisella Müller, Brigitte Schmidt, Chalid Ghadban, Sonja Kallendrusch und Urszula Grabiec.

Ferner bin ich dem LOEWE Lipid Signaling Forschungszentrum Frankfurt (LiFF) zu Dank verpflichtet, ohne dessen Unterstützung die Realisierung meiner Arbeit nicht möglich gewesen wäre. Den ehemaligen und aktuellen Mitarbeitern der Anatomie II möchte ich im nachfolgend für die angenehme und motivierende Atmosphäre im Labor danken: Doris Evers, PD Dr. Charlotte von Gall, Kaia Lang, Elke Lädtke, Prof. Frank Nürnberger, PD Dr. Christof Schomerus, PD Dr. Helmut Wicht, Dr. Qiang Zhang.

Mein Dank gilt nicht zuletzt meiner Familie und meiner Freundin, die während meiner gesamten Ausbildung als wohlwollende Wegebegleiter mit Rat und Tat zur Seite standen.

Ihr habt durch eure Ratschläge und durch euer geduldiges Zuhören, mir Sicherheit, Kraft und Hoffnung gegeben und damit die notwendige Voraussetzung für meine Dissertation geschaffen.

Schriftliche Erklärung

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

„Das Endocannabinoidsystem im neuroendokrinen und autonomen Nervensystem der Nagetiere“

am Institut der Anatomie II der Dr. Senckenbergischen Anatomie unter Betreuung und Anleitung von Herrn Prof. Dr. med. Horst-Werner Korf ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe. Darüber hinaus versichere ich, nicht die Hilfe einer kommerziellen Promotionsvermittlung in Anspruch genommen zu haben.

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.

Frankfurt am Main, den 28.04.2010

A.-A. Jafarpour

Tagungsbeitrag

1. Jafarpour A.-A. et al. Immunohistochemical demonstration of an endocannabinoid system in the adrenal gland of the syrian hamster. 104th Annual Meeting of the Anatomische Gesellschaft. March 27-30, Antwerpen, Belgium.