

**Der Einfluss von kalorischer Restriktion und Melatonin  
auf die circadiane Physiologie der Maus (*Mus Musculus*,  
Linnaeus 1758)**

**Dissertation**

**zur Erlangung des Doktorgrades des Fachbereichs Biologie der  
Universität Hamburg**

**vorgelegt von**

**David Resühr**

**Hamburg**

**Hamburg, Juli 2004**

Genehmigt vom  
Fachbereich Biologie der  
Universität Hamburg  
auf Antrag von Herrn Professor Dr. K. WIESE  
Weitere Gutachter der Dissertation:  
Herr Professor Dr. J. OLCESE

Tag der Disputation: 29. Oktober 2004

Hamburg, den 15. Oktober 2004



Professor Dr. Arno Frühwald  
Dekan

**1. Gutachter**  
**2. Gutachter**

**Prof. Dr. Konrad Wiese**  
**Prof. Dr. James Olcese**

**Tag der Disputation 29.10.2004**

## Tempus Fugit – die Zeit fliegt

<b>1 Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1 Biologische Rhythmen	1
1.1.1 Der Sitz des Hauptschrittmachers - der SCN	5
1.1.2 Die molekulare innere Uhr	6
1.2 Melatonin – „Das Hormon der Dunkelheit“	9
1.2.1 Grundlegendes über das Pinealhormon	9
1.2.2 Synthese von Melatonin	10
1.2.3 Die Melatoninrezeptoren	11
1.2.4 Verteilung der Melatoninrezeptoren	12
1.2.5 Signaltransduktion der Melatoninrezeptoren	14
1.2.6 Weitere Wirkungen von Melatonin	15
1.3 Kalorische Restriktion, Diät	17
1.3.1 Effekte von kalorischer Restriktionsernährung	17
1.3.2 Altersbedingte Veränderungen im ZNS von Säugetieren	20
1.3.3 Kalorische Restriktion und Chronobiologie	21
1.4 Ziel der Arbeit	23
<b>2 Material und Methoden</b>	<b>25</b>
2.1 Tiermaterial: Mäuse des Stammes B6C3F1	25
2.2 Tötung und Gewebeentnahme	27
2.3 Material für die Aktivitätsaufzeichnung von Mäusen	28
2.4 Bakterienstämme	30
2.5 Verwendete PCR Oligonukleotide, <i>Primer</i>	30
2.6 Verwendete Vektoren	34
2.7 Isolierung von Gesamt-RNA	34
2.8 Bestimmung der Integrität von RNA mit dem Agilent Bioanalyzer 2100™	35
2.8.1 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	36
2.9 cDNA-Synthese	37
2.10 Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	38
2.10.1 Quantitative <i>Realtime-PCR</i> (LightCycler™, iCycler™)40	
2.11 DNA-Auftrennung mittels Agarose-Gelelektrophorese	44
2.12 Reinigung von DNA-Fragmenten aus einer PCR-Reaktion	45
2.13 Reinigung von DNA-Fragmenten aus dem Gel	46
2.14 Ligation von DNA in einen bakteriellen Vektor	47
2.15 Transformation und Ausplattieren der Bakterien	48
2.16 Plasmid-Minipräparation	50
2.17 Restriktionsverdau von DNA	50
2.18 DNA-Sequenzierung	51
2.19 Herstellung fluoreszenzmarkierter cDNA-Sonden	53
2.19.1 Synthese Aminoallyl-modifizierter cDNA	53
2.19.2 Kopplung von Fluoreszenzfarbstoffen an modifizierte cDNA	57
2.19.3 Analyse der fluoreszenzmarkierten Sonde mit dem Nano Drop™	59
2.20 Hybridisierung von <i>Microarrays</i> auf dem Xeotron® Chip-System	60
2.21 Auswertung der <i>Microarrays</i>	63
2.22 Liste der verwendeten Lösungen und Reagenzien	64
2.23 Liste der verwendeten Kits und Reagenzien	65
2.24 Firmenverzeichnis	66

<b>3 Ergebnisse:</b>	<b>67</b>
<b>3.1. Physiologische Daten</b>	<b>67</b>
3.1.1 Entwicklung des Körpergewichts der Versuchstiere	67
3.1.2 Aktivitätsaufzeichnung mittels Aktogrammen	68
3.1.3 Statistische Auswertung der Aktivitätsaufzeichnung	78
3.1.3.1 Einfluss von KR und Melatoninsubstitution auf die Aktivität von Mäusen	78
3.1.3.2 Einfluss des Alterungsprozesses auf die Aktivität von Kontrollmäusen	79
3.1.4 Statistische Auswertung einer Phasenverschiebung	80
3.1.5 Zunahme der endogenen circadianen Periode Tau in Abhängigkeit des Alters	82
<b>3.2 Molekularbiologische Untersuchungen</b>	<b>84</b>
3.2.1 Amplifikation des murinen Melatonin-Rezeptors Typ 2	84
3.2.2 PCR-Amplifikation von Uhr-Genen im Hypothalamus der Maus	86
3.2.3 Amplifikation des mCLOCK-Transkriptes	87
3.2.4 Kontroll-PCR mit Haushaltsgen- <i>Primern</i>	89
<b>3.3 Microarray-Untersuchungen an der Leber der Maus</b>	<b>90</b>
3.3.1 Bestätigung der <i>Microarray</i> -Ergebnisse mit Realtime-PCR	92
<b>3.4 Analyse circadian variierender Transkripte im Hypothalamus der Maus mittels Microarrays</b>	<b>95</b>
3.4.1 <i>Microarray</i> -Untersuchung von circadian regulierten Transkripten im Hypothalamus von Kontrollmäusen	98
3.4.2 <i>Microarray</i> -Untersuchung von circadian regulierten Transkripten im Hypothalamus von KR- und MT-Mäusen	103
3.4.3 Postvalidierung von <i>Microarray</i> -Ergebnissen mittels quantitativer Realtime-PCR	109
<b>4 Diskussion</b>	<b>117</b>
4.1 Entwicklung des Körpergewichtes bei KR- MT- und Kontrolltieren des Mäusestammes B6C3F1	117
4.2 Lokomotorische Aktivität	118
4.3 Expression von <i>Clock</i> in Geweben der Maus	124
4.4 Die MT2-Rezeptor-Sequenz	127
4.5 Genexpression in der Leber	129
4.6 Hypothalamische Genexpression	132
4.6.1 Expression bekannter Uhr-Gene	132
4.6.2 Circadiane Expression im Hypothalamus – <i>Microarrays</i>	134
4.7 <i>Microarray</i> -Technologie und Chronobiologie – eine Evaluierung	142
<b>5 Zusammenfassung</b>	<b>143</b>
5.1 Summary	145
<b>6 Anhang</b>	<b>148</b>
6.1 Abkürzungen	148
6.2 Glossar	150
6.3 Literaturverzeichnis	150
6.4 Danksagung	157

# 1 Einleitung

## 1.1 Biologische Rhythmen – eine Übersicht

In der Chronobiologie (griech. *Chronos*=Zeit) wird nach sich periodisch wiederholenden biologischen Mustern oder Rhythmen gesucht.

Biologische Rhythmen sind allgegenwärtig und haben sich wahrscheinlich seit den ersten Ursprüngen allen Lebens entwickelt. Sie stellen eine Anpassung eines Lebewesens an eine sich verändernde Umwelt dar. Alle Lebewesen dieser Erde, vom primitiven Einzeller bis hin zum komplexen Säugetier, sind einer Vielzahl von chronobiologischen Einflüssen ausgesetzt. Der Wechsel von Tag und Nacht und die variierende Tageslänge im Rahmen der Jahreszeiten sind natürliche Zyklen unserer Erde, sowie die Mondphasen und die Tiden.

Je nach der Länge des Zyklus, also seiner Frequenz, definierte ihn der Begründer der Chronobiologie, Aschoff (1981) als circadian (etwa einen Tag lang), circalunar (etwa eine Mondphase lang), circannual (etwa ein Jahr lang) oder circatidal (etwa einen Gezeitenzyklus lang). Wenn man die biologische Rhythmik auf circadiane Phänomene basierend betrachtet, kann man eine feinere Einteilung vornehmen. Kürzer als einen Tag sind „ultradiane“ Rhythmen, länger sind „infradiane“ Rhythmen. Typische ultradiane Rhythmen reichen vom Bruchteil einer Sekunde (z.B. der elektrischen Aktivität von Neuronen) über Sekunden (dem Herzschlag und der Atmung) bis zu mehreren Stunden (z.B. der pulsatilen Sekretion einiger Hormone). Der „prominenteste“ circadiane Rhythmus ist der Wach-Schlaf-Rhythmus. Infradiane Rhythmen von mehr als 24 Stunden sind z.B. der Menstruationszyklus (Arendt, 1995) oder der saisonal bedingte Fellwechsel bei einigen Tieren.

Wie lassen sich circadiane Rhythmen am besten definieren? Circadiane Rhythmen sind der äußere Ausdruck eines internen Zeitmessungssystems, welches die Tageszeit misst. Circadiane Uhren werden von sich periodisch wiederholenden Reizen der Umwelt gestellt bzw. synchronisiert, wobei das Licht den stärksten synchronisierenden Stimulus (Zeitgeber) darstellt. Da diese Rhythmen endogen generiert werden, laufen sie auch nach Ausschluss aller zeitgebenden Einflüsse (vor allem Licht) weiter. Biologische Uhren werden deshalb auch als Schrittmacher (*pacemaker*) bezeichnet.

In Säugetieren ist der dominante Schrittmacher (*master circadian clock*) in den suprachiasmatischen Nuclei (SCN) des anterioren Hypothalamus lokalisiert (Reppert & Weaver, 2001).

Der unter natürlichen Bedingungen vorgegebene Rhythmus ist für alle Lebewesen dieser Erde gleich, seine Ursache liegt in der Dauer der Erddrehung, nämlich 24 Stunden. Dieser Rhythmus ist schon seit Milliarden von Jahren vorhanden, alles sich jemals entwickelnde Leben war und ist ihm ausgesetzt. Auch die Bahn der Erde in ihrem Orbit um die Sonne (365 Tage) hat einen starken Einfluss auf Lebewesen, denn sie ist in den äquatorfernen Regionen Ursache für die Jahreszeiten.

Ohne die täglich wiederkehrenden regelmäßigen Zeitgeberreize (Licht, Temperatur, Nahrungsaufnahme oder soziales Umfeld) weicht der endogene Rhythmus graduell vom exogenen 24 Stunden-Rhythmus ab (Aschoff et al., 1971).

Ein unsynchronisierter Rhythmus wird freilaufend (*free-running*) genannt. Seine endogene Periode wird als  $\tau$  (Tau) bezeichnet und ist länger oder kürzer als 24 Stunden – abhängig von der untersuchten Spezies, des Individuums und seines physiologischen Zustandes.

Es kommt also mit der Zeit zu Phasenverschiebungen, wobei man je nach Richtung der Verschiebung von einer Phasenverzögerung (das Einsetzen der Aktivität wird verzögert, *phase delay*) oder Phasenbeschleunigung (das Einsetzen der Aktivität beginnt früher, *phase advance*) spricht.

Tagaktive Tiere haben eine endogene Periode  $\tau$  von über 24 Stunden, nachtaktive Tiere unter 24 Stunden (Aschoff 1981). Die Aktivität von Versuchstieren wird in der Wissenschaft als Doppelplot-Aktogramm dargestellt. Hierbei ist die Aktivität horizontal gegen die Zeit aufgetragen. Es werden immer zwei Tage nebeneinander, und der zweite Tag unter dem ersten dargestellt (also in der Reihenfolge 1-2, 2-3, 3-4,...). Diese Darstellungsmethode wurde auch bei der Anfertigung dieser Arbeit verwendet.

Das circadiane System ist sehr flexibel, es passt sich einem starken exogenen Zeitgeber (Licht) an, und verändert seine Phase entsprechend. Appliziert man während eines Freilaufes einen Lichtpuls, so wird, je nachdem wann dieser erfolgt, das System vor- oder zurückgestellt (Abb. 1.1 Phasenbeschleunigung oder Phasenverzögerung). Die Richtung und Stärke einer Phasenverschiebung hängt davon ab, zu welcher Zeit innerhalb der endogenen Phase ein Zeitgeberreiz appliziert wird (Abb.1.1).

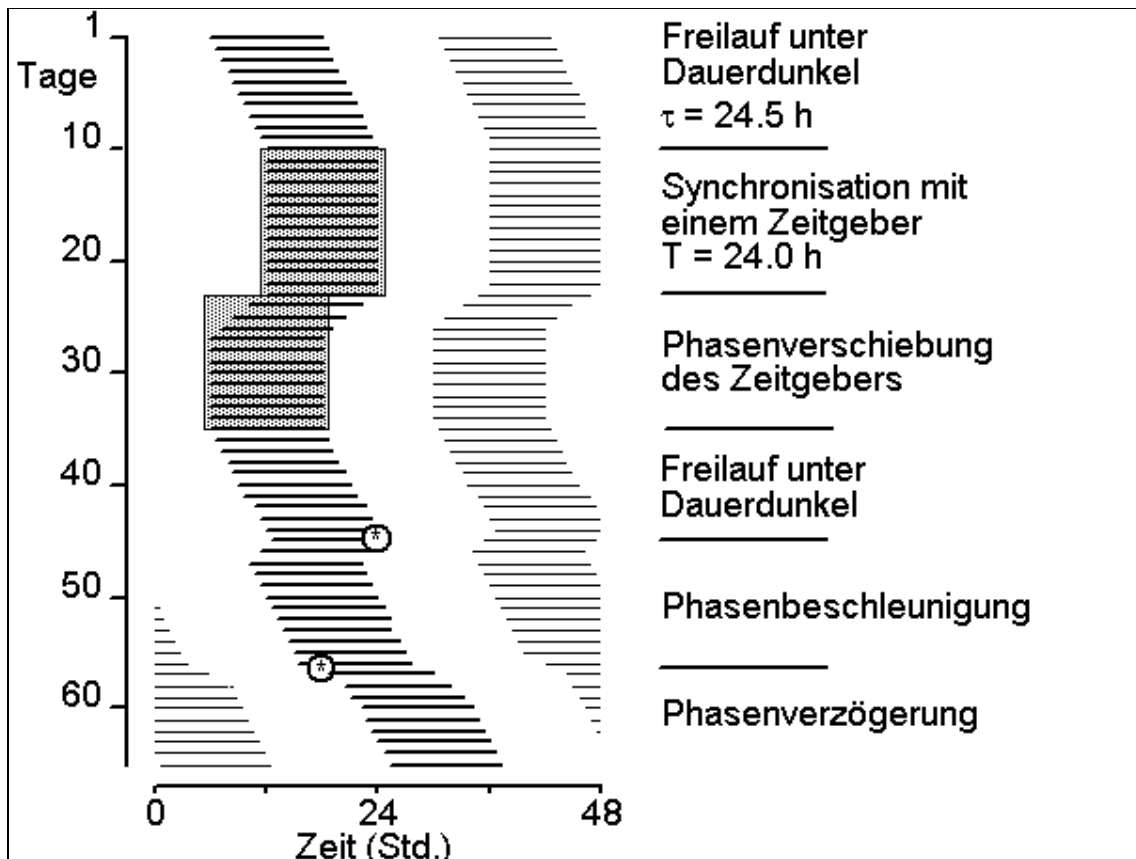
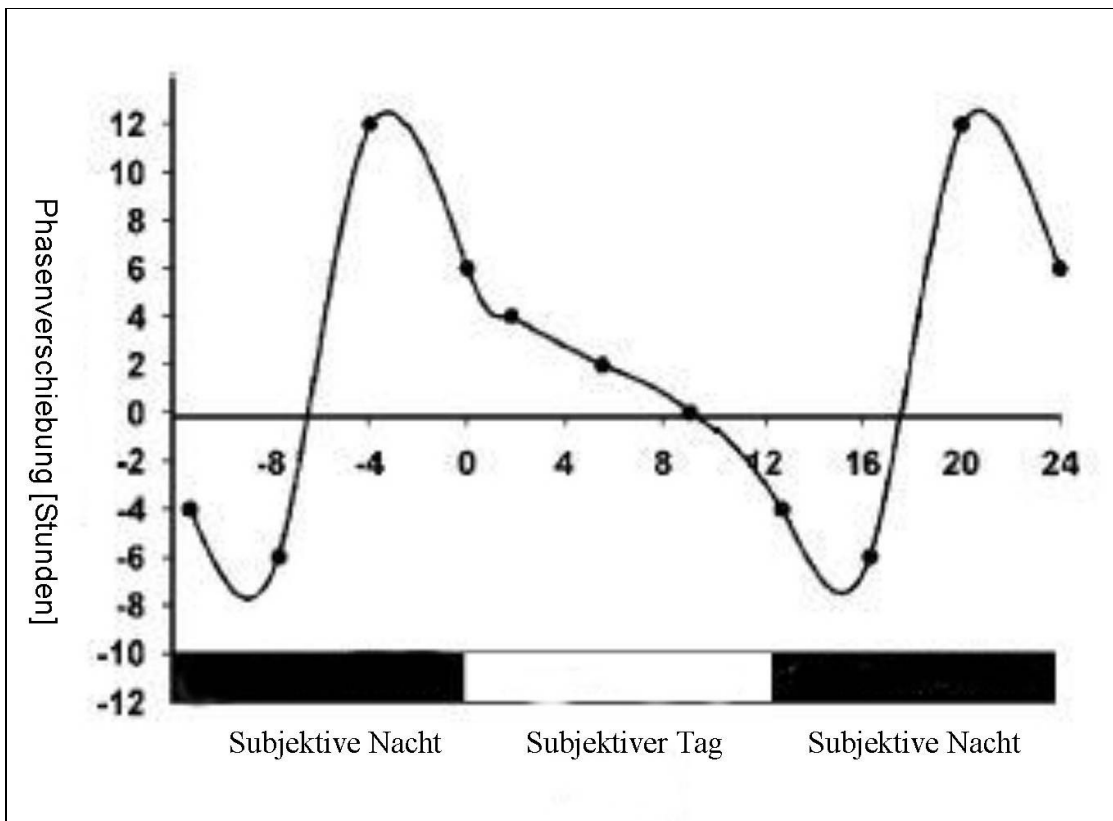


Abb.1:1: Darstellung eines typischen Aktogramms mit Beispielen diverser Zeitgeber Veränderungen. Die ersten 10 Tage befindet sich das Tier im Freilauf mit einer endogenen Periode „Tau“ von 24,5 h. Es folgen 10 Tage Synchronisation unter 12h LD (Licht/Dunkel-Zyklus). Eine Phasenbeschleunigung wird durch Umstellung der Lichtperiode erreicht, gefolgt von Freilauf unter DD (Dauerdunkel). Während des Freilaufes kommt es zuerst durch einen Lichtpuls (\*) zu einer Phasenbeschleunigung, danach (\*) zu einer Phasenverzögerung. Verändert von AG Wollnik, Universität Stuttgart

Eine „Phasen-Antwort-Kurve“ (*Phase Response Curve*) stellt die Richtung und Magnitude der Antwort der endogenen Uhr auf eine Veränderung der Lichtverhältnisse, z.B. eines Lichtpulses im Dauerdunkel, dar. Wird der Zeitgeberreiz am Ende der Aktivitätsphase präsentiert, erfolgt eine Phasenbeschleunigung (*phase advance*). Erfolgt der Stimulus am Anfang der Aktivitätsphase gibt es eine Phasenverzögerung (*phase delay*).



**Abb.1.2:** Darstellung einer Phasen-Antwort-Kurve (PRC – *Phase Response Curve*). Je nachdem, zu welcher Zeit innerhalb der PRC während des Freilaufes ein Lichtreiz präsentiert wird, resultiert eine Phasenverschiebung nach vorne oder nach hinten. Verändert nach Devlin, 2001.

Die Magnitude der Phasenverschiebung ist hierbei deutlich von dem Zeitpunkt der Applikation abhängig. Die stärkste Verschiebung der endogenen Phase erfolgt am Anfang und am Ende der subjektiven Nacht.

Mit zunehmendem Alter verändert sich das endogene circadiane System. Die Umstellung auf eine neue Lichtphase dauert länger, der hell/dunkel-Aktivitätsrhythmus ist fragmentierter als in jungen Tieren, und die endogene Periode verändert sich – sie wird entweder kürzer (Pittendrigh und Daan 1974) oder länger (McAuley et al. 2002).

Endogene Rhythmen können nur auf exogene Frequenzen synchronisiert werden, die gering von der eigenen Frequenz abweichen. So ist das System nur in Maßen anpassungsfähig.

### 1.1.1 Der Sitz des Hauptschrittmachers - der SCN

Die suprachiasmatischen Nuclei sind eine paarige Struktur im Hypothalamus. Sie befinden sich links und rechts vom dritten Ventrikel, über dem Chiasma opticum. Jeder Nucleus besteht aus etwa 10.000 Neuronen, die strategisch positioniert sind, um visuellen Eingang für die Licht-Dunkel-Synchronisation über direkte und indirekte Retina-zu-SCN-Verbindungen zu erhalten (Klein et al., 1981). Die meisten SCN-Neuronen sind GABAerg innerviert (Moore et al., 2002; Hattar et al., 2002).

Die stabile Phase der SCN-Uhr unter LD-Bedingungen ist wahrscheinlich eine Balance zwischen interner Synchronisation (via GABA) und Phasenverschiebungs-Effekte durch Glutamat (Reppert & Weaver, 2001). Eine Population der SCN Neuronen ist durch circadian erfolgende, spontane Entladungsraten charakterisiert. Auch in isolierten Neuronen bleibt diese Rhythmik erhalten, weshalb diese Zellen „Uhr-Zellen“ (*clock-cells*) genannt werden (Welsch et al., 1995). Unabhängig von der untersuchten Tierart sind die Entladungsraten während des subjektiven Tages hoch, während der subjektiven Nacht jedoch niedrig. Zwischen den Neuronen jedes SCN und auch zwischen den beiden Nuklei gibt es multiple Zellkontakte, durch die Kommunikation ermöglicht wird (Van den Pol et al., 1991).

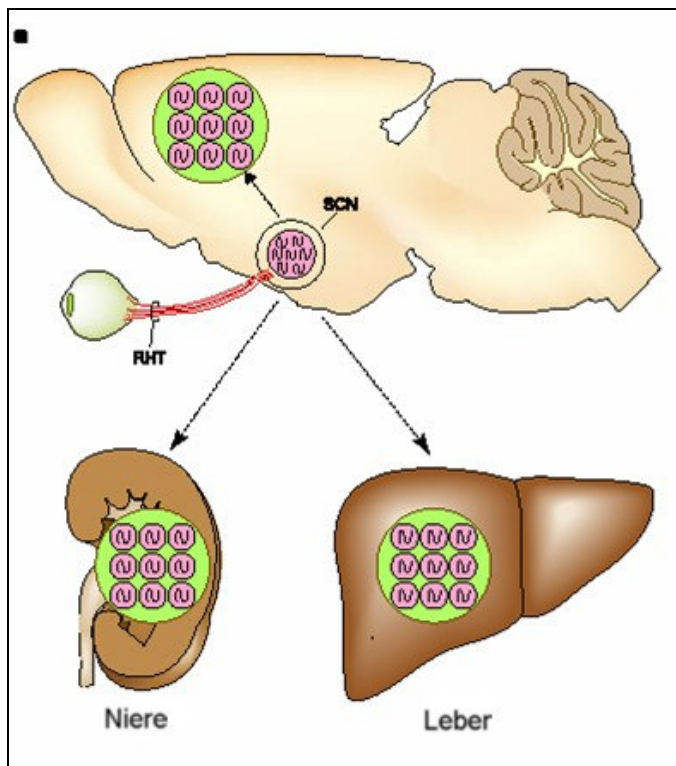


Abb. 1.3: Schema der Interaktionen von *Master* und *Slave-oscillators*. Nach Reppert & Weaver, 2002 (verändert)

Die wichtigsten Mechanismen für die Kommunikation des SCN mit seiner Umgebung bilden Natrium-abhängige Aktionspotentiale. Blockiert man diese durch Tetrodotoxin oder Barbiturate, wird die Uhr außer Kraft gesetzt und die Tiere werden (für die Zeit der Behandlung) im Dauerdunkeln (DD) arrhythmisch (Schwarz et al., 1987 & 1991). Es wird davon ausgegangen, dass circadiane Rhythmen bei Säugetieren durch ein hierarchisch aufgebautes Multioszillatorsystem gesteuert werden. Der Hauptoszillator ist hierbei der paarige SCN mit seinen „Uhr-Zellen“. Aber auch andere Hirnareale wie Cerebellum, Cortex, olfaktorische Bulbi und periphere Organe wie Leber, Milz und Niere besitzen circadiane Oszillatoren (*slave oscillators*), die das Verhalten und die Physiologie eines Lebewesens mitsteuern (Lavery et al., 1999). Die Phase der „slave oscillators“ ist hierbei um einige Stunden gegenüber der Phase des SCN versetzt (Scheaman et al., 1997; Zylka et al., 1998). Alle diese peripheren Oszillatoren unterliegen der Kontrolle des SCN und werden von diesem synchronisiert. Die Natur des SCN-abhängigen Signals, das zur Synchronisation beiträgt, ist bis heute unklar. Dass es sich hierbei um Melatonin handelt ist unwahrscheinlich, denn auch bei Melatonin-defizienten Mausstämmen gibt es neuronale und periphere circadiane Oszillationen der Genaktivität (Zylka et al., 1998). Als synchronisierende Faktoren werden auch arginines Vasopressin (AVP) und GABA aus dem SCN in Erwägung gezogen. AVP aus dem SCN könnte in die Steuerung der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse bei Ratten involviert sein und somit die Korticosteronausschüttung aus den Nebennieren bedingen. Ähnlich könnte AVP zur Aktivierung der HPG-Achse (Hypothalamische-Hypophysen-Gonaden-Achse) beitragen, der die Fertilität unterliegt. GABA Freisetzung aus dem SCN scheint die Melatoninsynthese zu regulieren, indem es den stimulatorischen Effekt der paravertikulären Nuclei inhibiert. Letztendlich gibt es noch eine unbekannte, diffundierbare Substanz des SCN (Silver et al., 1996), die bei SCN-läsionierten Hamstern Rhythmizität wiederherstellen kann.

### **1.1.2 Die molekulare innere Uhr**

Das bisher vollständigste Bild über die Funktionsweise der molekularen circadianen Uhr wurde am Modell der Fruchtfliege, *Drosophila melanogaster*, erreicht (Williams et al., 2000). Es gibt zwischen der Fruchtfliege und der Maus große Übereinstimmungen in den Kernkomponenten der inneren Uhr.

Das molekulare Netzwerk der inneren Uhr besteht aus einer transkriptionellen/translationalen Rückkopplungsschleife (*feedback-loop*). Diese Rückkopplungsschleifen interagieren miteinander auf positive und negative Art.

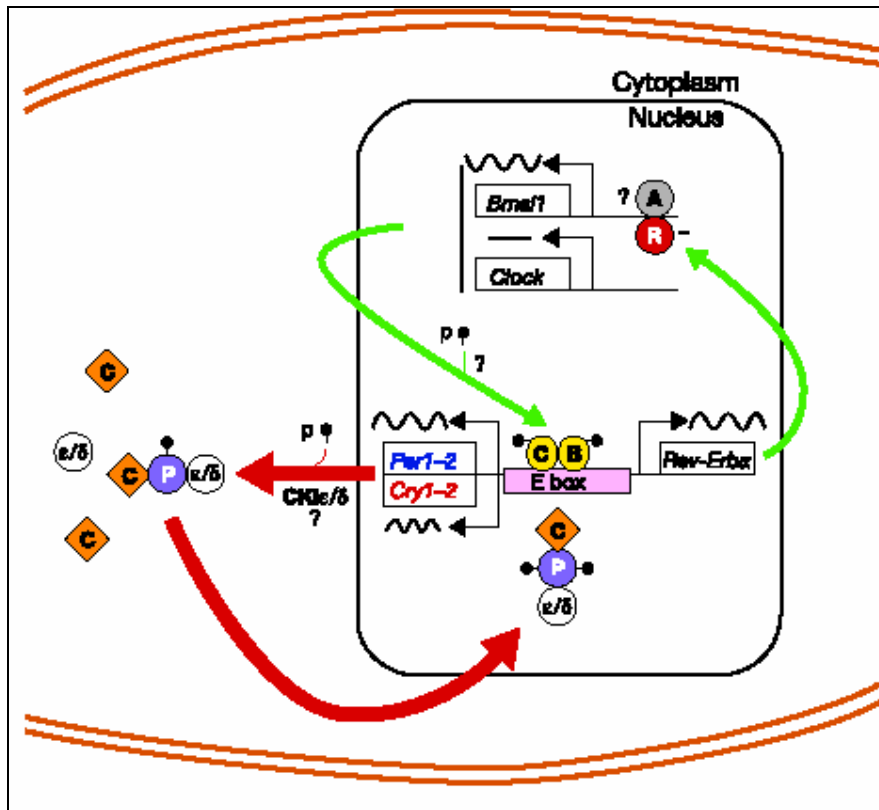


Abb. 1.4: Grundlegende Elemente der circadianen transkriptionellen Rückkopplungsschleife einer Zelle der inneren Uhr bei Säugetieren. Positiv wirkende Elemente sind mit dünnen grünen Pfeilen dargestellt, negative mit dicken roten. Verändert aus Reppert & Weaver, 2002.

Zusammenfassend läuft die transkriptionelle Kaskade wie folgt ab:

Die negative Rückkopplungsschleife beinhaltet die dynamische Regulierung von drei *Period*- (*Per*) Genen (in der Maus *mPer1-3* genannt) und zwei *Cryptochrome*-Genen (*mCry1* und *mCry2* in der Maus). Die rhythmische Transkription der *mPer* und *mCry*-Gene wird von den basic helix-loop-helix (bHLH)-PER-ARNT-SIM (PAS)-Protein enthaltenden Transkriptionsfaktoren CLOCK und BMAL1 getrieben. PAS ist ein Akronym für die ersten drei Proteine, die diese Protein-dimerisierungs Domäne gemeinsam haben: *Drosophila Per*, der humane *aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator* (ARNT) und das *Drosophila single-minded*-Protein. PAS-Domänen enthaltende Proteine repräsentieren eine vielfältige Familie (Hogenesch et al., 1997) und sind auch häufige Merkmale von Uhr-relevanten Proteinen diverser Organismen (Pflanzen, Pilze, Insekten und Säugetiere).

CLOCK und BMAL1-Heterodimere aktivieren die Transkription von *mPer* und *mCry*-Genen durch die Bindung an E-Box-Verstärker (*enhancer*), DNA-Elemente im Promotorbereich der jeweiligen Gene und agieren somit als positive Elemente.

Nach ihrer Translation im Zytoplasma bilden mPER- und mCRY-Proteine miteinander und einer Caseinkinase (CK1 $\epsilon$ ) multimerische Komplexe. Anschliessend werden sie von dieser Kinase phosphoryliert. Der phosphorylierte CRY-PER-CK1 $\epsilon$  Komplex ist instabil (die Phosphorylierung ist eine Markierung zum Abbau) und wird nach Erreichen einer Schwellenkonzentration in den Nukleus transloziert (Gekakis et al., 1998).

Im Nukleus wirkt der Komplex, vor allem aber die mCRY-Proteine, als negative Regulatoren. Sie interagieren direkt mit CLOCK und/oder BMAL1 und inhibieren die von ihnen angetriebene Transkription der *mPer* und *mCry*-Gene (Kume et al., 1999). Die mPER und mCRY Proteine hemmen ihre eigene Transkription und bilden somit die negative Rückkopplungsschleife.

Auch die Transkription des Genproduktes von REV-ERB $\alpha$  wird durch die CLOCK und BMAL1-Heterodimere aktiviert. Es ist Ligand für einen nukleären "orphan" Rezeptor (*ROR response element*) im Promotorbereich von BMAL1. Die Bindung von REV-ERB $\alpha$  an dieses Element führt zur Inhibition der BMAL1-Transkription (Preitner et al., 2002).

Die steigenden Mengen an mPER und mCRY Proteinen im Nukleus wiederum inhibieren die Transkription von REV-ERB $\alpha$ , was zu einer Derepression (Aktivierung) von BMAL1 führt. REV-ERB $\alpha$  agiert quasi als Verbindung zwischen den negativen (mPer, mCry) und den positiven (CLOCK/BMAL) Elementen der Rückkopplungsschleife. Seine circadiane Regulation unterliegt den negativen Elementen der Schleife, es selber steuert die rhythmische Expression von BMAL1, einem positiven Element (Preitner et al., 2002).

Beide Schleifen sind durch das CLOCK-BMAL1-Heterodimer funktionell verbunden. CLOCK- und BMAL1-Komplexe bilden also die Kernkomponente der molekularen inneren Uhr (Shearman et al. 2000, Reppert & Weaver 2002). Dies wird dadurch deutlich, dass in homozygoten *Clock/Clock* –KO Mäusen (mit defektem CLOCK-Protein) die RNA-Rhythmen von *mPer1-3* und *mCry1-2* im SCN deutlich reduziert sind (Gekakis et al., 1998; Jin et al., 1999; Kume et al., 1999).

Die Funktion der Caseinkinase-I $\epsilon$  ist für eine intakte biologische Uhr unerlässlich. Eine Mutation beim syrischen Hamster führt zum Tau-Phänotyp, einer kurzen endogenen Periode (Ralph et al., 1988; Young et al., 2000). Die Mutation betrifft nur den Austausch einer Aminosäure (Cystein zu Arginin), aber reduziert die Phosphorylierungsaktivität der Kinasen erheblich (Lowrey et al., 2000).

Die Expression von *mPer1* wird durch Lichtexposition zu Beginn oder am Ende der Nacht induziert, während die von *mPer2* nur am Beginn der Nacht induziert wird. *mPer3* zeigt keine Regulierbarkeit durch Licht (Albrecht et al., 1997).

## **1.2 Melatonin – „Das Hormon der Dunkelheit“**

### **1.2.1 Grundlegendes über das Pinealhormon**

Das primäre Hormon der Pinealdrüse ist Melatonin. Sein Name rührt von seiner Entdeckung her, den Melanophoren aus dem Krallenfrosch *Xenopus Laevis*. Vor mehr als 40 Jahren beobachtet Aaron Lerner, dass sich Krallenfrosch-Melanophoren durch Kontakt mit Melatonin zusammenziehen, ein Tonus also. Es hat Melanin-aggregierende Wirkung. Daher der Name *MelaTonin*- Substanz, die in Melanozyten einen Tonus auslöst. Melatonin besitzt eine wichtige Rolle in der Steuerung einer Vielzahl biologischer Prozesse. Es steuert saisonale Fortpflanzung, beeinflusst die Phase circadianer Rhythmen bei Säugetieren und moduliert retinale Funktionen. Tiere, die an die jahreszeitliche Variation der Umweltbedingungen angepasst sind, tun dies durch Veränderungen der täglichen Melatoninproduktion. In diesen Tieren dient Melatonin als zeitliches, antizipatorisches Signal der härteren Umweltbedingungen des herannahenden Winters (Barrett et al., 2003). Die höheren und längeranhaltenden Melatoninkonzentrationen führen zu adaptiven Veränderungen. Es werden reproduktive Kompetenz, Fell- oder Federwachstum und Metabolismus verändert, um einen maximalen Vorteil für das Individuum und sein Überleben zu gewährleisten (Doolen et al., 1998). Melatonin dient nicht nur als Signal von Nacht und Tag, sondern kodiert auch für die Tageslänge, somit für die Jahreszeit.

Es gibt auch Hinweise auf einen Effekt von Melatonin auf vasculäre, renale und gonadale Funktion. Interessanterweise hat Melatonin in verschiedenen Spezies ganz unterschiedliche Effekte: In Hamstern wirkt es antigonadotrop, wobei es in Schafen progonadotrop wirkt. Außerdem wird Melatonin in allen Säugetieren nachts ausgeschüttet. Es verringert die Körpertemperatur bei tagaktiven Tierarten – bei nachtaktiven jedoch nicht.

Die größte Rolle von Melatonin ist seine Funktion als „Chronobiotikum“ – seinen Einfluss an der Steuerung circadianer Rhythmen.

## 1.2.2 Synthese von Melatonin

N-acetyl-5-methoxytryptamin, Melatonin, ist ein Indolamin mit einer Molekularmasse von 232,27. Es wird aus Tryptophan synthetisiert, welches über 5-Hydroxytryptophan zu Serotonin konvertiert (5-Hydroxy-Tryptamin) wird. Die beteiligten Enzyme sind die Tryptophanhydroxylase und die aromatische Aminosäuredecarboxylase.

Serotoninspiegel sind in der Pinealdrüse tagsüber sehr hoch und fallen in der frühen Nachtphase schnell ab, da verschiedene metabolische Prozesse, die Serotonin als Substrat benutzen, aktiviert werden. Das Enzym Arylalkylamin-N-Acetyltransferase (aaNAT) konvertiert Serotonin mithilfe von Coenzym A zu N-Acetylserotonin, dem direkten Vorläufer von Serotonin. In den meisten Spezies nimmt die Aktivität der aaNAT in der Nacht zu, durch Licht kann dieser Effekt allerdings verhindert werden.

N-Acetylserotonin wird durch das Enzym HIOMT (Hydroxyindol-O-Methyl-Transferase) zu Melatonin konvertiert, welches zu erhöhten nächtlichen Melatoninspiegeln führt. Melatonin hat sowohl lipophile als auch hydrophile Eigenschaften, deswegen kann es durch Diffusion leicht in Zellen und Gewebe eindringen (Arendt et al., 1995). Melatonin wird im Blut transportiert und in der Leber über 6-Hydroxymelatonin und der darauf folgenden Sulfatierung oder Glucuronidierung abgebaut (und über den Harn ausgeschieden).

Melatonin hat keine toxischen Eigenschaften, im Gegenteil, es scheint freie Radikale abzufangen und somit vor oxidativem Zellschaden zu schützen (Reiter et al., 1996).

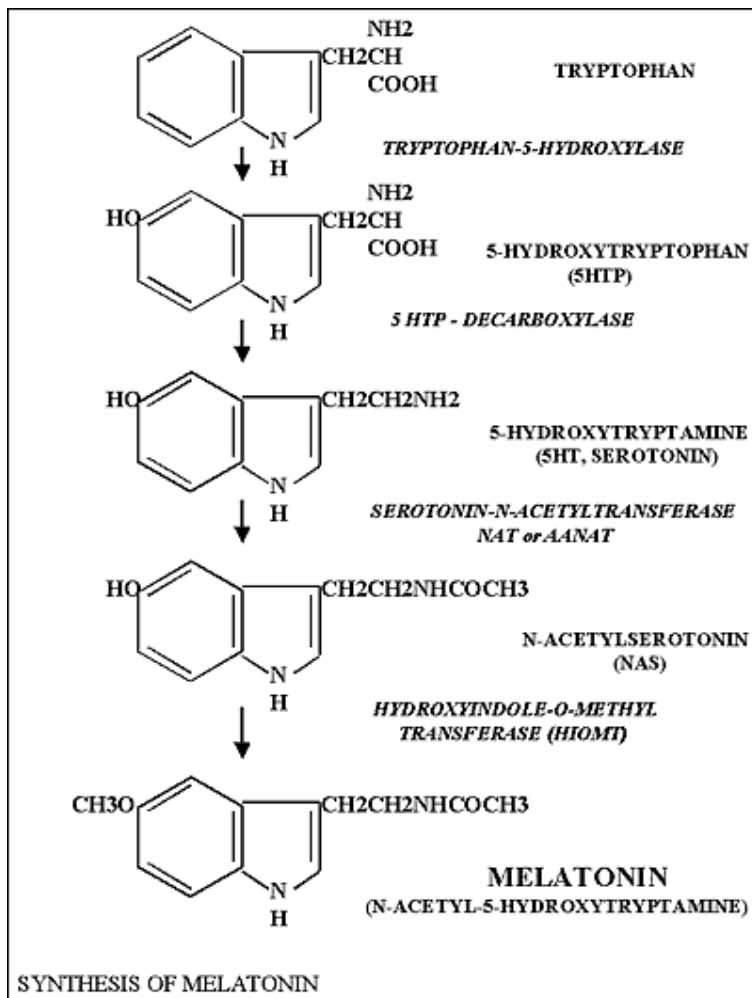


Abb. 1.5: Biosynthese von Melatonin. Aus Arendt et al., 2002.

Melatonin wird in den meisten Körperflüssigkeiten gefunden, wobei seine Konzentration in der Nacht höher ist als am Tag. Eine Entfernung der Pinealdrüse hat zur Folge, dass keine messbaren Mengen Melatonin mehr gebildet werden, obwohl es Hinweise gibt, dass es auch in der Retina oder der Harderschen Drüse gebildet wird (hier aber nur in sehr geringen Mengen).

### 1.2.3 Die Melatoninrezeptoren

Der erste klonierte Melatoninrezeptor wurde in *Xenopus*-Melanophoren exprimiert (Ebisawa et al., 1994). Obwohl sich später herausstellte, dass es sich um eine mutierte Form des Wildtyprezeptors handelte (Jockers et al., 1997), ebnete seine Entdeckung den Weg für die Klonierung von Melatoninrezeptoren anderer Spezies wie Säugetieren und Vögeln.

Die Melatoninrezeptoren gehören alle zur Familie der G-Protein gekoppelten Rezeptoren (GPCR). Sie besitzen sieben alpha-helicale Transmembrandomänen und einige Sequenzmotive, die für sie charakteristisch und hochkonserviert sind. Zwei Rezeptortypen sind in Säugetieren vorhanden, MT1 und MT2 (bei Vögeln gibt es zusätzlich den Mel1c-Rezeptor aber keinen MT2-Rezeptor).

Ein weiterer Rezeptor mit 40% Sequenzhomologie mit den anderen Mitgliedern dieser Familie wurde kloniert – allerdings bindet dieser Subtyp kein Melatonin und wird als MRR (*melatonin related receptor*) bezeichnet. Basierend auf Bindungsstudien mit <sup>125</sup>I-2-Iodomelatonin wurde ein zusätzlicher Melatoninrezeptor vorhergesagt (Molinari et al., 1996) – neuere Studien haben allerdings ergeben, dass es sich hierbei um eine Chinon-Reductase-2 handelt, die kein Mitglied der GPCR-Superfamilie ist, und ungewisse Funktion hat. Die kodierende Region von allen drei bekannten Melatoninrezeptoren besteht aus zwei Exons, jeweils getrennt durch ein großes Intron.

## **1.2.4 Verteilung der Melatoninrezeptoren**

Die Gewebeverteilung der Melatoninrezeptoren ist für jede Spezies sehr spezifisch.

In niederen Vertebraten sind sie im ZNS weit verbreitet. Dies ist bei Vögeln offensichtlich, wo zwei Subtypen von Rezeptoren (MT1 und Mel1c) zwar distinkt aber überlappend exprimiert werden. Sie könnten also wichtige neurologische Funktionen haben – derzeit ist allerdings wenig darüber bekannt. In Schafen scheint es noch nicht einmal ein Gen für den MT2-Rezeptor zu geben.

Im Frettchen, einem sich saisonal fortpflanzenden Tier, wurden bisher im Gehirn keine Melatoninrezeptoren entdeckt, jedoch in hoher Konzentration im Pars tuberalis der Hypophyse.

Die Melatoninrezeptoren werden hauptsächlich im Gehirn, aber auch in peripheren Geweben wie Herz, Lunge, Niere und Leber exprimiert (Naji et al., 2004). Der MT1-Rezeptor weist die höchste Dichte im Gehirn (außerdem im Pars tuberalis der Hypophyse) der meisten Säugetiere auf. Über seine Expression im SCN wird wahrscheinlich die Wirkung von Melatonin auf die innere Uhr vermittelt (Reppert et al., 1994). Studien mit MT1-KO Mäusen haben gezeigt, dass dieser Rezeptor für den inhibitorischen Effekt von Melatonin auf die neuronalen Entladungsraten im SCN verantwortlich ist. Es scheint allerdings, dass im Bezug auf die Phasenverschiebungseigenschaften von Melatonin die Rezeptoren funktionell redundant sind.

Die MT2-Rezeptorexpression im SCN ist so niedrig, dass sie nicht mittels Autoradiogrammen mit  $^{125}\text{I}$ -2-Iodomelatonin (wie für MT1 üblich) detektiert werden kann, sondern nur durch RT-PCR. Dennoch ist bekannt, dass MT2 für den phasenanpassenden Effekt von Melatonin verantwortlich ist (Liu et al., 1997, Hunt et al., 2001). Der MT2-Rezeptor ist nicht bei allen Säugetieren vorhanden.

Durch eine natürliche Mutation im sibirischen Hamster (Liu et al., 1997) ist der MT2-Rezeptor nicht funktionell. Dennoch zeigen diese Tiere eine ungestörte saisonale Reproduktion und circadiane Rhythmik als Reaktion auf Melatoningaben (Weaver et al. 1996). Dieses lässt vermuten, dass der MT2-Rezeptor für die Vermittlung dieser Reaktionen irrelevant ist. Der MT2-Rezeptor ist überhaupt sehr niedrig exprimiert – seine physiologische Rolle ist noch nicht vollständig geklärt.

Zu Beginn dieser Arbeit (2001) gab es noch keine vollständige murine MT2-Sequenz. Erst letztes Jahr wurde die vollständige Sequenz veröffentlicht und eine Studie mit MT2-KO Mäusen vorgestellt (Jin et al., 2003). Demnach ist der MT2-Rezeptor funktionell relevant und vermittelt Melatonineffekte bei einer höheren Konzentration als für MT1 notwendig. MT2-KO Mäuse sind fertil und zeigen einen normalen circadianen Phänotyp unter LD- und DD-Bedingungen. Die Inhibierung der SCN-Entladungsraten durch Melatonin ist in MT2-KO Mäusen nicht beeinträchtigt (im Gegensatz zum MT1-Rezeptor KO). Beide Rezeptortypen tragen zur Regulierung der CREB-Phosphorylierung bei. Melatonin reduziert schon in niedrigen Konzentrationen die PACAP-induzierte CREB-Phosphorylierung (Kopp et al., 1997; Von Gall et al., 1998). In Wildtyp-Tieren reichen physiologische Konzentrationen von Melatonin ( $<1\text{nM}$ ) aus, um die Menge an phosphoryliertem CREB um 70% zu reduzieren.

In MT1-KO Mäusen fehlt dieser Effekt, nur bei höheren Konzentrationen gibt es einen residualen Effekt (Von Gall et al., 2000). Der MT1-MT2 Doppelknockout zeigt noch nicht einmal mehr diesen Effekt. Es scheint also, dass der MT1-Rezeptor bei niedriger Konzentration und der MT2-Rezeptor bei hohen Konzentrationen Reaktionen weiterleitet. Dies könnte dadurch erklärt werden, dass der MT2-Rezeptor eine wesentlich geringere Affinität zu Melatonin hat als der MT1-Rezeptor (MT2-Rezeptor  $K_d=199,9\pm 13,4\text{pM}$ , MT1-Rezeptor  $K_d=59,3\pm 18,3\text{pM}$ , Jin et al., 2003).

Es gibt Bindungsstellen für Melatonin im hypophysären Pars tuberalis, die mit der Steuerung der Reproduktion in sich saisonal fortpflanzenden Spezies in Verbindung gebracht werden (Reppert et al., 1994).

Die Rezeptoren im Nucleus paraventricularis des Thalamus könnten auf die Regulierung limbischer Funktionen wirken, z.B. den sedativen Effekt von Melatonin auf tagaktive Säuger vermitteln.

Rezeptoren in cerebralen Arterien könnten Einfluss auf die kardiovaskuläre Funktion und Temperaturregulation haben (Viswanathan et al., 1990). Der MT1-Rezeptor ist hauptsächlich im SCN und in vielen Spezies auch im Pars tuberalis exprimiert (Roca et al., 1996.). Der MT2-Rezeptor kommt hauptsächlich in der Retina vor. Andere Hirnregionen wie Hippocampus oder Cortex zeigen sehr niedrige Rezeptor-mRNA-Expression. Es wurden sowohl Spezies- als auch Altersunterschiede in der Rezeptorexpression beobachtet. In alternden Mäusen nimmt die detektierbare mRNA Menge für den MT1 Rezeptor im SCN ab. Dieses impliziert einen altersbedingten Verlust an MT1-Rezeptoren, welches zur Desynchronisierung des circadianen Systems beitragen könnte.

### **1.2.5 Signaltransduktion der Melatoninrezeptoren**

Die Melatoninrezeptoren sind an ein inhibitorisches G-Protein gekoppelt ( $G_i$ ). Ihre Aktivierung führt zur Inhibition der Adenylatzyklase über einen Pertussis-Toxin sensitiven Mechanismus. Nach Ligandenbindung untergehen die Melatoninrezeptoren wahrscheinlich eine Konformationsänderung, bei der sie ein inhibitorisches G-Protein aktivieren. Das aus  $\alpha\beta\gamma$ -Untereinheiten bestehende Protein bindet GTP und dissoziiert zu  $G\alpha$ -GTP und  $G\beta\gamma$ -Untereinheiten. Die  $G\alpha$ -GTP-Untereinheit hemmt über die Adenylatzyklase die Neubildung von cAMP aus ATP (Reppert et al, 1994 & 1995; Conway et al., 2000).

In einer humanen Zelllinie führt die Aktivierung des MT1- Rezeptors zur Potenzierung der  $PGF2\alpha$ -vermittelten Phospholipase C-Aktivität und der Freisetzung von Arachidonsäure. Dieser Effekt könnte durch die  $\beta\gamma$ -Untereinheiten des heterotrimerischen G-Proteins vermittelt werden (Godson et al., 1997).

Melatonin inhibiert die Induktion des Transkriptionsfaktors PhosphoCREB durch Forskolin in Schaf-Hypophysenzellkulturen. Dies geschieht wahrscheinlich durch die Inhibition des cAMP Signalweges. Melatonin inhibiert ebenfalls die (Forskolin-stimulierte) Induktion der AP-1 Transkriptionsfaktoren *c-fos* und *jun B* in Schaf Pars tuberalis (Ross et al., 1996).

Es scheint eine generelle Hemmung der Signaltransduktion in Zellen zu geben, die den cAMP/pCREB/AP-1 Mechanismus benutzen.

## 1.2.6 Weitere Wirkungen von Melatonin - mögliche therapeutische Einsatzgebiete

Störungen des circadianen Systems führen zu einer verkürzten Lebensspanne in vielen Tiermodellen. Parallel dazu nimmt die Synthese und Freisetzung von Melatonin im Alter stark ab (Pang et al., 1984). Es wurde gezeigt, dass exogene Melatoningaben die circadiane Kopplung, also die Manifestierung geregelter Rhythmen, verstärkt.

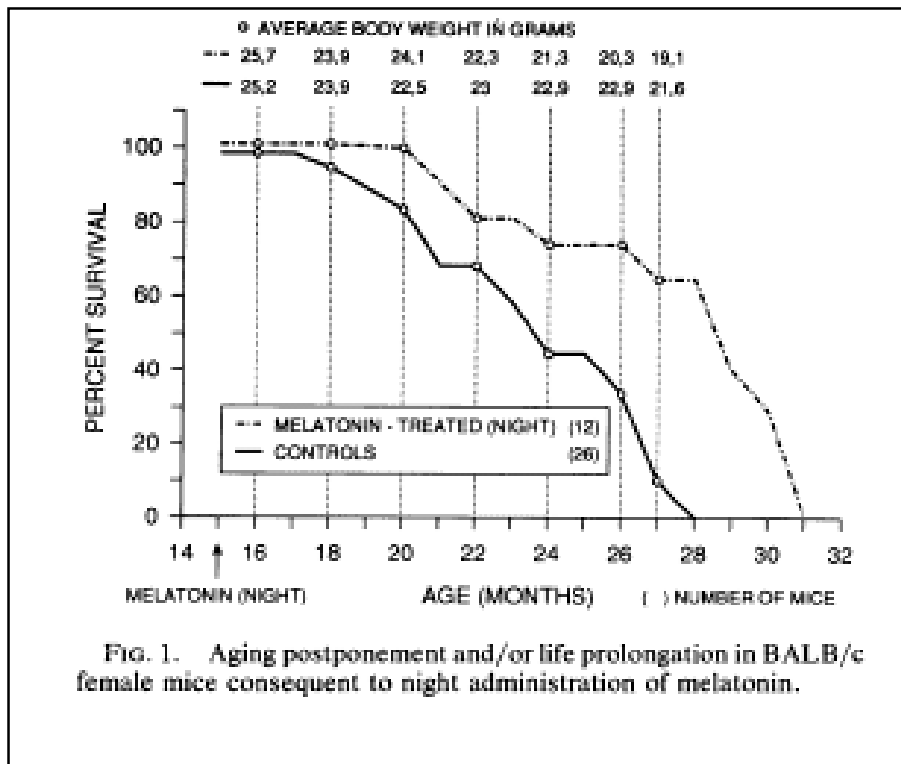


Abb. 1.6: Die Verlängerung der Lebensspanne durch Melatoningaben. Aus Pierpaoli & Regelson, 1994.

Außerdem haben Pierpaoli et al. (1994) festgestellt, dass die Lebensspanne von Mäusen durch Melatoninsubstitution verlängert werden kann. Es können auch weitere, altersbedingte Veränderungen durch diese Substitution verhindert oder zumindest abgemildert werden (Koster van Hoffen et al., 1993, Reiter et al., 1994).

Bei Seneszenz-beschleunigten SAM-P 6 Mäusen wurde beobachtet, dass Melatonin eine neuroprotektive Funktion hat und vor altersbedingten DNA-Schäden im Gehirn schützt (Morioka et al., 1999). Ferner stärkt Melatonin das Immunsystem durch die Induktion einer Reihe von Interleukinen und Interferonen (Carollo et al., 1992, Weindruch et al., 1982).

- Circadiane Störungen (bedingt durch Alter, Blindheit etc.)
- Schlafstörungen (Jet lag, Schichtarbeit etc.)
- Fertilitätsregulation, Verhütung
- Immunologische oder onkologische Intervention
- Kardiovaskuläre/Kreislauf-Therapie

**Tab. 1.1: mögliche therapeutische Einsatzgebiete von Melatonin**

Es wurde gezeigt, dass Melatonin die Entwicklung von Mammatumoren und von humanen MCF-7 Brustkrebszellen *in vitro* verlangsamen kann. Diese Effekte könnten zumindest teilweise auf die Unterdrückung der Expression des Östrogenrezeptors zurückzuführen sein (Molis et al., 1994). Außerdem kann Melatonin in hohen Dosen die Expression der 5-Lipoxygenase verringern. Dieses Enzym partizipiert an der Biosynthese von Leukotrienen, welche allergische und entzündliche Prozesse begleiten (Steinhilber et al., 1995).

Niedrige Melatoninkonzentrationen wurden mit Krankheiten wie Alzheimer (Papolla et al., 1997), Multipler Sklerose (Sandyk et al., 1994), plötzlichem Kindstod (Sturner et al., 1990), Epilepsie (Maurizi et al., 1985) und postmenopausaler Osteoporose (Sandyk et al., 1992) in Zusammenhang gebracht.

Bei allen Wirkungen, die Melatonin nachgesagt werden, darf der objektive Betrachter niemals die Skepsis verlieren. Mitte der 90er Jahre wurde Melatonin als „Wunderhormon“ sehr populär. Unter anderem deswegen, weil ein extrem populärwissenschaftliches Buch (Pierpaoli und Regelson, 1994) erschien, in dem die Autoren behaupten, dass Melatonin Altern rückgängig machen kann. Diese Studie, bzw. die Schlussfolgerungen daraus, wurden nicht gut überlegt. Es wurden Pinealdrüsen von jungen in alte Mäuse transplantiert, worauf eine Verlängerung der Lebensspanne beobachtet wurde – der Effekt wurde dem „jugendlichen“ Melatonin der transplantierten Drüsen zugeschrieben. Das Problem hierbei ist, dass die verwendeten Mausstämme, wie viele Labormausstämme, Melatonin-defizient waren. Die Mutmaßung, Melatonin hätte das Leben der Versuchstiere verlängert, ist absurd. Dennoch zeigten Versuche derselben Autoren, dass exogene Melatoningaben bei einigen Mausstämmen die Lebensdauer um etwa 20% verlängerte.

Was verschwiegen wurde war, dass in einem anderen, Melatonin-profizienten Mausstamm (CH3), die Substitution mit Melatonin zu Zunahme der Tumorzinzidenz im reproduktiven System führte.

Es gibt keine Wunderdroge gegen das Altern. Auch wenn es viele wissenschaftliche Hinweise auf einen profitablen Effekt der Melatoninsubstitution bei alternden Tieren gibt, es ist nicht hinlänglich erwiesen, ob dies für den Menschen auch gilt.

Die Indizien für einen positiven Effekt auch im (alternden) Menschen sind allerdings nicht zu übersehen. Die Behandlung von jet lag (Petrie et al., 1989) und chronischen Schlafstörungen (Oldani et al., 1994) ist durchaus erfolgreich. Einen Leitfaden für die Etablierung einer Chronotherapie gibt es aber noch nicht. Dies und die weitere Evaluierung der potentiellen Einsatzgebiete von Melatonin gilt es zu erforschen.

## **1.3 Kalorische Restriktion, Diät**

### **1.3.1 Effekte von kalorischer Restriktionsernährung**

Ein weiterer therapeutischer Ansatz (neben Melatoninsubstitution) die speziesspezifische Lebensdauer zu erhöhen, ist eine kalorisch begrenzte Ernährung.

Die Gerontologie ist immer damit beschäftigt, Interventionsmaßnahmen gegen altersbedingte Erkrankungen zu finden. Selbst wenn es für den Menschen nicht das Ziel ist, die Lebensdauer dramatisch zu erhöhen, eine Verbesserung der Lebensqualität im hohen Alter ist erstrebenswert. Weindruch et al. (1982, 1992, 2003) haben schon ausgiebige Studien zum Einfluss von kalorischer Restriktionsernährung (KR) auf die Lebensspanne und die Physiologie der Maus durchgeführt. Die Art der Ernährung ist im Bezug auf den Verlauf des Alterns unglaublich wichtig. Die Etablierung einer Restriktionsdiät muss sehr genau geplant werden, denn es soll keine Mangelernährung sein. Defizite essentieller Nährstoffe müssen vermieden werden, um den Tieren eine ausgewogene Diät zu erteilen. Diese Diäten werden mit Mineralien, Vitaminen und Proteinen angereichert, enthalten aber weniger Fett. Man unterscheidet verschiedene Arten von Diäten: Nicht aufgereinigte Diäten („*nonpurified diets*“, NPD), halbaufgereinigt („*semipurified diets*“ SPD) und aufgereinigt („*purified diets*“). Nichtaufgereinigte Diäten enthalten weniger veredelte Inhaltsstoffe wie z.B. Weizensamen, Getreideschrot und Fischöl. Aufgereinigte und halbaufgereinigte Diäten sind sehr sorgfältig zusammengesetzt.

Sie enthalten unter anderem Sucrose, Getreideöle, Laktalbumin und Casein (Pugh et al., 1999). Die Stärke der kalorischen Restriktion wird immer in Prozent zur durchschnittlichen *ad libitum* Nahrungsaufnahme von Kontrolltieren bezogen.

Wie aus Abb.1.7 ersichtlich, konnten Weindruch et al. (1996, 2003) einen direkten Zusammenhang von aufgenommener Kalorienmenge und maximaler Lebensspanne beobachten. Die durchschnittliche Lebensspanne von 27 Monaten bei Kontrolltieren konnte auf 45 Monate bei starker kalorischer Restriktion (40-50kcal/Woche) erhöht werden. Aber auch schon eine geringere Restriktion (85kcal/Woche) hatte einen lebensverlängernden Effekt auf die Mäuse. Wie KR den Alterungsprozess verlangsamt ist noch nicht klar. Möglicherweise spielen hormonelle Veränderungen, eine niedrige Körpertemperatur und Metabolismusrate, Verringerung der freien Radikalbildung, Verringerung des Körperfettanteils und Stärkung des Immunsystems eine entscheidende Rolle. Interessanterweise nehmen restriktiv gefütterte Mäuse gegenüber *ad libitum* gefütterten nicht weniger, sondern mehr Kalorien pro Gramm Körpergewicht und Lebensdauer auf (Weindruch et al., 1996). Dennoch leben sie länger. Möglicherweise liegt dies daran, dass KR-Mäuse ihre Nahrung und die daraus beziehbare Energie einfach optimaler nutzen als Kontrolltiere. Bei Ratten und Rhesusaffen wurde beobachtet, dass KR die Körpertemperatur senkt, welches den Sauerstoffverbrauch reduziert. Parallel dazu sind Triiodthyronin – und „*growth hormone*“ (GH)-Konzentrationen verringert.

Möglicherweise führt also ein hypometabolischer Zustand des Körpers zu der Verlängerung der Lebensspanne. Dies wird dadurch bekräftigt, dass poikilotherme Tiere und überwinterte Säugetiere ebenfalls länger leben, wenn die Umgebungstemperatur kälter ist (Lane et al., 1996; Sohal et al., 1996). KR verlangsamt die Akkumulation oxidativer Schäden an DNA und Proteinen, welche maßgeblich an altersbedingten Erkrankungen und Degeneration beteiligt sein sollen (Barja, 2002). Auch bei der Unterdrückung der Tumorentwicklung scheint KR eine Rolle zu spielen, denn die Zellproliferation in vielen Geweben wird verzögert (Lok et al., 1988). Weindruch et al. (1982) sehen eine wichtige Rolle in der Stärkung des Immunsystems bei alternden Tieren mit Restriktionsfütterung.

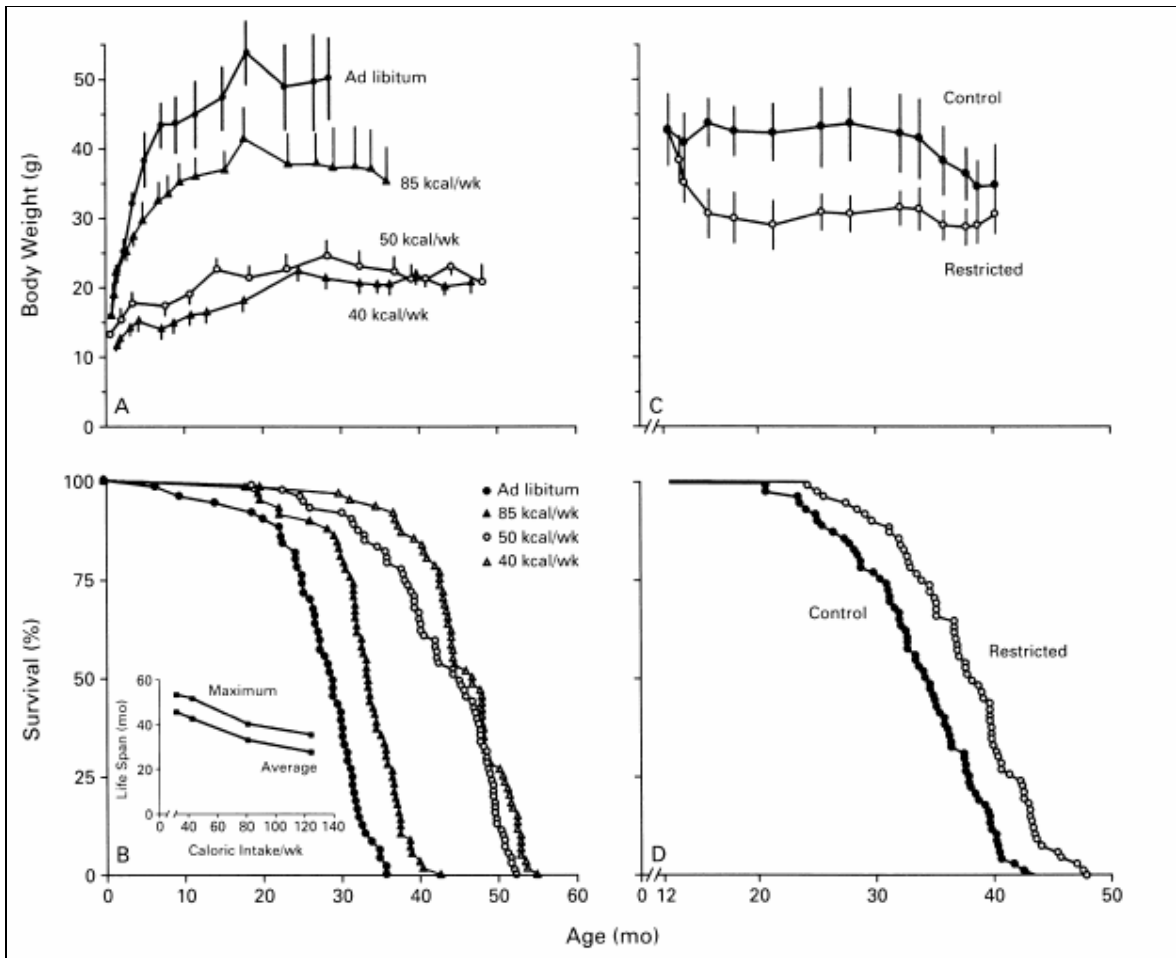


Abb. 1.7: Aus: Weindruch et al., 2003

Interessanterweise gibt es einige übereinstimmende Effekte von KR und Melatoninsubstitution

Kalorische Restriktion

Melatoninsubstitution

	Kalorische Restriktion	Melatoninsubstitution
Metabolische Effekte	Senkt Körpertemperatur	Senkt Körpertemperatur
	Beugt oxidativem Zellschaden vor (über erhöhte Aktivität von Antioxidanten)	Beugt oxidativem Zellschaden vor (über erhöhte Aktivität von Antioxidanten)
Immunologische Effekte	Induziert Interferone und unterdrückt Entzündungsreaktionen	Induziert Interferone und unterdrückt 5-LOX Expression
Onkostatistische Effekte	Verlangsamung des Wachstums von durch	Verlangsamung des Wachstums von durch

	radioaktive Strahlung verursachten Tumoren. Verlangsamung spontanen Tumorwachstums	radioaktive Strahlung und Chemikalien ausgelösten Tumoren. Verlangsamung spontanen Tumorwachstums.
Endokrine Effekte	Verlangsamte reproduktive Seneszenz	Verlangsamte reproduktive Seneszenz
Altersbedingte Effekte	Verlängert die Lebenserwartung	Verlängert die Lebenserwartung

Tab. 1.2: Vergleich von Melatonin- und KR-Effekten. Weitere Literaturverweise: Stokkan et al. (1991), Nordito et al. (1989), Blask (1984)

### 1.3.2 Altersbedingte Veränderungen im ZNS von Säugetieren

Während des Alterungsprozesses bei Säugetieren kommt es zu Verschlechterungen der kognitiven und motorischen Fähigkeiten. Dies ist der größte Risikofaktor für diverse neurologische Erkrankungen wie zum Beispiel Alzheimer (Lee & Weindruch, 2000). Studien haben erwiesen, dass normales Altern des Gehirns mit subtilen morphologischen und funktionellen Veränderungen in spezifischen neuronalen Schaltkreisen einhergeht, im Gegensatz zum großflächigen Absterben von Neuronen (Morrison et al., 1997). Tatsächlich gibt es auch über diverse Säugetierspezies hinweg Gemeinsamkeiten im Alterungsprozess des ZNS, wie z.B. Atrophie der pyramidalen Neuronen, synaptische Atrophie, Verringerung der Dopaminrezeptoren im Striatum, Akkumulation fluoreszenter Pigmente, Abnormalitäten des Zytoskelettes und reaktive Astrozyten und Mikroglia (Lee et al., 2000). Bisher wurden noch keine Studien veröffentlicht, in denen altersbedingte Veränderungen des Hypothalamus bzw. des hypothalamischen Transkriptoms von Mäusen gezeigt wurden. Die meisten Informationen über den Einfluss von KR auf die Genexpression wurden in der Leber, im Muskel (Weindruch et al., 2001) oder im Herzen (Lee et al., 2002) von Mäusen gesammelt. Hier wurde festgestellt, dass ein Grossteil der altersbedingten (genetischen) Veränderungen durch KR reversibel sind. Bei der Untersuchung der Genexpression in verschiedenen Geweben mit Hilfe von *Microarrays* und *Realtime-PCR* wurde festgestellt, dass der Effekt von KR von Gewebe zu Gewebe unterschiedlich sein kann. Transkripte, die z.B. in der Leber reguliert werden, können im Herzen oder im Gehirn unverändert sein (Weindruch et al., 2001).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass (neuronales) Altern in einem Gen-Expressionsprofil resultiert, welches indikativ für Entzündungsreize, oxidativem Stress und verringerte neurotrophe Unterstützung ist. Auf transkriptionellem Niveau zeigen sich bei Mäusen Parallelen zu humanen neurodegenerativen Erkrankungen.

Eine kalorische Restriktion, also eine kalorienreduzierte Diät, verlangsamt den Alterungsprozess und verringert in Mäusen die altersbedingte Induktion von Genen, die an der Stress-Antwort und entzündlichen Prozessen beteiligt sind (Lee & Weindruch, 2000).

Die postulierten Mechanismen des (ZNS-) Alterns beinhalten Instabilität der nukleären und mitochondrialen DNA (Gaubatz et al., 1994), neuroendokrine Dysfunktion (McEwen et al. 1998), die Produktion reaktiver (schädlicher) Sauerstoffspezies (Sohal et al. 1996), verändertem Calcium-Metabolismus (Disterhoft et al. 1994) und entzündungsvermittelten neuronalen Schäden (Blumenthal et al., 1997). In der Tat ist eine kalorienreduzierte Ernährung die einzige Intervention, mit der es möglich ist, die intrinsische Rate des Alterungsprozesses zu verlangsamen. Beim Vergleichen der Genexpressionsprofile von alten KR-Tieren mit Kontrolltieren wurde festgestellt, dass in allen untersuchten Organen KR ein „jugendlicheres“ Genexpressionsprofil verursacht.

Bis jetzt wurde der Effekt von KR auf die Genexpression noch nicht im Hypothalamus der Maus untersucht. Ferner wurde bei allen Untersuchungen dieser Art ein wichtiger Faktor – die Tageszeit der Probennahme – nicht beachtet. Da viele Gene ein circadianes Expressionsprofil haben, könnte es auch sein, dass einige davon durch KR reguliert werden. Die ermittelte Expression der Gene wäre unterschiedlich, je nachdem, wann Proben genommen wurden.

In der von mir angefertigten Arbeit wurde dieser Faktor näher untersucht.

### **1.3.3 Kalorische Restriktion und Chronobiologie**

Der Zusammenhang von Restriktionsernährung und circadianer Physiologie ist weit weniger deutlich als der mit Melatonin. Es wurden Studien durchgeführt, in denen ein Einfluss der Fütterungszeit auf den circadianen Rhythmus festgestellt wurde. Die circadiane Schwankung der Körpertemperatur von Mäusen ist abhängig vom Zeitpunkt der Fütterung. Bei der Fütterung am Tag, der eigentlichen Ruhephase von Mäusen, verschiebt sich das Temperaturmaximum in die Lichtphase. Bei Fütterung im Dunkeln erreicht die Körpertemperatur ebenfalls im Dunkeln ihr Maximum (Nelson et al., 1988).

Wenn Ratten, Hamster und Mäuse täglich um die gleiche Uhrzeit restriktiv gefüttert werden, nimmt 2-4 Stunden vor diesem Zeitpunkt die Aktivität zu (Mistlberger, 1994).

Diese „Nahrungs-antizipatorische“ Aktivität (FAA, *food-anticipatory activity*) ist sogar dann vorhanden, wenn der Sitz der molekularen Uhr, der SCN, läsiert wurde (Stephan et al, 1979). Deswegen wird der FAA als SCN-unabhängiger Rhythmus betrachtet.

Molekularbiologisch ist dies noch interessanter, denn Wakamatsu et al. (2001) haben festgestellt, dass auch der Rhythmus der Uhr-Gene *mPer1* und *mPer2* durch diese zeitlich definierte Fütterung in ihrer Phase verschoben wird. Allerdings gilt dies nur für den Cortex und den Hippocampus, im SCN bleibt der *mPer1*- und *mPer2*-Rhythmus klar an Licht als Zeitgeber gekoppelt. Es ist also möglich, dass die Expression der *mPer*-Gene außerhalb des SCN, den SCN-unabhängigen Aktivitätsrhythmus steuert – als sekundärer Schrittmacher.

Es ist wenig über die Mechanismen, die zu diesem Phänomen führen, bekannt (Choi et al., 1998). Möglicherweise werden in vielen peripheren Geweben Uhrgene entsprechend flexibel reguliert. Falls dies der Fall ist, könnte es bedeuten, dass die Komponenten der circadianen Uhr für sehr weitläufige (metabolische) Funktionen notwendig sind, und sich nötigenfalls vom vorgegebenen Rhythmus des SCN abkoppeln.

## **1.4 Ziel der Arbeit**

Das Verständnis um die Bedeutsamkeit der Chronobiologie nimmt rapide zu. Insbesondere in der Altersforschung gibt es ein großes Interesse an der Funktionsweise der inneren Uhr und ihrer Degeneration während der Seneszenz. Störungen des circadianen Systems durch Krankheit oder Alter haben profunde Effekte auf die Physiologie und das Wohlbefinden von Menschen. Die therapeutische Anwendung von Melatonin kann bei vielen Krankheitssymptomen helfen. Die Melatoninsekretion nimmt bei Säugetieren mit zunehmendem Alter ab (Iguchi et al., 1981). Einschlafstörungen, wie sie bei einem Grossteil der Bevölkerung vorkommen, werden oft erfolgreich mit Melatonin behandelt. Auch Schichtarbeiter oder Fernreisende profitieren von dem synchronisierenden Effekt von Melatonin. Blinde, denen die Möglichkeit der Synchronisation durch Licht fehlt, können ebenfalls häufig so behandelt werden. Außerdem wird Melatonin mit einer Reihe psychiatrischer Krankheitsbilder in Verbindung gebracht. Hierzu zählen jahreszeitliche Gemütsschwankungen (Putilov, 1999), Schizophrenie und manische Depressionen. Bei Patienten mit unipolarer Depression werden niedrige Serum-Melatonin-Konzentrationen und

ein gestörter circadianer Melatoninrhythmus berichtet (Wirz-Justice & Arendt, 1979). Möglicherweise kann Melatonin die Entwicklung von altersbedingten Krankheiten verlangsamen oder gar verhindern. Kalorische Restriktionsernährung ist für den Menschen nicht realistisch anwendbar – aber da auch Melatonin erwiesenermaßen lebensverlängernd wirkt, könnte hier eine Anwendung in der Geriatrie praktikabel sein.

In dieser Arbeit habe ich sowohl verhaltensphysiologische als auch molekularbiologische Untersuchungen angestellt, um den Einfluss von Melatonin und kalorischer Restriktionsernährung auf Mäuse zu untersuchen. Ich betrachtete den Effekt der Behandlungen auf die circadiane Physiologie, indem ich die lokomotorische Aktivität aufgezeichnet habe und verschiedene chronobiologische (Phasenverschiebungen, DD) Experimente durchführte. Durch einen Vergleich der Reaktionen auf die gegebenen Stimuli sollte erkannt werden, ob die Behandlungen sich positiv auf das murine circadiane System auswirkten.

Molekularbiologisch legte ich meinen Schwerpunkt auf den Hypothalamus der Maus, in dem der SCN liegt. Es war meine Aufgabe, das komplexe Genexpressionsprofil im Hypothalamus und den Einfluss der von mir applizierten Behandlungen auf diese Expression zu untersuchen.

In Bezug auf kalorische Restriktion wird meistens nur ein Tageszeitpunkt untersucht, ferner hat noch niemand die Genexpression bei KR-Tieren im Hypothalamus untersucht.

Betrachtet wurden drei Gruppen von Tieren (Kontroll-, melatoninsubstituiert und KR) zu vier verschiedenen Zeitpunkten, jeweils 6 Stunden auseinander.

Parallel dazu wurden:

A: Jeweils alle exprimierten Gene pro Gruppe in einem circadianen Zusammenhang betrachtet, um zu erkennen, welche Gene einen circadianen Rhythmus aufweisen. Ziel war es, zusätzliche (putativ Uhr-regulierte) Transkripte zu identifizieren. Werden manche Transkripte nur durch eine oder die andere Behandlung rhythmisch exprimiert? Werden in unbehandelten Tieren rhythmische Transkripte durch eine meiner Behandlungen in ihrer Periodik beeinträchtigt?

B: Vergleiche zwischen den Gruppen angestellt, um zu sehen, welche Gene durch die Behandlungen beeinflusst werden. Möglicherweise gibt es Transkripte, die von KR und Melatonin ähnlich reguliert werden?

C: Untersucht, ob Gene, die bekanntermaßen beim alternden Organismus differentiell

reguliert werden, auf meine Behandlungen ansprechen. Werden Gene, die erwiesenermaßen an neurologischen Erkrankungen beteiligt sind, beeinflusst? Diese Arbeit beinhaltet zwei sehr unterschiedliche Disziplinen biologischer Forschung, die selten im Zusammenhang untersucht werden – Verhaltensbiologie und Molekularbiologie.

Ich habe in Kooperation des IHF (Institut für Hormon und Fortpflanzungsforschung) in Hamburg mit dem *Department of Biomedical Sciences, FSU College of Medicine, Tallahassee (USA)* gearbeitet.

Hierbei war es mir möglich, allermodernste Methoden der Molekularbiologie anzuwenden. Die Nutzung der *Microarray*-Technologie und quantitativer Realtime-PCR wird zunehmend zum Alltag in modernen Forschungslaboratorien. Für die biomedizinische Forschung sind diese Methoden ein großer Schritt vorwärts.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Tiermaterial: Mäuse des Stammes B6C3F1

Es handelt sich bei den Versuchstieren um männliche Mäuse (*Mus musculus domesticus* L.) des Stammes B6C3F1. Sie wurden von der Firma Charles River (Wilmington, MA) gekauft. Dies ist die F1-Generation eines Hybridstammes. Er wurde erzeugt durch Kreuzung des maternalen C57BL/6 mit dem paternalen C3H Stamm. Dieser Stamm ist genotypisch und phänotypisch uniform und toleriert Gewebetransplantationen (Tumoren, Ovarien, Haut) von Mäusen jedes parentalen Stammes – die hauptsächliche Anwendung findet in diesem Bereich und in der Toxikologie statt.

Die Entscheidung für diesen Stamm als Tiermodell in meiner Arbeit beruht auf der Tatsache, dass der paternale Stamm (C3H) Melatonin-profizient ist. Der maternale Stamm C57BL/6 ist Melatonin-defizient, wie viele andere Labormausstämme auch. Die F1-Generation produziert Melatonin, aber in sehr geringen Mengen. Die Tiere hatten ein Alter von 6 Wochen zu Beginn des Versuches. Alle Tiere wurden gewogen und entsprechend ihres Körpergewichtes in 3 Gruppen eingeteilt (Normal, Melatonin, KR), dessen mittleres Körpergewicht gleich war. Die Tierhaltung erfolgte einzeln in Plexiglaskäfigen, die zur Überwachung Infrarotsensoren (Conrad Elektronik) installiert hatten. Es herrschte im Tierstall eine relative Luftfeuchtigkeit von 68% bei einer durchschnittlichen Raumtemperatur von 20 ( $\pm$ 2) °C. Der Lichtzyklus war zu Beginn der Versuchsperiode: Licht an von 06:00 Uhr – 18:00 Uhr, Dunkelheit dementsprechend von 18:00 Uhr bis 06:00 Uhr. Modifikationen des Lichtzyklus werden später beschrieben.

#### Fütterung:

Die Nahrung wurde von der Firma TEKLAD, Wisconsin (*AIN-93M adult maintenance precision pellets*) bezogen.

Kontrolltiere (Normal) und Melatonin-substituierte Tiere (MT) bekamen Standardnahrung, die kalorisch restringierten (KR) Tiere bekamen eine speziell zusammengesetzte mineral- und vitaminsubstituierte Restriktionsdiät - um eine Unter- nicht aber Mangelernährung zu etablieren.

Die Nahrung setzte sich wie folgt zusammen.

Inhalt	Normaldiät [g/kg]	Restriktionsdiät (KR) [g/kg]	% von Normaldiät
Kasein	140	233	166,4
L-Cystein	1,8	3	166,6
Maismehl	465,7	295	63,3
Dextriniertes Maismehl	155	155	100
Saccharose	100	100	100
Sojabohnen-Öl	40	66,7	166,7
Zellulose	50	58,3	116,3
Mineral-Mix*	35	58,3	166,5
Cholin-Bitartrat	2,5	4,2	168
Vitamin-Mix**	10	16,7	167

\*beinhalten dibasisches Kalzium-Phosphat, Kalzium-Karbonat, Kalium-Zitrat-Monohydrat, Natrium-Chlorid, Magnesium-Chlorid, Magnesium-Oxid, Eisen-Citrat, Mangan-Carbonat, Zink-Carbonat, Carbonat, Chrom-Kalium-Sulfat, Kalium-Jodat, Natrium-Selen (Ramsey et al.,2000)

\*\* Teklad#40060Madison, Wisconsin, USA

Beide Diäten sind isokalorisch mit 3,6kcal/g (Pugh et al., 1999).

Zu Beginn des Versuches wurden alle Tiere *ad libitum* gefüttert. Die durchschnittlich pro Tag gefressene Menge Futter wurde ermittelt, indem jedem Einzeltier eine definierte Menge angeboten und am folgenden Tag die übrig gebliebene Menge gewogen wurde. Der Mittelwert des gefressenen Futters betrug pro Tag 4,3g und wurde als 100% festgelegt.

Die Tiere wurden 3 Mal die Woche gefüttert. Montags und Mittwochs bekamen sie 2/7 ihrer wöchentlichen Nahrung, Freitags 3/7. Gefüttert wurde während der Aktivitätsphase der Tiere, um keinen zusätzlichen Zeitgeber-Stimulus zu setzen. Zusätzlich wurde die Fütterungszeit regelmäßig verändert, ebenfalls um eine Gewöhnung zu verhindern.

Die Tiere der KR-Gruppe bekamen für die ersten 2 Wochen dieselbe Menge Normalfutter wie die Tiere der anderen beiden Gruppen. Für die nächsten 2 Wochen bekamen die KR-Tiere 100% der Restriktionsdiät, um sie an das „neue“ Futter zu gewöhnen. Nach weiteren 14 Tagen wurde die angebotene Futtermenge auf 80%, dann auf die finalen 60% des täglichen Bedarfwertes reduziert (2,6g/Tag).

Die 20 Melatonin-substituierten Tiere bekamen nebst der gleichen Diät wie die Normaltiere 5µg/ml Melatonin über das Trinkwasser verabreicht (die verwendeten Trinkflaschen wurden aufgrund der photolabilen Eigenschaften von Melatonin schwarz lackiert und das Wasser zweimal die Woche ersetzt).

Da Melatonin an sich nicht wasserlöslich ist, wurden Stocklösungen von 5mg/ml in 96%Ethanol hergestellt. Um einen Liter melatoninhaltiges Wasser herzustellen, wurde entsprechend 1ml Melatonin-Stocklösung benötigt.



Da nun Alkohol im Wasser enthalten war (0,1%), der lediglich als Vehikel diente, wurden sowohl die Normal- und die KR-Tiere ebenfalls mit Alkohol in der gleichen Konzentration im Trinkwasser gefüttert. Die Tiere wurden für die ersten 14 Wochen wöchentlich, danach 14-täglich gewogen, um den Verlauf und Erfolg der applizierten Restriktionsernährung zu verfolgen und ggf. intervenieren zu können.

Insgesamt wurden zwei wie oben beschriebene Versuchsreihen mit 60 Tieren im Abstand von eineinhalb Jahren durchgeführt.

Es wurden insgesamt also 120 Tiere aus diesen Gruppen untersucht, außerdem wurden aus der ersten Versuchsreihe 6 Normaltiere übrig behalten und noch einige Monate altern lassen (es wurden ein paar Tiere im Überschuss gekauft). Die 6 Normaltiere aus der ersten Versuchsreihe hatten bei Ende des zweiten Versuchs ein Alter von 30 Monaten. Ich beziehe mich in dieser Arbeit allerdings ausschließlich auf Daten der zweiten Versuchsreihe, denn das gewonnene Tiermaterial aus dem ersten Versuch wurde größtenteils für die Anfertigung einer anderen Dissertation verwendet.

Da ein Teil der Ergebnisse in den USA mit anderen technischen Geräten und Methoden gewonnen wurde als in Hamburg, kommt es vor, dass Geräte gleicher Funktion oder gleiche Reagenzien anderer Hersteller aufgeführt werden.

## **2.2 Tötung und Gewebeentnahme**

Die Tötung der Tiere erfolgte im Alter von 14 Monaten (6 Tiere hatten ein Alter von 30 Monaten). Es wurde zu 4 Zeitpunkten Zeitgeber-Zeit (ZT) 0, 6, 12 und 18 (entspricht als Uhrzeit 06:00 Uhr, 12:00 Uhr, 18:00 Uhr und 00:00 Uhr) getötet, pro Zeitpunkt und Gruppe jeweils 5 Tiere. Die sechs 30-Monate alten Tiere wurden um ZT 6 (12:00 Uhr) getötet.

Die Tiere wurden in einem Exikator über Trockeneis in CO<sub>2</sub>-Atmosphäre betäubt und durch cervicale Dislokation getötet. Das austretende Blut wurde sofort aufgefangen und zur Serumgewinnung verwendet.

Folgende Organe wurden präpariert:

Gehirn, Leber, Milz, Niere, Lunge, Herz, Hoden, Skelettmuskel, Nebennieren, Schilddrüse, Augen, Penis, Nebenhoden und Bauchspeicheldrüse. Die Gewebe wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend bis zur RNA-Extraktion bei -80°C gelagert.

Zur Präparation des Hypothalamus wurden die Gehirne mit 5ml RNALater™ überschichtet, für 2h bei 4°C inkubiert, und mit einem Skalpell präpariert.

Von ventral wurde ein Saggitalschnitt durch das *Chiasma opticum* geführt. Ein weiterer Saggitalschnitt wurde ca. 3mm kaudal geführt und die entstehende Hirnscheibe auf die kaudale Seite gelegt. Die weitere Schnitfführung erfolgte wie dargestellt: Abb. 2.1

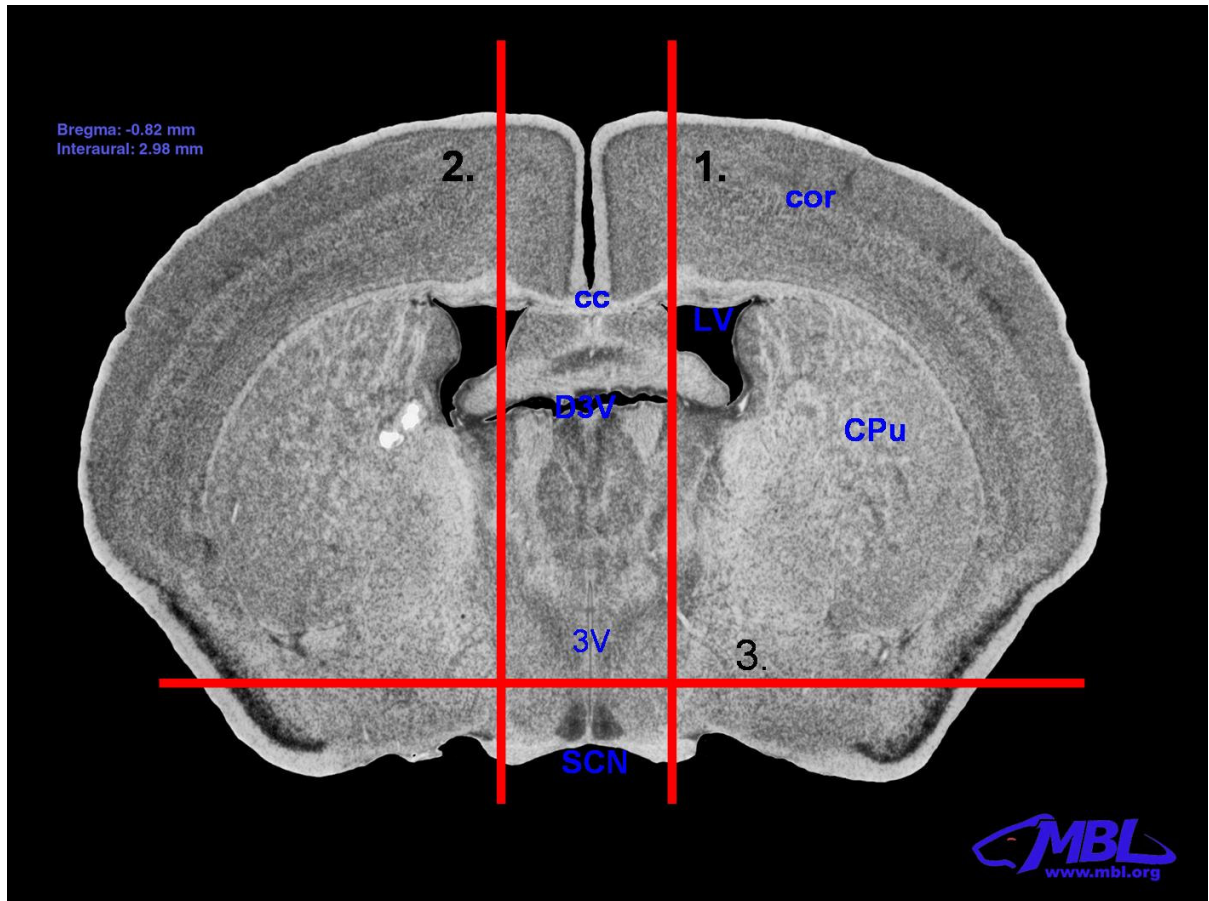


Abb. 2.1: Darstellung der Präparation des Hypothalamus aus der „Hirnscheibe“. Schnitte wie abgebildet 1 & 2 Saggital, 3 Horizontal. Bild verändert aus „Mouse Brain Library- [www.mbl.org](http://www.mbl.org)“ (SCN=Sprachiasmatische Nuclei, 3V= dritter Ventrikel, D3V= dorsaler Teil des dritten Ventrikels, cor=Cortex, CPu= Putamen, LV= laterale Ventrikel, cc=Corpus Callosum)

Das resultierende Hirnstück wurde zur Extraktion von RNA verwendet. Außerdem wurden bei der Präparation möglichst viel Cortexgewebe, das Cerebellum und die olfaktorischen Bulbi gewonnen und bei -80°C gelagert.

## 2.3 Material für die Aktivitätsaufzeichnung von Mäusen

Um die Bewegungen der Mäuse in ihren Käfigen zu erfassen, wurden auf 39 Käfige (Kanäle 0-38) passive IR-Bewegungsmelder von Conrad-Elektronik (Artikel-Nr.: 192236-3F)

montiert. Da die gleichzeitig erfassbaren Aktivitätssignale nicht für die gesamte Population an Versuchstieren ausreichen, wurden nach jeder Versuchsperiode unüberwachte Tiere innerhalb der Gruppen mit überwachten getauscht.

Die Erfassung der genauen Lichtschaltpunkte erfolgte mittels einer Fotodiode (Conrad – Elektronik, Best. Nr. 163988-3F) angeschlossen an Kanal 39. Die Bewegungen der Tiere wurden als TTL Signale erfasst und über eine digitale I/O-Karte (Modell PIO 24/48 II Best. Nr. 968072–22, Conrad Elektronik) in einen IBM 286 Computer geleitet. TTL Signale sind Spannungen zwischen 0 und 5 Volt. Von 0 bis 0.8 Volt wird das Signal als „0“ (keine Bewegung) erkannt, von 2.4 bis 5 Volt als „1“ (Bewegung). Nach jedem ausgelösten Bewegungssignal gab es eine Ruhezeit des Melders von 7 Sekunden, in der keine weiteren Signale aufgezeichnet werden konnten. Die Signale wurden jeweils für 6 Minuten-Intervalle gesammelt, bevor ein neues Aufzeichnungsintervall begann (also 240 Intervalle am Tag). Die Beleuchtung im Tierstall war zu Beginn des Versuchs von 06:00 Uhr bis 18:00 Uhr, wurde aber häufig experimentell variiert.

Um elektrostatische Störungen auszuschließen, wurden alle Verbindungen mit abgeschirmten Kabeln (Conrad–Elektronik, Best.Nr 606863-3F) ausgeführt und die Abschirmung an beiden Enden mit Masse verbunden.

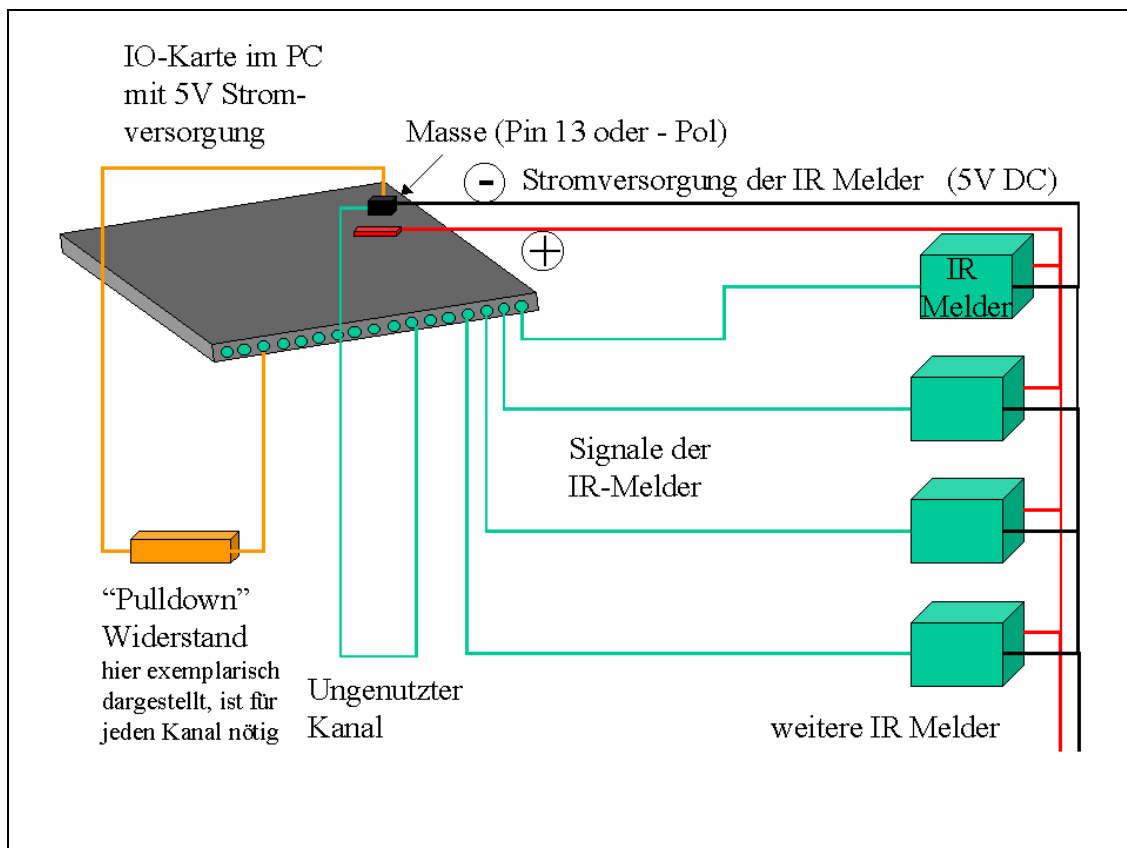


Abb. 2.2: Schematische Darstellung der Verkabelung von IR-Meldern mit der I/O-Karte.

Zur Aufzeichnung und zur grafischen Darstellung der Aktivitätsdaten wurde ein Quickbasic Computerprogramm verwendet (Autor: Haiko Dernbach, Tiermedizinische Hochschule Hannover).

In diesem Programm wurden für jede Messung Parameter wie Licht an/aus, Intervalldauer, Ruhezeit der Melder, Namen der einzelnen Kanäle (Tierkäfignummern) und Name des Experiments festgelegt. Ferner wurde mit diesem Programm die endogene Periode  $\tau$  der Tiere unter DD-Bedingungen bestimmt. Die primäre Datenaufzeichnung erfolgte auf einem 286er IBM PC, 500MB Festplatte, 32MB Arbeitsspeicher.

Die Daten wurden wöchentlich auf Diskette gespeichert und zur Bearbeitung auf einen Dell® Dimension 2400 PC, 2,2 GHz, 80 GB Festplatte, 256 MB Arbeitsspeicher, übertragen. Zur statistischen Evaluierung der Daten wurden die Rohdateien konvertiert und in Excel® importiert. Ein Teil der Exceldaten wurde mit GraphPad Prism® weiter statistisch bearbeitet.

## 2.4 Bakterienstämme

### *Escherichia coli* TOP10 One Shot™ (Invitrogen)

Genotyp: F' {*lacIq*, Tn10(Tetr)} *mcrA* (*mrr-hsdRMS-mcrBC*) ODF= M15 ODFX74 *deoR* *recA1* *araD139* (*ara-leu*)7697 *galU* *galK* *rpsL*(Str) *endA1* *nupG*

## 2.5 Verwendete PCR Oligonukleotide, *Primer*

Alle *Primer* wurden bei den Firmen MWG (Ebersberg) bzw. IDT (Coralville, USA) synthetisiert.

Alle *Primer* sind in 5' → 3'-Orientierung aufgeführt:

### 2.5.1 Standard Uhr-Gen-*Primer*

Cryptochrom 1 (mCry 1)

mCry1-FW 5' GAGGGCTGGATCCACCATTAG

mCry1-Rev 3' CTACAGCTCGGGACGTTCTCTC

Cryptochrom 2 (mCry2)

mCry2-FW 5' CCTTGGATTGACGCCATCATGAC

mCry2-Rev 3' GAGTCCTTGCTTGCTGGCTCTTG

### CLOCK (mClk) Spleissvariante delta 18

mClk-FW 5' GCGAGAACTTGGCATTGAAGAG  
mClk-Rev 3' CTGTGTCCACTCATTACACTCTG

### CLOCK (mClk) total CDS

CLOCK-total-F 5' AGCTGGGGTCTATGCTTCCT  
CLOCK-total-R 3' CTACTGTGGCTGGACCTTGG

### Period 2

mPer2-F 5' GAGGAGTACTACCAGCTGCTAA  
mPer2-R 3' ATTCTAGGCGCTTCATAGCCCGA

### Typ 2 Melatonin Rezeptor mMT2

mMT2 A-F 5' TACTGCTGCATCTGTCATAG  
mMT2-A-R 3' GCGCAAATCACTCGGTCTCA

mMT2-B-F 5' GGTCTGCAGTCACTGGTATA  
mMT2-B-R 3' CACAAACACTGCAAACATGG

mMT2\_3'UTR\_B 3' CCACTCTGCTCACTTCACAG

### hsMT2 (Hamster Melatonin Rezeptor Typ2)

hsMT2-A-F 5' TGTACTIONCCTTACCCACTCG  
hsMT2-A-R 3' AGACAATGGCGTTAAGGCAGC

### 2.5.2 Realtime PCR-Primer

#### Period 1 (Per1)

mPer1-LC-F 5' TCCCTGTTTCGTCCTCCACT  
mPer1-LC-R 3' CTTGAGCCATTGCTGTTTGC

Period 2 (Per2)	
mPer2F 5'	CGAGAGTGAGGAGAAAGGCAACAT
mPer2R 3'	TTCTTCCGAGCACCGTCTAATGTC
Cryptochrome 1 (Cry1)	
mCry1_F 5'	TCCCCTCCCCTTTCTCTTTA
mCry1_R 3'	TGAGTCATGATGGCGTCAAT
Cryptochrome 2 (mCry2)	
mCry2_F 5'	AAGCTGAATTCGCGTCTGTT
mCry2_R 3'	GTGGTTTCTGCCCATTCAGT
CLOCK	
mCLOCK-LC-F 5'	GGTTTGATCACAGCCCAACT
mCLOCK-LC-R 3'	CCTCCGCTGTGTCATCTTTT
mBMAL1	
mBMAL1_F 5'	CGAAGACAATGAGCCAGACA
mBMAL1_antis 3'	AAATAGCTGTGCGCCCTCTGA
Melatoninrezeptor Typ 1 (mMT1)	
mMT1_LC-F 5'	GGATATGGGTCCTGGTCCTT
mMT1_LC-R 3'	ACTAGCCACGAACAGCCACT
Melatoninrezeptor Typ 2 (mMT2)	
LCmMT2-F 5'	TTTATGGGCTCCTGAACCAG
LCmMT2-R 3'	CCCTGTGCTCCTCAGTAAG
Arginine-Vasopressin	
mAVP-FW 5'	CTTCCAGAACTGCCCAAGAG
mAVP-RV 3'	GGGCAGGTAGTTCTCCTCCT
D-Site-Albumin Binding Protein	
mDBP-FW 5'	CATTCCAGGCCATGAGACTT
mDBP-RV 3'	TGGCTGCTTCATTGTTCTTG

Cytochrome P450 type 2a4  
Cyp2a4 F-5' CCAGATATTGAGGCCAAGGTCCAT  
Cyp2a4 R-3' GCCTCCGTATAGGGCATCTTCATT

Cytochrome P450 type 3a11  
Cyp3a11 F 5' CTGGATTCTAAGCAGAAGCACCGA  
Cyp3a11 R 3' GTGATCTCCATGTCAGAAAGGGCT

*Fatty acid synthase*

mFasn F 5' GTGGCTATGATTATGGCCCTCAGT  
mFasn R 3' GTGTCCATGAAGGTCACCCAGTTA

*Solute carrier 21 a1*

Slc21a1 F 5' CTCCAGACACTGAACTTGCAGAGA  
Slc21a1 R 3' TCTCCATCGTTCTCGACCTTAGGA

### 2.5.3 *Primer* für Haushaltsgene

Ribosomal Protein s27

mRP27-F-5' CCAGGATAAGGAAGGAATTCCTCCTG  
mRP27-R-3' CCAGCACACATTCATCAGAAGG

Hypoxanthin-Phosphoribosyl-transferase

mHPRT-F 5' CTGGTGAAAAGGACCTCTCG  
mHPRT-R 3' TTGCGCTCATCTTAGGCTTT

### 2.5.4 Allgemeine *Primer*

Oligo-d(T) d(T)<sub>30</sub>  
T7 *Primer* 5' CGGGATATCACTCAGCATAATG  
SP6 *Primer* 5' ATTTAGGTGACACTATAGAA

## 2.6 Verwendete Vektoren

### pDRIVE™ (Qiagen)

Der pDRIVE -Vektor (3.8 kb) ist ein viel erprobtes System für die Klonierung von PCR-Produkten. Er ist durch die Addition von 3'-terminalen Uracilen an beiden Enden der Klonierungsstelle präpariert (ein modifizierter T-Vektor). Die effiziente Ligation von PCR-Produkten erfolgt über eine Anlagerung ihrer 3'-Deoxyadenosinreste an die U-Überhänge des Plasmides. Dieser Vektor hat einen f1 Replikationsursprung sowie T7- und SP6-RNA Polymerase-Promotoren, die die multiple Klonierungsstelle 5' und 3' flankieren. *Inserts* können mittels *EcoRI* herausgeschnitten werden.

Die Selektion geschieht über Ampicillin-Resistenz und die Unterbrechung der kodierenden Region für das  $\alpha$ -Peptid der  $\beta$ -Galactosidase („Blau-Weiß-Selektion“).

## 2.7 Isolierung von Gesamt-RNA

### Theorie:

Neben ribosomaler RNA existieren in den Zellen viele verschiedene *Messenger-RNAs* (*mRNAs*). Die mRNAs spiegeln den momentanen Zustand der Zelle wider, ihre Gesamtheit wird als „Transkriptom“ bezeichnet. Jedes Gewebe, wenn nicht sogar jede Zelle, hat ihr spezifisches Genexpressionsmuster in Form von mRNAs, je nachdem was ihre Funktion im Organismus ist. Die isolierte Gesamt-RNA ist Ausgangsmaterial für diverse molekularbiologische Methoden wie cDNA-Synthese, *Northern-Blot*, RNase Protection Assay (RPA), etc. RNAs sind sehr labil und werden bei Kontamination mit endo- oder exogenen RNAsen, die abundant sind, abgebaut. Um die RNA bei der cDNA-Synthese zu schützen, kann ein Ribonuklease-Inhibitor verwendet werden, der in den Reaktionsansatz hinzupipettiert wird.

### Material:

- RNA-Later™ (Ambion)
- Trizol™ (Invitrogen)
- Chloroform (Merck)
- Isopropanol (Merck)
- DEPC-Wasser
- UltraTurrax™ (Janke & Kunkel)

-Ethanol (Merck)

### **Methode:**

Die langfristige Lagerung der Gewebeteile erfolgte bei -80°C. Die Gehirne, die zur Bearbeitung in die USA geschickt wurden, waren zusätzlich in RNALater™ konserviert, nachdem sie in flüssigem Stickstoff schockgefroren wurden.

Die Isolierung von RNA erfolgte mit Hilfe einer Flüssig-Extraktionsmethode (Trizol™, Invitrogen), die eine Modifikation der Methode nach Chomczynski & Sacchi (1987) darstellt. 5 ml Trizol™-Lösung wurden zu je 50-100 mg Gewebe gegeben.

Die Gewebepreparate wurden in 15 ml Falcon-Tubes mit einem UltraTurrax™ homogenisiert.

Nach Zugabe von 1ml Chloroform (0,2ml Chloroform pro eingesetztem ml Trizol™) wurde die Suspension kräftig durch Schütteln gemischt und 3min bei Raumtemperatur inkubiert.

Es wurde anschließend für 30min in einer großen Eppendorf-Zentrifuge bei 4000Upm und 4°C zentrifugiert. Der Überstand (2-2,5ml) wurde in ein frisches Falcon-Tube überführt, mit 2,5ml Isopropanol versetzt und heftig geschüttelt.

Nach 10min Inkubation bei Raumtemperatur wurde für 1h bei 4000Upm und 4°C zentrifugiert. Das entstandene RNA-Präzipitat (*Pellet*) wurde einmal mit 2,5ml 75% Ethanol gewaschen (15 min, 4000Upm 4°C) und anschließend für 15min an der Luft getrocknet. Das getrocknete *Pellet* wurde dann in 100 µl DEPC-behandeltem Wasser resuspendiert.

## **2.8 Bestimmung der Integrität von RNA mit dem Agilent**

### **Bioanalyzer 2100™ und RNA 6000 Nano Chips**

#### **Theorie:**

Da die Qualität (Integrität) der RNA für alle folgenden molekularbiologischen Untersuchungen sehr wichtig ist, muss auf eventuelle Degradationen geprüft werden.

Eine gängige Methode ist eine denaturierende Gelelektrophorese mit Formamid und Formaldehyd-haltigem Agarosegel, bzw. Guanidinium-Isothiocyanat. Ich hatte für die Durchführung dieser Studie die Möglichkeit, eine Integritätsmessung mit einem modernen System, dem Agilent Bioanalyzer 2100 durchzuführen. Dieses System hat den Vorteil, dass nur sehr geringe Mengen (im Mikroliter Bereich) giftiger Substanzen verwendet werden, eine qualitative und quantitative Auswertung (in Form eines Elektropherogrammes) gemacht wird,

und dass die gesamte Analyse mit Vorbereitung in weniger als einer Stunde gemacht werden kann (also wesentlich schneller als eine denaturierende Gelelektrophorese).

Prinzipiell wird eine Kapillarelektrophorese in einem kompakten Chipsystem durchgeführt. Durch Färbung der RNA mit einem Fluoreszenzfarbstoff und Vergleich mit einem internen Standard kann die Größe der in der Probe vorhandenen RNAs (18s und 28s) und ihr Verhältnis zueinander bestimmt werden.

### **Material:**

- Agilent Bioanalyzer 2100
- RNA 600 Chips
- RNA 6000 Nano Reagents & Supplies

### **Methode:**

Es wurde je 1µl RNA untersucht. Der Chip wurde, wie im Herstellerprotokoll beschrieben, mit den Proben beladen und im Agilent Bioanalyzer 2100 untersucht. Die Integrität der Proben wurde mit einem Computer erfasst und zusätzlich zu Dokumentationszwecken ausgedruckt.

## **2.8.1 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren**

### **Theorie:**

Zusätzlich zur beschriebenen Integritätsmessung der RNA wurde die Konzentration spektrophotometrisch gemessen. Obwohl auch schon bei der Integritätsmessung eine Quantifizierung stattfand, wollte ich die ermittelten Konzentrationen mit einer alternativen Methode bestätigen, denn die Genauigkeit der für die folgenden Experimente verwendeten Menge an RNA war sehr wichtig. In der Regel wurden zwischen den Methoden Standardabweichungen von 10-20% festgestellt. Nukleinsäuren (DNA und RNA) absorbieren elektromagnetische Wellen im UV-Bereich. RNA, DNA und freie Nukleotide haben ein Absorptionsmaximum bei 260 nm, während die aromatischen Reste der Aminosäuren (z.B. Phenylalanin) bei 280 nm maximal absorbieren. Die Quotienten der Werte von 260 nm und 280 nm sind ein Maß für die Reinheit der Nukleinsäuren (DNA: 1.8-2.0; RNA: 2.0-2.2). Eine reine, doppelsträngige DNA-Lösung hat mit  $OD_{260}=1$  eine Konzentration von 50 µg/ml, eine einzelsträngige RNA-Lösung 40 µg/ml und eine Oligonukleotid-Lösung 33 µg/ml. Anstatt

die Messung in Wasser durchzuführen, wurde Phosphatpuffer ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , pH 7,0) verwendet, um möglichst reproduzierbare Ergebnisse zu erhalten (Mülhardt, 2000).

**Material:**

- Spektralphotometer (Eppendorff BioPhotometer)
- Phosphatpuffer 10mM pH 7,0

**Methode:**

5 $\mu\text{l}$  der in DEPC-Wasser gelösten RNA wurden mit 495 $\mu\text{l}$  10mM Phosphatpuffer 1:100 verdünnt. Nach Ermittlung des Leerwertes mit ausschließlich Phosphatpuffer wurde aus der Absorption bei  $\lambda_{260}$  und  $\lambda_{280}$  unter Berücksichtigung der Verdünnung die Konzentration und Reinheit der RNA bestimmt.

## 2.9 cDNA-Synthese

**Theorie:**

Für PCR- und viele *Microarray*-Anwendungen muss aus RNA eine cDNA hergestellt werden. Diese wird aus mRNA in Gegenwart von Desoxynukleotiden, dem entsprechenden Reaktionspuffer und durch das Enzym Reverse Transkriptase (RT) synthetisiert. Es müssen zusätzlich *Primer*-Moleküle vorliegen, an denen das Enzym mit der Synthese beginnt. Als Matrize dient die zuvor isolierte totale RNA (in dieser ist zu einem Teil mRNA vorhanden). Verwendeter *Primer* ist wahlweise ein Oligo-d(T)-*Primer* oder kurze Oligonukleotide variierender Sequenz (meist Hexamere). Ich verwendete einen Oligo-d(T) Primer. Den Vor- und Nachteil von der einen über die andere Methode habe ich an anderer Stelle untersucht (Resuehr&Spiess, 2003).

**Material:**

- SuperScript™ First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen)
- Oligo-d(T)-Primer (im Kit enthalten)
- 10 x Erststrang-Puffer(im Kit enthalten)
- 0.1 M DTT (im Kit enthalten)
- dNTP-Mix 10mM (im Kit enthalten)
- Superscript II Reverse Transkriptase (im Kit enthalten)

- RNase OUT (im Kit enthalten)

### **Methode:**

Je 2µg Gesamt-RNA wurden mit 1 µl Oligo-d(T)-*Primern* versetzt, mit DEPC-Wasser auf 9µl aufgefüllt, für 5 min auf 75°C erhitzt und dann bei Raumtemperatur 5min inkubiert. Folgende Reagenzien wurden hinzupipettiert:

Reagenz	Menge [µl]
10x RT Buffer	2
0,1M DTT	2
SS2	1
RNase Out	1
dNTPs 10mM	1
25mM MgCl	4

Der Reaktionsansatz wurde für eine Stunde bei 42°C im Wasserbad inkubiert, gefolgt von einer 15-minütigen Inaktivierung des Enzyms bei 75°C.

Abschliessend wurde der Ansatz durch Zugabe von 80µl DEPC-Wasser auf 100 µl aufgefüllt.

## **2.10 Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR)**

(Saiki et al., 1988)

### **Theorie:**

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ist eine Methode, um das Vorhandensein definierter Abschnitte von DNA-Molekülen (genomisch oder aus cDNA) *in vitro* zu prüfen und diese zu vervielfältigen. Die Startnukleotide (*Primer*) sind hierbei sequenzspezifisch für das zu amplifizierende Gen oder Transkript. Die Verlängerung der *Primer* erfolgt nach deren Hybridisierung mit dem komplementären DNA-Strang durch eine thermostabile DNA-Polymerase (z.B.: *Taq*<sup>TM</sup>-Polymerase). Dies geschieht bei 72°C, dem Wirkungsoptimum des Enzyms. Die Länge des DNA-Amplifikates wird durch die Position der 5'- und 3'-*Primer* bestimmt, es ist von ihnen flankiert. Die Syntheseprodukte hybridisieren nach jedem Elongationsschritt, gefolgt von einer Denaturierung bei 95°C wieder mit den *Primern*, sodass ein spezifischer DNA-Abschnitt durch Wiederholung des PCR-Vorgangs (Denaturierung, *Primer*-bindung und Elongation) sehr schnell exponentiell angereichert werden kann.

Mittlerweile sind die kommerziell erhältlichen DNA-Polymerasen mit ihren Puffern optimiert. Einige Parameter können aber die Qualität der PCR verbessern, z.B. die Modifikationen der Magnesium-Konzentrationen. Zweiwertige Magnesium-Ionen werden als Kofaktor benötigt. Deren Konzentration ist individuell vom DNA-Template abhängig und

kann variiert werden.

Am entscheidendsten ist die Anlagerungstemperatur der *Primer*. Die optimale Hybridisierungstemperatur ist von ihrer Länge und dem G/C-Gehalt abhängig.

Die Elongationszeit richtet sich nach der Länge der Amplifikate. Je länger das Amplifikat, desto mehr Zeit braucht die DNA-Polymerase für die Elongation. Die *Taq*-Polymerase ist in der Lage, etwa 1000 Nukleotide pro Minute einzubauen.

Heutzutage werden sogenannte *HotStart*-Polymerasen immer häufiger angeboten.

Diese haben den Vorteil, erst nach einer initialen Hitzeaktivierung ihre enzymatische Aktivität zu erlangen. Dadurch wird während des Vorbereitens der Reaktion keine unspezifische Synthese ausgeführt, was sonst zu unspezifischen Amplifikationen führen kann.

### **Material:**

-DNA Polymerase TaKaRa Ex Taq™ Hot Start Version (5U/μl)

-10x Taq-Puffer (TaKaRa)

-2,5mM dNTPs (TaKaRa)

-Robocycler (Stratagene)

-0,2ml Tube Strip (Stratagene)

-Cap Strip (Stratagene)

### **Methode:**

Alle PCR-Ansätze wurden in einem Volumen von 50 μl durchgeführt. Folgender Ansatz wurde in einem 0,2 ml Reaktionsgefäß eines Reaktionsgefäß-Streifens (0,2ml Tube Strip, Stratagene) zusammenpipettiert:

Anzahl der Reaktionen:	<b>1</b>		<b>n</b>
10x Reaktionspuffer	5	μl	x n μl
dNTP-Mix (10 2,5μM)	4	μl	x n μl
5'- <i>Primer</i> (10 μM)	1	μl	x n μl
3'- <i>Primer</i> (10 μM)	1	μl	x n μl
TaKaRa ExTaq (5U/μl)	0,2	μl	x n μl
cDNA-Template (Menge variiert)	x	μl	x n μl
<u>H<sub>2</sub>O</u>	x	μl	x n μl

Für multiple Ansätze werden die Reagenzien mit der Anzahl der durchzuführenden Reaktionen +2 (wegen Negativkontrolle Pipettierfehler) multipliziert.

Die Ansätze wurden in den auf 95°C vorgeheizten PCR-Block gestellt. Der *Robocycler* verfügt über einen beheizbaren Deckel, der das Übersichten der PCR Reaktion mit Mineralöl (um Evaporation zu vermeiden) unnötig macht. Die PCR wurde standardmäßig unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

1. 95°C 5 min (Hitzeaktivierung DNA-Polymerase, *Hot Start* )
2. 95°C 15s (Denaturierung)
3. 60°C 30s (*Primer-Hybridisierung*), je nach Primer variabel
4. 72°C 1 min (Elongation)
5. 95°C 2 min (finale Elongation)

Die PCR-Zyklen bestanden aus einer Wiederholung der Schritte 2-4 (35x).

Die Anlagerungstemperatur der Primer war individuell abhängig von der Schmelztemperatur. 5µl Aliquote der PCR-Produkte wurden auf ein 1-1,5%iges analytisches Agarosegel aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt.

### **2.10.1 Quantitative *Realtime-PCR* (LightCycler™, iCycler™)**

#### **Theorie:**

Die bisher beschriebene PCR-Methode ist nichtquantitativ, d.h. man kann keinen Rückschluss auf die Menge an amplifiziertem Transkript in der untersuchten Probe ziehen. Allerdings ist dies genau der zu untersuchende Faktor in dieser Arbeit. Es sollten die Genexpressionen von verschiedenen Proben, unterschiedlichen Zeitpunkten oder Behandlungen, untersucht werden. Der Verlauf einer PCR-Amplifizierung hat sigmoidalen Charakter, d.h. sie hat Sättigungsverhalten. Eine PCR verläuft meist nur innerhalb von 6-8 Zyklen exponentiell. Nur während dieses Bereichs kann eine quantitative Aussage getroffen werden.

Der Lightcycler™, der iCycler™ und alle anderen quantitativen PCR-Maschinen können die Menge der PCR-Produkte in Echtzeit (*real time*) bestimmen. Hierzu wird nach jedem Zyklus die Fluoreszenz des DNA-spezifischen Farbstoffs SybrGreen™ I gemessen.

Die Fluoreszenzintensität ist dabei proportional zur Menge an gebildeter dsDNA. Die

Quantifizierung wird anschließend mit der entsprechenden Software entweder relativ, d.h. über die Bestimmung des sog. *crossing points* (Anzahl der Zyklen, die zu einer Fluoreszenz mit 2 Standardabweichungen über dem Hintergrund führen) oder aber absolut über Standard-Eichkurven, durchgeführt. Als Standardkurve kann man entweder ein Plasmid benutzen, in das die entsprechende Zielsequenz kloniert ist, oder ein aufgereinigtes PCR-Produkt.

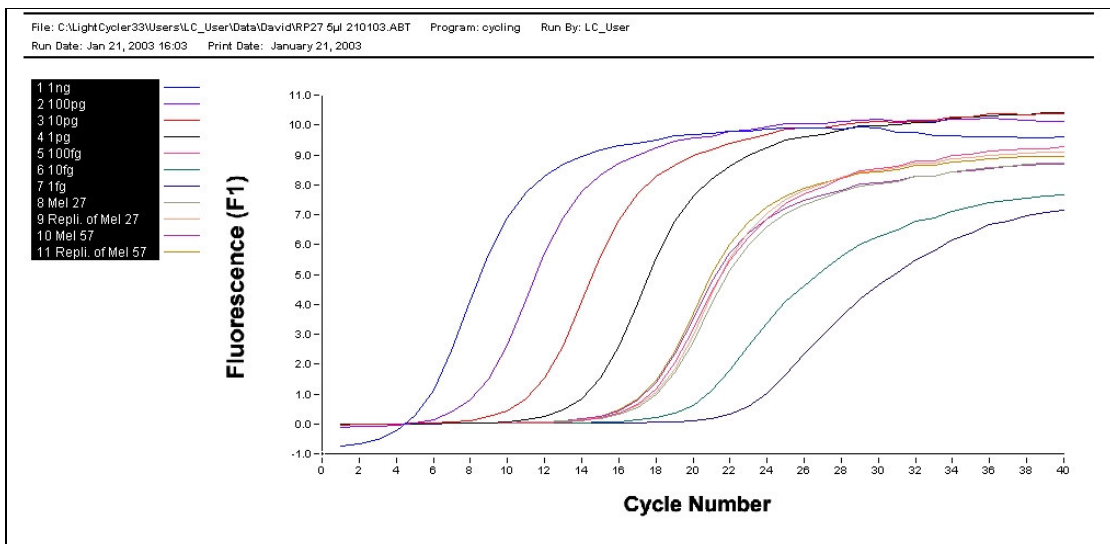
Wenn man ein Plasmid benutzt, kann man anhand der Größe des klonierten PCR-Produktes und des verwendeten Plasmides über die photometrische Bestimmung der Konzentration die Kopienzahl festlegen. Die Quantifizierung mittels Realtime-PCR erfolgt dann in Kopienzahl des zu untersuchenden Transkriptes.

Ich habe für jede *Primer*-Kombination ein PCR-Produkt benutzt und als Verdünnungsreihe in 1:10 Schritten als Standard-Eichkurve gemessen, die Quantifizierung erfolgte in ng/PCR-Reaktion.

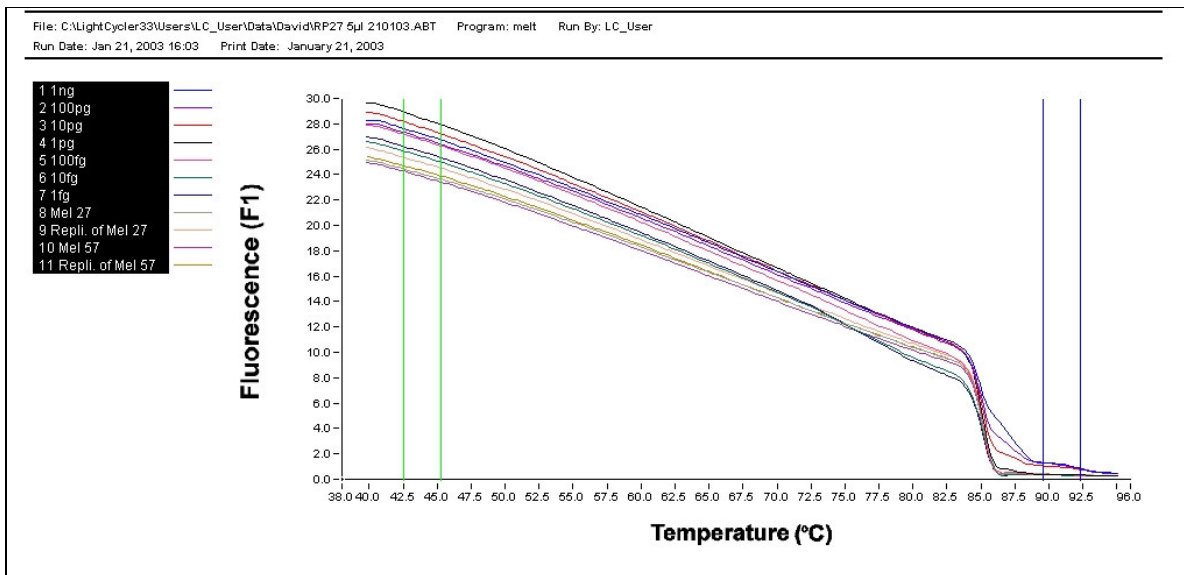
Am Ende einer jeden quantitativen PCR-Reaktion ist es angeraten, eine Schmelzkurve durchzuführen. Hierbei wird der Reaktionsansatz am Ende der PCR auf 40°C abgekühlt, sodass alle PCR-Produkte als doppelsträngige DNA vorliegen (und maximale Fluoreszenz emittieren). Anschliessend wird die Temperatur in Inkrementen bis 95°C erhöht (während die emittierte Fluoreszenz permanent gemessen wird). Hierbei trennen sich bei einer für die Größe und Zusammensetzung des jeweiligen PCR-Produktes charakteristischen Temperatur die DNA-Doppelstränge und entlassen den Fluoreszenzfarbstoff.

Die Folge ist ein beinahe schlagartiges Absinken der gemessenen Fluoreszenz – genannt der Schmelzpunkt. Stringente PCRs haben nur einen Schmelzpunkt, d.h. ein PCR-Produkt.

Eine gelelektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte ermöglicht es dann zusätzlich zu prüfen, ob die antizipierte Größe des PCR-Produktes stimmt.



**Abb. 2.3:** Darstellung des Amplifikationsverlaufes einer Standardkurve und Proben, wie beschrieben, am LightCycler™ hergestellt. Es wurden 7 Verdünnungen eines PCR-Produktes benutzt, von 1ng/Ansatz bis 1fg/Ansatz. Es wurden zwei Proben in Duplikaten gemessen.



**Abb. 2.4:** Darstellung einer Schmelzkurve der zuvor gezeigten PCR-Produkte. Alle Produkte schmelzen bei derselben Temperatur, es wurde also ein Amplifikat gebildet.

### Material:

#### Hamburg:

- Lightcycler™ Instrument (Roche)
- Lightcycler™ Kapillaren (Roche)
- Lightcycler™ Software 3.0 (Roche)
- QIAGEN SYBR Green® oder BioRad Quantitect SYBR Green® Mix
- Kapillar-Kühlblock (Roche)

Tallahassee, USA:

-BIORAD iCycler™ Instrument

-BIORAD- iCycler Software™

-IQ™ BIO-RAD SYBR Green Supermix

-QuantiTect™ SYBR® Green PCR Kit (Qiagen)

-PCR Plates, 96 Well, Kat.Nr. 2239441, BIO-RAD iCycler™

## Method:

Reaktionsansatz: Lightcycler™ Roche und Qiagen Reagenzien

Anzahl der Reaktionen:	<b>1</b>		<b>n</b>
2x Quantitect Mix	12,5	µl	x n µl
5'-Primer (10 µM)	1	µl	x n µl
3'-Primer (10 µM)	1	µl	x n µl
cDNA-Template (Menge variiert)	x	µl	x n µl
<u>H<sub>2</sub>O</u>	<u>x</u>	<u>µl</u>	<u>x n µl</u>
Σ	25	µl	

Standard-Thermoprofil der PCR im Lightcycler:

1x	95°C 15 min (Hitzeaktivierung DNA-Polymerase, <i>Hot Start</i> )
40x	{ 95°C 15 s
	{ 60°C 30 s (die <i>annealing</i> - Temperatur ist <i>Primerspezifisch</i> )
	{ 72°C 60 s
1x	Schmelzkurve

Nach der PCR wurde der Ansatz zur gelelektrophoretischen Analyse aus den Kapillaren (bei 2000g, 1min) in ein Eppendorf-Gefäß zentrifugiert und auf einem Agarose-Gel aufgetrennt.

Reaktionsansatz: iCycler™ und IQ™ BIO-RAD SYBR Green Supermix

Anzahl der Reaktionen:	<b>1</b>		<b>n</b>
2x iQ Supermix	12,5	µl	x n µl
5'-Primer (10 µM)	1	µl	x n µl
3'-Primer (10 µM)	1	µl	x n µl
cDNA-Template (Menge variiert)	x	µl	x n µl
<u>H<sub>2</sub>O</u>	<u>x</u>	<u>µl</u>	<u>x n µl</u>
Σ	25	µl	

Standard-Thermoprofil der PCR im iCycler™:

1x 95°C 5 min (Hitzeaktivierung DNA-Polymerase, *Hot Start*)  
40x { 95°C 15 s  
60°C 30 s (die *annealing*- Temperatur ist *Primerspezifisch*)  
72°C 30 s  
1x Schmelzkurve

Nach der PCR im iCycler™ konnten die Produkte aus der Mikrotiterplatte (96er Format) zur gelelektrophoretischen Analyse weiterverwendet werden.

## 2.11 DNA-Auftrennung mittels Agarose-Gelelektrophorese

### Theorie:

Die Agarose-Gelelektrophorese ist die einfachste und effektivste Methode, DNA-Fragmente von 0,5-25 kb Länge und RNA voneinander zu trennen und zu identifizieren. Sie basiert auf der Wanderung der DNA im elektrischen Feld (aufgrund der negativen Ladung) durch ein Agarosegel zur Anode. Abhängig von der Größe der DNA wandern die Moleküle unterschiedlich schnell und werden so im Gel aufgetrennt. Diese Technik wird sowohl zur Identifizierung von DNA-Fragmenten (analytisch) als auch zur Isolierung der DNA (präparativ) eingesetzt. Insbesondere wenn es mehrere Banden im Agarosegel gibt, ist die präparative Nutzung wertvoll. Die Nukleinsäuren werden durch den interkalierenden Farbstoff Ethidiumbromid (EtBr) im Gel unter UV-Licht sichtbar gemacht.

### Material:

- 10x TBE
- 50x TAE
- 6x Ladebuffer (Fermentas bzw. Promega)
- Ethidiumbromid (10 mg/ml in Wasser; Roth, Fischer)
- DNA-Längenstandards: GeneRuler™ 100bp DNA Ladder Plus (Fermentas)  
Smartladder™ (Eurogentec)
- Agarose „*Elektrophoresis Grade*“ (Gibco BRL, Fischer)
- Elektrophoresekammer und Zubehör (Biorad, MWG Biotech)

### Methode:

Je nach antizipierter Fragmentgröße (150 bp-2,4kb) wurden 1-2%ige Agarosegele hergestellt.

Es wurden für 1%ige Gele 1g Agarose in 100ml 1x TBE (analytisch) oder 1x TAE (präparativ) in einem Mikrowellenherd erhitzt, abgekühlt und mit Ethidiumbromid (10 µg/100 ml Gelvolumen) vermischt. Das Gel wurde in einen Gelträger gegossen, der Kamm eingesetzt und bei Raumtemperatur polymerisieren lassen (etwa 20min). Die zu untersuchenden PCR-Produkte wurden mit 1/6 Volumen des Ladepuffers (6x) versehen und bei 100-120V aufgetrennt. Zur Ermittlung der Fragmentlängen wurden geeignete Längenstandards parallel aufgetragen. Unter UV-Licht wurden die DNA-Fragmente sichtbar gemacht, fotografiert und digital gespeichert.

## **2.12 Reinigung von DNA-Fragmenten aus einer PCR-Reaktion**

### **Theorie:**

Um PCR Produkte für weitere Anwendungen (wie Klonierung oder Sequenzierung) verwenden zu können, müssen diese aufgereinigt werden. Hierbei werden unverbrauchte dNTPs, Primer und Enzyme aus der Reaktion entfernt. Eine schnelle, zuverlässige Methode ist das Benutzen des Qiagen PCR-Purifikation Kit, welches mit Zentrifugensäulchen operiert. Hierbei wird die DNA an eine Silikamembran gebunden, gewaschen und danach sauber in Wasser oder einem Nidrigsalzpuffer eluiert.

### **Material:**

- QIAquick® PCR Purification Kit (Qiagen)

### **Methode:**

Zu 50µl PCR-Produkt wurden 250µl Puffer PB gegeben und gemischt. Die Probe wurde auf ein Qiaquick-Säulchen (in einem 2ml Sammelgefäß) geladen und 1min bei 14.000 Upm zentrifugiert.

Nach Verwerfen des Durchflusses wurde mit 750µl Puffer PE gewaschen (1min bei 14.000 Upm, Durchfluss verworfen). Anschließend wurde die DNA in einem frischen 1,5ml Mikrozentrifugenröhrchen in 50µl RNase-freiem Wasser eluiert und dessen Konzentration photometrisch bestimmt. Die Lagerung erfolgte bis zur Verwendung bei -20°C.

## 2.13 Reinigung von DNA-Fragmenten aus dem Gel

### Theorie:

Wenn es bei einer PCR dazu kommt, dass mehrerer Produkte amplifiziert und sequenziert werden sollen, müssen diese getrennt werden. Hierzu ist es notwendig, die DNA-Fragmente unterschiedlicher Größe aus dem Agarosegel zu isolieren.

Im Anschluss an eine Gelelektrophorese (vorzugsweise in TAE-Puffer, weil das Borat im TBE-Puffer mit den meisten Reinigungsmethoden interferiert) wird das Gel auf einen UV-Tisch gelegt und die DNA-Banden von Interesse mit einem sterilen Skalpell oder einem anderen geeigneten Gegenstand ausgeschnitten. Nun kann das Gel aufgelöst und die DNA unter Hochsalzbedingungen an eine Silica-Matrix gebunden werden. Agarose-Reste werden gewaschen, und mit einem Niedrigsalzpuffer (TE) oder Wasser wird die DNA von der Matrix eluiert.

### Material:

-QIAquick Gel Extraction Kit (50) Kat Nr. 28704

-Heizblock (Fisher)

-Eppendorf Tischzentrifuge

### Methode:

Die ausgeschnittenen DNA-Banden wurden gewogen, mit 2 Vol. (200µl/100mg Gel) des Diffusionspuffers versetzt und für 30min bei 50°C im Heizblock inkubiert. Es wurde 1min bei 14.000Upm zentrifugiert und der Überstand in ein frisches Mikrozentrifugenröhrchen überführt.

Der Überstand wurde mit 3 Vol. des Puffers QG versetzt, gemischt und auf ein Zentrifugensäulchen pipettiert.

Nach 1min Zentrifugation bei 14.000Upm und Verwerfen des Überstandes wurde mit 750µl Puffer PE gewaschen. Das Zentrifugensäulchen wurde zum Trocknen erneut 1min bei 14.000Upm zentrifugiert. Die DNA wurde in ein frisches Mikrozentrifugenröhrchen mit 50µl RNase-freiem Wasser eluiert und dessen Konzentration photometrisch bestimmt.

Die Lagerung erfolgte bis zur Verwendung bei -20°C.

## 2.14 Ligation von DNA in einen bakteriellen Vektor

### Theorie:

Um DNA-Fragmente durch Bakterien zu vermehren, können diese in Plasmide kloniert werden, die mit dem exponentiellen Wachstum der Bakterienzellen vervielfältigt werden. Mit dieser Methode können binnen kurzer Zeit (über Nacht) sehr viele Kopien eines gewünschten DNA-Fragmentes hergestellt werden – mehr als in einer PCR. Dies ist für einige Anwendungen wie z.B. das Herstellen von Sonden notwendig. Das Verknüpfen von DNA-Fragmenten mit dem Enzym DNA-Ligase versteht man als Ligation. DNAs mit komplementären einzelsträngigen Enden können über diese eine Basenpaarung eingehen. Sie werden deshalb als kohäsiv oder klebrig (*sticky ends*) bezeichnet. Über diese Enden können DNAs durch die DNA-Ligase fest verbunden werden. Die DNA-Ligase katalysiert die Bildung neuer Phosphodiesterbrücken. Eine Eigenschaft der *Taq*-Polymerase ist es, an die 5'-Enden der PCR-Produkte ein zusätzliches Adenin-Nukleotid anzuhängen. Bringt man ein solches Produkt in Anwesenheit einer Ligase mit einem geeigneten Vektor mit T-Überhang (bei pDRIVE™ ein U-Überhang), wird das Fragment in den Vektor ligiert. DNA-Ligationen haben *in vivo* eine wichtige Bedeutung bei der DNA-Replikation und -Reparatur. *In vitro* werden verschiedene DNA-Fragmente durch die Ligation zu größeren Molekülen verknüpft. Die T4-DNA-Ligase ligiert sowohl überlappende Enden (*sticky ends*) als auch glatte Enden (*blunt ends*). Der Vektor ist vor der Klonierung linear, durch das Einsetzen eines DNA-Fragmentes wird er rezirkularisiert.

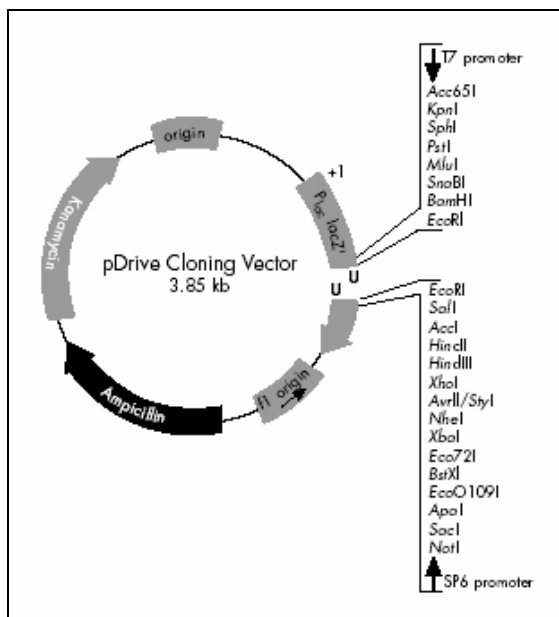


Abb.2.5: pDrive™ Vektor. Aus Qiagen Handbuch

Nach Transformation und Kultur von Bakterien mit dem Plasmid kann die vervielfältigte DNA durch Präparation gewonnen und durch Verdau mit einer Restriktionsendonuklease (z.B. EcoRI) analysiert werden. Danach ist die klonierte, vervielfältigte DNA für den nächsten geplanten Versuch bereit.

### **Material:**

- PCR Cloning Kit (Qiagen)
- gereinigte dsDNA, PCR Produkt oder Gelextrakte
- SOC Medium

### **Methode:**

Das zu klonierende DNA-Fragment wurde wie beschrieben gereinigt und dessen Konzentration photometrisch bestimmt. Die folgenden Komponenten wurden in einem 0,5ml Reaktionsgefäß vereinigt. Die zu klonierende DNA wurde im 5-10 Fachen molaren Überschuss zum Vektor verwendet.

Die Ligationen wurden in einem 10 µl Reaktionsansatz durchgeführt:

pDRIVE-DNA (10 ng/µl)	1	µl
PCR-DNA	1-4	µl
Ligation-Master-Mix (2x)	2	µl
<u>H<sub>2</sub>O</u>	<u>variabel</u>	<u>µl</u>
Σ	10	µl

Die Reaktionen wurden für 2 Stunden bei 4°C im Kühlschrank inkubiert.

Im Anschluss an die Ligation wird eine Transformation kompetenter Bakterien durchgeführt.

## **2.15 Transformation und Ausplattieren der Bakterien**

### **Theorie:**

Bei der Transformation handelt es sich um die Einführung fremder Plasmid-DNA in Bakterienzellen.

Diese zentrale Technik in der Molekularbiologie wird immer dann eingesetzt, wenn von einer bestimmten DNA größere Mengen benötigt werden. Aufgrund der Eigenschaften des Plasmides werden in den Wirtszellen viele Kopien davon hergestellt. Erfolgreich transformierte Bakterien können aufgrund einer Antibiotika-Resistenz selektioniert werden, die ihnen über das Plasmid vermittelt wird.

### **Material:**

- Kompetente Zellen (Top 10, Invitrogen)
- LB-Medium
- LB-Antibiotikum-Platten (mit 100 µg Ampicillin/ml Agar)
- Brutschrank (Heraeus)
- Schüttelinkubator (Heraeus)
- Ampicillin (100 mg/ml; Sigma)
- 0.5 M IPTG (Sigma)
- 10% (w/v) X-Gal (Sigma) in DMSO
- 0.5 M β-Mercaptoethanol (Invitrogen)

### **Methode:**

Die kompetenten Top 10<sup>TM</sup> Zellen (100 µl Aliquote) wurden auf Eis aufgetaut und sofort mit 0.5 µl β-Mercaptoethanol gemischt. Jeweils 2-5 µl der Ligationsansätze wurden vorsichtig zu den Zellen pipettiert und vermischt. Es wurde 30min auf Eis inkubiert. Dann folgte ein Hitzeschock von 45 sec bei 42°C, woraufhin die Zellen für 1-2 min abgekühlt wurden. Nach Zugabe von 250 µl SOC-Medium wurde für 1 h bei 37°C und 225 Upm im Schüttelinkubator inkubiert, um die vorliegende Antibiotika-Resistenz zu exprimieren. Währenddessen wurden auf LB-Amp-Platten je 40µl IPTG-Stocklösung (100mM) und 40µl X-Gal Stocklösung (40mg/ml) ausgestrichen und die Platten für 30min bei 37°C inkubiert.

Anschließend wurden 30 bzw. 70µl des Reaktionsansatzes auf einer LB-Amp-Platte ausgestrichen. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 37°C.

Am nächsten Tag wurden die rekombinanten Klone (weiße Kolonien) mit einer sterilen Pipettenspitze aufgenommen und in ein 15ml-Falcon-Röhrchen mit 5 ml LB-Flüssigmedium mit Ampicillin (100 µg/ml) überführt. Es wurde über Nacht bei 37°C, 225 rpm im Schüttelinkubator inkubiert.

## 2.16. Plasmid-Minipräparation

### Theorie:

Die meisten Plasmidpräparationen sind Modifikationen des klassischen Protokolls von Birnboim et al. (1979). Es wird eine Alkali-Lyse der Bakterien durchgeführt, gefolgt von einer Präzipitation von Zelltrümmern und chromosomaler DNA. Anschließend wird die Plasmid-DNA säulen-chromatographisch gereinigt.

### Material:

- Transformierte Bakterienkulturen
- QIAprep™ Spin Miniprep- Kit (Qiagen)

### Methode:

Die Bakterienkultur wurde 10min bei 4.000Upm zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde das Bakterienpräzipitat (*Pellet*) in 250µl Puffer P1 resuspendiert und in ein Mikrozentrifugenröhrchen überführt. Es wurden 250µl Puffer P2 hinzugefügt und durch Invertieren gemischt. Dann wurden 350µl Puffer N3 hinzugefügt, gemischt und 10min bei 14.000Upm zentrifugiert. Der Überstand wurde auf ein QiaPrep™ Zentrifugensäulchen überführt und für 1min zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen, danach wurde die gebundene Plasmid-DNA auf der Säule mit 750µl Puffer PE gewaschen (1min bei 14000Upm zentrifugiert). Der Durchfluss wurde verworfen und es wurde ein weiteres Mal, um die Membran zu trocknen, 1min bei 14000Upm zentrifugiert. Zur Elution der Plasmid-DNA wurden 50µl DEPC-Wasser auf die Membran pipettiert und für 1min bei 14000Upm zentrifugiert. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte photometrisch.

## 2.17 Restriktionsverdau von DNA

### Theorie:

Restriktionsenzyme sind bakterielle Endonukleasen, die spezifische Muster (Sequenzen) auf einem doppelsträngigen DNA-Molekül erkennen und die DNA an dieser Stelle spalten.

Die meisten Restriktionsendonukleasen vom Typ II erkennen Tetra-, Penta- oder Hexanukleotidsequenzen. Durch die hydrolytische Spaltung der beiden DNA-Stränge entstehen entweder glatte Enden (*blunt ends*) oder versetzte 5'- bzw. 3'-überstehende Enden (*sticky ends*). Das 5'-Ende der DNA trägt dabei immer eine Phosphatgruppe, das 3'-Ende eine Hydroxylgruppe. Die durch Restriktion entstandenen DNA-Fragmente können für eine Ligation und zur Herstellung einer Sonde verwendet werden.

**Material:**

- EcoRI (New England Biolabs)
- Wasserbad (Heraeus)

**Methode:**

Es wurden entweder *Insert*-tragende Plasmide, dsDNA-Fragmente oder genomische DNA wie folgt eingesetzt:

	<b>Verdau</b>	
DNA	ca. 500	ng
H <sub>2</sub> O	variabel	µl
10x Puffer	1	µl
<u>EcoRI (10 U/µl)</u>	<u>1</u>	<u>µl</u>
Σ	10	µl

Die Restriktionsverdaue wurden für 1 h bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Anschliessend wurden 5µl des Ansatzes gelelektrophoretisch analysiert.

## **2.18 DNA-Sequenzierung**

**Theorie:**

Das in dieser Studie verwendete Verfahren ist eine Variation des ursprünglichen Sequenzierverfahrens von Sanger (1977). Anstatt Radioaktivität wird jedoch Fluoreszenz verwendet. Zuerst werden DNA-Fragmente der Matrize in einer PCR hergestellt.

Das Ausgangsmaterial kann in Form doppelsträngiger Plasmid-DNA, eines PCR-Produktes oder genomischer DNA vorliegen.

Die DNA-Stränge werden vor der eigentlichen Sequenzreaktion denaturiert und es wird eine PCR mit nur einem *Primer* (sequenzspezifisch für das PCR-Produkt), dNTPs und fluoreszenzmarkierten ddNTPs gemacht. Die Verwendung von dNTPs und ddNTPs hat zur Folge, dass nach Einbau eines ddNTP ein Kettenabbruch erfolgt. Das fluoreszenzmarkierte Nukleotid ist hierbei endständig und kann durch Laseranregung detektiert werden. In den meisten Vektoren befinden sich beidseitig, die *multiple cloning site* (MCS) flankierend, Promotorsequenzen an denen gängige *Primer*, z.B. T7 und SP6 binden können. Beim Sequenzieren von *insert* tragenden Plasmiden wird also auch ein wenig vom Plasmid sequenziert. Für eine Sequenzierung aus 5'- und 3'- Richtung, müssen dementsprechend je zwei Reaktionen mit 5'- und 3'-*Primern* angesetzt werden.

Die fluoreszenzmarkierten DNA-Fragmente werden in einem Acrylamidgel (im ABI PRISM 377 DNA Sequencer) elektrophoretisch aufgetrennt, wobei die Fluoreszenz von einem Detektor gemessen wird.

Im elektrischen Feld wandern der Größe entsprechend die unterschiedlich fluoreszierenden DNA-Fragmente (mit endständigem ddATP\*, ddTTP\*, ddGTP\* oder ddCTP\*) durch das Gel und werden durch Laseranregung detektiert. Der Reihe nach dargestellt ergibt dies die komplementäre Sequenz des Matrizenstranges.

### **Material:**

- ABI PRISM Big Dye™ Terminators v3.0 Cycle Sequence Kit (Applied Biosystems)
- Robocycler (Stratagene)
- ABI PRISM 377 DNA Sequencer
- gereinigtes PCR-Produkt oder Plasmid

### **Methode:**

#### *Sequenzreaktion*

Es wurden 500-1000ng Plasmid-DNA bzw. 50-100ng/100bp gereinigtes PCR-Produkt als Matrize benutzt und mit folgenden Reagenzien in einem 0,2ml Eppendorf-Gefäß gut durchmischt:

- 1,5µl genspezifischer *Primer* (bei Plasmid T7- bzw. Sp6-Primer) 10pmol/µl
- 2µl Big Dye Mix
- 6µl 6x Puffer
- add. dest. Wasser bis zum Endvolumen von 20µl

Thermoprofil im *Robocycler*<sup>TM</sup>

95°C	10 s	}	: 25 Zyklen
50°C	5 s		
60°C	4 min		

Zu dem PCR-Produkt wurden 2µl 3M NatriumAcetat pH 5,2 und 50µl 96% Ethanol gegeben. Es wird für mindestens 30min bei -20°C inkubiert (bei Bedarf auch über Nacht).

Anschließend wird für 30min bei 4°C und 14.000Upm zentrifugiert. Das resultierende Präzipitat wird zweimal mit 70% Ethanol gewaschen und für 15min an der Luft getrocknet.

Das Sequenzieren erfolgte mit Hilfe eines ABI PRISM 377 DNA Sequencer (Applied Biosystems) im Zentralen Service Labor des Institutes für Zellbiochemie und Klinische Neurologie des Universitätsklinikums Hamburg Eppendorf gemacht.

## **2.19 Herstellung fluoreszenzmarkierter cDNA-Sonden für eine *Microarray*-Hybridisierung.**

### **2.19.1 Synthese Aminoallyl-modifizierter cDNA**

#### **Theorie:**

Als Sonden bezeichnet man spezifische, einzelsträngige DNA- oder RNA-Moleküle, die eingesetzt werden, um eine bestimmte Population von DNA- oder RNA-Molekülen mit komplementärem Strang in *Microarrays*, verschiedenen *Blot*-Typen oder Gewebeschnitten (*in situ*) nachzuweisen. Diese Sonden werden fluoreszenz-, radioaktiv oder nicht-radioaktiv (durch einen ausfallenden Farbstoff wie NBT und BZIP) markiert und werden z.B. in *Microarrays*, *Northern-Blot*-, *Southern-Blot*- oder *in situ*-Hybridisierungen eingesetzt.

In dem von mir verwendeten Verfahren wird zuerst für jede Probenpopulation (bis zu 4 in einem Experiment) ein cDNA-Strang synthetisiert in den Aminoallyl-markierte Nukleotide eingebaut werden. Dieser Einbau erfolgt in allen Proben gleich (sofern die Matrizen-RNA dieselbe Qualität hat) – es gibt also im Gegensatz zum direkten Einbau eines fluoreszenzmarkierten Nukleotides keinen Einfluss auf die Ausbeute an fluoreszierender Sonde. Der Fluoreszenzfarbstoff (vorliegend als Carboxylsäure-Succinimidylester) wird in einer zweiten Reaktion, chemisch an die Aminoallyl-modifizierten Nukleotide gekoppelt. Diese Markierungsmethode ist wesentlich besser als eine direkte Markierung, denn die Fluoreszenzfarbstoffe (z.B. Cy 3 und Cy 5) haben eine unterschiedliche Molekülgröße, welche zu erheblichen Diskrepanzen in der Markierungseffizienz führen kann.

In dieser Arbeit wurden immer vier Proben mit unterschiedlichen Fluorophoren zeitgleich markiert, um die vier Zeitpunkte des Tages oder ggf. andere experimentelle Fragestellungen zu untersuchen.

### **Material:**

- SuperScript™ Indirect cDNA Labeling Core Kit (Invitrogen™)
- Ca. 20µg Total RNA (guter Integrität) pro zu untersuchender Probe
- Oligo(dT)<sub>20</sub> Primer (im Kit enthalten)
- 10-mM dNTP mix, incl. Amino-modifizierten Nukleotiden (im Kit enthalten)
- 5X Erst-Strang Puffer (im Kit enthalten)
- 0,1 M DTT (im Kit enthalten)
- RNaseOUT™ (im Kit enthalten)
- SuperScript™ III Reverse Transkriptase (im Kit enthalten)
- DEPC behandeltes Wasser (im Kit enthalten)
- 1 N NaOH
- 1N HCl
- 3 M Natrium Acetat pH 5,2
- Wasserbad oder Inkubator auf 46°C und 70°C gestellt
- Eis
- 0,5-ml RNase-freie Reaktionsgefäße

## Methode:

Die RNA wird durch Ethanol-Natriumacetat-Fällung präzipitiert, gewaschen und an der Luft bei RT getrocknet.

Auf die getrocknete RNA im 1,5ml Reaktionsgefäß werden folgende Reagenzien pipettiert:

- 16µl DEPC behandeltes Wasser
- 2µl Oligo(dT)<sub>20</sub> Primer

Das Reaktionsgefäß wird für 5 min bei 70°C inkubiert, anschließend für mindestens 1 min auf Eis gestellt.

Folgende Reagenzien werden in das Reaktionsgefäß pipettiert:

Reagenz	Menge µl
- 5X Erst-Strang Puffer	6
- 0,1 M DTT	1,5
- 10-mM dNTP mix	1,5
- RNaseOUT™ (40U/µl)	1
- SuperScript™ III (400U/µl)	2

Endvolumen 30µl

Der Inhalt des Reaktionsgefäßes wird durch auf- und abpipettieren gemischt und für 2 Stunden bei 46°C Inkubiert.

## Hydrolyse und Neutralisation:

- Es werden 15µl 1 N NaOH in das Reaktionsgefäß pipettiert und für 10 min bei 70°C inkubiert
- 15µl 1 N HCl werden hinzugefügt, um den pH-Wert zu neutralisieren
- 20µl 3 M Natriumacetat (pH 5,2) werden hinzugefügt

## Reinigung der Aminoallyl-modifizierten cDNA

### Theorie:

Nach der Synthese der Aminoallyl-modifizierten cDNA müssen nicht-inkorporierte dNTPs und hydrolysierte RNA aus der Reaktion entfernt werden, da sie in den folgenden Schritten störend wirken. Hierzu werden S.N.A.P.<sup>TM</sup> Säulchen verwendet, auf deren Membran die cDNA gebunden wird, während alle störenden Anteile in den Durchfluss gehen.

### Material:

- cDNA Labeling Purification Module (Invitrogen<sup>TM</sup>)
- Aminoallyl- modifizierte cDNA
- Ethanol 96% -20°C
- Ethanol 75% -20°C
- Isopropanol
- DEPC behandeltes Wasser
- Mikrozentrifuge
- 1,5ml Reaktionsgefäß (im Kit enthalten)
- 3 M Natrium Acetat pH 5,2 (im Kit enthalten)
- Glykogen 20mg/ml (im Kit enthalten)

### Methode:

1. Probe mit 500µl Ladepuffer (mit Isopropanol) versetzen und durch Vortexen mischen.
2. Probe auf S.N.A.P.<sup>TM</sup>-Säule laden und 1min bei 14.000g zentrifugieren –Durchfluß verwerfen (die cDNA ist nun an der Membran der Säule gebunden).
3. 700µl Waschpuffer (mit Ethanol) auf Säule pipettieren und 1min bei 14.000g zentrifugieren – Durchfluß verwerfen
4. Waschvorgang (3.) wiederholen, Durchfluß verwerfen.
5. Säule zum Trocknen 1min bei 14.000g zentrifugieren (dies entfernt alle Ethanolreste, die bei der darauffolgenden Elution stören) – Durchfluß verwerfen.
6. 50µl DEPC-behandeltes Wasser auf die Säule (mit gebundener, gereinigter cDNA) pipettieren und 1min bei RT inkubieren, dann 1min bei 14.000g zentrifugieren

7. Elution mit weiteren 50µl DEPC-behandeltem Wasser wiederholen
8. Eluat (100µl) mit 10µl 3 M Natrium Acetat pH 5,2, 2µl Glykogen 20mg/ml versetzen und mischen (durch Pipettieren oder Vortexen).
9. 300µl -20°C Ethanol 96% hinzufügen.
10. Inkubation bei -20°C zum Fällern für mindestens eine Stunde, ggf. über Nacht.
11. Durch Zentrifugieren bei 4°C für 30-60min Präzipitieren – Ethanol verwerfen
12. Einmal mit 250µl 75% Ethanol -20°C Waschen – Ethanol verwerfen
13. Präzipitierte cDNA für 10-15 min bei RT an der Luft trocknen

## **2.19.2 Kopplung von Fluoreszenzfarbstoffen an Aminoallyl-modifizierte cDNA**

### **Theorie:**

An die Aminoallyl-modifizierten cDNA wird durch eine chemische Reaktion der jeweilige Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt. Der Farbstoff, z.B. Alexa Fluor® 555, liegt als Aminreaktives Carboxylsäure-Succinimidyl-Ester-Dinatrium-Salz vor. In Gegenwart von Natriumbikarbonat-Salz und DMSO kommt es zu einer Veresterung mit dem in der cDNA vorhandenen 5-(3-Aminoallyl)-dUTP.

### **Material:**

- Präzipitierte, Aminoallyl-modifizierte cDNA
- DEPC-behandeltes Wasser (im Kit enthalten)
- Natriumbikarbonat Lösung (25mg/ml) (im Kit enthalten)
- DMSO (im Kit enthalten)
- ARES™Alexa Fluor® Farbstoff (entweder 488, 555, 594 oder 647)

### **Methode:**

1. Die präzipitierte, Aminoallyl-modifizierte cDNA wird in 5µl DEPC-behandeltem Wasser gelöst – hierzu ggf. für 5min bei 42°C inkubiert

2. Frischer, reaktiver Fluoreszenzfarbstoff wird vorbereitet, indem der Inhalt eines Reaktionsgefäßes mit dem Salz des Farbstoffes in 2µl DMSO gelöst wird.
3. Zu der gelösten Aminoallyl-modifizierten cDNA werden 3µl Natriumbikarbonat Lösung (25mg/ml) und der in DMSO gelöste Fluoreszenzfarbstoff pipettiert – Endvolumen 10µl

Die Inkubation erfolgt im Dunkeln, bei RT für eine Stunde.

### Reinigung fluoreszenzmarkierter cDNA

#### **Theorie:**

Sinn der Reinigung der fluoreszenzmarkierten cDNA ist es, nichtinkorporierte Fluorophore und Salze aus der Reaktion zu entfernen, da diese bei der Hybridisierung des XeoChip® störende Hintergrundfluoreszenz verursachen.

#### **Material:**

- Fluoreszenzmarkierte cDNA
- cDNA Labeling Purification Module (Invitrogen™)
- Aminoallyl-modifizierte cDNA
- Ethanol 96% -20°C (Merck)
- Ethanol 75% -20°C
- Isopropanol (Merck)
- DEPC behandeltes Wasser (Diethylpyrocarbonat, Sigma)
- Mikrozentrifuge
- 1,5ml Reaktionsgefäß (im Kit enthalten)
- 3 M Natrium Acetat pH 5,2 (im Kit enthalten)
- Glykogen 20mg/ml (im Kit enthalten)

#### **Methode:**

1. Fluoreszenzmarkierte cDNA mit 20µl 3 M Natriumacetat (pH 5,2) und 500µl Ladebuffer (mit Isopropanol) versetzen und durch Vortexen mischen.

2. Probe auf S.N.A.P.<sup>TM</sup>-Säule laden und 1min bei 14.000g zentrifugieren –Durchfluss verwerfen (die markierte cDNA ist nun an der Membran der Säule gebunden).
3. 700µl Waschpuffer (mit Ethanol) auf Säule pipettieren und 1min bei 14.000g zentrifugieren – Durchfluss verwerfen
4. Waschvorgang (3.) wiederholen, Durchfluss verwerfen.
5. Säule zum Trocknen 1min bei 14.000g Zentrifugieren (dies entfernt alle Reste Ethanol, die bei der darauf folgenden Elution stören) – Durchfluss verwerfen.
6. 50µl DEPC-behandeltes Wasser auf die Säule (mit fluoreszenzmarkierter cDNA) pipettieren und 1min bei RT inkubieren, dann 1min bei 14.000g zentrifugieren\*
7. Eluat (50µl) mit 10µl 3 M Natrium Acetat pH 5,2, 2µl Glykogen 20mg/ml versetzen und mischen (durch Pipettieren oder Vortexen).
6. 300µl -20°C Ethanol 96% hinzufügen.
7. Nun werden alle vier unterschiedlich fluoreszenzmarkierten Sonden vereinigt.
8. Inkubation bei -20°C zum Fällern für mindestens eine Stunde, ggf. über Nacht.
9. Durch Zentrifugieren bei 4°C für 30-60min präzipitieren – Ethanol verwerfen
10. Einmal mit 250µl 75% Ethanol -20°C Waschen – Ethanol verwerfen
11. Präzipitierte fluoreszenzmarkierte cDNA für 10-15 min bei RT an der Luft trocknen (im Dunkeln)

\*an dieser Stelle werden 2µl jeder fluoreszenzmarkierten Sonde entfernt und mit dem NanoDrop analysiert.

### **2.19.3 Analyse der Fluoreszenzmarkierten Sonde mit dem Nano Drop<sup>TM</sup>**

#### **Theorie:**

Um Effizienz der Kopplung von Fluoreszenz an die cDNA zu überprüfen, wird spektrophotometrisch gemessen. Prinzipiell kann man dazu jedes Photometer nutzen, welches ein Abtasten der Wellenlängen im Bereich des entsprechenden Farbstoffes zulässt. Das verwendete Gerät hat den Vorteil, eine Voreinstellung für die Messung von fluoreszenzmarkierter cDNA zu haben, bei der Quantität und Qualität der DNA und die molare Inkorporationsrate an Fluoreszenzfarbstoff gemessen wird. Außerdem wird nur ein winziges Probenvolumen (1-2µl der Sonde) benötigt, um genau zu messen.

### **Material:**

- NanoDrop ND1000 UV-Vis Spektrophotometer (NanoDrop Technologies)
- Fluoreszenzmarkierte Sonde

### **Methode:**

1-2µl der fluoreszenzmarkierten Sonde werden auf die Messoptik pipettiert und das Gerät wird geschlossen. In der Software wird die Anwendung "*Microarray*" gewählt und der entsprechende Fluoreszenzfarbstoff festgelegt.

Es erfolgt ein Abtasten der Absorptionswellenlängen von 200nm bis 800nm.

Absorptionsmaxima werden graphisch dargestellt sowie Konzentration und Reinheit angezeigt.

## **2.20 Hybridisierung von *Microarrays* auf dem Xeotron® Chip-System**

### **Theorie:**

Das heterogene Gemisch fluoreszenzmarkierter Sonden soll auf *Microarrays* hybridisiert werden. Dies bedeutet, dass die fluoreszenzmarkierten cDNA-Stränge an den entsprechenden (komplementären) Oligonukleotiden auf dem *Microarray* binden. Das Design der *Microarrays* für diese Studie habe ich selber vorgenommen. Es wurden spezifische Sequenzen von 1000 Transkripten der Maus ausgewählt, die von der Herstellerfirma *in situ* (in Duplikaten) auf den Chips synthetisiert wurden. Die verwendeten *Microarrays* waren also speziell für die Fragestellung meiner Studie zusammengestellt.

### **Material:**

- Fluoreszenzmarkierte Sonde
- XEOTRON EXPRESSION ARRAY® (XeoChip®)
- XeoEX® Buffer Kit (Xeotron®)
- M-2 Manual Microfluidic Station (Xeotron®)

- Xeotron® cDNA Labeling Kit (Xeotron®)
- 1.5 mL Reaktionsgefäße (Eppendorf)
- 0.5 mL Reaktionsgefäße (Eppendorf)
- 16 gauge needle
- Cleaning XeoChip®
- Costar Centrifuge Tube Filter (0.22 µM)
- 10% Triton X-100 (Lösung)

**Methode:**

Die *M-2 Manual Microfluidic Station* wird wie folgt vorbereitet:

- Alle verwendeten Waschpuffer müssen frisch hergestellt werden, es werden jeweils 1,5ml des entsprechenden Puffers mit 30µl 10%Triton X-100 versetzt.
- Wasch und Vorbereitungsschritte werden mit dem Einlaßschlauch im Puffer und dem Auslaßschlauch in einem Auffanggefäß durchgeführt – der Durchfluss wird verworfen.
- Hybridisierung erfolgt mit Ein- und Auslaßschlauch im selben Reaktionsgefäß. Standardzeit ist 18 Stunden bei 32°C.

Reinigen der M-2 Manual Microfluidic Station

Es werden in beide Kammern der Hybridisierungsstation *Cleaning XeoChips®* geladen.

Puffer EX2 (mit Triton) durch die Hybridisierungsstation pumpen.

Vorbereiten der fluoreszenzmarkierten Sonde für die Hybridisierung

1. Folgende Reagenzien werden zur präzipitierten, fluoreszenzmarkierten Sonde pipettiert.

Reagenz	µL
20X SSPE	15

Formamid	12,5
Triton X-100 (10%)	2
Control Spike 2	2
Nuklease freies Wasser	18,5
Endvolumen	50µl

Die nächsten Schritte werden alle vor Licht geschützt durchgeführt.

2. Die Sonde wird gut gemischt, für 3min bei 94°C inkubiert und anschliessend für eine Minute auf Eis gestellt.
3. Die denaturierte Sonde wird nun für eine Minute bei 12.000g durch einen mit 50µl Puffer EX-3 angefeuchteten Costar 0.22 µM Filter zentrifugiert.
4. In den Deckel eines 0,5ml Reaktionsgefäßes werden mit einer 20gauge Infusionsnadel 2 Löcher gestochen, die als Ein und Auslassöffnungen der Schläuche der *M-2 Manual Microfluidic Station* dienen, die filtrierte Sonde wird nun in dieses Gefäß pipettiert.
5. Das Reaktionsgefäß mit der Sonde wird in den entsprechenden Halter der Station gestellt, der Ein- und Auslassschlauch werden durch die Löcher im Deckel gesteckt, sodass sie in die Hybridisierungslösung tauchen. Hierbei ist zu beachten, dass der Einlassschlauch bis zum Boden, der Auslassschlauch ein wenig darüber zu liegen kommt.
6. Der Bereich der Hybridisierungsstation mit dem Reaktionsgefäß wird mit Alufolie abgedeckt, um die fluoreszenzmarkierte Sonde vor Ausbleichen zu schützen.
7. Auf der Hybridisierungsstation wird die Option *Hybridize* ausgewählt – die Hybridisierung ist nach 18 Stunden abgeschlossen.

### Waschen des XeoChip®

Nach erfolgter Hybridisierung wird der XeoChip® in der Hybridisierungsstation gewaschen um ungebundene Reste der Fluoreszenzsonde zu entfernen.

1. Der Einlassschlauch der Hybridisierungsstation wird herausgezogen und die Option *Prime* ausgewählt. Nun wird die restliche Sonde aus dem Kreislaufsystem entfernt und in dem Reaktionsgefäß (für eine etwaige zweite Hybridisierung (aufgefangen)).
2. Puffer EX3 (mit Triton X-100) wird durch den XeoChip® gepumpt
3. Puffer EX2 (mit Triton X-100) wird durch den XeoChip® gepumpt

4. Puffer EX4 (mit Triton X-100) wird durch den XeoChip® gepumpt
5. Puffer EX2 (ohne Triton X-100) wird durch den XeoChip® gepumpt

Gescannte Bilder der 4 Fluoreszenzkanäle werden als .TIFF und .BMP Dateien gespeichert.

## 2.21 Auswertung der XeoChip® *Microarrays*

### Theorie:

Der XeoChip® wird nun mit einem geeigneten *Microarray*-Scanner (ScanArray 5000 XL *Microarray* Analysis System, Packard Biosciences und ScanArray External Laser System, GSI Luminomics) gelesen.

Hierbei werden die verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffe nacheinander in ihrer jeweiligen Wellenlänge angeregt. Die ermittelten Intensitäten werden elektronisch zur weiteren Auswertung gespeichert.

### Material:

- ScanArray 5000 XL *Microarray* Analysis System, Packard Biosciences und ScanArray External Laser System, GSI Luminomics
- Scanarray™ Software
- Microsoft Excel®
- GraphPad Prism®

### Methode:

Der hybridisierte, gewaschene *Microarray* wird gescannt, die Fokustiefe beträgt i.d.R. - 1789µm, bei Chips des Xeotron Systems. Bei Bedarf muss sie manuell ermittelt werden (siehe Benutzerhandbuch). Die Auflösung beträgt 5µm.

Die Einstellungen für Laserstärke (LASER gain) und Photomultiplier Verstärkung (PMT gain) werden beim ersten Lesen automatisch ermittelt. Hierzu wird die Option Autogain Laser bzw. PMT Autogain gewählt, bevor die eigentliche Datenerfassung des XeoChip® erfolgt. Das zweite Scannen erfolgt mit um 20% erhöhter Laserstärke, um eine Maximale Ausbeute auch von schwachen Signalen zu erhalten. Die Daten werden als Excel®-Dateien gespeichert und nach Lowess-Verfahren analysiert (Dudoit et al., 2000). Es wird jeweils der Mittelwert der Duplikate auf dem *Microarray* gebildet wobei sich die Anzahl der Klone (von

2000 Duplikaten) auf 1000 reduziert. Schwache Signale und Signale von Duplikaten die sich stark unterscheiden werden aus der weiteren Analyse entfernt.

## 2.22 Liste der verwendeten Lösungen und Reagenzien

### **LB Medium/Liter**

Trypton 10 g

Hefeextrakt 5 g

NaCl 10 g

H<sub>2</sub>O auf 1 l

pH auf 7.0 einstellen, autoklavieren.

Für Agar-Platten 15 g Agar hinzugeben

### **SOC Medium/Liter**

Trypton 20 g

Hefeextrakt 5 g

NaCl 0.5 g

250 mM KCl 10 ml

mit H<sub>2</sub>O auf 900 ml auffüllen, pH auf 7.0

einstellen, mit H<sub>2</sub>O auf 990 ml auffüllen,

autoklavieren, dann 10 ml einer sterilen

Glukose-Lösung (2 M) hinzugeben.

### **50x TAE/Liter**

Tris-Base 2 M

Eisessig 57.1 ml

EDTA 0.1 M

H<sub>2</sub>O auf 1 l

pH auf 8.5 einstellen, autoklavieren.

### **10x TBE/Liter**

Tris-Base 0.89 M

Borsäure 0.89 M

EDTA 20 mM

autoklavieren.

## 2.23 Liste der verwendeten Kits und Reagenzien

Alexa Fluor® 555 and Alexa Fluor® 647 reactive dye pacs (je 10 Reaktionen) Kat. Nr. A32755, Molecular Probes®

Ares™ Alexa Fluor® 488 DNA Labeling Kit (10 Reaktionen) Kat.Nr. A-21665 Molecular Probes®

Ares™ Alexa Fluor® 594 DNA Labeling Kit (10 Reaktionen) Kat.Nr. A-21669 Molecular Probes®

cDNA Labeling Purification Module, 30 RXN Invitrogen™, Kat.Nr. 450042

DNA Polymerase TaKaRa Ex Taq™ Hot Start Version, 10x PCR Buffer, dNTP Mixture for PCR, Kat.Nr. RR006A, TAKARA BIO INC.

Expression XeoChip®, Custom made *Microarrays*, Xeotron

GeneRuler™ 100bp DNA Ladder Plus, ready to use Kat.Nr. SM0323, Fermentas

IQ™ BIO-RAD SYBR Green Supermix, 2x Mix for Real-Time PCR, 500x50µl Rxn., Kat.Nr. 1708882

Optical Tape, Box of 100, Kat.Nr. 2239444 BIO-RAD iCycler™

PCR Plates, 96 Well, Kat.Nr. 2239441, BIO-RAD iCycler™

QIAGEN PCR Cloning Kit (10), Kat. Nr. 231122, Qiagen

QIAprep Spin Miniprep Kit (50) Kat. Nr. 27141, Qiagen

QIAquick Gel Extraction Kit (50) Kat.Nr. 28704 Qiagen

QIAquick® PCR Purification Kit (250) Kat. Nr. 28106, Qiagen

RNA 6000 Nano Chips 25 RNA 6000 Nano Chips 2 Electrode Cleaners, Kat.Nr. 50654476, Agilent Technologies

RNA 6000 Nano Reagents & Supplies, Kat.Nr. 50654476

RNAlater™, 100ml Kat.Nr. 7020

Rneasy Mini Kit (250), Kat Nr. 74106, Qiagen

SuperScript™ First-Strand Synthesis System for RT-PCR, 50 Rxns.Kat.Nr. 11904018

SuperScript™ II Reverse Transcriptase, 2000Units, Invitrogen™ 18064022

SuperScript™ Indirect cDNA Labeling Core Kit 30 Rxn., Kat.Nr. L101402 Invitrogen™

TRIZOL® Reagent, 200ml, Kat.Nr. 15596018 Invitrogen™

XeoEX Buffer Kit Kat.Nr X3000, Xeotron

QuantiTect™ SYBR® Green PCR Kit (200x50µl Rxn.), Kat. Nr. 204143 Qiagen

0,2ml Tube Strip, 80 strips of 12 Kat.Nr. 410082 Stratagene

Cap Strip, 80 strips of 12, Kat.Nr. 410086, Stratagene

One Shot® TOP10 Chemically Competent *E. coli*, (10), Kat.Nr. C-404003, Invitrogen

NanoDrop ND1000 UV-Vis Spektrophotometer

## 2.24 Firmenverzeichnis

Qiagen, Hilden

Roth, Karlsruhe

Sigma, Deisenhofen

Xeotron, Houston, USA

USA Molecular Probes, Inc. Eugene, USA

TAKARA BIO INC. Otsu, Japan

Fermentas Life Science, Hanover USA

Agilent Technologies, Waldbronn

Merck, Darmstadt

New England Biolabs, Schwalbach

Charles River Laboratories, Inc.,

Wilmington, MA 01887-1000

Roche, Mannheim

Sarstaedt, Nürnberg

Stratagene, Heidelberg

Invitrogen life technologies™, Carlsbad

GibcoBRL, Eggenstein

Heraeus, Karlsruhe

Invitrogen, Leek, Niederlande

NanoDrop Technologies, Rockland

MWG, Ebersberg

Teklad Test Diets, Wisconsin, USA

IDT Integrated DNA Technologies,

Coralville USA

## 3 Ergebnisse:

### 3.1. Physiologische Daten

#### 3.1.1 Entwicklung des Körpergewichts der Versuchstiere im Verlaufe der Versuchszeit

Die unbehandelten Kontrolltiere (N=20) hatten zu Beginn des Versuches ein Körpergewicht von  $29,1 \pm 0,42\text{g}$ , die Melatonin-substituierten Tiere (N=20) wogen im Mittel  $29,4 \pm 0,35\text{g}$ . Bei der letzten Gewichtsbestimmung in der vierzigsten Woche hatten die Kontrolltiere ein Gewicht von  $41,04 \pm 0,88\text{g}$  und die Melatonin-substituierten Tiere ein Gewicht von  $35,03 \pm 0,85\text{g}$ .

Der Gewichtsunterschied zwischen den Kontrolltieren und den Melatonin-substituierten Tieren ist nach zweiseitigem t-Test (GraphPad Prism<sup>®</sup>) statistisch signifikant ( $p < 0,001$ ). Das Körpergewicht der Versuchstiere der KR-Gruppe (N=20) nahm von durchschnittlich  $28,6 \pm 0,32\text{g}$  zu Beginn des Versuchs bis zur zehnten Woche kontinuierlich ab ( $20,5 \pm 0,3$ ), danach bis zur vierzigsten Woche auf  $24,07 \pm 0,38\text{g}$  zu.

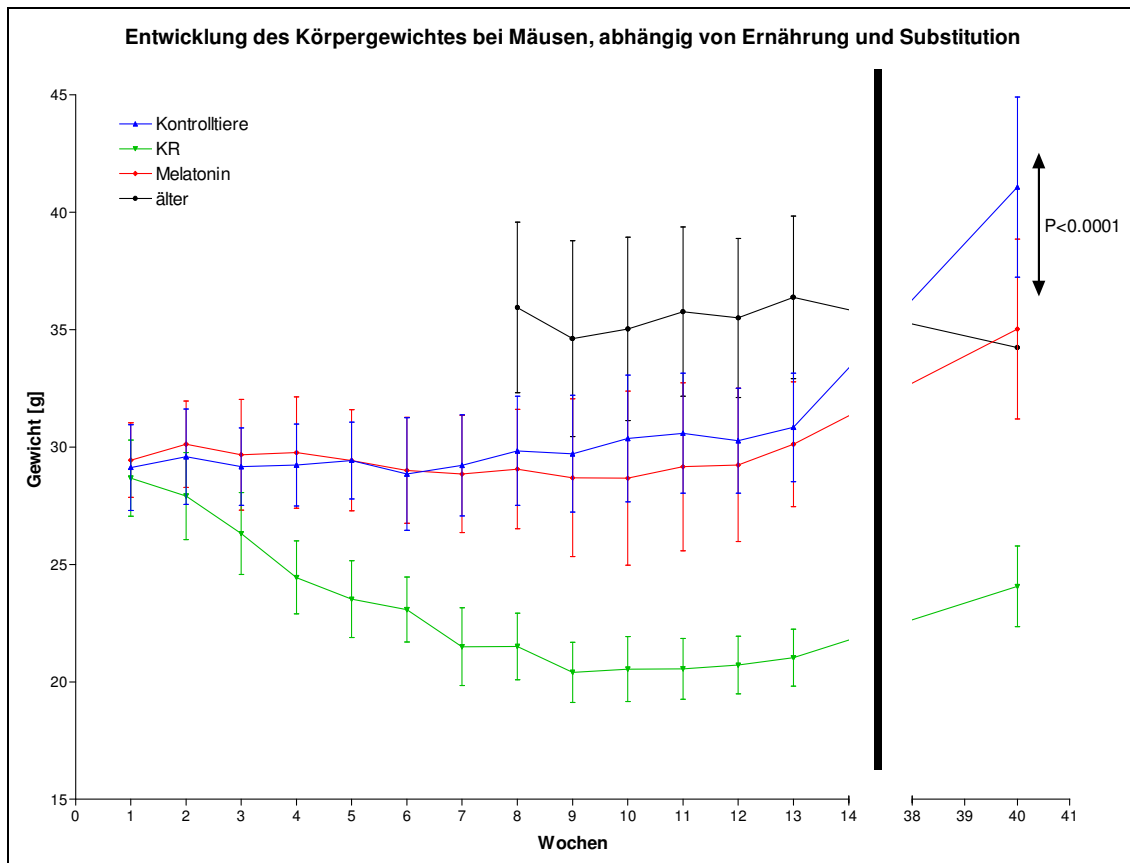


Abb. 3.1: Verlauf des Körpergewichtes der Tiere über die Versuchszeit.

Die älteren Tiere, die bei Beginn der Gewichtsaufzeichnung ein Alter von 18 Monaten hatten, wogen durchschnittlich  $35,9 \pm 1,48\text{g}$  und verloren bis zur vierzigsten Woche an Gewicht auf  $34,23 \pm 0,91\text{g}$ .

### 3.1.2 Aktivitätsaufzeichnung mittels Aktogrammen

In den ersten Wochen der Aktivitätsaufzeichnung herrschte die oben beschriebene Photoperiode. Das Versuchstier zeigte einen gut manifestierten Tag/Nacht Rhythmus. Das Einsetzen der Aktivität erfolgt sofort nach Anbruch der Dunkelheit um ZT12 (18:00 Uhr). Nach Etablieren von DD (\*) zeigte das Tier einen Freilauf der Aktivität, die in jeder folgenden subjektiven Nacht früher einsetzte. Die endogene Periode  $\tau$  betrug 23,4 Stunden.

Der Gruppendurchschnitt für Tiere dieses Alters betrug  $23,46 \pm 0,07$  Stunden.

Nach Wiederherstellung der ursprünglichen Photoperiode ( $\Delta$ ) zeigte das Tier den ursprünglichen LD Aktivitätsrhythmus. Das gewählte Tier ist repräsentativ für die Kontrolltiergruppe.

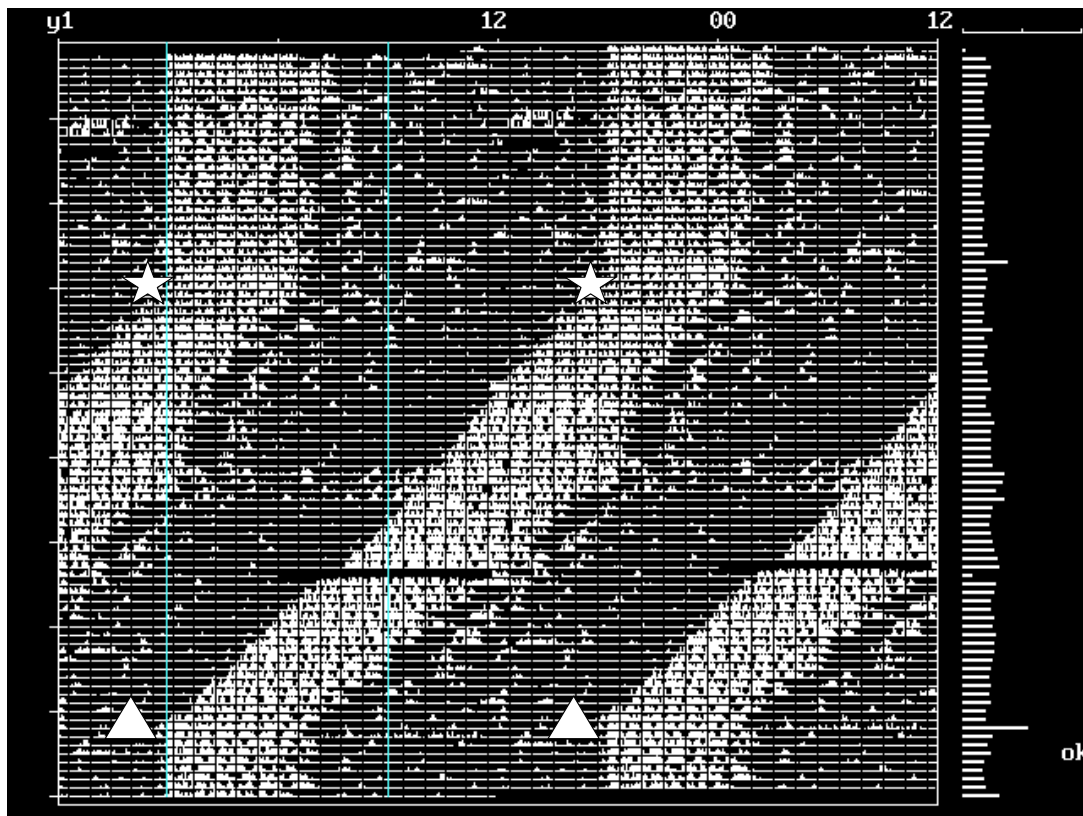
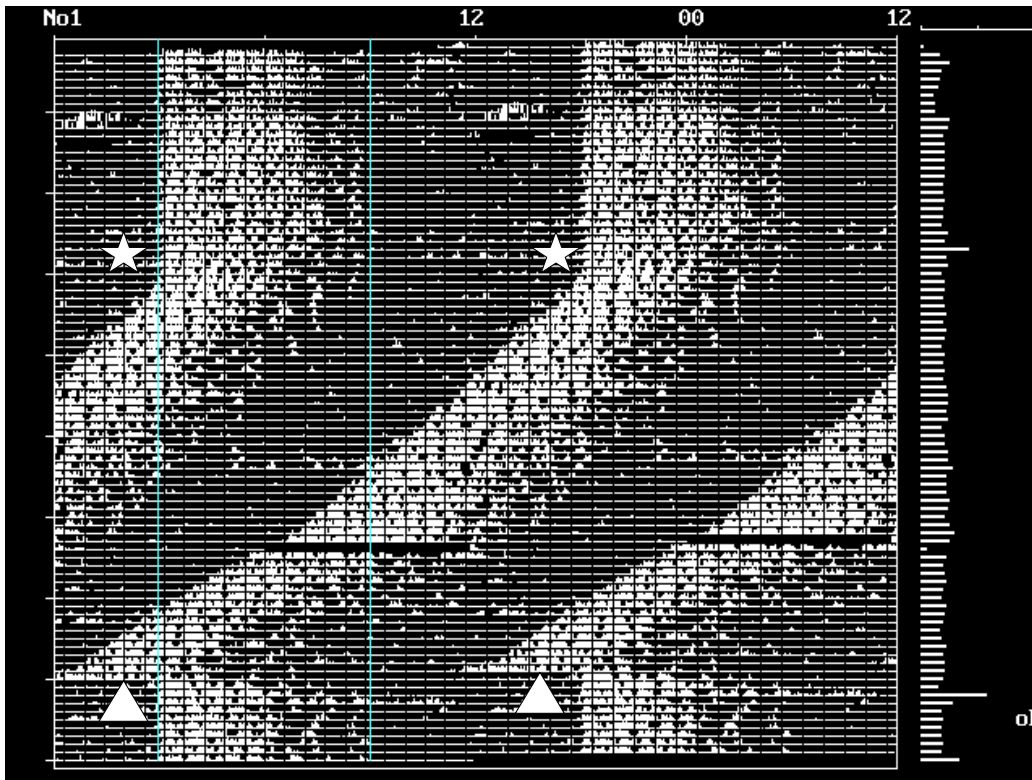


Abb. 3.2: Repräsentatives Aktogramm einer Kontrollmaus im Alter von 3-6 Monaten. Es herrschte eine Lichtperiode von 06:00-18:00, gefolgt von DD(\*) bis zur Wiederherstellung der ursprünglichen Lichtperiode ( $\Delta$ ).

Der horizontale Bildausfall im unteren Drittel des Aktogrammes kam durch den Neustart des Computers nach einer Stromunterbrechung zustande und erscheint auf einigen anderen Aktogrammen ebenfalls. Hierbei wird immer graphisch in der nächsten Zeile fortgefahren – der Ausfall der Datenaufzeichnung betrug nur wenige Stunden.



**Abb.: 3.3** Repräsentatives Aktogramm einer Kontrollmaus im Alter von 7-10 Monaten. Es herrschte eine Lichtperiode von 06:00-18:00, gefolgt von DD(\*) bis zur Wiederherstellung der ursprünglichen Lichtperiode (Δ)

Das Lichtregime für das oben gezeigte Aktogramm war identisch mit dem aus Abb. 3.2. Das Versuchstier zeigte ebenfalls einen resoluten Tag/Nacht Rhythmus unter LD und einen Freilauf unter DD. Die endogene Periode  $\tau$  betrug 23,3 Stunden. Der Gruppendurchschnitt betrug  $23,47 \pm 0,08$  Stunden.



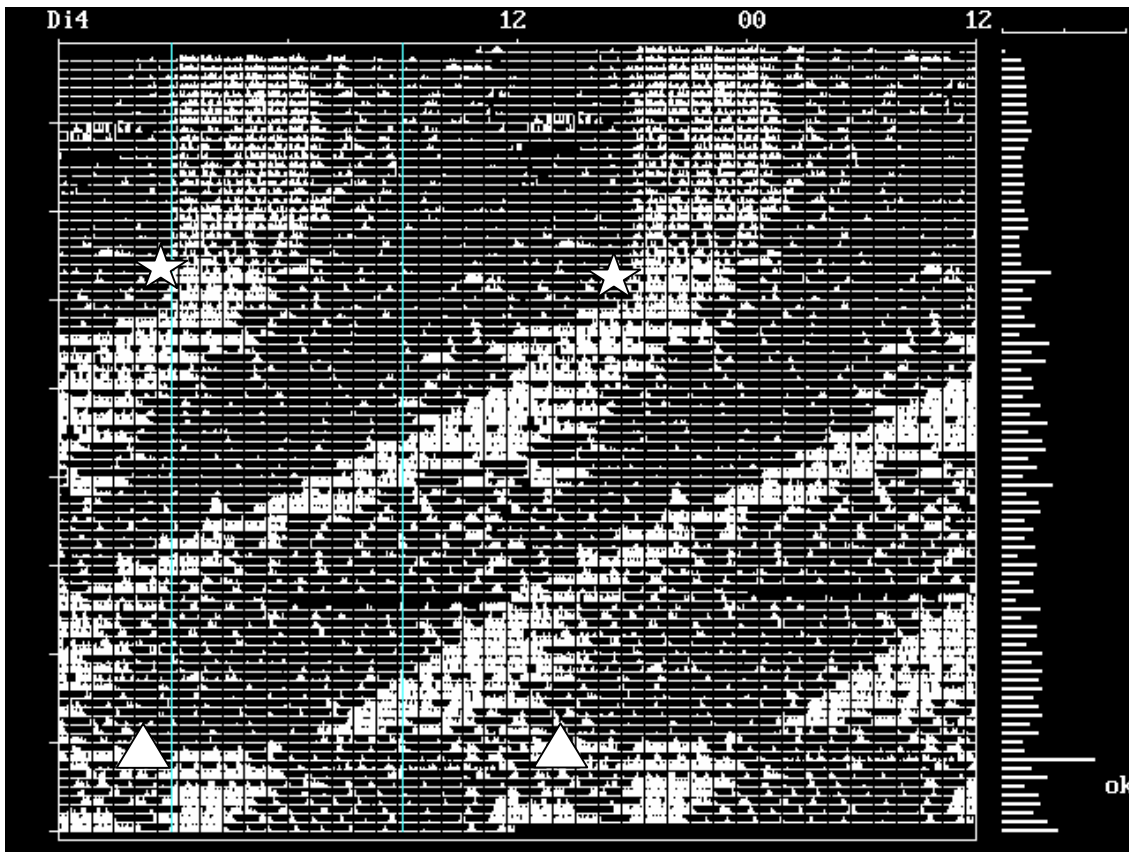


Abb.3.5: Repräsentatives Aktogramm einer KR-Maus im Alter von 7-10 Monaten. Es herrschte eine Lichtperiode von 6:00-18:00 Uhr. Anschließend DD(\*) bis zur Wiederherstellung der ursprünglichen Lichtperiode (Δ).

Das untersuchte Tier zeigte die generelle Verhaltensauffälligkeit der KR-Gruppe. Der Aktivitätsrhythmus war sowohl unter LD als auch unter DD-Bedingungen stark fragmentiert, wobei die Fragmentierung unter DD zunahm. Die Menge an Gesamtaktivität nahm während der DD-Phase augenscheinlich zu. Die endogene Periode  $\tau$  betrug 23,2 Stunden bei einem Gruppendurchschnitt von  $23,59 \pm 0,04$  Stunden. Die Wiederherstellung der LD-Rhythmik gelang nur sehr langsam und innerhalb des dargestellten Datenbereiches nicht vollständig. (vgl. Abb. 3.3, Kontrolltier im selben Versuchszeitraum).

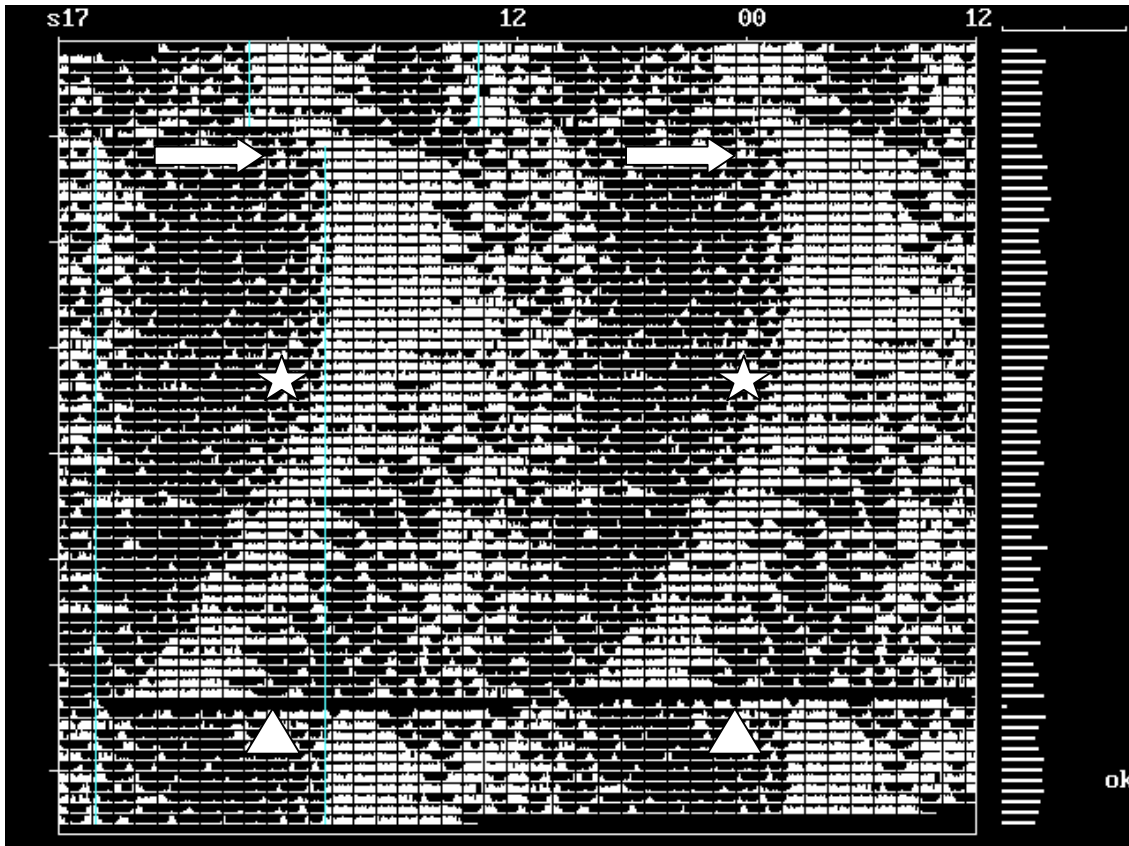


Abb.3.6: Repräsentatives Aktogramm einer KR-Maus im Alter von 11-14 Monaten. Es herrschte eine Lichtperiode von 10:00-22:00 Uhr, gefolgt von einer 4 Stunden Phasenverzögerung auf 14:00-02:00 Lichtperiode(⇔). Anschließend DD(\*) bis zur Wiederherstellung der 14:00-02:00 Uhr Lichtperiode (Δ).

Das hier untersuchte Tier der KR-Gruppe zeigte dieselben Auffälligkeiten wie das vorherige, jüngere. Die endogene Periode  $\tau$  betrug 23,6 Stunden, welches unter dem Gruppendurchschnitt von  $23,92 \pm 0,02$  Stunden (in diesem Alter) liegt. Der Rhythmus ist sehr stark fragmentiert, allerdings gelingt die Resynchronisation an LD-Bedingungen besser.

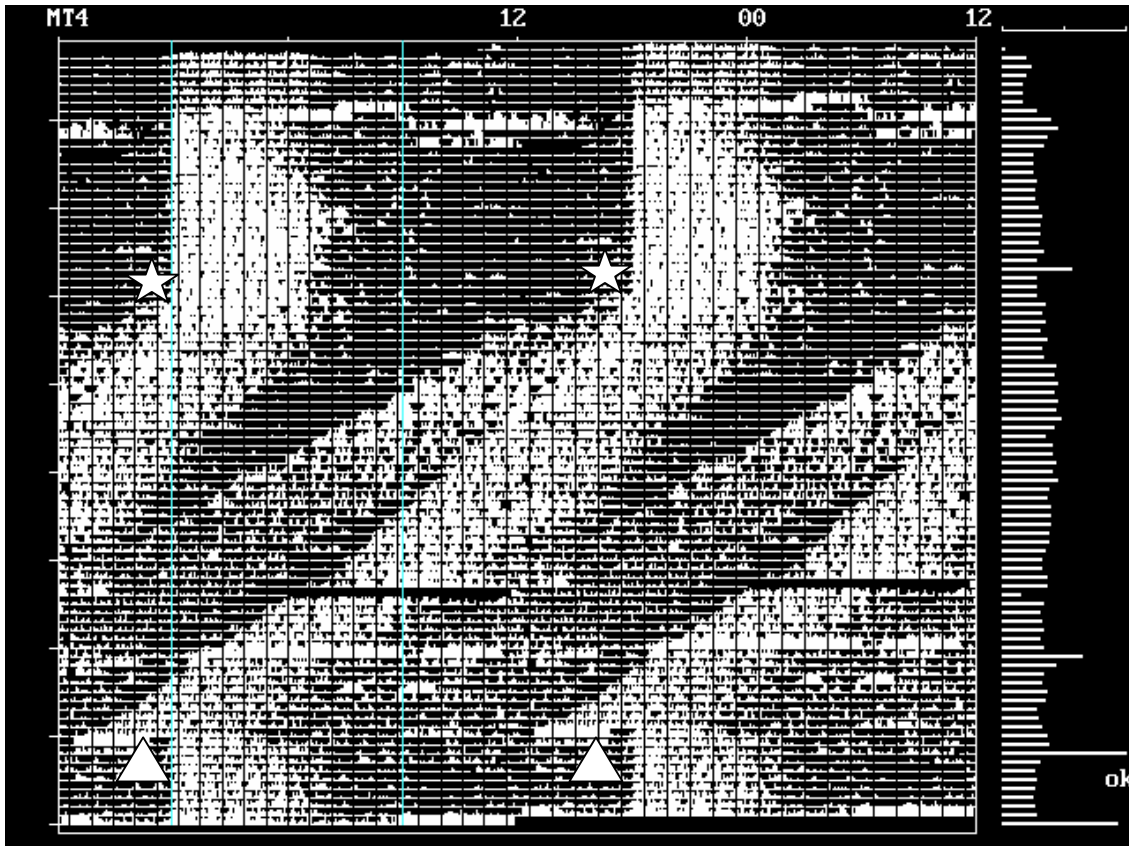


Abb. 3.7: Repräsentatives Aktogramm einer Melatonin-substituierten Maus im Alter von 7-10 Monaten. Es herrschte eine Lichtperiode von 06:00-18:00 Uhr. Anschließend DD(\*) bis zur Wiederherstellung der 06:00-18:00 Uhr Lichtperiode (Δ).

Die Tiere der Melatonin-substituierten Gruppe hatten, wie hier exemplarisch dargestellt, eine sehr gute Anpassung an LD-Bedingungen, sowie eine schnelle Resynchronisation auf LD-Bedingungen nach einer DD-Phase. Interessanterweise spaltet sich das Aktivitätsmaximum unter DD-Bedingungen allmählich in 2 Komponenten auf, dessen Phasenabstand sich zunehmend vergrößert. Dieses Phänomen wurde mit höchster Häufigkeit bei den Melatonin-substituierten Tieren beobachtet (5 von 10) und trat bei KR-Tieren nicht auf. Nur zwei der Kontrolltiere wiesen diese Art der Phasenspaltung auf. Die endogene Tageslänge des dargestellten Tieres betrug  $\tau=23,3$  Stunden. Der Gruppendurchschnitt betrug (in diesem Alter)  $23,43\pm 0,06$  Stunden.

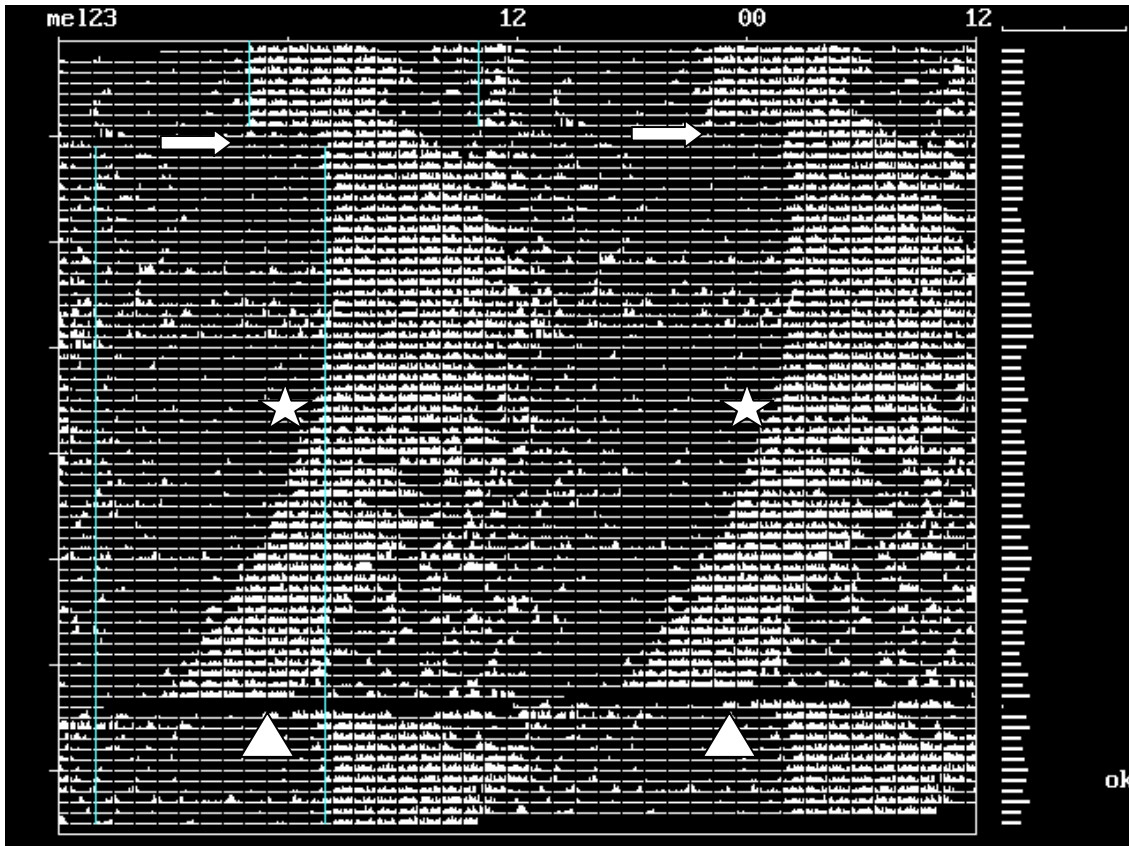
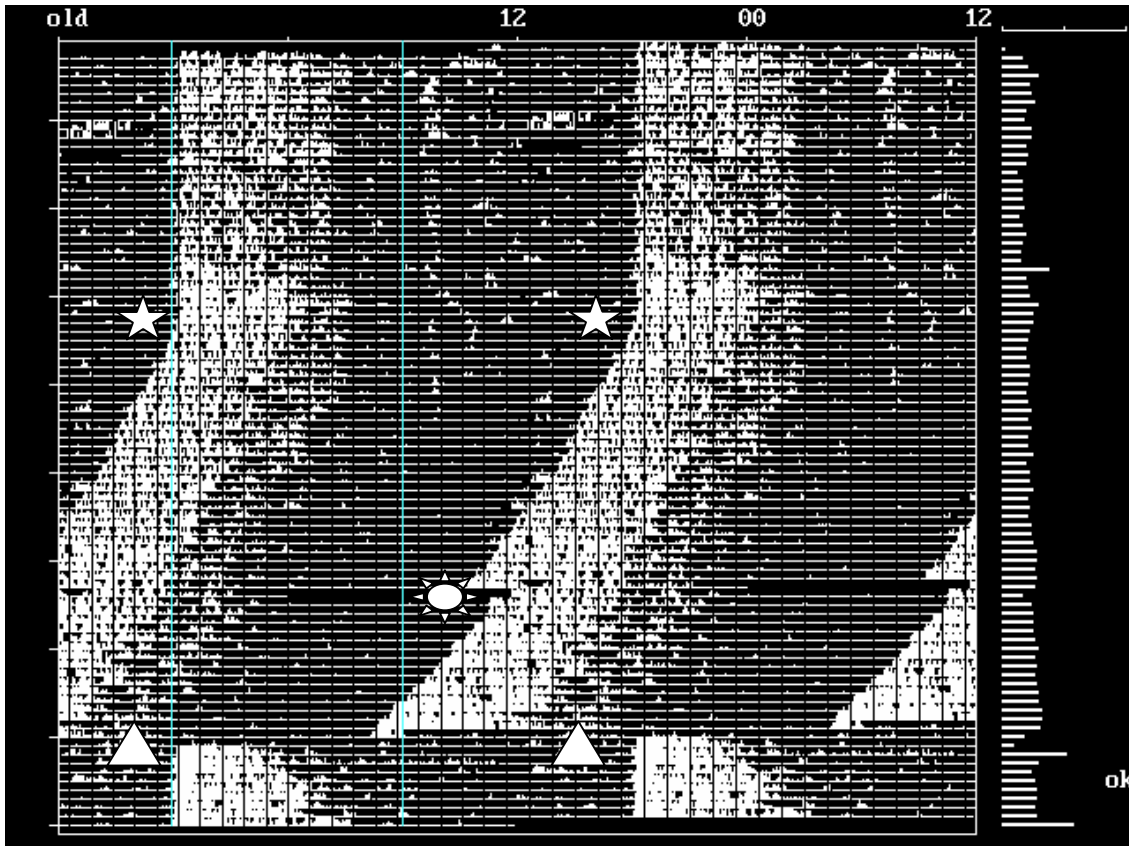


Abb.3.8: Repräsentatives Aktogramm einer Melatonin-substituierten Maus im Alter von 11-14 Monaten. Es herrschte eine Lichtperiode von 10:00-22:00 Uhr, gefolgt von einer 4 Stunden Phasenverzögerung auf 14:00-02:00 Lichtperiode(⇔). Anschließend DD(\*) bis zur Wiederherstellung der 14:00-02:00 Uhr Lichtperiode (Δ).

Diese Tier zeigt insgesamt etwas weniger Aktivität als das vorherige, jüngere Melatonin-substituierte. Die Anpassung an die Phasenverzögerung (⇔) sowie die Wiederherstellung des LD-Zyklus nach DD (Δ) geschah sehr schnell. Die Aufspaltung des Aktivitätsrhythmus in zwei Phasen war bei diesem Tier nur sehr gering. Die endogene Periode betrug  $\tau=23,6$  Stunden (Gruppendurchschnitt  $23,84\pm 0,03$  Stunden). Der Zeilenumbruch in der Aktivitätsaufzeichnung bei Wiederherstellung der 14:00-02:00 Uhr Lichtperiode kam durch einen automatischen Neustart des Systems nach kurzem Stromausfall zustande.



**Abb.3.9: Repräsentatives Aktogramm einer Kontrollmaus im Alter von 15-18 Monaten. Es herrschte eine Lichtperiode von 06:00-18:00 Uhr. Während der DD-Phase wurde ein 30min Lichtpuls gesetzt (☼) Wiederherstellung von LD (△).**

Ebenso wie die jüngeren Tiere der Kontrollgruppe, zeigte dieses Tier einen robusten circadianen Rhythmus. Unter DD-Bedingungen kam es zum Freilauf, nach Wiederherstellung vom LD-Regime zur Anpassung an dieses. Ferner habe ich während der DD-Phase (\*) einen 30-minütigen Lichtpuls gesetzt, der zu einer Phasenverzögerung führte (☼). Der Lichtpuls wurde früh in der subjektiven Nacht, etwa 1h nach Einsetzen der Aktivität des Tieres verabreicht und verursachte eine Phasenverzögerung von etwa 2-2,5 Stunden. In diesem Alter hatten die Kontrolltiere eine durchschnittliche endogene Periode von  $23,78 \pm 0,03$  Stunden.



Abb.3.10: Repräsentatives Aktogramm einer Kontrollmaus im Alter von 25-28 Monaten. Es herrschte eine Lichtperiode von 06:00-18:00 Uhr. Während der DD-Phase wurde ein 30min Lichtpuls gesetzt (☼) Wiederherstellung der Lichtperiode (Δ).

Auffällig ist, dass es nur einen sehr schwach ausgeprägten allgemeinen Rhythmus verglichen zu jüngeren Tieren gibt. Dennoch lässt sich das circadiane System noch entkoppeln durch DD, Phasenverzögern durch einen Lichtpuls und Resynchronisieren durch LD.



Abb.3.11: Repräsentatives Aktogramm einer Kontrollmaus, im Alter 25-28 Monaten wie auf Abb. 3.10 Es herrschte eine Lichtperiode von 06:00-18:00 Uhr. DD ab \*, LD (Δ).

Das obige Bild stellt den Aktivitätsverlauf eines weiteren alten Tieres dar. Die schwache Ausprägung des Rhythmus und der Hang zur Fragmentierung ist noch deutlicher zu erkennen als auf Abb. 3.10. Der Gruppendurchschnitt der endogenen Periode  $\tau$  lag bei  $23,86 \pm 0,08$  Stunden.

### 3.1.3 Statistische Auswertung der Aktivitätsaufzeichnung

#### 3.1.3.1 Einfluß von KR und Melatonin-substitution auf lokomotorische Aktivität

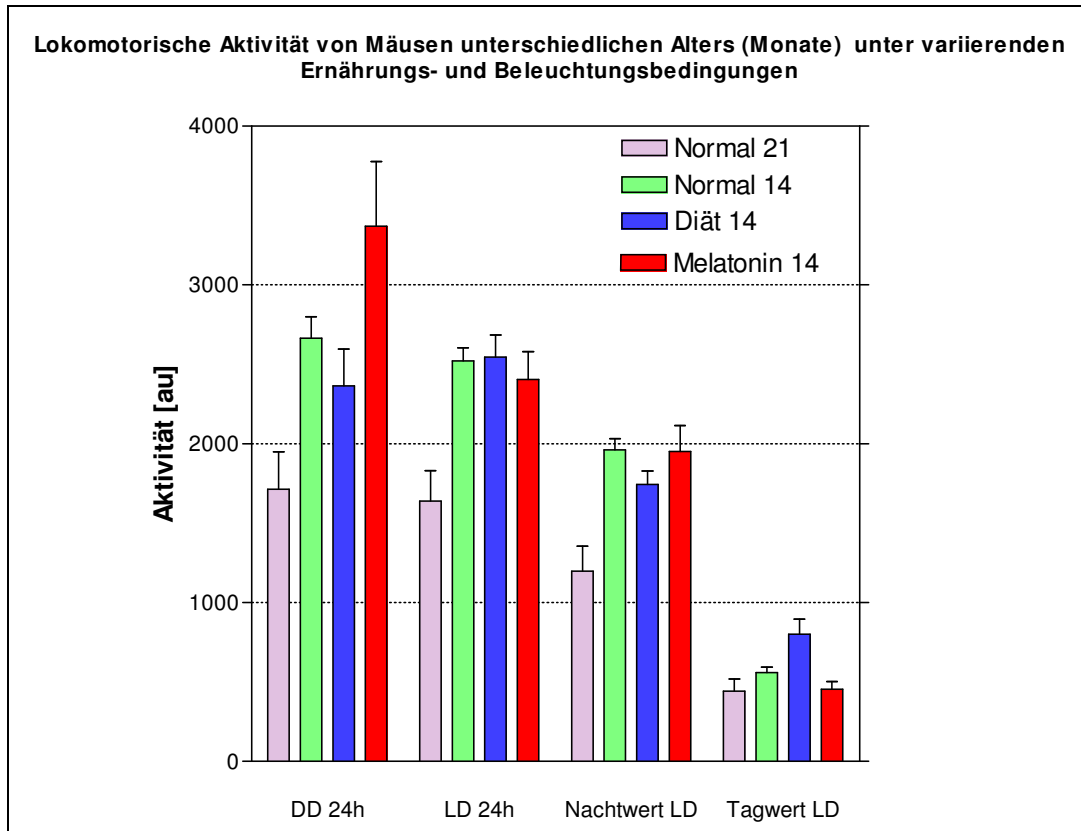


Abb. 3.12: Dargestellt ist die Aktivität der Tiere unterschiedlicher Versuchsgruppen unter LD- und DD-Bedingungen. Es gab N=10 für Gruppen der 14 Monate alten Tiere und N=6 für die 21 Monate alten Tiere. Standardfehler sind jeweils angezeigt. Die Aktivitätseinheiten sind von den Sensoren aufgezeichnete Impulse [au] (*activity units*). Zusätzlich wurde die Aktivität von 21 Monate alten Tieren mit aufgeführt.

Die Aktivität während der Dunkelphase ist bei allen Versuchsgruppen höher als während der Lichtphase. Die Nachtaktivität ist bei den KR-Tieren (Diät) etwas geringer, die Tagaktivität etwas höher als bei den gleichaltrigen Kontroll- und MT-Tieren. Auf Gesamtaktivität gerechnet gibt es aber keinen signifikanten Unterschied zwischen diesen Gruppen.

Es ist ferner deutlich, dass die Gesamtaktivität unter LD und DD-Bedingungen mit zunehmendem Alter abnimmt (vgl. Normal 14, Normal 21). Es scheint, dass die Gesamtaktivität unter DD-Bedingungen bei den MT-Tieren zunimmt.

### 3.1.3.2 Einfluss des Alterungsprozesses auf die lokomotorische Aktivität von Kontrollmäusen

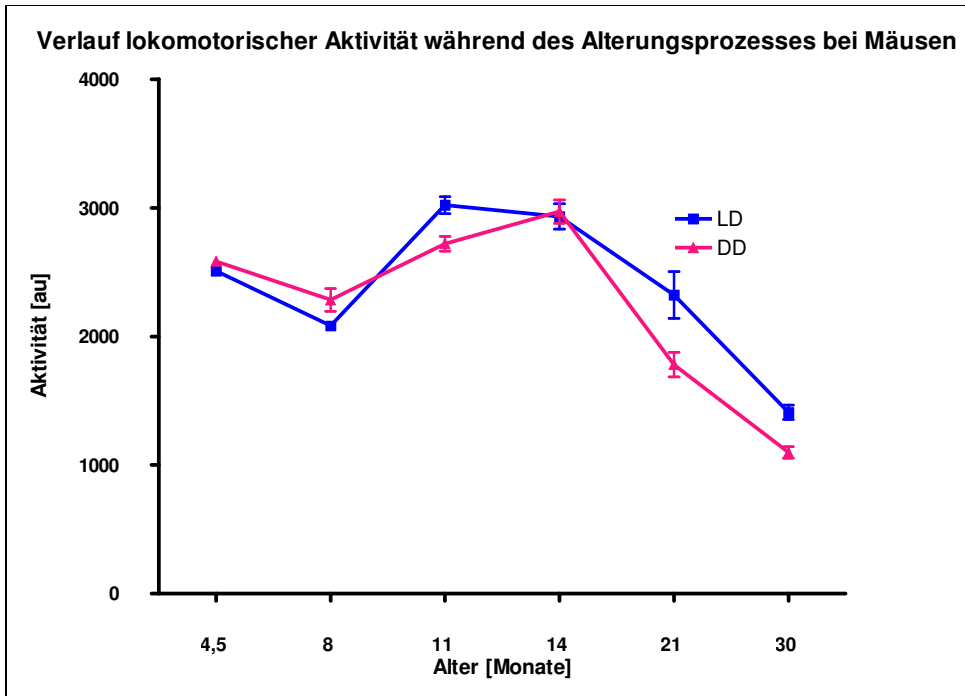


Abb. 3.13: Die lokomotorische Aktivität von unbehandelten Kontrollmäusen in einem Zeitraum von 30 Monaten. Standardfehler sind angegeben. N=10 für 4,5 -14 Monate und N=6 für 21-30 Monate..

Wenn man nur die Aktivität der Kontrolltiere über einen längeren Zeitraum betrachtet, ist die Abnahme an Gesamtaktivität deutlich mit dem Alter korrelierbar. Interessanterweise nimmt die Aktivität bei diesem Stamm B6C3F1 in dem ersten Lebensjahr auf seinen Maximalwert zu, um danach stetig abzunehmen.

### 3.1.4 Statistische Auswertung einer Phasenverschiebung

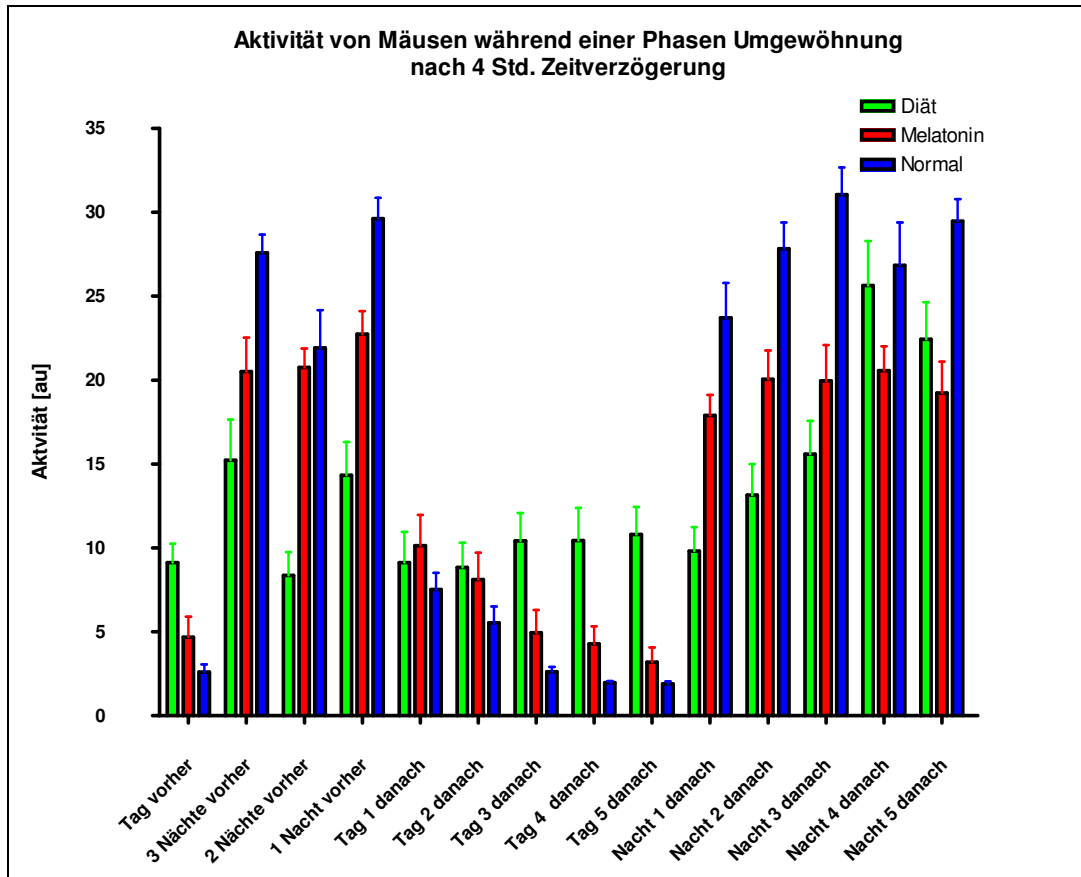


Abb.3.14: Tag- und Nachtaktivität bei Mäusen im Alter von 11 Monaten vor und nach einer Phasenverzögerung

Die von mir applizierte Phasenverzögerung (siehe Abb. 3.4; 3.6 & 3.8) wurde für alle Gruppen statistisch ausgewertet, um festzustellen, ob eine der Behandlungen zu einer schnelleren Resynchronisation beiträgt. Es wird zuerst die Durchschnittsaktivität während der Lichtphase (Tag vorher) gebildet. Diese ist, wie bereits demonstriert, bei den KR-Tieren höher als bei den anderen. Es folgt die Durchschnittsaktivität der drei Nächte vor der Verzögerung (3,2,1 Nacht vorher). Nach der Phasenverzögerung ist die Tagaktivität bei allen Gruppen (nicht signifikant bei den KR-Tieren) höher und nimmt an den darauffolgenden Tagen bei den MT- und Kontrolltieren ab (Tag1-5 danach).

Bei der Nachtaktivität (Nacht 1-5 danach) verhält es sich umgekehrt: sie ist erst geringer als die der Durchschnittsnacht, nimmt aber ebenfalls bis auf den ursprünglichen Wert zu. Die KR-Tiere übertreffen in Nacht 3-5 die normale Durchschnittsaktivität.

Die Dauer bis zur Wiederherstellung der durchschnittlichen Nachtaktivität (Resynchronisation an neue Lichtverhältnisse) stelle ich für die einzelnen Gruppen im Folgenden vor:

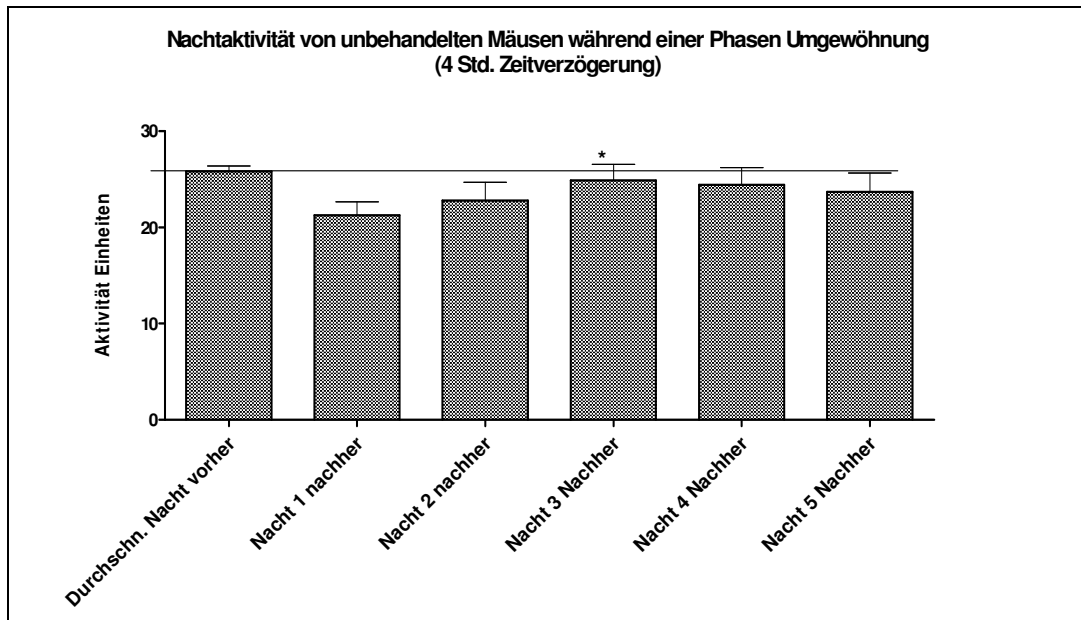


Abb.3.15 Resynchronisationszeit nach 4h Phasenverzögerung bei Kontrolltieren

Unbehandelte Kontrolltiere erreichten in der dritten Nacht nach einer vierstündigen Phasenverzögerung wieder eine für sie normale Menge an Nachtaktivität.

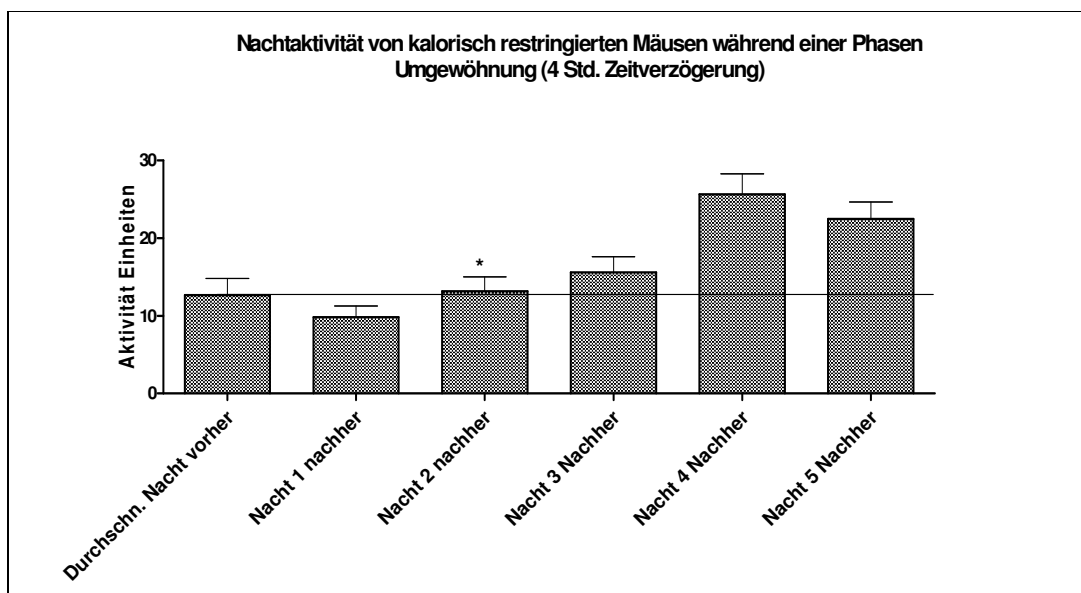


Abb.3.16 Resynchronisationszeit nach 4h Phasenverzögerung bei KR-Tieren

Bei KR-Tieren wird die Resynchronisation schon in der zweiten Nacht nach der Phasenverzögerung erreicht. Die Aktivität steigt von der zweiten bis vierten Nacht weiter an und sinkt ab der fünften Nacht wieder ab (s. Abb. 3.14).

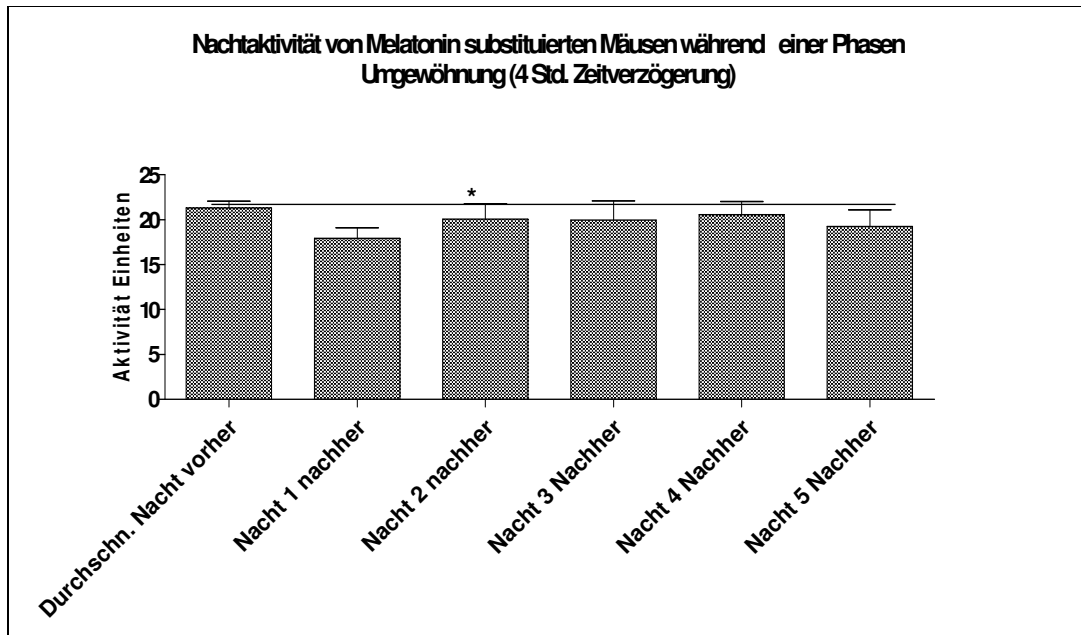
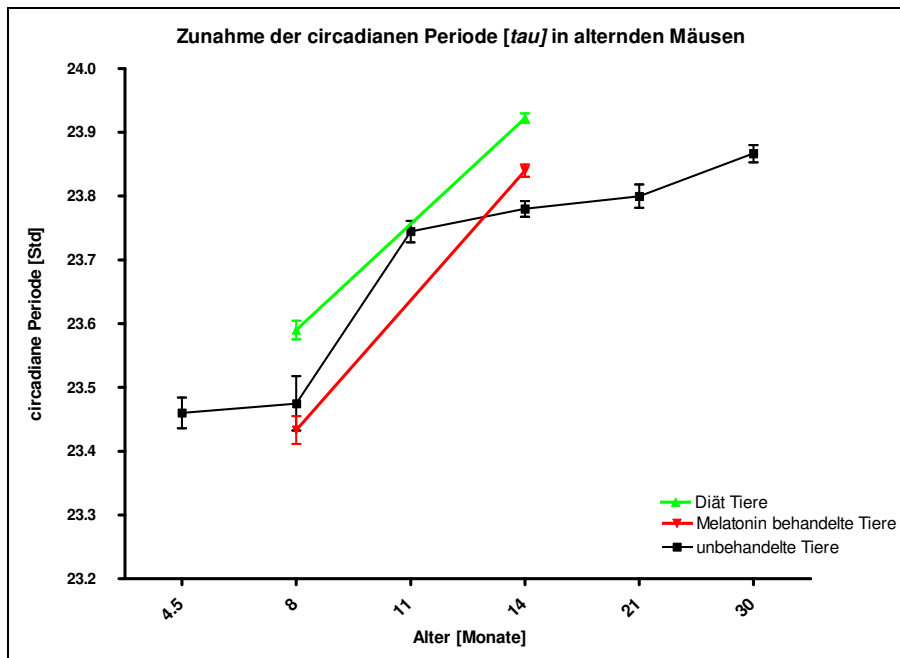


Abb.3.17 Resynchronisationszeit nach 4h Phasenverzögerung bei MT-Tieren

Melatonin-substituierte Tiere benötigten (wie die KR-Tiere) nur eine Nacht zur Resynchronisation. Allerdings sind die Aktivitätseinheiten bei den KR und MT-Tieren sehr unterschiedlich, da es bei der KR-Gruppe mehr Tagaktivität gibt. Außerdem wird der Überschuss an Aktivität bis zur vierten Nacht deutlicher – anscheinend hatte die Phasenverzögerung hier einen sehr akuten, aber nachlassenden Effekt der Aktivitätssteigerung. Die Phasenverzögerung hatte bei den Kontroll- und MT-Tieren einen wesentlich subtileren Effekt.

### 3.1.5 Zunahme der endogenen circadianen Periode Tau in Abhängigkeit des Alters

Um festzustellen, ob sich die Länge der endogenen Periode mit a) dem Alter und b) einer der applizierten Behandlungen ändert, habe ich dies graphisch dargestellt.



**Abb.3.18: Zunahme der endogenen Periode  $\tau$  mit steigendem Alter**

$\tau$  nimmt mit zunehmendem Alter in dem von mir untersuchten Mäusestamm zu: Von einem Durchschnittswert von  $23,46 \pm 0,07$  Stunden bei 4,5 Monate alten Tieren auf  $23,86 \pm 0,08$  Stunden bei 30 Monate alten Tieren.

Weder KR noch MT als Behandlungen können diese Verlangsamung der inneren Uhr mit zunehmendem Alter aufhalten. Allerdings scheint die circadiane Uhr bei KR-Tieren (8 und 14 Monate) etwas langsamer zu laufen, als bei den Kontroll- und MT-Tieren (siehe Kap. 3.1.2). Nach t-Test Analyse (Zweiseitiger t-Test, Graph Pad Prism®, jeweils  $N=10$ ) ist der Unterschied in  $\tau$  zwischen Kontroll-, KR- und MT-Tieren im Alter von 8 und 14 Monaten jeweils signifikant ( $p < 0,05$ ). Im Alter von 14 Monaten, ist die endogene Periode bei beiden Behandlungsgruppen signifikant ( $p < 0,05$ ) länger als bei den Kontrolltieren. Es gibt nur zwei Punkte der  $\tau$  Bestimmung für KR und MT-Tiere, da wie bei den Kontrolltieren eine präzise Bestimmung der Periode nur bei einer längeren Verweildauer im Dauerdunkel ( $> 3$  Wochen) durchgeführt werden kann.

In den ersten Monaten wurden die KR- und MT-Tiere aktivitätsüberwacht, jedoch nicht lange genug unter DD-Bedingungen gehalten um  $\tau$  konform mit den Kontrolltieren zu bestimmen.

## 3.2 Molekularbiologische Untersuchungen

### 3.2.1 Amplifikation der unbekanntenen 3'-Region des murinen Melatonin-Rezeptors Typ 2 - mMT2

Die PCR-Amplifikation des mMT2-Rezeptors wurde mit einer Vielzahl von Primerkombinationen durchgeführt, um den noch unveröffentlichten Teil der Sequenz zu erhalten.

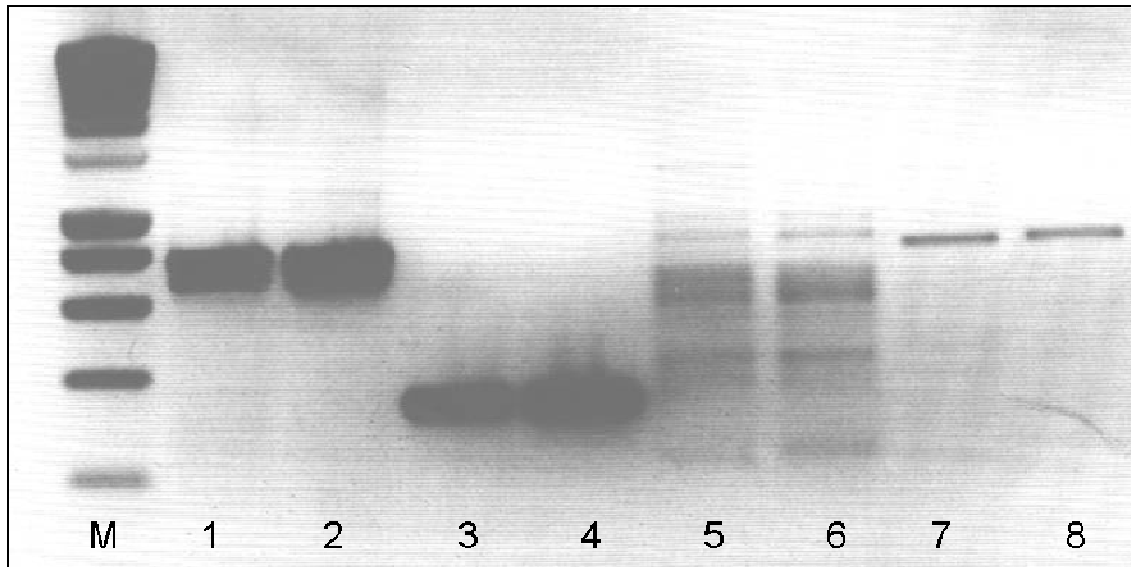


Abb.3.19: mMT2-Amplifikation aus Cerebellum cDNA einer Kontrollmaus ZT 12 mit verschiedenen Primerkombinationen. M= -200bp Größenstandard „*Smartladder*“, 1,2 Clock delta 18-Kombination, 3,4= mMT2-A-F & mMT2-A-R, 5,6 mMT2AF & -mMT2-3'UTR-A, 7,8 MT2-A-F & mMT2\_3'UTR\_B

Die PCR wurde nach einem Standardprotokoll im Robocycler durchgeführt:

Nach der Hitzeaktivierung der Polymerase wurden 35-Zyklen mit folgenden Parametern amplifiziert: 95°C 20s, 59°C 30s, 72°C 1min. In Bahn 1 & 2 wurde ein Teil des mCLOCK Transkriptes amplifiziert, hierauf wird in 3.2.3 eingegangen. Es gelang mir, in Bahn 7 & 8 abgebildet, ein putatives MT2 PCR-Produkt von etwa 800bp zu amplifizieren.

Dies geschah mit einem 5'-*Primer* aus der bekannten Sequenz (MT2-A-F) zusammen mit einem 3'-*Primer*, den ich aus genomischen DNA-Informationen konstruiert habe (mMT2\_3'UTR\_B).

Das Produkt wurde, wie im Methodenteil beschrieben, in den pDRIVE™- Vektor kloniert und Bakterien transformiert. Anschließend an die Blau/Weiss-Selektion, Übernachtkultur und der Minipräp wurde von 5'- und 3'-Richtung (mit T7 und SP6 -*Primern*) sequenziert.

Der Sequenzvergleich ergab eine 99%ige Übereinstimmung (bis auf 2 Basen) mit dem entsprechenden Genbankeintrag und ein ca. 400bp weiteres offenes Leseraster (ORF, *open reading frame*), gefolgt von einem putativen TAG-Stopcodon. Ein Sequenzvergleich ist auszugsweise im Folgenden dargestellt:


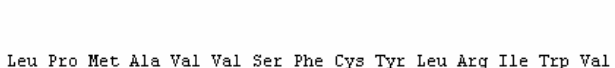



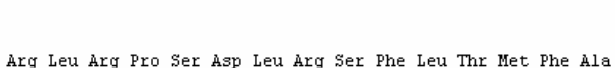

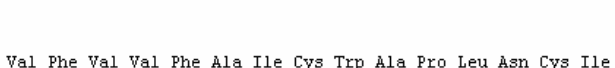
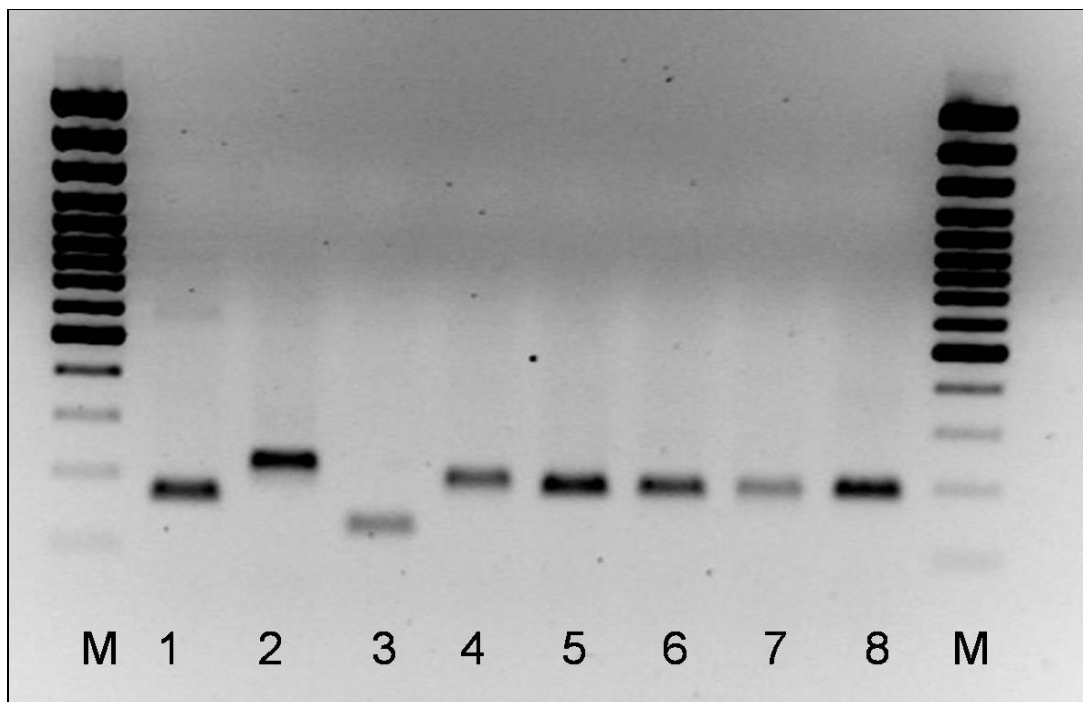
	Ala	Ser	Thr	Gln	Tyr	Thr	Ala	Ala	Val	Val	Ala	Ile	His	Phe	Leu	Majority
	200										210					
586	Ala	Ser	Thr	Gln	Tyr	Thr	Ala	Ala	Val	Val	Ala	Ile	His	Phe	Leu	MT2 complete.SEQ
586	GCC	AGC	ACA	CAG	TAC	ACG	GCA	GCT	GTG	GTG	GCC	ATC	CAC	TTC	CTC	
163	Ala	Ser	Thr	Gln	Tyr	Thr	Ala	Ala	Val	Val	Ala	Ile	His	Phe	Leu	MT2 dave.SEQ
163	GCC	AGC	ACA	CAG	TAC	ACG	GCA	GCT	GTG	GTG	GCC	ATC	CAC	TTC	CTC	
																+ Majority
																- Majority
	Leu	Pro	Met	Ala	Val	Val	Ser	Phe	Cys	Tyr	Leu	Arg	Ile	Trp	Val	Majority
	220										230					
631	Leu	Pro	Met	Ala	Val	Val	Ser	Phe	Cys	Tyr	Leu	Arg	Ile	Trp	Val	MT2 complete.SEQ
631	CTT	CCC	ATG	GCT	GTG	GTG	TCC	TTC	TGC	TAC	CTG	CGA	ATC	TGG	GTA	
208	Leu	Pro	Met	Ala	Val	Val	Ser	Phe	Cys	Tyr	Leu	Arg	Ile	Trp	Val	MT2 dave.SEQ
208	CTT	CCC	ATG	GCT	GTG	GTG	TCC	TTC	TGC	TAC	CTG	CGA	ATC	TGG	GTA	
																+ Majority
																- Majority
	Leu	Val	Leu	Gln	Ala	Arg	Arg	Lys	Ala	Lys	Ala	Thr	Arg	Lys	Leu	Majority
	230										240					
676	Leu	Val	Leu	Gln	Ala	Arg	Arg	Lys	Ala	Lys	Ala	Thr	Arg	Lys	Leu	MT2 complete.SEQ
676	CTG	GTG	CTC	CAG	GCC	CGA	AGG	AAG	GCC	AAG	GCT	ACG	AGG	AAG	CTG	
253	Leu	Val	Leu	Gln	Ala	Arg	Arg	Lys	Ala	Lys	Ala	Glu	Arg	Lys	Leu	MT2 dave.SEQ
253	CTG	GTG	CTC	CAG	GCC	CGA	AGG	AAG	GCC	AAG	GCT	GAG	AGG	AAG	CTG	
																+ Majority
																- Majority
	Arg	Leu	Arg	Pro	Ser	Asp	Leu	Arg	Ser	Phe	Leu	Thr	Met	Phe	Ala	Majority
	250										260					
721	Arg	Leu	Arg	Pro	Ser	Asp	Leu	Arg	Ser	Phe	Leu	Thr	Met	Phe	Ala	MT2 complete.SEQ
721	CGT	CTG	AGA	CCG	AGT	GAT	TTG	CGC	AGT	TTC	CTA	ACC	ATG	TTT	GCA	
298	Arg	Leu	Arg	Pro	Ser	Asp	Leu	Arg	Ser	Phe	Leu	Thr	Met	Phe	Ala	MT2 dave.SEQ
298	CGT	CTG	AGA	CCG	AGT	GAT	TTG	CGC	AGT	TTC	CTA	ACC	ATG	TTT	GCA	
																+ Majority
																- Majority
	Val	Phe	Val	Val	Phe	Ala	Ile	Cys	Trp	Ala	Pro	Leu	Asn	Cys	Ile	Majority
	260										270					
766	Val	Phe	Val	Val	Phe	Ala	Ile	Cys	Trp	Ala	Pro	Leu	Asn	Cys	Ile	MT2 complete.SEQ
766	GTG	TTT	GTG	GTT	TTT	GCC	ATA	TGC	TGG	GCC	CCC	CTC	AAC	TGT	ATC	

Abb. 3.20: Auszug aus der Sequenz AY078982 *Mus musculus* strain B6C3F1 MT2 melatonin receptor mRNA, partial cds (Resuehr & Olcese 2002) verglichen mit der (später) komplett veröffentlichten Sequenz AY145850 *Mus musculus* Mel1b melatonin receptor mRNA, complete cds (Jin et al. 2003)

In der isolierten Sequenz gibt es einen Basenaustausch von ACG → GAG, der einen Aminosäureaustausch von Threonin zu Glutamat verursacht. Das offene Leseraster ist bis zum Stopcodon intakt.

### 3.2.2 PCR-Amplifikation von Uhr-Genen im Hypothalamus der Maus

Alle in dieser Studie verwendeten PCR-Primer wurden unter Standard- und Realtime-PCR Bedingungen getestet. Die PCR-Produkte wurden gelelektrophoretisch analysiert, um die korrekte Größe des Produktes festzustellen und das Vorhandensein von störenden Nebenprodukten auszuschließen. Exemplarisch stelle ich folgende PCR-Produkte vor:



**Abb.3.21: PCR Amplifikation von Uhr-genen im Hypothalamus der Maus.** Es wurde als zu amplifizierende Matrize cDNA eines unbehandelten Kontrolltieres vom Zeitpunkt ZT 12 genommen. Amplifikation erfolgte im I-Cycler nach Standard PCR-Protokoll bei 60°C *Annealingtemperatur*. M= 100bp Größenstandard, 1 CLOCK, 2 MT1, 3 MT2, 4 Per1, 5 Per2, 6 ObRb, 7 NPY, 8 Bmal1, M

Alle für die quantitative Realtime-PCR eingesetzten Primer wurden entworfen, um PCR-Produkte mit einer Größe von 150-250bp zu erhalten. Die erwartete Produktgröße wurde für alle Primerkombinationen bestätigt.

### 3.2.3 Amplifikation des mCLOCK-Transkriptes

#### 3.2.3.1 Amplifikation des 2,4kB mCLOCK-Transkriptes aus verschiedenen peripheren Geweben

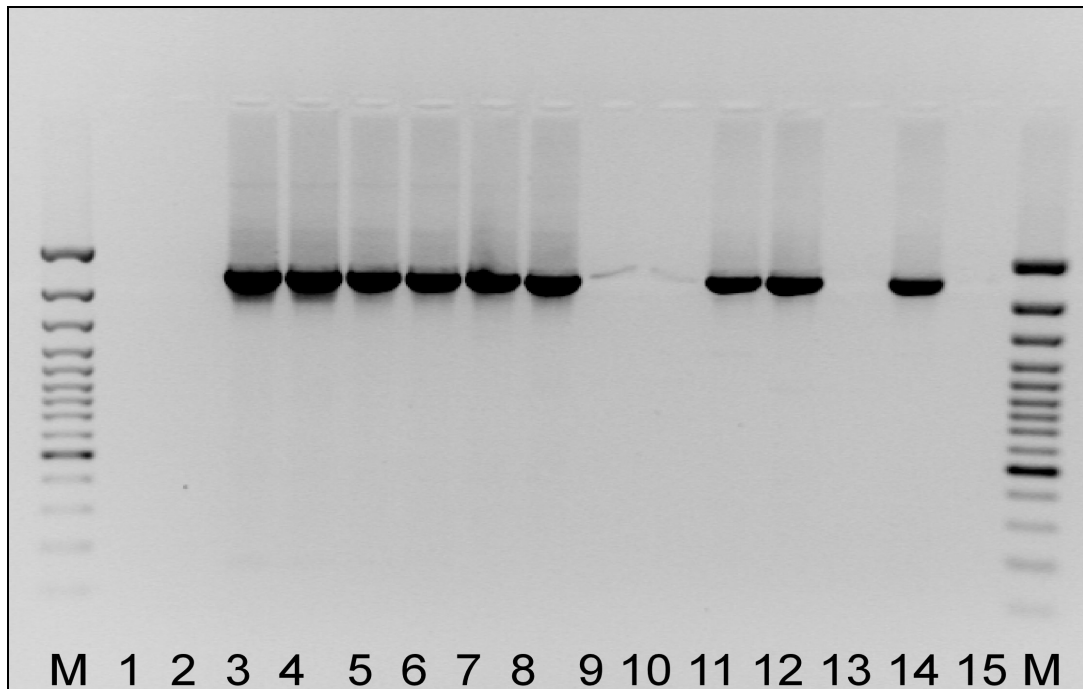


Abb.: 3.22: Expression des CLOCK 2,4 kb-Transkriptes in verschiedenen Geweben der Maus: M = 100bp Größenstandard, 1,2 Hoden, 3,4 Cerebellum, 5,6 Olfaktorische Bulbi, 7,8 Hypothalamus, 9,10 Leber, 11,12 Lunge, 13, 14 Milz, 15 Negativkontrolle

Die Amplifikation des mCLOCK Transkriptes mit der Primerkombination „mCLOCK-Total“ ergab eine spezifische 2,4kb Bande in allen untersuchten Geweben bis auf Hoden und in einer Probe Milz. Nach mehrmaliger Wiederholung mit verschiedenen Hoden und Milz cDNAs konnte das Amplifikat aus Milz, in keinem Fall aber aus Hoden amplifiziert werden. Die Expression des Transkriptes in der Leber scheint sehr gering zu sein. Die PCR wurde nach leicht modifiziertem Protokoll im Robocycler durchgeführt:

95°C 30s, 59°C 30s, 72°C 2min - 35 Zyklen

### 3.2.3.2 Amplifikation einer Spleißvariante des mCLOCK Transkriptes aus verschiedenen Geweben

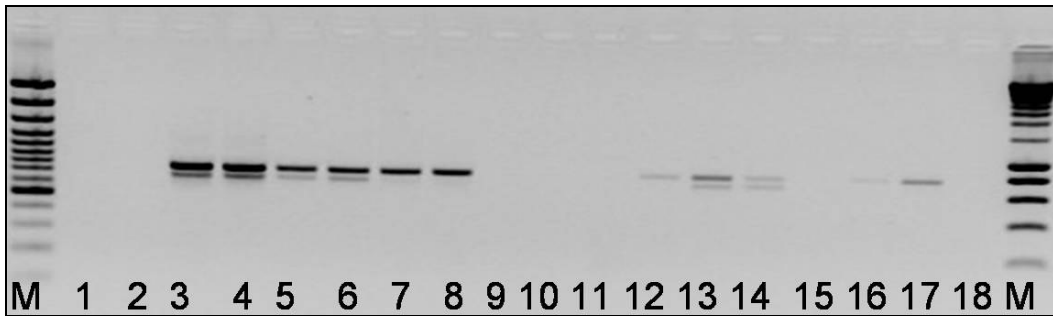


Abb.3.23: Expression einer Spleißvariante in verschiedenen Geweben der Maus: M= 100bp Groessenstandard. 1,2 Hoden, 3,4 Cerebellum, 5,6,Olfaktorische Bulbi, 7,8 Milz, 9,10 Leber, 11,12 Lunge, 13,14 Hypothalamus, 15,16 Herz, 17 Niere, 18 Negativkontrolle,

Nach der Hitzeaktivierung der Polymerase wurden 35-Zyklen mit folgenden Parametern amplifiziert: 95°C 20s, 59°C 30s, 72°C 1min.

Die Amplifikation des mCLOCK Transkriptes mit der Primerkombination „Clock delta 18“ ergab in einigen Geweben eine Doppelbande. Die größere Bande war 760bp groß und entsprach der berechneten Produktgröße. Die kleinere Bande war ca. 90 Basen kleiner. Die Doppelbanden konnten nur aus neuronalem Gewebe amplifiziert werden. In nicht-neuronalen Geweben wurde immer nur eine distinkte Bande amplifiziert. Entgegen der vorherigen PCR mit einer anderen Primerkombination, konnte mit diesen Parametern kein CLOCK-Transkript aus der Leber amplifiziert werden.

Beide PCR-Produkte wurden, wie im Methodenteil beschrieben, gereinigt, kloniert und nach Minipräp sequenziert. Beide Sequenzen ergaben 100% Homologie zum Eintrag vom murinen CLOCK Transkript (NM-007715). Allerdings wurde eine Deletion von 90 Basen gefunden. Das *Alignment* (Sequenzvergleich) mit der genomischen DNA in der Gendatenbank ergibt folgendes Schema:

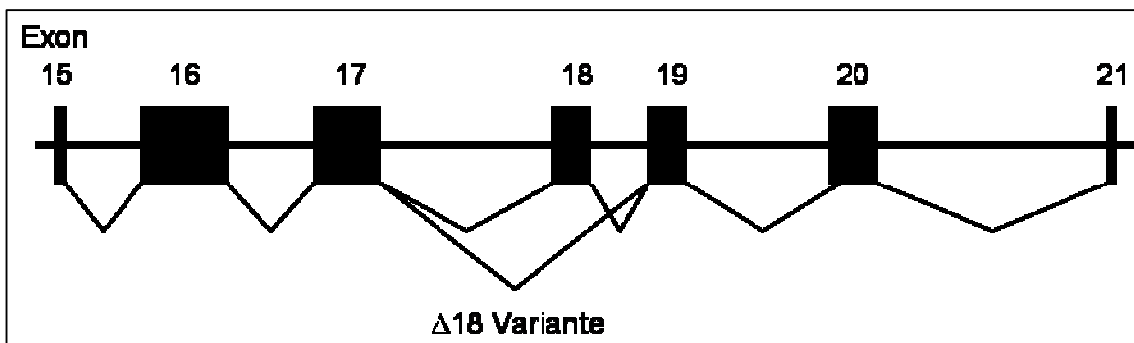
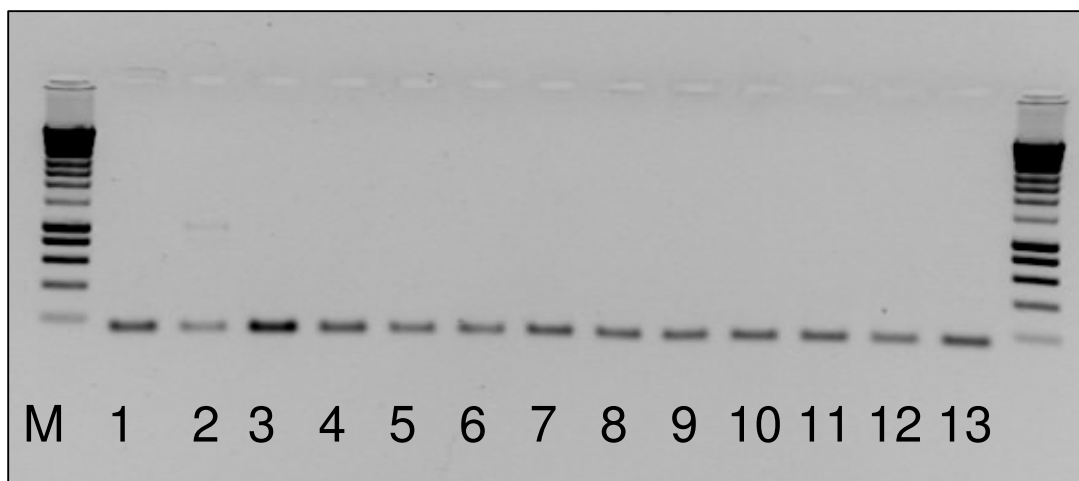


Abb.3.24: mCLOCK  $\Delta 18$ -Spleißvariante: Ausschnitt aus dem genomischen Aufbau des murinen CLOCK-Transkriptes, Exon 18 wird im Mäusestamm B6C3F1 alternativ gespleißt.

Die identifizierte  $\Delta 18$ -Spleissvariante habe ich in der Genbank unter folgendem Eintrag veröffentlicht: AY118227 *Mus musculus* CLOCK mRNA, partial cds, alternatively spliced (Resuehr & Olcese 2002). Als Referenzsequenz diente NM\_007715 *Mus musculus* circadian locomoter output cycles kaput (Clock), mRNA (Wilsbacher et. al., 2000).

### 3.2.4 Kontroll-PCR mit Haushaltsgen-*Primern*



**Abb.3.25: Kontroll PCR mit HPRT Primern in verschiedenen Geweben der Maus: M = 200bp Größenstandard, 1,2 Hoden, 3,4 Cerebellum, 5,6 olfaktorische Bulbi, 7,8 Hypothalamus, 9,10 Leber, 11,12 Lunge, 13 Milz**

In allen mit Haushaltsgenprimern getesteten cDNAs ließ sich eine spezifische Bande von 180bp (HPRT-Primer) amplifizieren. Bei der Nutzung von RP27 Primern (ICycler®) wurde entsprechend ein 300bp Produkt amplifiziert.

Weitere Gelelektrophoresen mit Haushaltsgen-PCRs und Negativkontrolle wurden durchgeführt, auf die Darstellung weiterer Ergebnisse dieser Art wird verzichtet, da sie keinen weiteren explikativen Wert haben - die Negativkontrollen waren immer negativ.

### 3.3 *Microarray*-Untersuchungen an der Leber der Maus

Die gewonnenen Daten beziehen sich nur auf einen Zeitpunkt des circadianen Tages: ZT 6.

Die *Microarray*-Untersuchung an der Leber von Mäusen diente zum Test der Methode. Alle Graphen werden von mir in Relation zu Kontrolltieren dargestellt. Ein Wert von 1 bzw. -1 ist unverändert gegenüber Kontrolltieren. Zur vereinfachten Darstellung habe ich die abregulierten Transkripte negativ eingezeichnet.

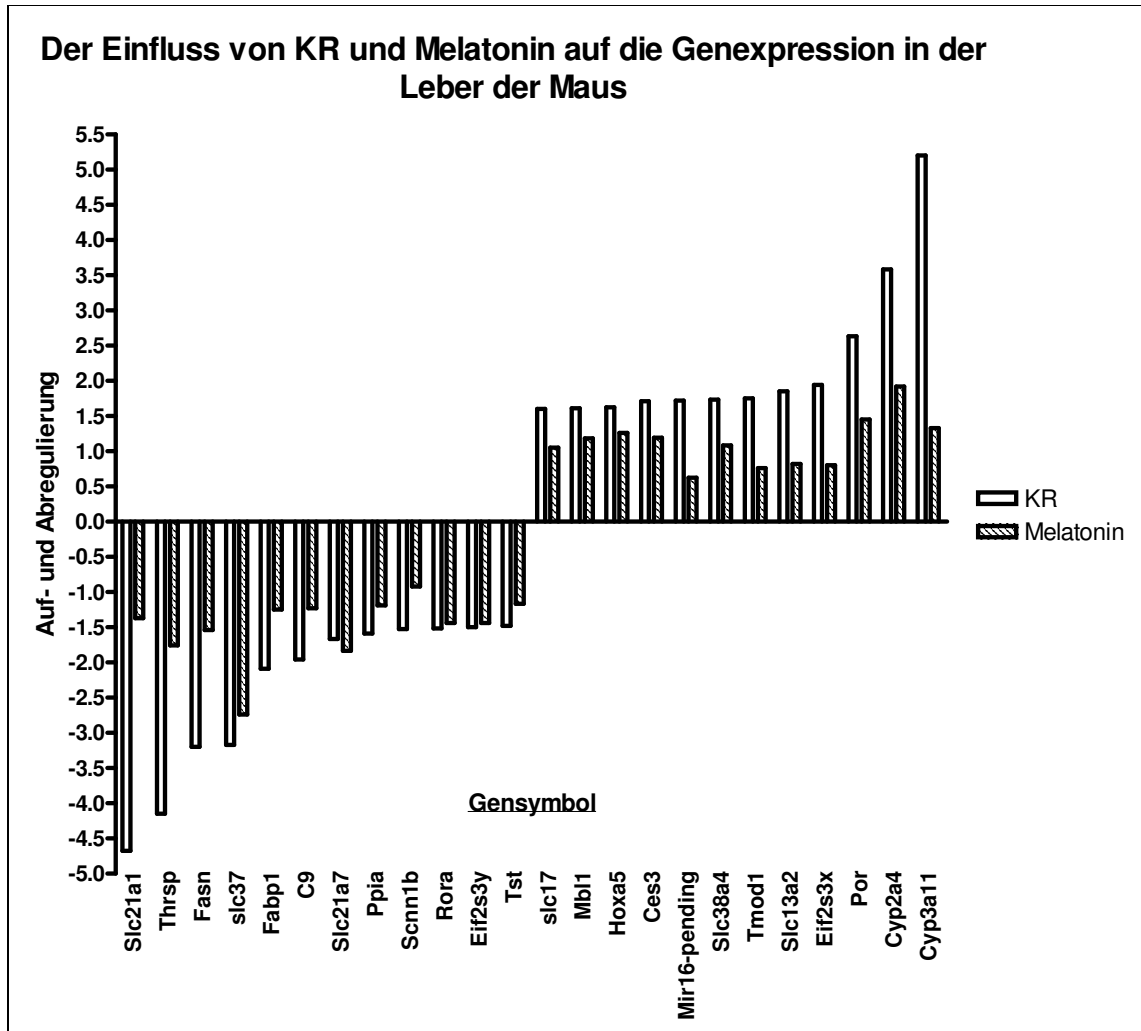


Abb.: 3.26: Darstellung von Lebertranskripten die durch KR Maximal auf- oder abreguliert wurden.

Als Schwellenwert habe ich 50% Zu- oder Abnahme der Genexpression gewählt ( $\pm 1,5$ -Fach). Es wurde ebenfalls zu jedem durch die Behandlung (KR oder MT) beeinflussten Transkript der Effekt der alternativen Behandlung auf dieses Transkript mit dargestellt.

Die stärksten differentiellen Transkripte in der Leber der Maus sind durch KR >5-Fach auf bzw. >4,5-Fach herabreguliert.

Die drei am stärksten durch KR aufregulierten Transkripte in der Leber gehören zu den mitochondrialen Cytochromoxidasen. Eine davon, Cyp3a11 ist induzierbar durch Steroidhormone wie Testosteron (Lindberg et al. 1988). Am stärksten herabreguliert sind eine Reihe von Transportmolekülen, die am Transport von organischen Anionen in die Hepatozyten beteiligt sind. Der Transporter Slc21a1 ist an der Bildung von Gallensalzen beteiligt (Wolters et al. 2002). Außerdem ist eine Fettsäuresynthetase (Fasn) und ein fettsäurebindendes Protein (Fabp1) herabreguliert. Ein durch Schilddrüsenhormon regulierbares Transkript der Leber (SPOT14, Grillasca et al.,1997) ist ebenfalls stark (>4-Fach) herabreguliert.

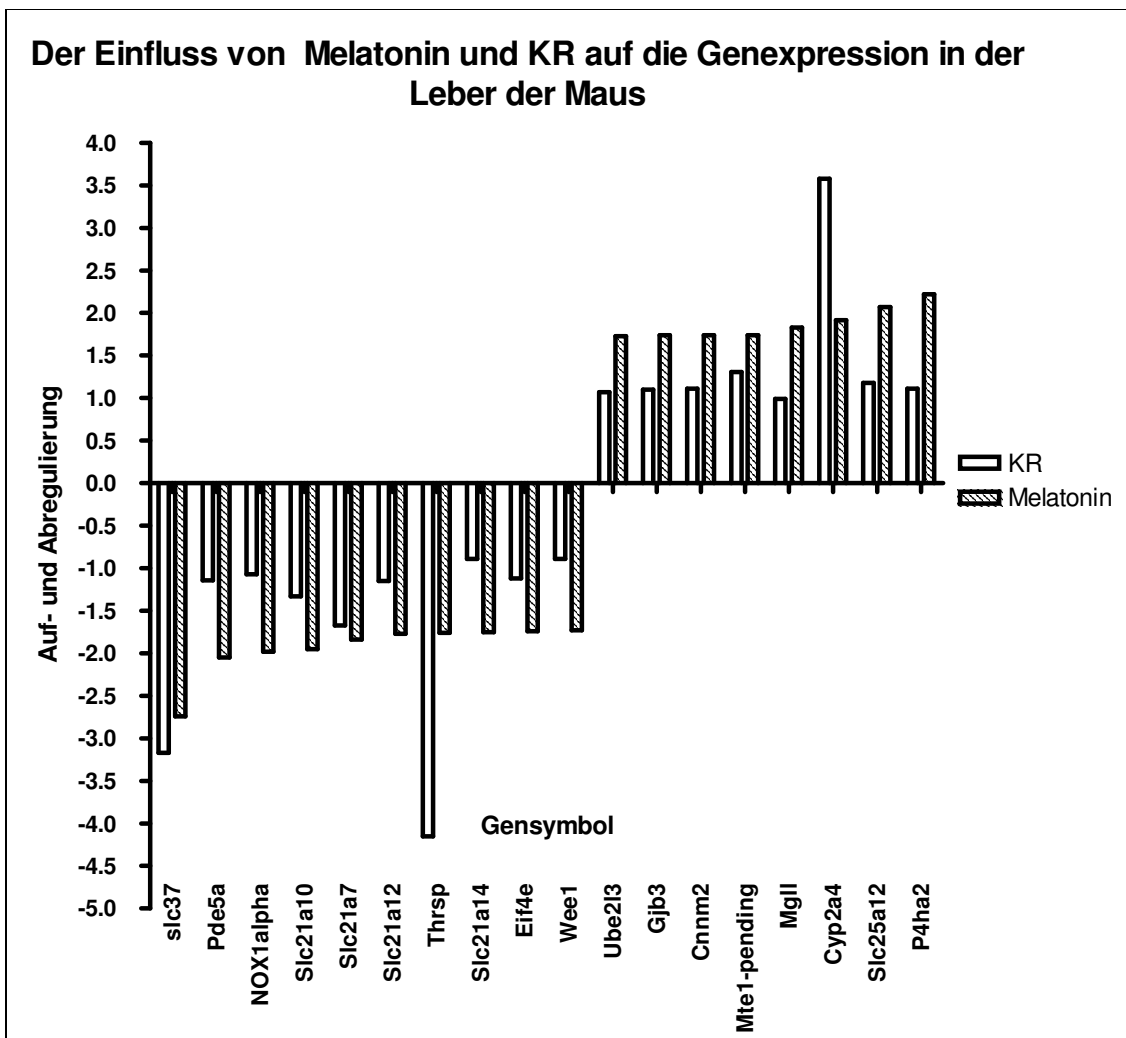


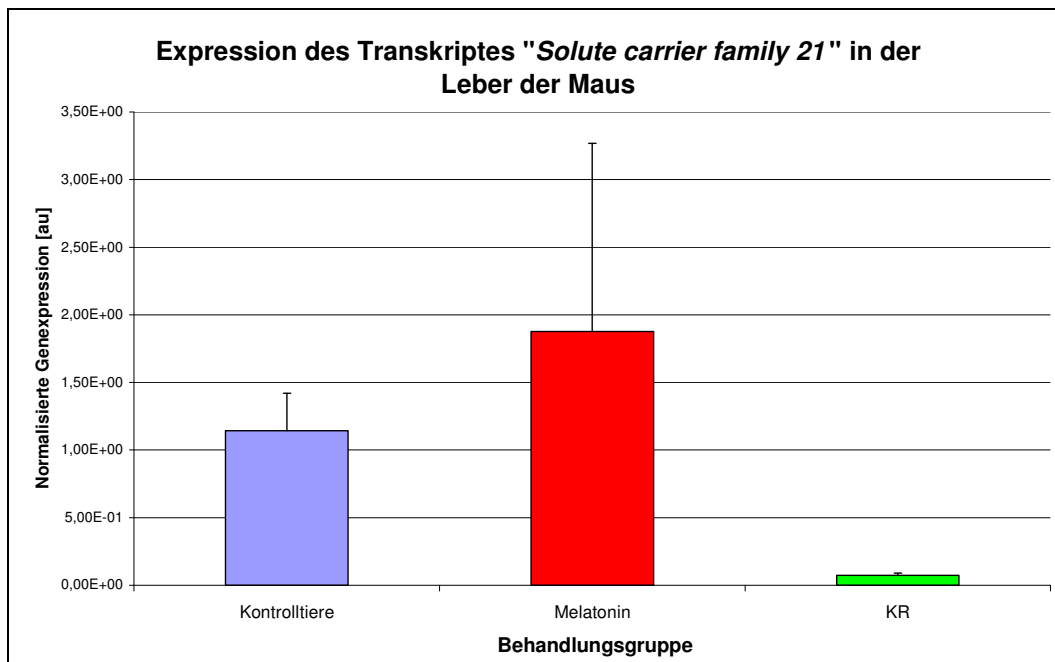
Abb. 3.27: Darstellung von Lebertranskripten, die durch Melatoninsubstitution maximal auf- oder abreguliert wurden

Die durch Melatonin regulierten Transkripte sind maximal 2,5-fach auf- und 3,2-fach abreguliert. Zu den am stärksten aufregulierten Transkripten zählen P4ha22-(oxoglutarate 4-dioxygenase) und Slc25a12, ein mitochondriales Transportmolekül. Sechs der herabregulierten Transkripte kodieren für Transportmoleküle.

Einige Transkripte scheinen von Melatonin und KR zwar nicht gleichstark, jedoch in dieselbe Richtung reguliert zu werden. Das prominenteste Beispiel hierfür ist Cyp2a4 für Aufregulierung, oder Thrsp für Abregulierung.

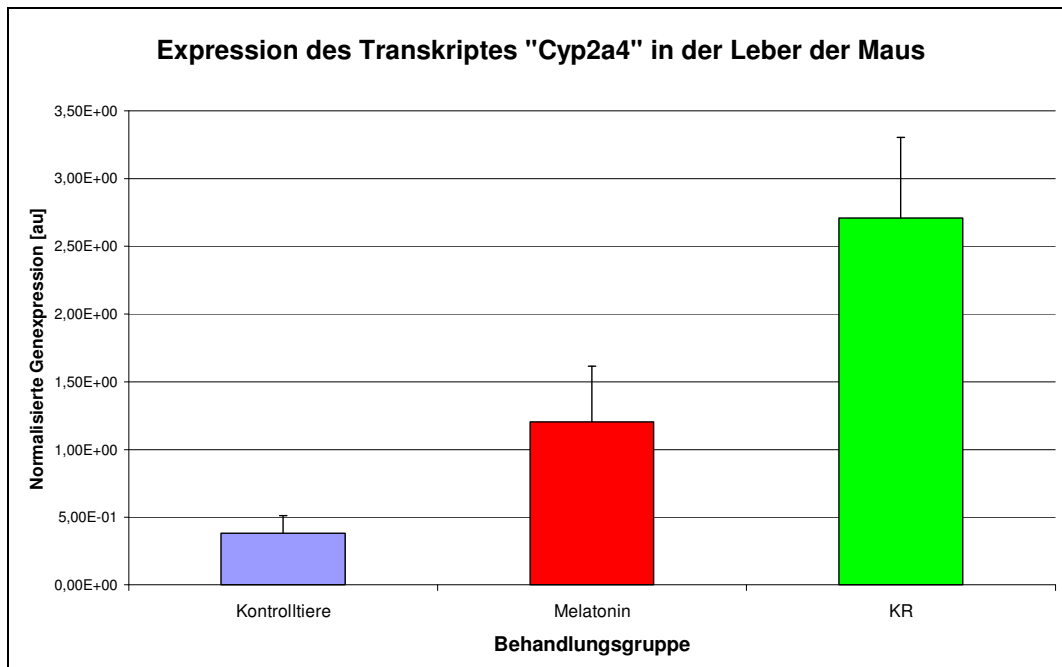
### 3.3.1 Bestätigung der *Microarray*-Ergebnisse mit Realtime-PCR

Um die Richtigkeit der *Microarray*-Ergebnisse zu bestätigen, wurden ein paar ausgewählte Transkripte mit Realtime-PCR postevaluiert.



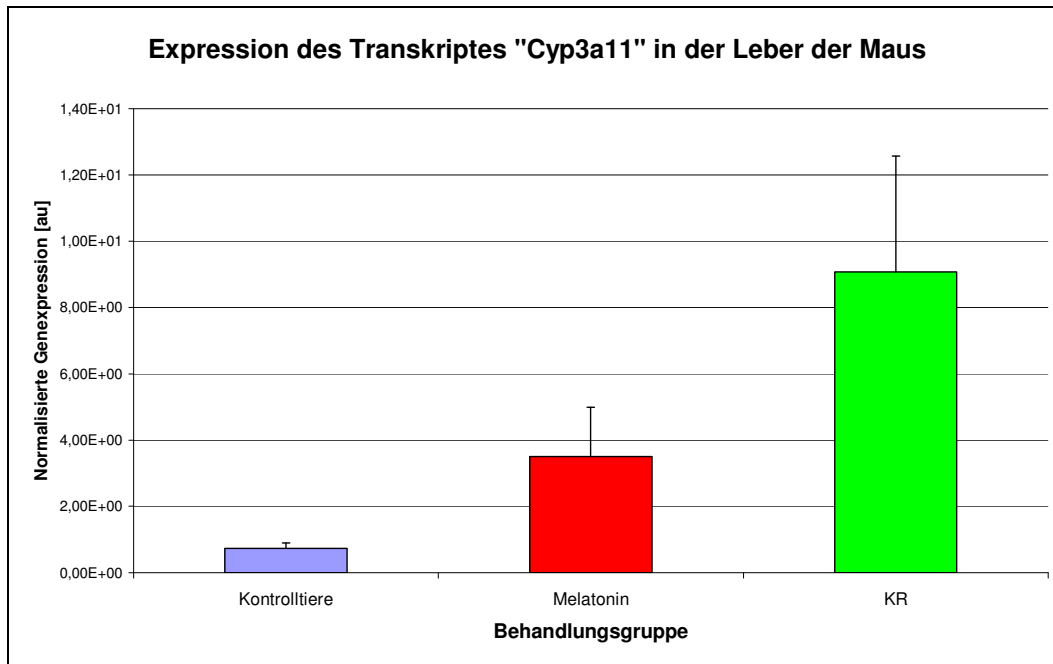
**Abb.3.28: Realtime-PCR-Expression des Transkriptes Slc21a1, NM\_013797 solute carrier family 21 (organic anion transporter) in der Leber der Maus .N=4 pro Gruppe, ZT6.**

Die Richtung der Beeinflussung des abgebildeten Transkriptes stimmte mit den *Microarray*-Ergebnissen überein. Zwischen Melatonin-substituierten und Kontrolltieren konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden. Die KR Tiere hingegen wiesen eine noch viel geringere Expression dieses Transkriptes auf, als durch das *Microarray*-Ergebnis zu erwarten gewesen wäre. Die Expression lag verglichen zu den Kontrolltieren mehr als 11-14-fach niedriger. Verglichen zu den Melatonin-substituierten Tieren (aufgrund der hohen Standardabweichung bei der MT) bei 7-26-fach niedriger.



**Abb.3.29: Realtime-PCR-Expression des Transkriptes Cyp2a4, NM\_009997, cytochrome P450, 2a4 (Cyp2a4) mRNA in der Leber der Maus. N=4 pro Gruppe**

Die Postevaluierung des Transkriptes Cyp2a4 ergab, dass auch hier die durch *Microarray* detektierbare Regulierung unterschätzt wird. In der *Microarray*-Untersuchung ist das Transkript etwa 3,5-fach (KR) und 2-fach (Melatoninsubstitution) heraufreguliert. Realtime-PCR ergibt eine stärkere Aufregulierung von 6-9-fach (KR) bzw. 2-4-fach Melatoninsubstitution



**Abb.3.30: Realtime-PCR- Expression des Transkriptes Cyp3a11, NM\_007818, cytochrome P450, steroid inducible 3a11 in der Leber der Maus. N=4 pro Gruppe**

Das Transkript Cyp3a11 ist durch KR am stärksten beeinflusst. Die durch Realtime-PCR ermittelte Expression lag bei 7-13-fach höher bzw. 4-6-fach (Melatoninsubstitution).

In der unten abgebildeten Tabelle sind alle durch *Microarray*-Untersuchungen in der Leber als signifikant (durch KR oder Melatonin) regulierten Transkripte notiert.

Genname	Accession	Name
C9	NM_013485	complement component 9 (C9), mRNA.
Ces3	NM_053200	carboxylesterase 3 (Ces3), mRNA.
Cnnm2	NM_033569	cyclin M2 (Cnnm2), mRNA.
Cyp2a4	NM_009997	cytochrome P450, 2a4 (Cyp2a4), mRNA.
Cyp3a11	NM_007818	cytochrome P450, steroid inducible 3a11 (Cyp3a11),
Eif2s3x	NM_012010	eukaryotic translation initiation factor 2, subunit 3,
Eif2s3y	NM_012011	eukaryotic translation initiation factor 2, subunit 3,
Eif4e	NM_007917	eukaryotic translation initiation factor 4E (Eif4e),
Fabp1	NM_017399	fatty acid binding protein 1, liver (Fabp1), mRNA.
Fasn	AF127033	fatty acid synthase mRNA, complete cds.
Gjb3	NM_008126	gap junction membrane channel protein beta 3 (Gjb3),
Hoxa5	NM_010453	homeo box A5 (Hoxa5), mRNA.
Mbl1	NM_010775	mannose binding lectin, liver (A) (Mbl1), mRNA.
Mgll	NM_011844	monoglyceride lipase (Mgll), mRNA.
Mir16-pending	NM_019580	membrane interacting protein of RGS16 (Mir16-pending),
Mte1-pending	NM_134188	mitochondrial acyl-CoA thioesterase 1 (Mte1-pending),
NOX1alpha	NM_172203	NADPH oxidase 1 alpha (NOX1alpha), mRNA.
P4ha2	NM_011031	procollagen-proline, 2-oxoglutarate 4-dioxygenase

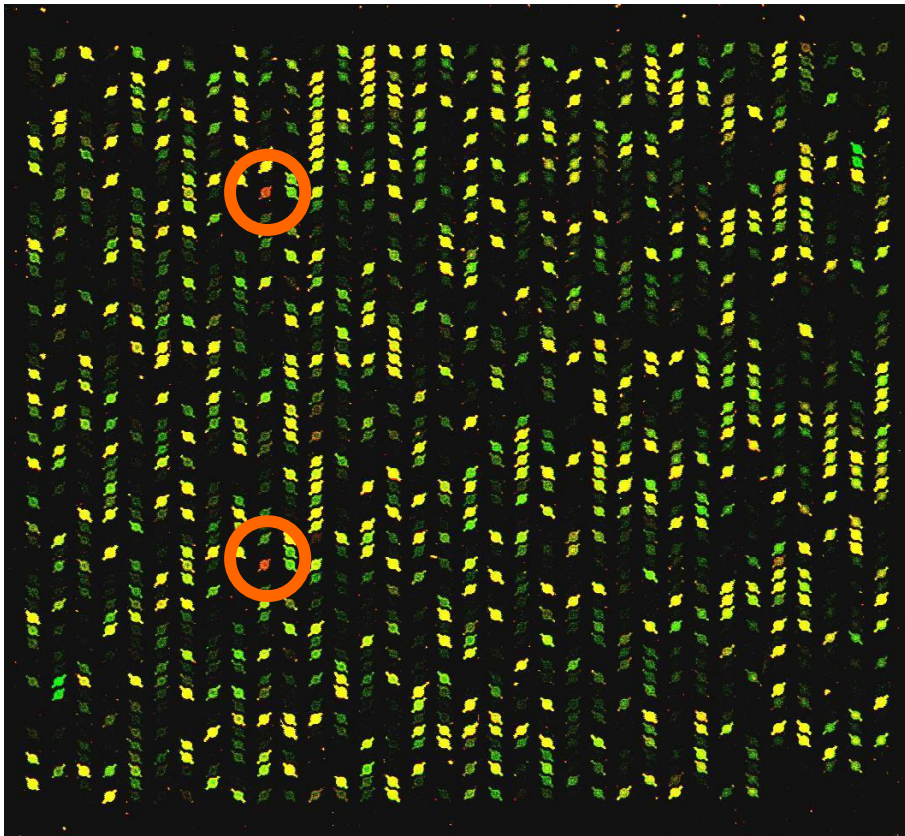
Pde5a	NM_153422	cGMP-binding/cGMP-specific phosphodiesterase (Pde5a),
Por	NM_008898	P450 (cytochrome) oxidoreductase (Por), mRNA.
Ppia	NM_008907	peptidylprolyl isomerase A (Ppia), mRNA.
Rora	NM_013646	RAR-related orphan receptor alpha (Rora), mRNA.
Scnn1b	NM_011325	sodium channel, nonvoltage-gated 1 beta (Scnn1b),
Slc13a2	NM_022411	solute carrier family 13 (sodium-dependent
slc17	BC028989	Mus musculus, Similar to solute carrier family 17 (sodium-dependent
Slc21a1	NM_013797	solute carrier family 21 (organic anion transporter),
Slc21a10	NM_020495	solute carrier family 21 (organic anion transporter),
Slc21a12	NM_148933	solute carrier family 21 (organic anion transporter),
Slc21a14	NM_021471	solute carrier family 21 (organic anion transporter),
Slc21a7	NM_130861	solute carrier family 21 (organic anion transporter),
Slc25a12	NM_172436	solute carrier family 25 (mitochondrial carrier,
slc37	NM_153062	solute carrier family 37 (glycerol-3-phosphate
Slc38a4	NM_027052	solute carrier family 38, member 4 (Slc38a4), mRNA.
Thrsp	NM_009381	thyroid hormone responsive SPOT14 homolog (Rattus)
Tmod1	NM_021883	tropomodulin 1 (Tmod1), mRNA.
Tst	NM_009437	thiosulfate sulfurtransferase, mitochondrial (Tst),
Ube2l3	NM_009456	ubiquitin-conjugating enzyme E2L 3 (Ube2l3), mRNA.
Wee1	NM_009516	wee 1 homolog (S. pombe) (Wee1), mRNA.

**Tab. 3.1:** Auflistung der durch KR und Melatonin in der Leber maximal auf- oder abregulierten Transkripte. Es sind Gensymbol, Genbank-Nummer (*Accession number*) und die Beschreibung des jeweiligen Genes aufgelistet.

25,6% dieser Transkripte gehören in die Klasse der Transportmoleküle, die z.B. Anionen oder Kationen über die Hepatozytenmembran transportieren können. 10,2% haben mit dem Fettsäurestoffwechsel zu tun und 7.6% gehören zu den P450 Cytochromoxidasen.

### **3.4 Analyse circadian variierender Transkripte im Hypothalamus der Maus mittels *Microarrays***

Von jeder Gruppe von Tieren wurden pro zu untersuchendem Zeitpunkt die RNA-Populationen (fünf RNA-Proben pro Gruppe und Zeitpunkt) gemischt (*gepoolt*). Diese wurden wie im Methodenteil beschrieben fluoreszenzmarkiert und auf Xeotron<sup>®</sup>-*Microarrays* hybridisiert. Nach Ermittlung der Fluoreszenzdaten durch Laserauswertung war es möglich, in Falschfarben dargestellte Überlagerungsbilder herzustellen.



**Abb.3.31: Vergrößertes Bild eines DNA-Microarrays. Sichtbare Farbkanäle: Grün Kontrollmaus Hypothalamus ZT0 (06:00 Uhr), Rot Kontrollmaus Hypothalamus ZT6 (12:00Uhr). Gelbe Punkte sind grün und rot überlagert, also nicht differentiell exprimierte Gene.**

In der obigen Abbildung sind nur 2 der vier gescannten Kanäle überlagert dargestellt. ZT0 wurde grün, ZT6 rot abgebildet. Die beiden markierten, dominant roten Spots sind Duplikate des Transkriptes Insulin Rezeptor (Insr, accession Nummer NM\_010568). Es scheint also um ZT6 verglichen mit ZT0 eine schon optisch sichtbar, höhere Expression dieses Transkriptes vorzuliegen. Alle weiteren Ergebnisse werden immer auf ZT0 bezogen, also relativ zu ZT0 innerhalb der untersuchten Gruppe dargestellt.

*Microarray*-Daten müssen normalisiert werden. Dies ist notwendig, falls unterschiedliche Mengen Sonden benutzt wurden, die gewählten Farbstoffe unterschiedliche Fluoreszenzeigenschaften haben oder es bei der Markierung der Sonden unterschiedliche Effizienzen gibt.

Eine Normalisierung der Daten durch das Lowess-Verfahren ermöglicht es, einen so genannten MA-Plot darzustellen. Beim Lowess (*Locally weighted scatter smoothing*) wird eine lokal begrenzte quadratische Regression über den gesamten Datensatz gefahren. Hierfür ist extreme Rechnerleistung erforderlich.

Die Methode hat den Vorteil, dass eine Parameter-unabhängige Regression von Daten gemacht werden kann, deren Verlauf sich nicht anhand von Regressionsformeln beschreiben lässt.

Da die Wahl der Fluoreszenzfarbstoffe konsistent war (ZT 0, 6, 12, 18 immer Alexa 555, 594, 647, 488) konnte folgender Zusammenhang zwischen gewähltem Fluorophor und Effizienz der Fluoreszenzmarkierung festgestellt werden:

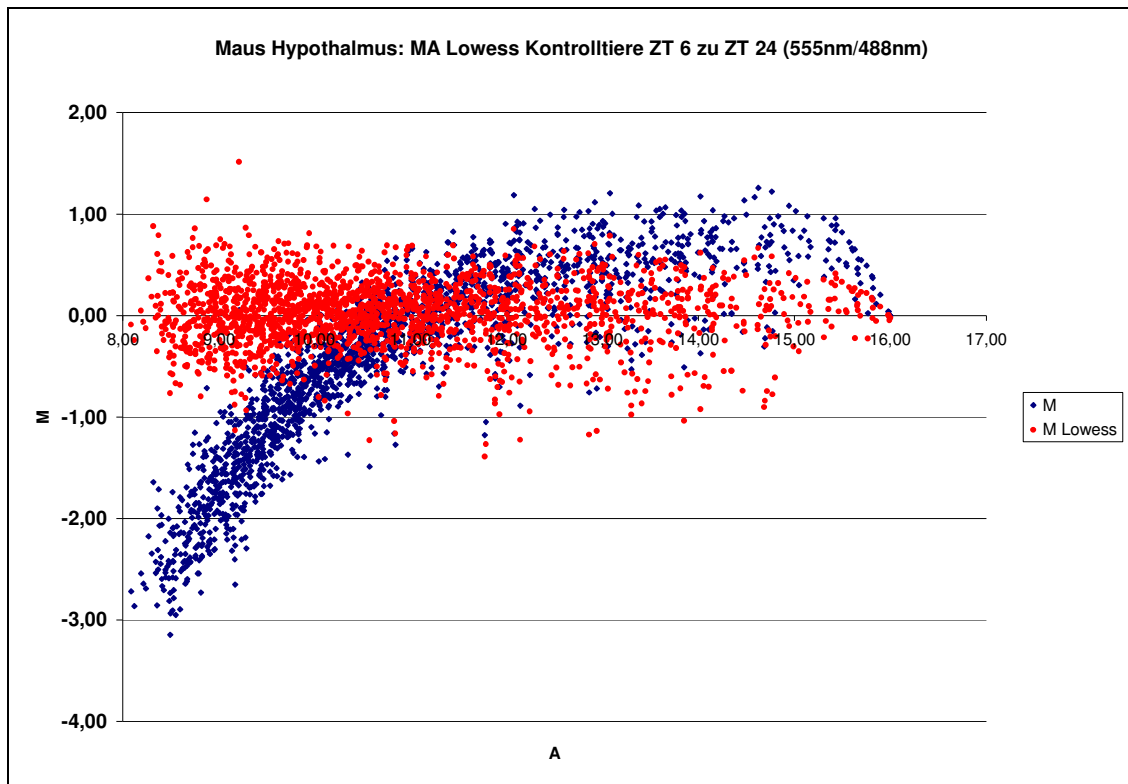


Abb. 3.32: MA-Plot von Alexa 555 zu Alexa 488 hybridisierten Sonden

Der abgebildete MA-Plot stellt die Differenz in der Intensität der Fluoreszenz zwischen den beiden untersuchten Kanälen (M) in Abhängigkeit von der Fluoreszenzintensität (A) dar. Hier konnte festgestellt werden, dass es eine sehr starke Krümmung (blau dargestellt) bei der Verwendung des Alexa 488 Fluoreszenzfarbstoffes gab. Zwar liegt die normalisierte Verteilungswolke (rot) auf der X-Achse, es musste aber sehr stark normalisiert werden. Dies ist ein Indikator für eine unterschiedliche Effizienz oder Menge an markierter Sonde. Da dies zu falsch-positiven oder falsch-negativen Resultaten führen kann, entschied ich mich, alle bisher Alexa 488 markierten Sonden (also immer ZT 18 bei den drei untersuchten Gruppen) auf einem separaten *Microarray* zu wiederholen.

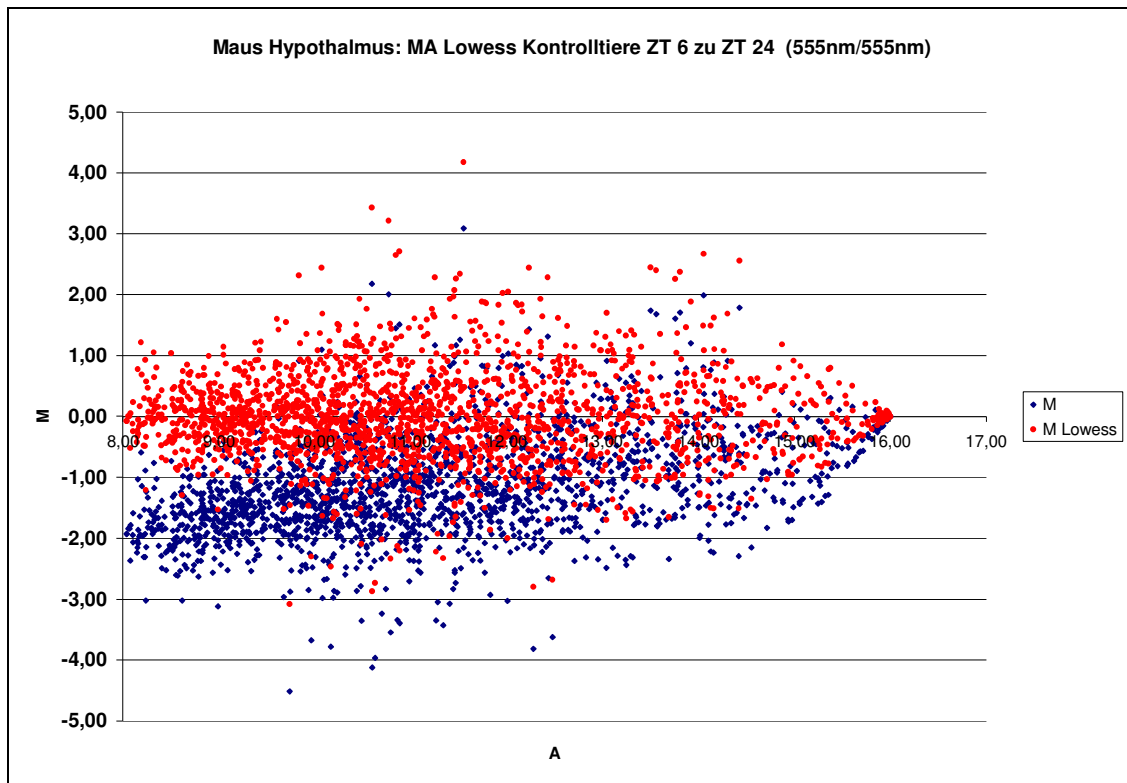


Abb. 3.33: MA-Plot von Alexa 555 zu Alexa 555 hybridisierten Sonden – vergleich von getrennten *Microarray* Experimenten.

Nach Tausch des Fluoreszenzfarbstoffes Alexa 488 gegen einen jeweils anderen und einer Wiederholung der Hybridisierung, war festzustellen (Abb.3.33), dass die starke Kurvenkrümmung aus Abb.3.32 verschwunden war. Diese Daten wurden für weitere Analysen verwendet.

### 3.4.1 *Microarray*-Untersuchung von circadian regulierten Transkripten im Hypothalamus von Kontrollmäusen

Nach erfolgter Hybridisierung, wurden die stärksten und schwächsten Transkripte ausgewählt und graphisch dargestellt. Die Reizschwelle betrug hierbei  $<0,55$  bzw.  $>1,80$ -Fach circadian reguliert. Ferner wurden die Mittelwerte von allen duplizierten Klonen auf den *Microarrays* gebildet (s. Abb. 3.31).

Nur wenn die Standardabweichung zwischen den Duplikaten geringer als 10% war, wurden sie ausgewählt. Eine Tabelle mit Gennamen und Beschreibungen befindet sich am Ende dieses Kapitels (Tab. 3.2).

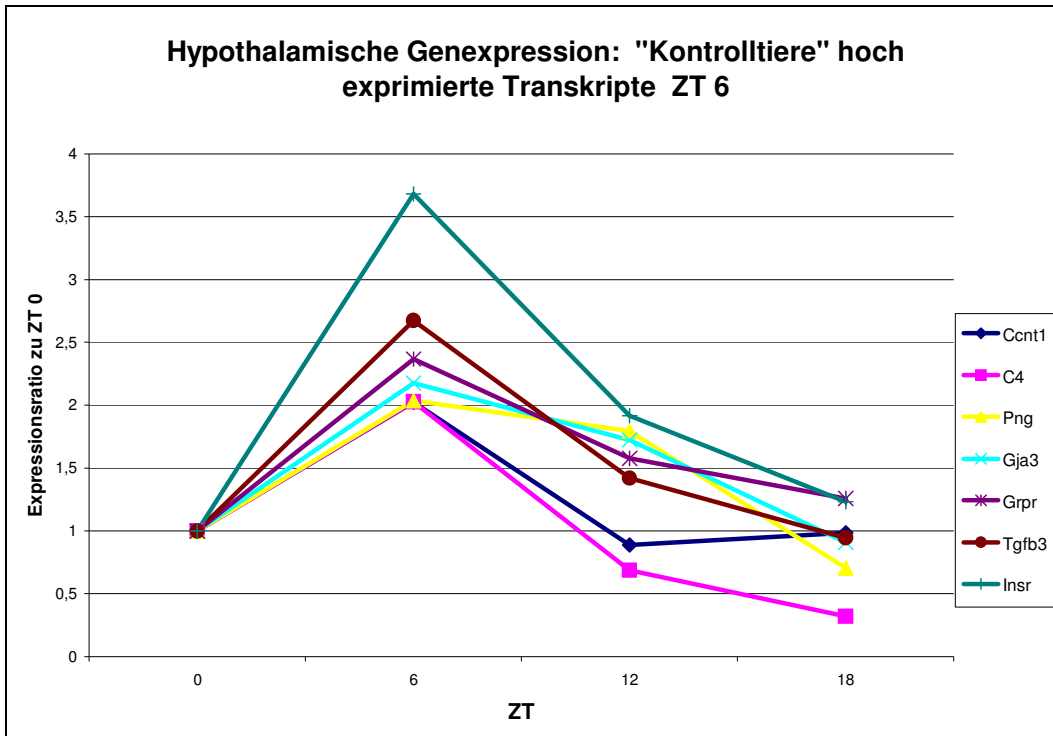


Abb.3.34: Im Hypothalamus von Kontrolltieren um ZT 6 stark exprimierte Transkripte

Zu den am stärksten aufregulierten Transkripten an ZT 6 gehörten ein Insulinrezeptor, ein Rezeptor für das „gastrin releasing peptide“ und Tgf beta 3 (ein Wachstumsfaktor).

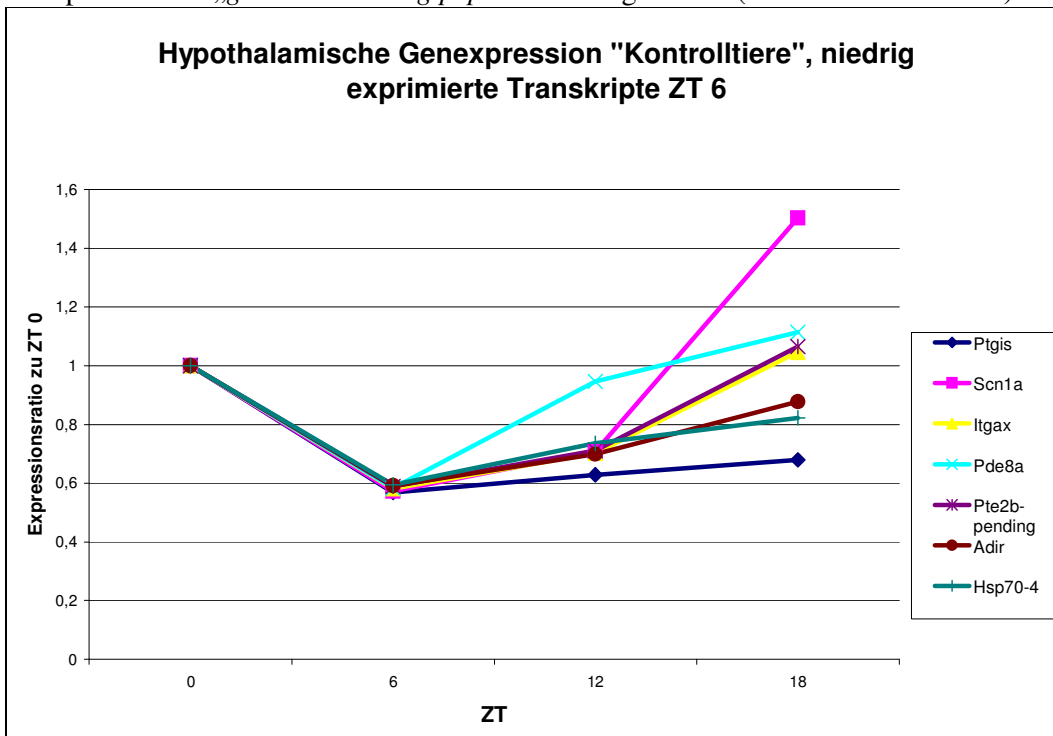


Abb.3.35: Im Hypothalamus von Kontrolltieren um ZT 6 gering exprimierte Transkripte

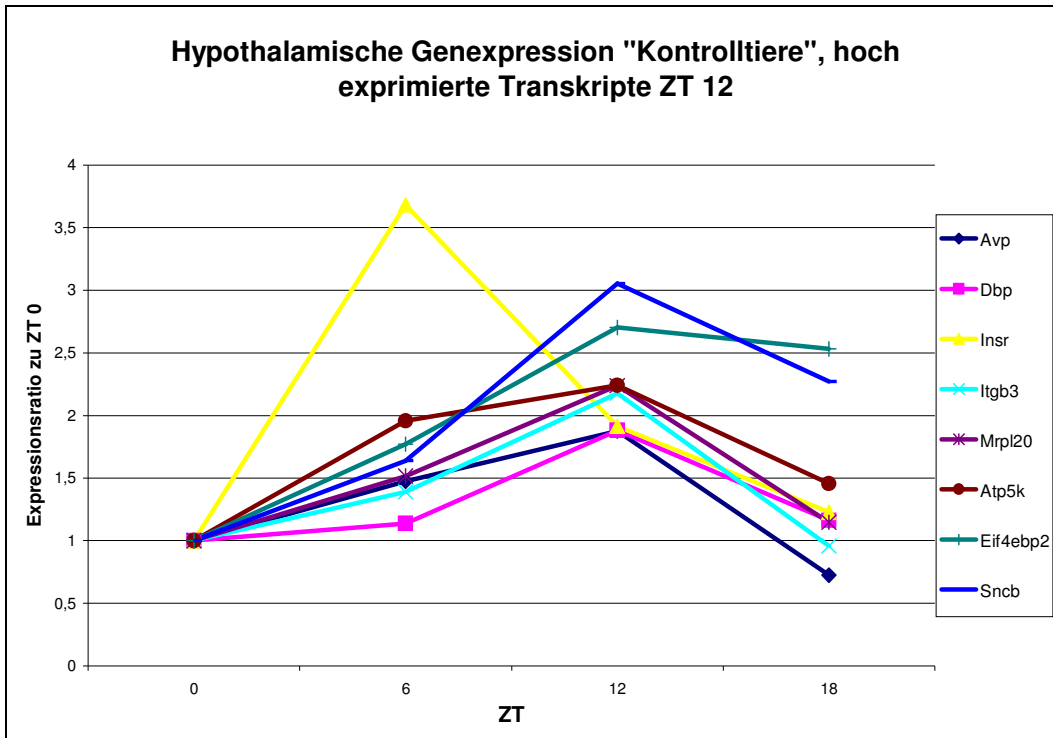


Abb.3.36: Im Hypothalamus von Kontrolltieren um ZT 12 stark exprimierte Transkripte

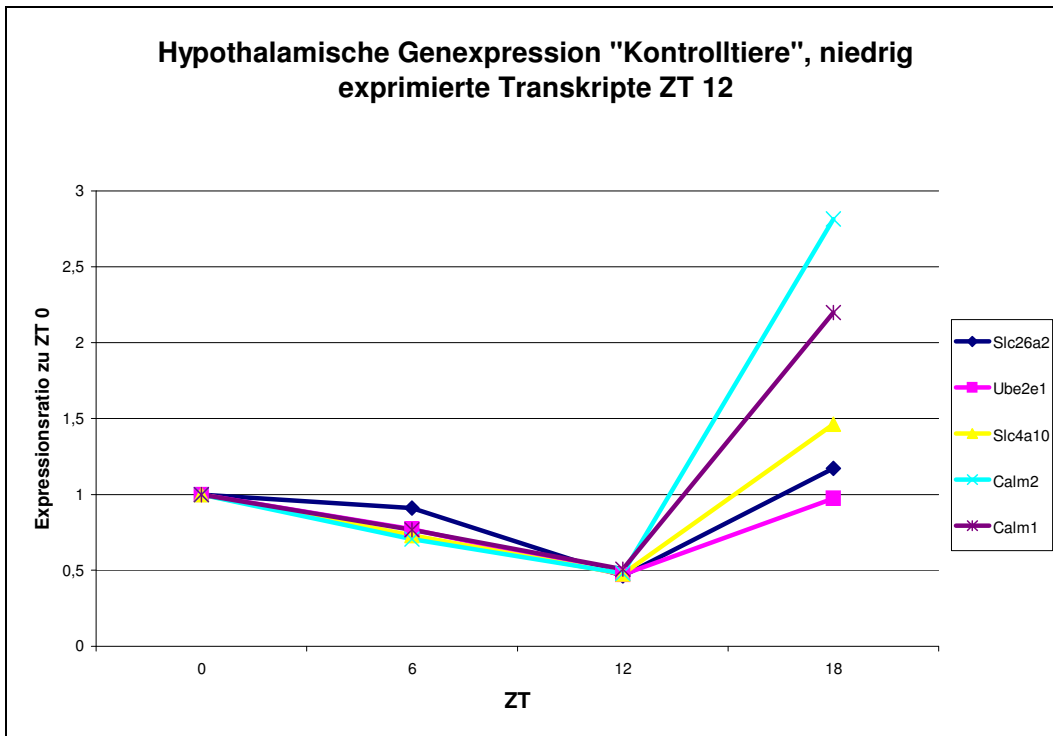


Abb.3.37: Im Hypothalamus von Kontrolltieren um ZT 12 gering exprimierte Transkripte

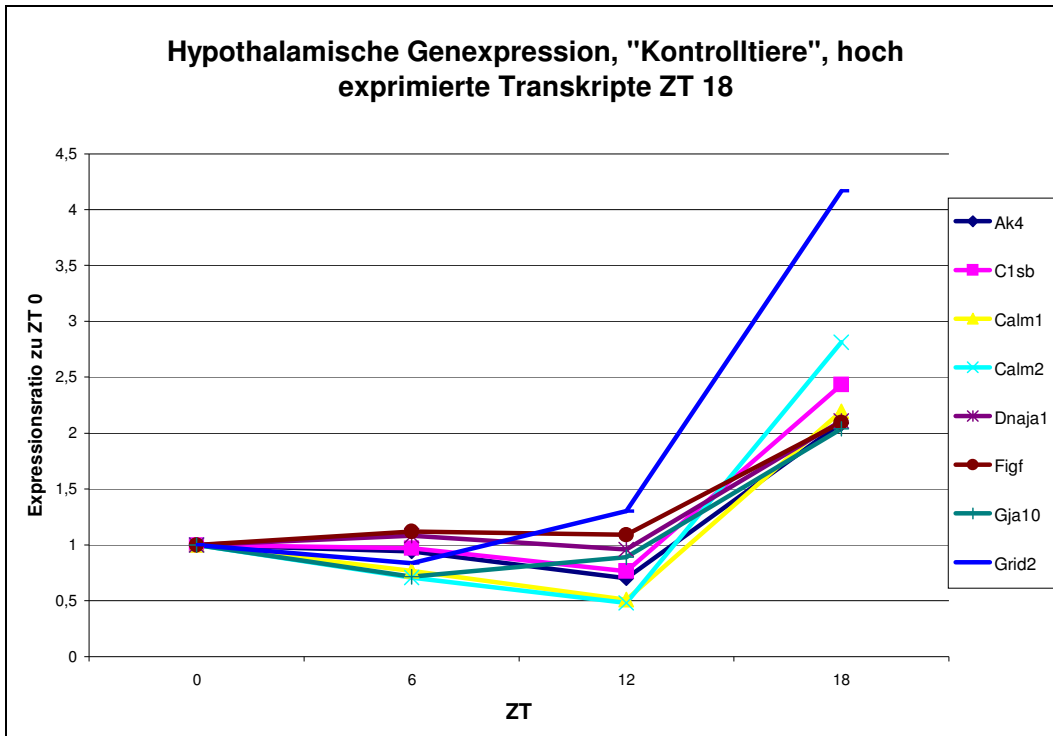


Abb.3.38: Im Hypothalamus von Kontrolltieren um ZT 18 stark exprimierte Transkripte

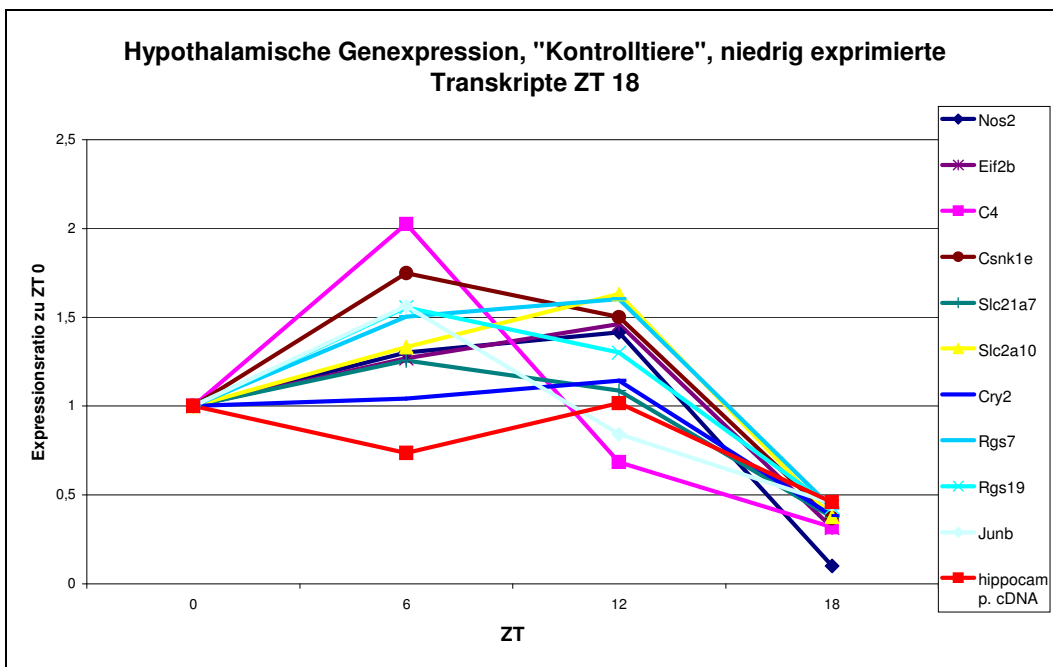


Abb.3.39: Im Hypothalamus von Kontrolltieren um ZT 18 gering exprimierte Transkripte

Gensymbol	Accession	Name
Adir	NM_023141	ATP-dependant interferon responsive (Adir), mRNA.
Ak4	NM_009647	adenylate kinase 4 (Ak4), mRNA.
Atp5k	NM_007507	ATP synthase, H <sup>+</sup> transporting, mitochondrial F1F0
Avp	NM_009732	arginine vasopressin (Avp), mRNA.
C1sb	NM_173864	complement component C1SB (C1sb), mRNA.
C4	NM_009780	complement component 4 (within H-2S) (C4), mRNA.
Calm1	NM_009790	calmodulin 1 (Calm1), mRNA.
Calm2	NM_007589	calmodulin 2 (Calm2), mRNA.
Ccnt1	NM_009833	cyclin T1 (Ccnt1), mRNA.
Cry2	NM_009963	cryptochrome 2 (photolyase-like) (Cry2), mRNA.
Csnk1e	NM_013767	casein kinase 1, epsilon (Csnk1e), mRNA.
Dbp	NM_016974	D site albumin promoter binding protein (Dbp), mRNA.
Dnaja1	NM_008298	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily A, member 1 (Dnaja1),
Eif2b	NM_010122	eukaryotic translation initiation factor 2B (Eif2b),
Eif4ebp2	NM_010124	eukaryotic translation initiation factor 4E binding
Figf	NM_010216	c-fos induced growth factor (Figf), mRNA.
Gja10	NM_010289	gap junction membrane channel protein alpha 10
Gja3	NM_016975	gap junction membrane channel protein alpha 3 (Gja3),
Grid2	NM_008167	glutamate receptor, ionotropic, delta 2 (Grid2), mRNA.
Grpr	NM_008177	gastrin releasing peptide receptor (Grpr), mRNA.
hippocamp. cDNA	AK049931	adult male hippocampus cDNA, RIKEN full-length
Hsp70-4	NM_015765	heat shock protein, 70 kDa 4 (Hsp70-4), mRNA.
Igfbp3	NM_008343	insulin-like growth factor binding protein 3 (Igfbp3),
Insr	NM_010568	insulin receptor (Insr), mRNA.
Itgax	NM_021334	integrin alpha X (Itgax), mRNA.
Itgb3	NM_016780	integrin beta 3 (Itgb3), mRNA.
Junb	NM_008416	Jun-B oncogene (Junb), mRNA.
Mrpl20	NM_025570	mitochondrial ribosomal protein L20 (Mrpl20), mRNA.
Nos2	NM_010927	nitric oxide synthase 2, inducible, macrophage (Nos2),
Pde8a	NM_008803	phosphodiesterase 8A (Pde8a), mRNA.
Png	NM_008889	phospholipase c neighboring (Png), mRNA.
Ppil2	NM_023249	peptidylprolyl isomerase (cyclophilin)-like 2 (Ppil2),
Pte2b-pending	NM_134247	peroxisomal acyl-CoA thioesterase 2B (Pte2b-pending),
Ptgis	NM_008968	prostaglandin I2 (prostacyclin) synthase (Ptgis),
Rgs19	NM_026446	regulator of G-protein signaling 19 (Rgs19), mRNA.
Rgs7	NM_011880	regulator of G protein signaling 7 (Rgs7), mRNA.
Scn1a	NM_018733	sodium channel, voltage-gated, type I, alpha
Slc4a10	NM_033552	solute carrier family 4, sodium bicarbonate
Slc21a7	NM_130861	solute carrier family 21 (organic anion transporter),
Slc26a2	NM_007885	solute carrier family 26 (sulfate transporter), member
Slc2a10	NM_130451	solute carrier family 2 (facilitated glucose
Sncb	NM_033610	synuclein, beta (Sncb), mRNA.
Tgfb3	NM_009368	transforming growth factor, beta 3 (Tgfb3), mRNA.
Ube2e1	NM_009455	ubiquitin-conjugating enzyme E2E 1, UBC4/5 homolog

**Tab. 3.2: Übersicht von circadian regulierten hypothalamischen Transkripten bei Kontrolltieren**

Die circadian regulierten Transkripte umfassten eine Vielzahl verschiedener Gengruppen. Uhr-relevante Gene wie Cry2 und die Casein Kinase 1ε wurden reguliert, sowie die „output“-Gene der Uhr wie DBP und AVP.

Ferner wurden Komponenten des Immunsystems C1sb, C4, Hitzeschockproteine (Dnaja1, Hsp70-4), Untereinheiten von Ionenkanälen (Gja10, Gja3) und Transportmoleküle der „solute carrier“-Familie circadian reguliert. Auf andere Genkategorien sowie einzelne Transkripte wird in der Diskussion eingegangen.

### 3.4.2 *Microarray*-Untersuchung von circadian regulierten Transkripten im Hypothalamus von KR- und MT-Mäusen

Die vorherigen graphisch und tabellarisch dargestellten circadian regulierten Transkripte wurden ebenfalls mittels *Microarrays* in den Hypothalami von KR und MT-Mäusen untersucht. Hierzu wurden wie bei den Kontrolltieren pro Zeitpunkt (und Gruppe) die fünf Einzelproben-RNAs gemischt, fluoreszenzmarkiert und analysiert. Der besseren Übersicht halber habe ich die Ergebnisse tabellarisch zusammengefasst und auf grafische Darstellung verzichtet. Es wurde jeder untersuchte Zeitpunkt (jeder Behandlung) mit dem korrespondierenden Zeitpunkt der Kontrolltiere verglichen.

Alle Werte sind bezogen auf die Expressionsniveaus in Kontrolltieren. KR-Tiere sind grün, MT-Tiere rot dargestellt. Zusätzlich habe ich die Genexpression in den Hypothalami von 30 Monate alten Kontrollmäusen (ZT6) untersucht.

	ZT 0	ZT 0	ZT 6	ZT 6	30 Mon. Alt	ZT 12	ZT 12	ZT 18	ZT 18
	KR/ N	MT/ N	KR/ N	MT/ N	Alt/ N	KR/ N	MT/ N	KR/ N	MT/ N
Gensymbol	MW	MW	MW	MW	MW	MW	MW	MW	MW
Adir	0,72	0,98	1,22	1,50	1,60	1,01	1,38	1,05	0,93
Ak4	1,57	0,99	1,95	1,12	1,66	2,06	1,38	1,14	1,04
Atp5k	0,62	1,17	0,59	0,86	0,97	0,37	0,74	0,86	0,67
Avp	1,00	0,70	1,08	0,62	0,91	0,65	0,46	0,65	0,76
C1sb	4,44	1,95	3,36	1,92	1,90	4,14	6,08	1,03	0,93
C4	1,23	0,46	1,18	0,40	0,36	2,02	0,62	0,61	0,92
Calm1	0,69	1,53	0,81	1,28	1,64	1,21	2,34	1,75	1,29
Calm2	0,60	1,10	0,70	0,91	1,10	0,92	1,39	2,07	1,83
Cent1	1,17	0,80	0,99	0,85	0,54	1,68	0,97	0,84	0,97
Cry2	1,10	0,36	1,26	0,39	0,52	0,94	0,36	1,02	1,14
Csng	1,75	1,30	1,72	1,23	1,13	1,14	0,89	0,93	1,23
Csnk1e	1,25	0,52	1,74	0,44	0,39	0,99	0,47	0,76	0,97
Dbp	1,25	1,02	1,25	1,13	1,35	0,56	0,84	0,87	0,97
Dnaja1	0,77	1,13	0,57	0,84	1,07	0,86	1,22	1,42	1,29
Eif2b	1,12	0,61	1,28	0,64	0,58	0,69	0,45	0,71	0,90
Eif4ebp2	1,31	1,73	1,20	1,17	2,14	0,85	1,55	0,94	0,47
Figf	1,17	1,14	1,04	1,10	1,30	1,16	1,01	1,11	0,98
Gja10	0,74	1,40	0,89	2,13	1,84	0,66	1,56	1,08	1,14
Gja3	1,49	0,91	1,03	0,61	1,17	1,04	0,57	1,13	0,95
Grid2	1,63	2,35	1,76	1,99	2,52	1,19	1,51	1,29	0,92
Grpr	1,02	1,09	0,75	0,88	0,63	0,70	0,82	0,88	0,95

hipp cDNA	0,69	0,67	0,65	0,70	0,67	0,66	0,62	1,67	1,31
Hsp70-4	0,73	0,90	0,86	1,35	1,22	0,67	1,02	1,10	1,16
Igf2bp3	1,01	0,94	0,63	0,97	1,20	0,81	1,01	0,98	1,17
Insr	1,17	1,24	1,49	1,29	1,33	0,83	0,98	1,35	1,24
Itgax	0,64	1,12	0,73	1,61	1,53	0,77	1,55	0,91	1,05
Itgb3	0,90	0,98	0,69	0,99	0,91	0,46	0,74	1,28	0,92
Junb	1,95	0,64	1,75	0,56	0,56	3,18	0,97	0,68	1,06
Mrpl20	0,81	1,48	0,72	0,88	0,87	0,47	0,74	1,07	0,83
Nos2	1,87	0,31	2,00	0,33	0,28	1,25	0,30	0,87	0,85
Pde8a	1,22	0,93	2,60	1,54	1,58	1,26	0,96	1,02	1,21
Png	0,44	0,70	0,31	0,66	0,57	0,32	0,57	1,09	1,11
Ppil2	0,83	1,11	0,69	1,44	1,34	0,80	1,51	1,39	1,25
Pte2b	0,59	1,02	0,58	1,34	1,26	0,69	1,15	1,42	1,27
Ptgis	0,56	0,85	0,80	1,30	1,14	0,87	1,20	1,12	1,27
Rgs19	2,88	0,59	2,67	0,61	0,48	2,08	0,54	0,71	0,87
Rgs7	2,14	0,65	2,12	0,56	0,57	1,68	0,58	1,00	0,87
Scn1a	0,59	1,44	0,70	1,34	1,37	0,81	1,42	1,43	1,29
Slc21a7	1,68	0,63	1,36	0,58	0,52	1,43	0,45	0,91	0,95
Slc26a2	0,57	1,12	0,61	1,06	1,13	1,43	1,69	0,90	1,34
Slc4a10	0,47	1,14	0,51	0,88	1,11	0,87	1,21	1,99	1,65
Slc2a10	1,52	0,88	1,64	0,75	0,64	1,06	0,61	1,03	0,98
Sncb	1,06	1,87	0,73	1,40	1,83	0,59	1,20	0,74	0,53
Tgfb3	0,78	1,13	0,47	1,13	0,44	0,70	0,83	0,82	1,11
Ube2e1	0,59	0,98	0,45	0,93	0,69	0,92	1,39	1,16	1,46

**Tabelle 3.3: Der Einfluss von KR und MT auf die murine hypothalamische Genexpression. (-fache Expression im Vergleich zu Kontrolltieren)**

Es wurden insgesamt 45 Gene untersucht, die bei den Kontrolltieren eine circadiane Variation aufwiesen. Der Vergleich der Genexpression in den Gehirnen von KR- und MT-Tieren zeigt, dass beide Behandlungen einige Transkripte gleich (C1sb) oder umgekehrt beeinflussen (NOS2). Ferner wurde die Anzahl der Gene bestimmt, die pro verglichenem Zeitpunkt signifikant gegenüber den Kontrolltieren reguliert sind. Hiermit sollte festgestellt werden, ob ein vermeintlicher Behandlungseffekt an einen Zeitpunkt des circadianen Tages gebunden ist.

Es sind in jeder Tabellenspalte die Anzahl der auf- (+) und abregulierten (-) Transkripte dargestellt. Als Schwellenwert wurde wieder  $<0,55$  und  $>1,8$  gewählt.

ZT	KR	Melatonin	Alt
0 (06:00 Uhr)	-7, +4	-5, +3	XXXXX
6 (12:00 Uhr)	-7, +6	-7, +3	-12, +3
12 (18:00 Uhr)	-4, +5	-10, +2	XXXXX
18 (24:00 Uhr)	-0, +2	-2, +1	XXXXX

**Tabelle 3.4: Anzahl der pro Zeitpunkt und Behandlung signifikant von den Kontrollen unterschiedlichen Transkripte**

Die Anzahl an Transkripten, die durch KR und/oder MT reguliert werden, ist über den circadianen Tag hinweg nicht konstant. Der geringste Effekt der Behandlungen scheint um ZT 18, dem Aktivitätsmaximum der Tiere, zu sein. Die meisten abregulierten Transkripte sind in der MT-Gruppe bei ZT 12 beobachtet worden, also direkt nach Einsetzen der Dunkelphase und Konsum von melatoninhaltigem Wasser. Die alten Tiere zeigten von allen die meisten abregulierten Transkripte. Hierzu gehören der C4 complement Faktor (Immunsystem) und Casein Kinase 1 $\epsilon$  und Cry2, Komponenten der circadianen Uhr. Ein Behandlungseffekt ist häufig streng an den untersuchten circadianen Zeitpunkt gekoppelt.

Selbst bei sehr stark beeinflussten Transkripten wie C1sb, das bei den KR- und MT- Tieren stark aufgeregt ist, ist die Amplitude des beobachteten Effektes von der Tageszeit abhängig. Wird beispielsweise ZT 18 als Referenzzeitpunkt gewählt, kann kein Behandlungseffekt festgestellt werden – zu allen anderen Zeitpunkten jedoch schon.

Da bisher nur Transkripte bei den KR- und MT-Tieren untersucht wurden, die in der Kontrolltiergruppe circadian schwankten, wurde die gruppeninterne circadiane Genexpression untersucht. Gewählt wurde, wie bei den Kontrolltieren, der Referenzzeitpunkt ZT0 (06:00 Uhr). Im Folgenden sind die mini- und maximal regulierten Transkripte dieser Gruppen dargestellt. Anstatt den gesamten circadianen Verlauf der Transkripte zu demonstrieren, ist jeweils ein Zeitpunkt maximaler und minimaler circadianer Expression dargestellt.

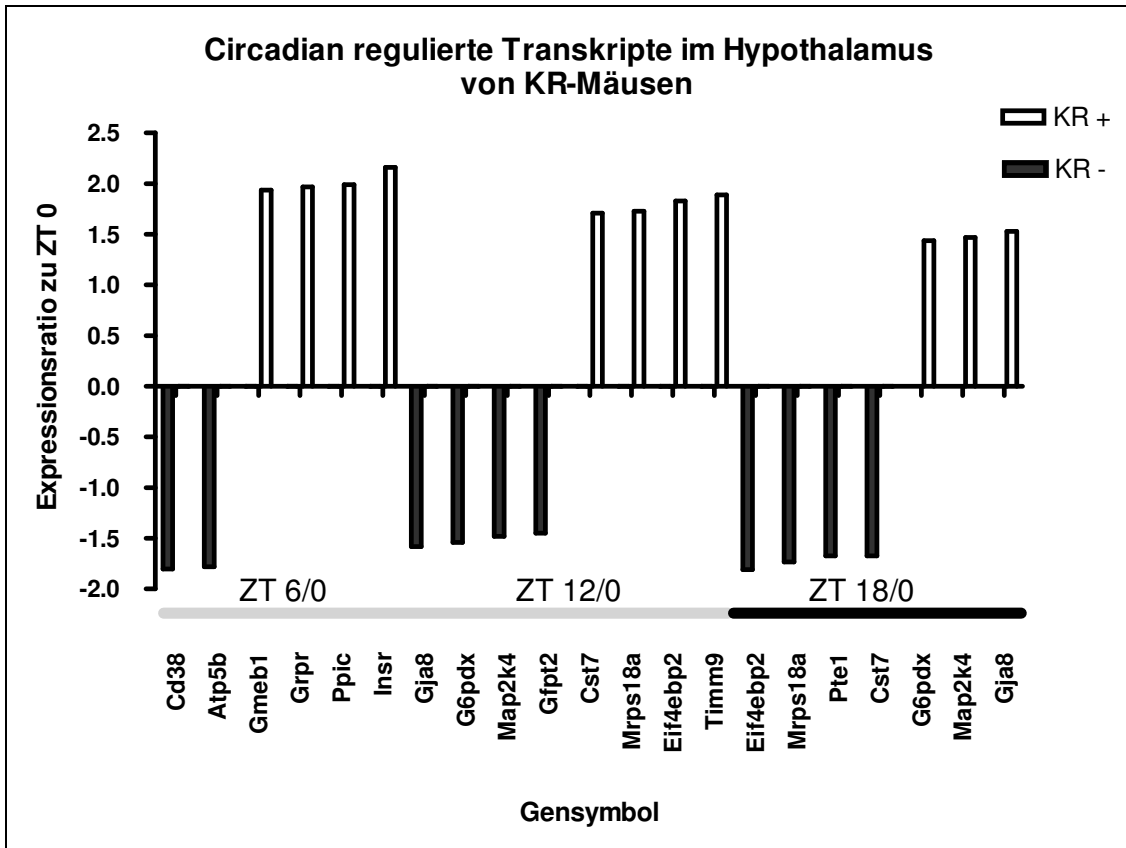


Abb.3.40: Transkripte, die im Hypothalamus von KR-Tieren eine circadiane Variation aufweisen.

Einige der in der KR-Gruppe circadian regulierten Transkripte weisen zum selben Zeitpunkt wie bei der Kontrollgruppe ein Maximum bzw. Minimum auf. Hierzu gehören an ZT 6 die Transkripte „Insr“ und „Grpr“ oder an ZT 12 das Transkript „Eif4ebp2“.

Der circadiane Verlauf dieser Transkripte ist im Vergleich zu den Kontrolltieren kaum beeinflusst (Daten nicht gezeigt). Andere Transkripte, die bei den Kontrolltieren nicht als circadian auffielen, werden in der KR-Gruppe rhythmisch exprimiert.

Einige dieser Transkripte sind an ihrem circadianen Minimum und Maximum getroffen worden – dies bedeutet, dass es sich hierbei um die Transkripte mit der größten circadianen Amplitude handelt. Hierzu gehören ein „*gap junction*“ Ionenkanalprotein, ein ribosomales Protein und eine Map-Kinase (Map2k4).

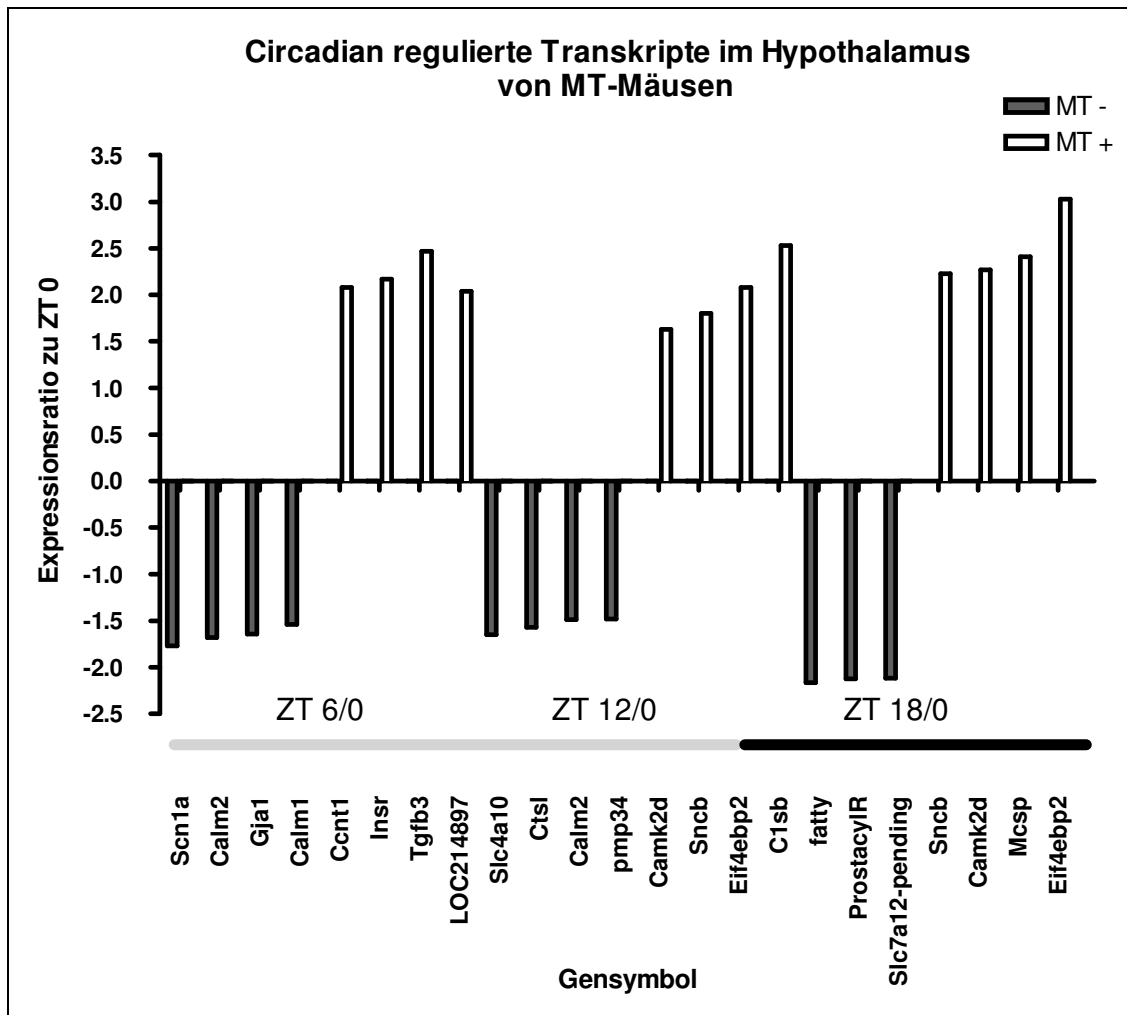


Abb. 3.41 Transkripte, die im Hypothalamus von MT-Tieren eine circadiane Variation aufweisen.

Gensymbol	Accession	Name
Atp5b	NM_016774	ATP synthase, H <sup>+</sup> transporting mitochondrial F1
Calm1	NM_009790	calmodulin 1 (Calm1), mRNA.
Calm2	NM_007589	calmodulin 2 (Calm2), mRNA.
Camk2d	NM_023813	calcium/calmodulin-dependent protein kinase II, delta
Ccnt1	NM_009833	cyclin T1 (Ccnt1), mRNA.
Cd38	NM_007646	CD38 antigen (Cd38), mRNA.
Cst7	NM_009977	cystatin F (leukocystatin) (Cst7), mRNA.
Ctsl	NM_009984	cathepsin L (Ctsl), mRNA.
Eif4ebp2	NM_010124	eukaryotic translation initiation factor 4E binding
fatty acid lig	AK012088	fatty acid Coenzyme A ligase, long chain 3, full insert
G6pdx	NM_008062	glucose-6-phosphate dehydrogenase X-linked (G6pdx),
Gfpt2	NM_013529	glutamine fructose-6-phosphate transaminase 2 (Gfpt2),
Gja1	NM_010288	gap junction membrane channel protein alpha 1 (Gja1),
Gja8	NM_008123	gap junction membrane channel protein alpha 8 (Gja8),
Gmeb1	NM_020273	glucocorticoid modulatory element binding protein 1

Grpr	NM_008177	gastrin releasing peptide receptor (Grpr), mRNA.
Insr	NM_010568	insulin receptor (Insr), mRNA.
LOC214897	NM_173185	casein kinase I, gamma 1 (LOC214897), mRNA.
Map2k4	NM_009157	mitogen activated protein kinase kinase 4 (Map2k4),
Mcsp	NM_008574	mitochondrial capsule selenoprotein (Mcsp), mRNA.
Mrps18a	NM_026768	mitochondrial ribosomal protein S18A (Mrps18a), mRNA.
pmp34	AJ006341	for peroxisomal integral membrane protein PMP34.
Ppic	NM_008908	peptidylprolyl isomerase C (Ppic), mRNA.
ProstacylR	D26157	Mouse prostacyclin receptor mRNA.
Pte1	NM_133240	peroxisomal acyl-CoA thioesterase 1 (Pte1), mRNA.
Scn1a	NM_018733	sodium channel, voltage-gated, type I, alpha
Slc4a10	NM_033552	solute carrier family 4, sodium bicarbonate
Slc7a12-pending	NM_080852	solute carrier family 7 (cationic amino acid
Sncb	NM_033610	synuclein, beta (Sncb), mRNA.
Tgfb3	NM_009368	transforming growth factor, beta 3 (Tgfb3), mRNA.
Timm9	NM_013895	translocase of inner mitochondrial membrane 9 homolog

**Tab. 3.5: Circadian variierende Transkripte im Hypothalamus von KR- und MT-Tieren.**

In der oben aufgestellten Tabelle wurden alle bei den KR- und MT-Tieren circadian schwankenden Transkripte aufgelistet.

Da es Übereinstimmungen gibt zwischen entweder allen drei Gruppen oder einer der Behandlungen und den Kontrolltieren, habe ich diese wie folgt farblich gekennzeichnet.

- Rot: Bei MT- und Kontrolltieren rhythmisch
- Grün: Bei KR- und Kontrolltieren rhythmisch
- Blau: Bei allen untersuchten Gruppen rhythmisch

Rhythmisch bedeutet in diesem Zusammenhang innerhalb der untersuchten Gruppe circadian schwankend, bedeutet jedoch nicht zwangsläufig synchron mit einer anderen Gruppe.

Es sind insgesamt 31 Transkripte aufgelistet, von denen nur zwei bei allen Gruppen, unabhängig von der Behandlung (unter strengen Auswahlkriterien) rhythmisch zu sein scheinen. Es gibt sieben Übereinstimmungen zwischen der MT- und eine zwischen der KR- und Kontrolltiergruppe.

Zu den bei allen Gruppen übereinstimmenden Transkripten zählt ein Transkriptionsfaktor-Bindungsprotein (Eif4ebp2) und ein Insulinrezeptor, der in allen Gruppen um ZT 6, in der Hellphase, sein Maximum erreicht.

### 3.4.3 Postvalidierung von *Microarray*-Ergebnissen mittels quantitativer Realtime-PCR

Einige der a) als circadian regulierten und b) durch KR und/oder MT beeinflussten Transkripte wurden zu Postevaluierungszwecken mittels quantitativer Realtime-PCR untersucht. Ferner wurden eine Reihe an bekannten Transkripten untersucht, die an der Steuerung der circadianen Uhr beteiligt sind. Diese waren auf *Microarray*-Ebene entweder nicht eindeutig als circadian erkennbar, oder nicht als Klone auf dem Array vorhanden. Hierbei ist von Vorteil, dass pro untersuchtem Zeitpunkt und Gruppe ein N von 5 vorliegt, sodass auch eine statistische Signifikanz erwogen werden kann. Da bei den *Microarray*-Untersuchungen *gepoolte* RNA verwendet wurde, waren keine „Tier zu Tier“ Standardabweichungen ermittelbar, welches die Genauigkeit der Ergebnisse beeinflussen kann. Alle Realtime-PCRs wurden gegen das Haushaltsgen RP27 normalisiert. Standardabweichungen sind ebenfalls eingezeichnet.

#### Negative Elemente der circadianen Uhr

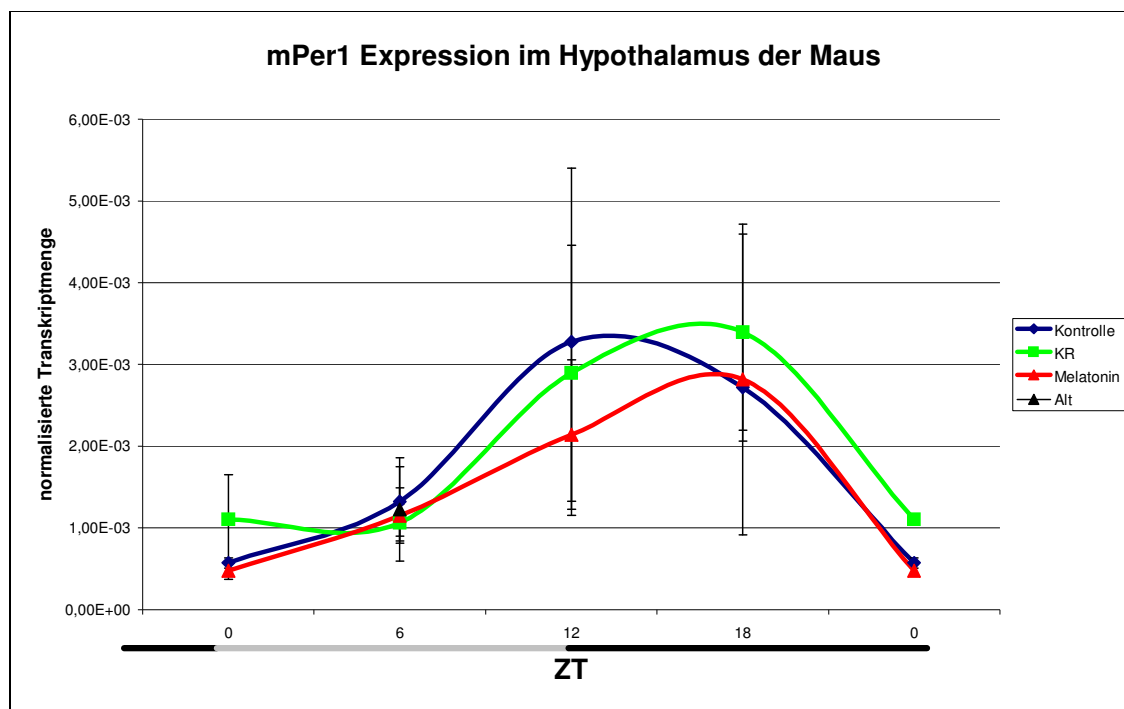


Abb.3.42: mPer1 Expression im Hypothalamus der Maus. Gemessen mittels Realtime-PCR.

Zur besseren graphischen Darstellung wird nach einem kompletten circadianen Zyklus (ZT 0-18) ZT0 nach ZT18 wiederholt.

Die Lichtphase ist unterhalb der X-Achse als Balken dargestellt (schwarz=dunkel, grau=Licht). Es gab keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen im Tagesverlauf der Genexpression.

Die mPer1 Expression erreichte bei den Kontrolltieren um ZT12 und bei den KR- und MT-Tieren scheinbar um ZT18 ihr Maximum. Der Expressionsunterschied von ZT 12 zu ZT 18 ist bei den KR- und MT-Tieren nicht statistisch signifikant. Der einzige Unterschied ist der von ZT0 zu ZT12 (Kontrolltiere) und ZT0 zu ZT18 bei den KR- und MT-Tieren.

Für die Expression in den alten Tieren gab es nur einen Zeitpunkt, ZT6. Hier lag die Expression von mPer1 im Mittel mit den anderen Gruppen.

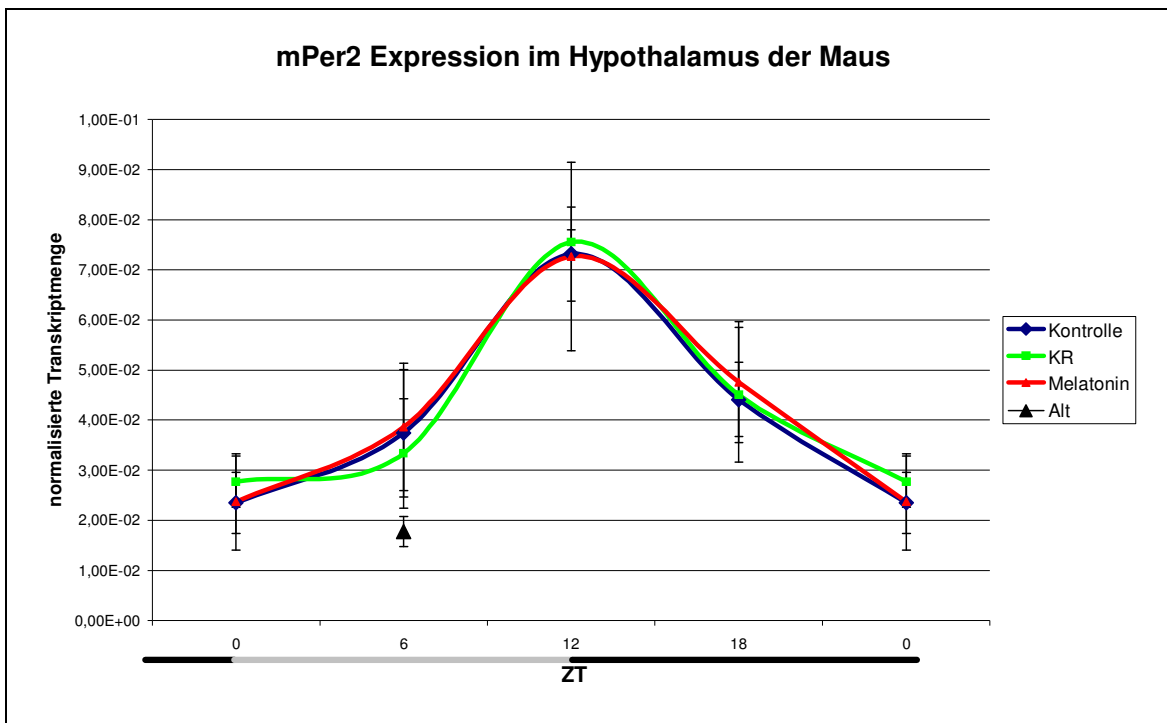


Abb.3.43: mPer2 Expression im Hypothalamus der Maus. Gemessen mittels Realtime-PCR.

Das Transkript mPer2 erreicht in allen untersuchten Gruppen seine maximale circadiane Expression um ZT 12. Zwischen den Gruppen konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden. Bei den alten Tieren wurde an ZT 6 weniger Transkript festgestellt als bei den anderen Gruppen. Ob dies ein Effekt verringerter Amplitude im Altern oder einfach durch eine mögliche Verschiebung der Phase bedingt wird, ist unklar.

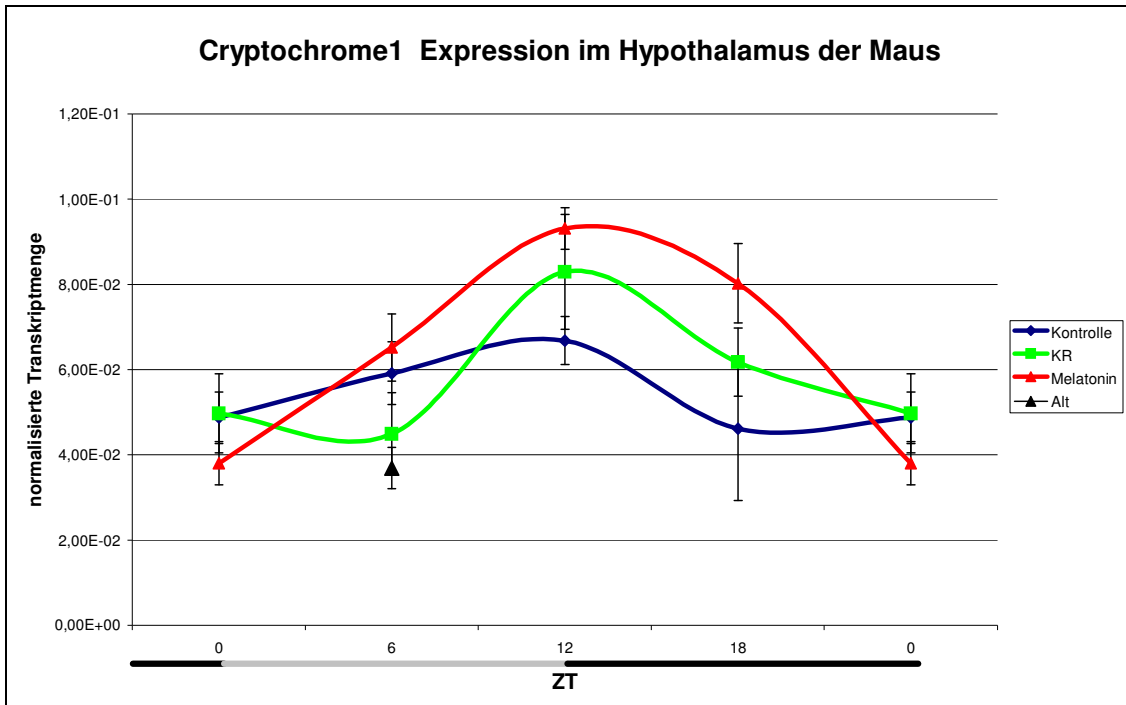


Abb.3.44: mCry1 Expression im Hypothalamus der Maus. Gemessen mittels Realtime-PCR.

Das Transkript mCry1 erreichte in allen Gruppen um ZT12 seine maximale Expression. Die hohen Standardabweichungen und der flache circadiane Verlauf bei den Kontrolltieren lassen keine signifikante Rhythmik erkennen. Die höchste circadiane Amplitude scheint bei den MT-Tieren vorzuliegen, ist jedoch nur an ZT18 signifikant gegenüber den anderen Gruppen. Die alten Tiere weisen an ZT 6 weniger Cry1 Transkript auf als die Vergleichstiere.

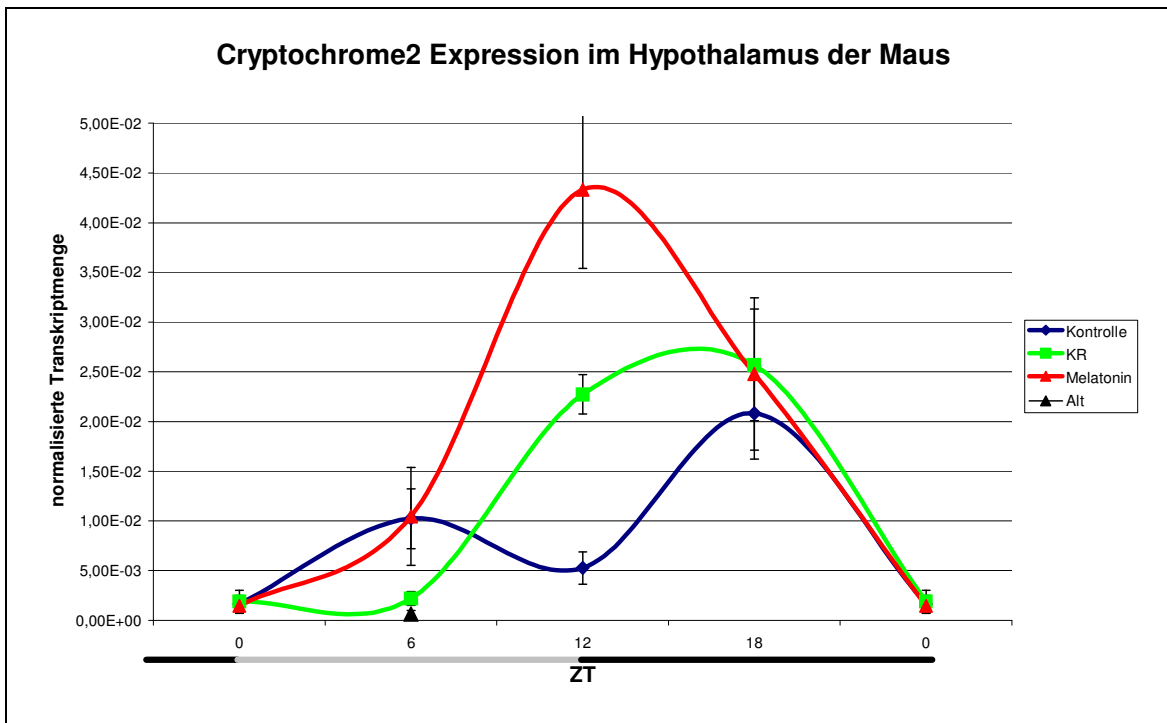


Abb. 3.45: mCry2 Expression im Hypothalamus der Maus. Gemessen mittels Realtime-PCR.

mCry2 zeigt eine circadiane Expression mit einer sehr hohen Amplitude bei den MT- und KR-Tieren. Das Maximum wird bei den MT-Tieren um ZT12 erreicht. Bei den KR-Tieren ist zwischen ZT12 und ZT18 kein signifikanter Unterschied zu erkennen. Interessant ist hierbei, dass die Kontrolltiere eine Doppelschwankung zeigen und ein versetztes Maximum zu ZT18 hin aufweisen. Das Minimum um ZT12 ist allerdings nicht signifikant gegenüber dem ZT6 Wert. Die Expression bei den alten Tieren ist sehr niedrig um ZT6.

### Positive Elemente der circadianen Uhr

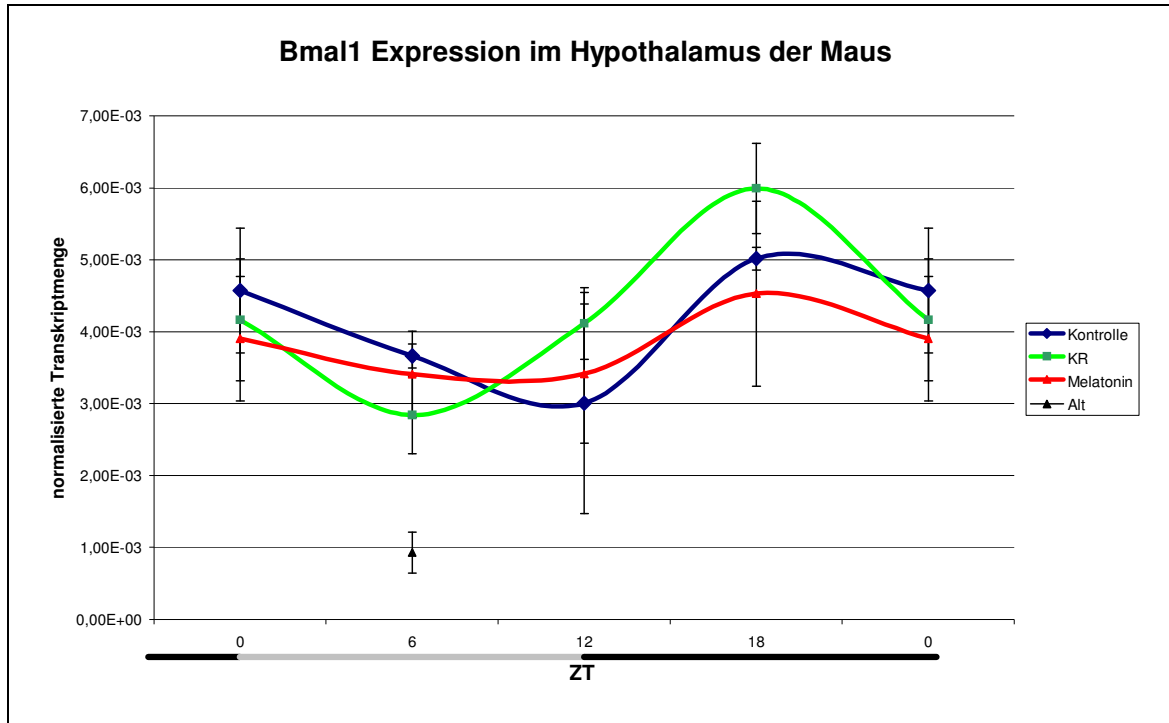


Abb.3.46: mBmal1 Expression im Hypothalamus der Maus. Gemessen mittels Realtime-PCR.

Der circadiane Verlauf der Bmal1-mRNA erreicht um ZT18 sein Maximum. Die Amplitude ist nur gering, aber vom niedrigsten Wert ZT6 (KR-, MT-Tiere) bzw. ZT12 (Kontrolltiere) zum höchsten Wert um ZT18 signifikant. Bei den alten Kontrolltieren ist die Bmal1-Expression um ZT6 verglichen mit den anderen Gruppen sehr niedrig.

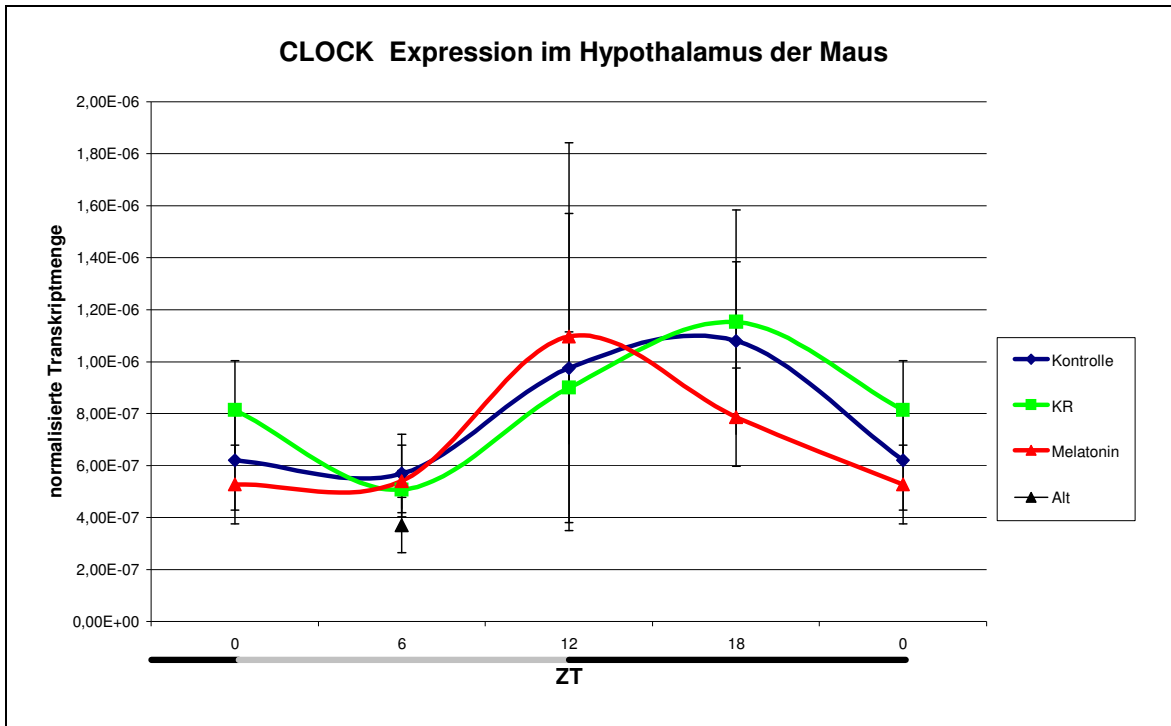


Abb. 3.47: mCLOCK Expression im Hypothalamus der Maus. Gemessen mittels Realtime-PCR.

Das mCLOCK Transkript zeigt scheinbar eine circadiane Schwankung mit einem Maximum um ZT 12-18. Allerdings sind die Standardabweichungen so groß, dass nicht eindeutig von einer circadianen Rhythmik gesprochen werden kann.

#### Melatoninrezeptoren

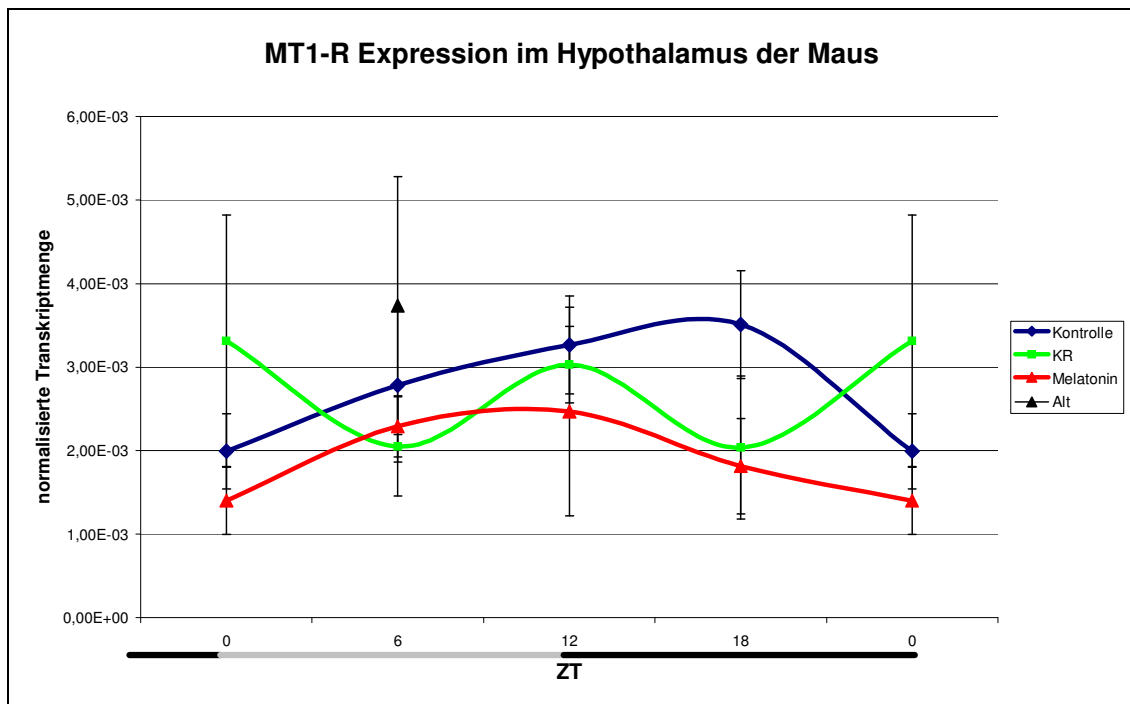


Abb. 3.48: mMT1-Rezeptor Expression im Hypothalamus der Maus. Gemessen mittels Realtime-PCR.

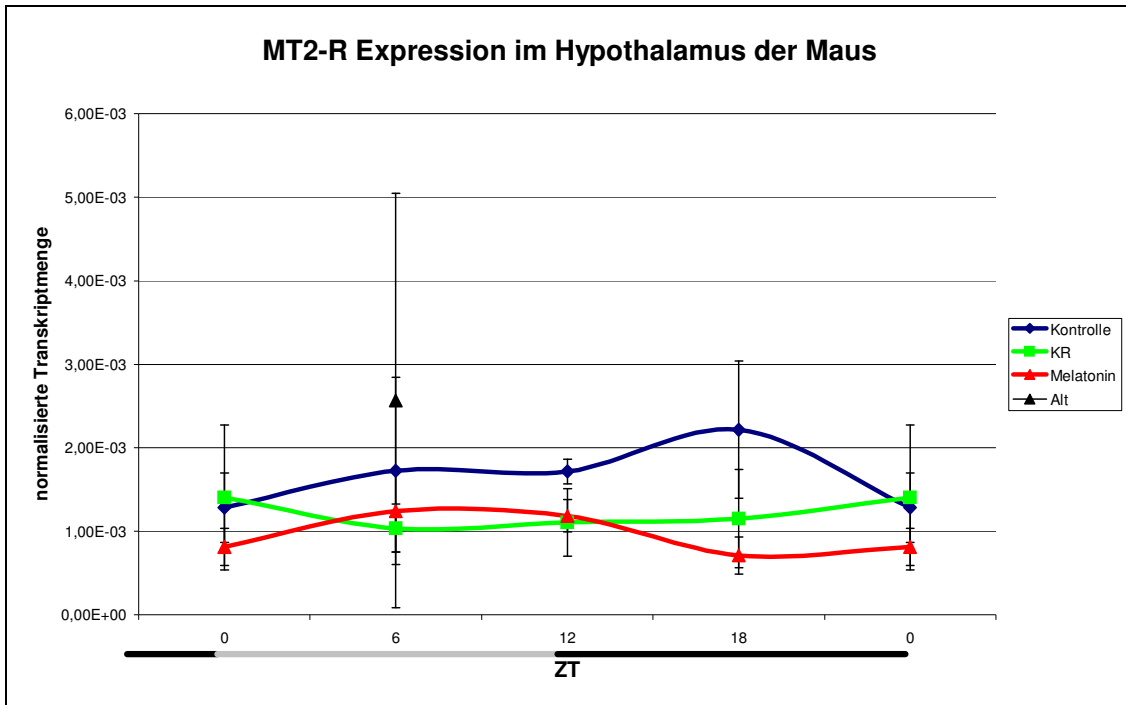
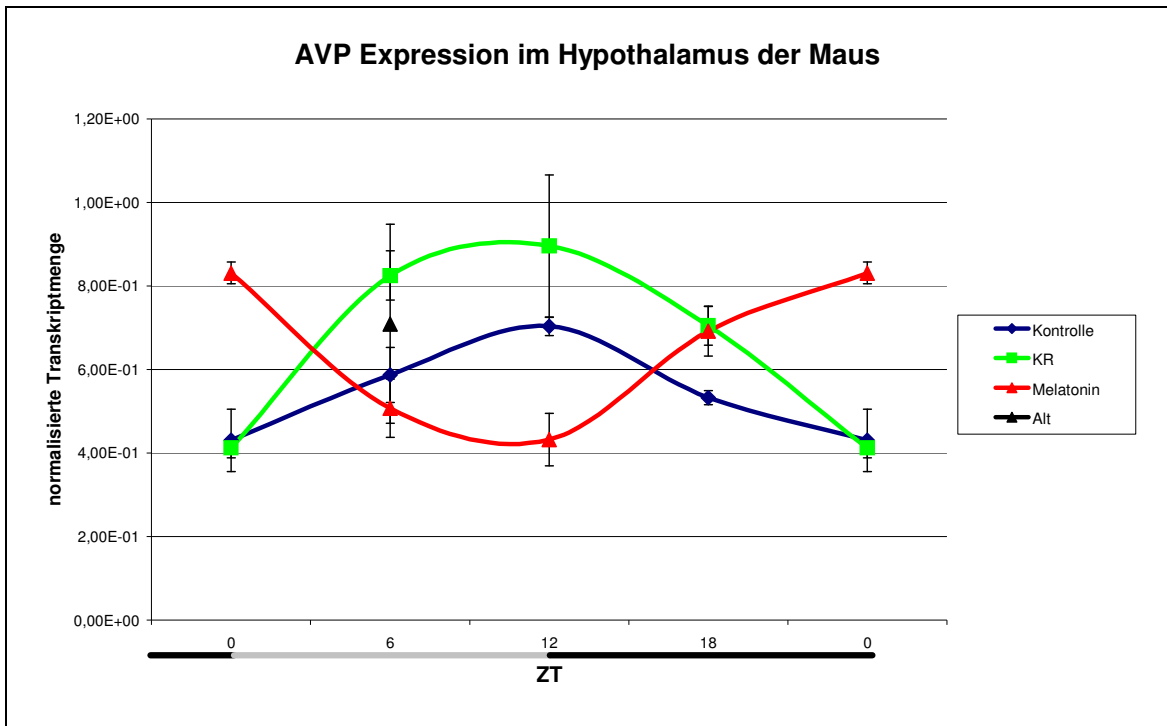


Abb. 3.49: mMT2-Rezeptor Expression im Hypothalamus der Maus. Gemessen mittels Realtime-PCR.

Für beide untersuchten Melatoninrezeptoren konnte keine signifikante circadiane Expressionsschwankung ermittelt werden.

Die flache Amplitude gepaart mit hohen Standardabweichungen erlaubt es nicht eine konkrete Aussage zu machen. Auffällig, wenn auch nicht signifikant, ist die scheinbar höhere Rezeptorexpression bei den alten Tieren.

## Output-Gene der circadianen Uhr



**Abb. 3.50:** Expression von arginin Vasopressin-Transkript im Hypothalamus der Maus. Gemessen mittels Realtime-PCR.

Die Untersuchung von AVP mittels *Microarrays* (Abb. 3.36.) zeigte eine circadiane Expression mit Maximum an ZT 12, sowie eine Verringerung der Expression bei MT-Tieren (Tab.3.3). Dies bestätigte sich durch die Realtime-PCR Untersuchungen. Die AVP (*arginine vasopressin*) mRNA zeigt bei dem Kontroll- und KR-Tieren ein Maximum an ZT12. Die circadiane Amplitude scheint bei den KR-Tieren etwas höher zu sein als bei den Kontrolltieren. Die AVP Expression der MT-Tiere verläuft antiphasisch dazu. Sie erreicht ein Minimum an ZT12 und ein Maximum an ZT0.

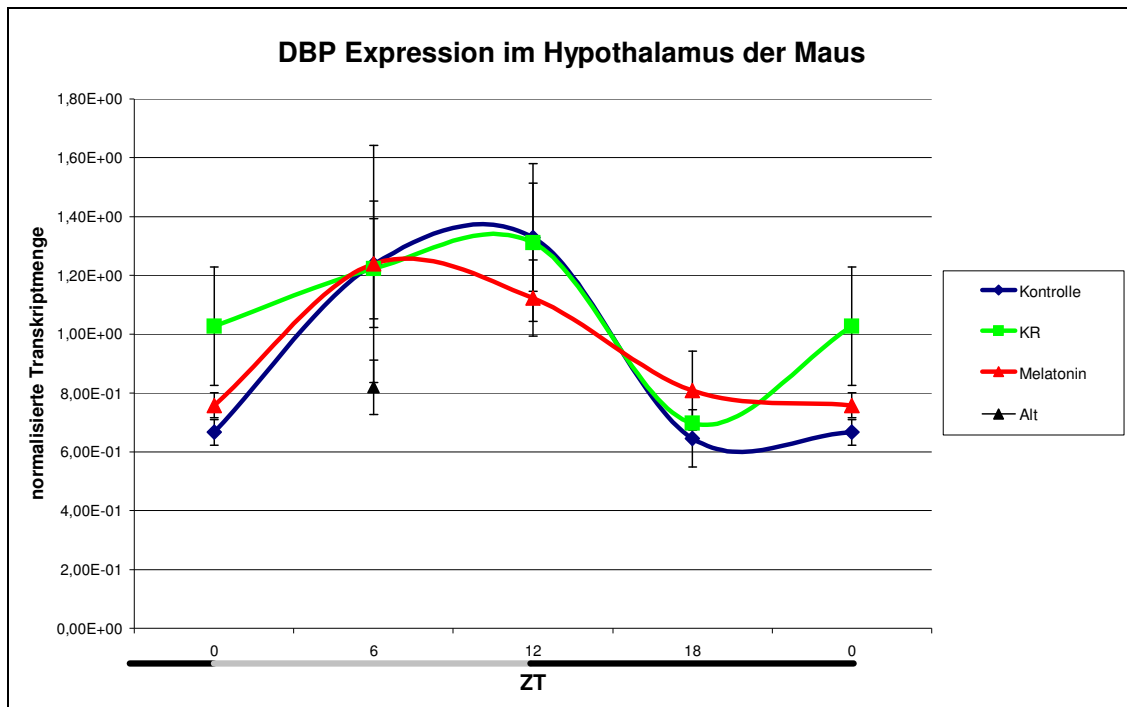


Abb. 3.51: Expression von „*D site albumin promoter binding protein (Dbp), mRNA*“ im Hypothalamus der Maus. Gemessen mittels Realtime-PCR.

Die DBP-Expression erreicht bei Kontrolltieren im *Microarray* sowie in der Realtime-PCR um ZT12 ihr Maximum. Zwischen den Gruppen kann mittels Realtime-PCR kein signifikanter Unterschied in der circadianen Expression dieses Transkriptionsfaktors ermittelt werden.

## 4 Diskussion

### 4.1 Entwicklung des Körpergewichtes bei KR- MT- und Kontrolltieren des Mäusestammes B6C3F1

Das Anfangsgewicht der Tiere aller Gruppen war ähnlich und betrug zwischen  $29,4 \pm 0,35\text{g}$  und  $28,6 \pm 0,32\text{g}$ . Nach der Eingewöhnung der KR-Mäuse and das Spezialfutter, wurde die verabreichte Menge graduierlich (14 Täglich um 20%) auf 60% der ursprünglichen Menge verringert, um den erwünschten Restriktionseffekt zu erreichen. Die Kontroll- und MT-Tiere bekamen weiterhin 100% der Normaldiät. Im Verlaufe der Diät nahmen die KR-Tiere bis zur 10. Woche ab (Abb. 3.1), dies blieb bis auf eine geringe Zunahme zum Ende des Versuches hin stabil. Der Gewichtsverlust der KR-Tiere war wie zu erwarten und wurde in dieser Art auch von anderen Forschergruppen berichtet (Pugh et al., 1999; Weindruch et al., 1980 & 1986). Gemessen an der Kalorienmenge, die i.d.R. in Restriktionsexperimenten gefüttert wird, war die von mir applizierte Restriktion mit 65,8 kcal/Woche etwas weniger streng als von anderen Forschern (58kcal/Woche Lee et. al, 2002; 52,5 kcal/Woche Dhahbi et al., 2004). Verfüttert wurde eine halbaufgereinigte Diät (SPD, *semipurified diet*) für Nagetiere (AIN-93M), die für kalorische Restriktion bis zu 40% geeignet ist (Pugh et al., 1999) und auch häufig bei Restriktionsexperimenten zur Anwendung kommt (Lee et. al, 2002; Dhahbi et al., 2004). In Anbetracht der Tatsache, dass fast alle KR-Tiere einen äußerlich gesunden Eindruck und entsprechendes Verhalten zeigten, kann davon ausgegangen werden, dass die Diät für den Versuch optimal zusammengesetzt war. Nur eines der KR-Tiere erlitt eine Art Schlaganfall nach 10 Monaten und zeigte halbseitige Lähmungserscheinungen. Das Aktogramm dieses Tieres zeigt den Zeitpunkt des Anfalls, hinterher war das Tier arrhythmisch (Daten im Ergebnisteil nicht gezeigt). Dies war ein Einzelfall, alle anderen Tiere der KR- und anderer Gruppen waren im Versuchsverlauf gesund. Das betreffende Tier wurde, da es stark in seiner Bewegung eingeschränkt war, getötet (ZT6), und die Organe, wie im Methodenteil beschrieben, präpariert. Es gab keine auffälligen organischen Veränderungen. Die Tatsache, dass Tiere des Stammes B6C3F1 mit 14 Monaten nicht sehr alt sind, erklärt, dass keine Analyse von altersbedingten Erkrankungen z.B. Tumorinzidenz gemacht werden kann. Adenome, Karzinome und andere Alterskrankheiten treten bei diesem Stamm erst später auf (ab ca. 21 Monaten, Dhahbi et al., 2004) – hier ist die Inzidenz bei KR-Tieren geringer.

Interessanterweise gab es zu Versuchsende einen signifikanten Gewichtsunterschied zwischen den MT- und Kontrolltieren. Dies wurde meiner Kenntnis nach noch nicht berichtet.

In der umstrittenen Studie von Pierpaoli und Regelson (1991, 1994) wurden nicht nur Pinealdrüsen von jungen in alte Mäuse transplantiert, sondern in einer separaten Gruppe auch Melatonin substituiert. Die Substitution mit Melatonin erfolgte bei BALB/c Weibchen (Melatonin-defizient!) in einer Konzentration von 10µg/ml Trinkwasser – doppelt so hoch wie in meiner Studie. Hierbei gab es zwischen den unbehandelten Kontrolltieren und den Melatonin-substituierten keinen signifikanten Gewichtsunterschied. Auch zeigten Pierpaoli und Regelson eine lebensverlängernde Wirkung der Melatoninbehandlung (von 23,8 auf 28,1 Monate). Da die Versuchstiere meiner Studie erst ein Alter von 14 Monaten hatten, kann ein solcher Effekt nicht eingeschätzt werden. Zu Beginn dieses Projektes war die maximale Lebensspanne des B6C3F1 Stammes nicht bekannt. Neueste Studien allerdings zeigen, dass die durchschnittliche Lebensspanne hier 30,7 Monate ist (Dhahbi et al., 2004) und durch eine 40%ige Kalorienreduktion (im Alter von 19 Monaten begonnen) auf 35,4 Monate erhöht werden kann. Im Alter von 14 Monaten waren meine Versuchstiere also erst mittelalt.

## **4.2 Lokomotorische Aktivität**

Die vorliegenden Ergebnisse implizieren einen tiefen Effekt des Alterns auf das circadiane System in Mäusen des Stammes B6C3F1. Einige Parameter des circadianen Rhythmus (der lokomotorischen Aktivität) sind gegenüber jungen Tieren verändert. Auch zeigen die Behandlungen, vor allem die kalorische Restriktion, Effekte auf die lokomotorische Aktivität von Mäusen. Altern verändert nicht nur die endogene Periode  $\tau$  unter Freilauf (DD), sondern auch das Aktivitätsmuster unter LD (Zeitgeber-definierten) Bedingungen. Ein sehr interessanter Effekt ist, dass  $\tau$  mit zunehmendem Alter zunimmt. Bei Kontrolltieren von einem Durchschnittswert von 23,46±0,07 Stunden (Alter: 4,5 Monate) auf 23,86±0,08 Stunden bei 30 Monate alten Tieren. Weder KR noch MT vermögen es, diesen Verlauf zu beeinflussen. Bei den von mir restriktiv gefütterten bzw. Melatonin substituierten Tieren nimmt  $\tau$  ebenfalls zu. Von 8 zu 14 Monaten verlangsamt sich die innere Uhr von 23,59±0,04 auf 23,92±0,02 Stunden (KR) bzw. 23,43±0,06 auf 23,84±0,03 Stunden bei MT-Tieren. Diverse Forschergruppen haben das Gegenteil bei Hamstern und Ratten festgestellt. Bei alternden Hamstern wurde eine Verkürzung der endogenen Periode  $\tau$  festgestellt (Van

Reeth et al., 1992 & 1993). Valentinuzzi und Kollegen (1997) stellten bei alternden Mäusen des Stammes C57BL/6 auch eine Verlängerung der Periode fest.

Der Effekt des Alterns auf die Periode  $\tau$  ist noch nicht einmal im selben Mäusestamm gleichbleibend erfasst worden. Welsch et al. (1996) berichteten wie Valentinuzzi (1997) von einer verlängerten Periode bei alternden C57BL/6 Mäusen, während Teena & Wax (1975) in diesem Stamm keinen altersbedingten Unterschied der Periode feststellten.

Diese Heterogenität der Ergebnisse lässt sich vielleicht durch unterschiedliche Beleuchtungsprotokolle vor oder während der Messung von  $\tau$  oder durch das unterschiedliche Alter der Versuchstiere erklären. Auffallend bei den Studien mit Hamstern von Van Reeth (1992 & 1993) ist, dass bei einem nachtaktiven Tier anstatt DD für Freilauf zu verwenden, LL, also Dauerlicht verwendet wurde. Ich glaube nicht, dass es angebracht ist, nachtaktive Tiere unter Dauerlicht-Bedingungen zu setzen und natürliche Reaktionen zu erwarten. Aschoffs Regel besagt, dass unter LL (Dauerlicht) die endogene Periode  $\tau$  bei nachtaktiven Tieren zunimmt. Steinlechner und Mitarbeiter (2002) bewiesen dies eindrucksvoll mit Wildtyp und Per1/Per2 mutanten Mäusen. Es wurde gezeigt, dass bis auf interessante Phänotypen bei den mutanten Mäusen, LL ab einer bestimmten Lichtstärke zu Arrhythmizität führt. Bei DD-Bedingungen jedoch bleibt die Periode unter 24h und die Tiere bleiben rhythmisch. Mäuse, Hamster und Ratten scheuen Licht – es ist sogar ziemlicher Stress für sie, ihm permanent ausgesetzt zu werden. Ferner war die endogene Periode der Hamster (*Mesocricetus auratus*) länger als 24 Stunden. Im Gegensatz zu meinen Mäusen müssen diese Hamster also durch einen täglich präsentierten Zeitgeber in ihrer Phase gebremst (verzögert) und nicht beschleunigt werden. Der Unterschied in der Periode von 4,5 und 30 Monate alten B6C3F1 Mäusen von ca. 0,4 Stunden ist vergleichbar mit der von Possidente und Mitarbeitern (1995) berichteten. Allerdings waren die dort verwendeten Mäuse erstens von anderen Stämmen und zweitens waren sie insgesamt jünger als in meiner Studie (1 und 7,5 Monate alt). Überhaupt habe ich den Verlauf der endogenen Periode bei Kontrolltieren für eine recht lange Zeit beobachten können, lediglich für die KR- und MT-Tiere gibt es wie bei andern Studien auch nur 2 Zeitpunkte. Die Veränderung der Periode scheint ein Charakteristikum des alternden circadianen Systems zu sein und es gibt Hinweise, dass die Uhr im SCN selber im Alterungsprozess verändert wird (Witting et al., 1994). Der Beginn lokomotorischer Aktivität unter LD-Bedingungen scheint sich im Alter leicht zu verzögern. Junge Mäuse (Abb. 3.2) sind sofort nach Einsetzen der Dunkelheit aktiv. Dies scheint bei älteren Mäusen nachzulassen (Abb. 3.9-3.11). Das verzögerte Einsetzen (um ca. 10-25min) der Aktivität ist im Einklang mit der Verlängerung der Periode. Die endogene Periode nähert

sich immer mehr der des Zeitgebers an. Entkoppelt unter DD-Bedingungen ist die Periode näher an 24 Stunden.

Die tägliche wiederkehrende Phasenverzögerung zur Synchronisation unter LD-Bedingungen ist also geringer in älteren Mäusen. Vergleichen wir diesen Befund nun mit den Hamstern, die jung eine Periode länger als 24 Stunden haben, so verkürzt sich  $\tau$  im Alter – also nähert sie sich genau wie bei meinem Mäusestamm der Periode des Zeitgebers an.

Alte Mäuse meines Stammes zeigen eine Verschlechterung der Rate von Aktivität zu Ruhephasen, ein Indiz für eine Degeneration der inneren Uhr. Dies wird durch Studien mit anderen Stämmen unterstützt (Davis et al., 1998; Teena et al., 1975). Die Fähigkeit sich an ein LD-Regime anzupassen, ist bei alten Mäusen stark eingeschränkt. Der gesamte Aktivitätsrhythmus ist stark fragmentiert. Es sind auf den Aktogrammen sichtbar mehr spontane Aktivitäten während der Lichtphase zu beobachten als bei jüngeren Tieren. Die Rate von Licht- zu Dunkelaktivität ist bei 14 Monate alten Tieren 3,5 (also 3,5 Mal mehr Aktivität im Dunkeln) und verschlechtert sich auf 2,5 bei 21 Monate alten Tieren. Das Phänomen der Fragmentierung ist auch sehr stark bei KR-Tieren aller Altersgruppen vorhanden. Allerdings muss hierbei sicherlich von einer Maskierung gesprochen werden.

Üblicherweise ist der stärkste maskierende Faktor Licht, denn der Zeitgebereffekt von Licht ist stärker als der endogene Rhythmus der Uhr unter LD-Bedingungen (Redlin, 2001). Unter LD-Bedingungen wird die endogene Uhr im SCN tagtäglich durch Licht resynchronisiert – ihr eigener Rhythmus kommt nur unter konstanten Bedingungen (LL oder DD) zum Tragen. Die restriktive Fütterung führt bei den Mäusen unweigerlich bis zu einem bestimmten Grad auch zu Stress und einer erhöhten allgemeinen Erregbarkeit. Ich habe bei den tierpflegerischen Tätigkeiten festgestellt, dass die KR-Tiere unglaublich aggressiv und reizbar (bissig) waren. Die kleinste Störung im Tierstall führte zu erhöhter Aktivität dieser Gruppe. Der Hunger, den diese Tiere zwischen den Fütterungen verspüren, ist vermutlich der Grund für eine hohe Aktivität während der Lichtphase und der Suche nach Futter (deswegen wurden die Fütterungen alternierend im Dunkeln durchgeführt). Der fragmentierte Rhythmus bei den KR-Tieren ist also (anders als bei alten Mäusen) Hunger, nicht altersbedingt. Auf Abb. 3.9-3.11 lässt sich die zunehmende Fragmentierung des Rhythmus mit dem Alter unter LD- und DD-Bedingungen erkennen. Ferner kann verfolgt werden, dass die Zeit zur Resynchronisation an LD nach DD mit dem Alter zunimmt. Von Valentinuzzi und Kollegen (1997) wurde Ähnliches beobachtet, nämlich dass nach einer 4-stündigen Phasenbeschleunigung alte Mäuse wesentlich länger brauchen, um sich an den neuen Lichtzyklus zu gewöhnen als junge Tiere.

In meinen Experimenten mit 30min Lichtpulsen in DD konnte ich zeigen, dass alte Mäuse weniger responsiv auf den Reiz reagieren, d.h. der Effekt der Phasenverschiebung geringer ist als bei jungen Mäusen. Die 24 Stunden Gesamtaktivität von Mäusen nimmt mit zunehmendem Alter ab (Abb. 3.12-13) – auch dies wurde von anderen Forschern beobachtet (McAuley et al., 2002, 2004). Der Effekt des Alterns auf die Rate der Resynchronisation könnte zumindest zum Teil mit der Aktivität zusammenhängen. Da die durch Dunkelheit induzierte Aktivitätsmenge bei alten Tieren weniger ist, könnte die Rückkopplung an die circadiane Uhr (ihrer Synchronisation) auch geringer sein (Valentinuzzi et al., 1997). Das circadiane System könnte sich während des Alterns gegenüber Zeitgeberreizen desensibilisieren. Stärkere Lichtpulse könnten ein desensibilisiertes System besser synchronisieren. Die Rate der Phasenverschiebung könnte auch als Messgröße für die Stärke der Kopplung des internen Zeitmessungssystems an externe Zeitgeber sein. Bei starker Kopplung an den LD-Zyklus ist die Resynchronisation schnell, bei schwacher Kopplung entsprechend langsamer - dies ist bei dem von mir untersuchten Mäusestamm (und dem von Valentinuzzi et al., 1997) der Fall. Bei einer durchgeführten Phasenverzögerung von 4 Stunden (Abb. 3.14-3.17) stellte ich fest, dass die Resynchronisation an die neuen Lichtverhältnisse bei den KR- und MT-Tieren am schnellsten ist. Zu beachten hier ist wieder die KR-Gruppe, denn nach der Phasenverzögerung gibt es einen Überschuss an Aktivität (Abb. 3.16: dritte bis fünfte Nacht dargestellt). Ich würde dies als Überkompensation bzw. erhöhte Erregbarkeit nach dem veränderten Zeitgeber-Stimulus werten. Ferner ist aus Abb. 3.14. ersichtlich, dass die Variabilität an Gesamtaktivität von Nacht zu Nacht bei dieser Gruppe recht hoch ist. Außerdem ist das Verhältnis von Tag- zu Nachtaktivität bei dieser Gruppe am schlechtesten. Die Menge an Aktivität am ersten Tag ist fast so hoch wie die in der ersten Nacht nach der Phasenverzögerung, welches ein Ausdruck der starken Fragmentierung ist. Die MT-Tiere zeigen ebenfalls eine schnelle Anpassung an die neuen Lichtverhältnisse, ohne einen folgenden Überschuss an Aktivität wie bei den KR-Tieren. Auch bei anderen Nagetieren wurde ein positiver Effekt von Melatonin auf die Anpassung an neue Lichtverhältnisse beschrieben (Van Reeth et al., 2001).

Ein weiteres Phänomen des untersuchten Mäusestammes ist das so genannte „*rhythm splitting*“ – das Aufspalten der Aktivität in zwei Maxima über den circadianen Tag (Abb. 3.7). Es gibt die Theorie, dass die circadiane Uhr in nachtaktiven Nagetieren von zwei Oszillatoren gesteuert wird (Abe. et al., 2001). Daan et al. (1978, 2001) beobachteten dies zuerst bei Hamstern unter LL-Bedingungen (Dauerlicht).

Die lokomotorische Aktivität spaltet sich hierbei in zwei Komponenten auf (biphasisch), eine Morgen- und eine Abendkomponente (M & E, *morning & evening*). Unter Zeitgeberbedingungen sind die M- und E- Komponente eng aneinander gekoppelt, unter freilaufenden Bedingungen können sie allerdings entkoppelt werden. Auch in anderen Säugetieren und Vögeln wurde dieses Phänomen beobachtet (Abe et al., 1999 & 2001; Gwinner 1974; Pittendrigh, 1960). Die genaue Ursache für das „*rhythm splitting*“ ist noch unklar. In Hamstern könnten die M- & E-Oszillatoren in der linken und rechten SCN-Hemisphäre lokalisiert sein. Unilaterale Läsionen des SCN in Hamstern mit gespaltener Aktivität führen zum Verlust einer Aktivitätskomponente und der Wiederherstellung nur eines circadianen Aktivitätsmaximums (Daan et al., 1978). Die Expression eines Uhr-Gens (*Per1*) im SCN von biphasischen Hamstern ist asymmetrisch und wechselt von Seite zu Seite des SCN (De la Iglesia et al., 2000). Andererseits gibt es Indizien auf die Lokalisierung der beiden Oszillatoren in derselben Seite des SCN (Mason, 1991; Zlomanczuk et al., 1991). Der SCN besteht aus zwei anatomisch distinkten Subregionen, venterolateral und dorsomedial. Die letztere bekommt direkte Lichtinformationen über den RHT (Moore et al., 2002). Nur in der venterolateralen Region kann das Gen *Per1* durch Licht induziert werden (Hamada et al., 2001). Außerdem dominieren in der venterolateralen Region VIP-enthaltende Neuronen, wobei in der dorsomedialen Region AVP-enthaltende Neuronen überwiegen. Die AVP und VIP-Rhythmen dissoziieren langsam in SCN-Kulturen, welches das Vorhandensein der E- & M- Oszillatoren in Subregionen des SCN nahe legt (Shinohara et al., 1995). Abe und Mitarbeiter (2001) stellten fest, dass die Genexpression von *Per1* und *Per2* in Hirnregionen außerhalb des SCN ebenso wie die Aktivitätsmaxima bei entsprechenden Mäusen biphasisch ist, also zwei Maxima korrespondierend zu den Aktivitätsmaxima im Verlaufe des circadianen Tages aufweist.

Eine alternative Theorie für das duale Oszillatorenmodell wurde von Daan et al. (2001) vorgeschlagen. Hierbei sollen *mPer1* und *mCry1* die Hauptelemente des M-, und *mPer2* und *mCry2* die Hauptelemente des E-Oszillators sein. Diese Theorie stützt sich auf Erkenntnisse über die circadiane Aktivität bei *knockout* Mäusen jedes der genannten Gene (van der Horst et al., 1999; Vitaterna et al., 1999; Zheng et al., 1999; Albrecht et al., 2001). Die Mechanismen, die für die Kopplung oder Entkopplung von M- & E-Oszillatoren verantwortlich sind, sind bislang ungeklärt. Es wird auch eine Beteiligung des Alterungsprozesses an der Häufigkeit des „*rhythm splitting*“ Phänomens nicht ausgeschlossen (McAuley et al., 2002). Im B6C3F1 Stamm konnte ich allerdings keinen Zusammenhang zwischen dem Alter und der Häufigkeit des Phänomens erkennen.

Bei KR-Tieren konnte ich im Gegensatz zu den MT-Tieren keine ausgeprägte biphasische Aktivität unter konstanten Bedingungen (DD) beobachten.

Ich würde dies allerdings dem starken maskierenden Effekt des Hungers und der daraus resultierenden fragmentierten Rhythmik zuschreiben. Der Hungerreiz ist wahrscheinlich ein so starker Zeitgeber, dass eine Entkopplung der Oszillatoren verhindert wird. Anders ist dies bei den MT-Tieren. Hier waren bis auf die Substitution mit Melatonin dieselben Bedingungen gegeben wie bei den Kontrolltieren. Es hat den Anschein, dass Melatonin im Stamm B6C3F1 ein „*rhythm splitting*“ begünstigt. Obwohl manche Kontrolltiere ebenfalls (2 von 10 gegenüber 5 von 10 MT-Tieren) eine biphasische Aktivität in DD aufwiesen, war die Stärke ihrer Ausprägung bei den MT-Tieren am deutlichsten. Vorausgesetzt es gibt im Gehirn von Mäusen ein duales Oszillatorensystem, wäre es möglich, dass die Rückkopplung von Melatonin auf die Uhr nur einen (SCN?) Oszillator betrifft. Würde ein Oszillator bevorzugt durch die Aufnahme von Melatonin synchronisiert werden, könnte sich der zweite leichter davon abkoppeln. Die geringere Ausprägung der M- und E-Komponenten bei Kontrolltieren könnte also mit der geringeren (endogenen) Melatoninmenge zusammenhängen. Es wäre interessant, diesen Effekt in einer noch länger angelegten Studie (>30 Monate) zu verfolgen. Dann wäre es auch möglich einzuschätzen, ob Melatonin auch im fortgeschrittenen Alter bei Mäusen ein „*rhythm splitting*“ begünstigt. Melatonin ist für die Anpassung des Organismus an (sich verändernde) Lichtverhältnisse wichtig. Ruby und Mitarbeiter (2000) stellten fest, dass Hamster mit wenig endogenem Melatonin es nicht schaffen, eine 5h Phasenverzögerung zu kompensieren. Unter Lichtbedingungen eines langen Tages (16h Licht) appliziert, verursachte die 5h Phasenverzögerung einen monatelangen Freilauf unter LD-Bedingungen. Die Kopplung von Licht als starkem Zeitgeber war also nicht ausreichend, um die endogene Phase mit der der Umwelt zu synchronisieren. Durch die exogene Gabe von Melatonin konnte die Resynchronisation erreicht werden. Interessanterweise besitzt *Phodopus sungorus* (der sibirische Hamster) keinen MT2-R (Weaver et al., 1996). Dennoch konnte Melatonin (über MT1-R) synchronisierend wirken. Der MT1-R ist als G-Protein gekoppelter Rezeptor mit hoher Affinität zu seinen Liganden charakterisiert worden (Barrett et al., 2003). Der MT1-R ist für die akute inhibitorische Wirkung von Melatonin auf die Rate der SCN-Aktionspotentiale verantwortlich. Phasenverschiebungen des circadianen Systems (auch in vitro als Aktionspotentiale in SCN-Zellkultur) kommen bei MT1-R *knockout* Mäusen dennoch vor (Liu et al., 1997). Deswegen wird die Vermittlung von Phasenverschiebungen zum Teil dem MT2-R zugesprochen

(Dubocovich et al., 1998; Hunt et al., 2001). Möglicherweise hatte die Substitution von Melatonin zur Folge, dass beide Rezeptoren aktiviert wurden.

Der MT2-R hat eine niedrigere Affinität zu Melatonin als der MT1-R (in COS7 Zellen MT1-R  $K_D = 59,3 \pm 18,3 \text{ pM}$ , MT2-R  $K_D = 199,9 \pm 13,4 \text{ pM}$ ; Jin et al., 2003). Die Verabreichung von Melatonin im Trinkwasser könnte die endogene Konzentration so sehr erhöht haben, dass der MT1-R oder beide Rezeptoren gesättigt und dadurch maximal aktiviert waren. Die ausgeprägte biphasische lokomotorische Aktivität bei einigen MT-Tieren könnte also mit unterschiedlicher Rezeptoraktivierung zusammenhängen. Es wäre sehr interessant, Autoradiogramme (MT1-R) bzw. *in-situ*-Hybridisierungen für die beiden Rezeptoren bei Tieren durchzuführen, die ein „*rhythm splitting*“ aufweisen. Möglicherweise ändert sich auch die Lokalisation einer der Rezeptoren während der biphasischen Aktivität. Da mittlerweile auch k.o.-Mäuse für beide Rezeptorsubtypen existieren, wäre es ferner von Interesse, zu sehen, ob das „*rhythm splitting*“ an das Vorhandensein des einen oder anderen Rezeptors gebunden ist.

### **4.3 Expression von *Clock* in Geweben der Maus: Spleißvariante $\Delta 18$ ist nur im Gehirn von B6C3F1 Mäusen detektierbar**

Das *Clock* Transkript ist eines der wichtigsten für eine intakte circadiane Physiologie bei Mäusen. Es kodiert für einen bHLH-PAS-Transkriptionsfaktor, der als positiver Aktivator innerhalb der circadianen Rückkopplungsschleife agiert (King et al., 1997).

Der *Clock-Locus* überspannt 90kb und besteht aus 23 konventionellen Exons, von denen eines (Exon 1a) alternativ gespleißt wird (King et al., 1997a).

Das ATG-Startcodon ist in Exon 4, das TAG-Stopcodon ist in Exon 23 lokalisiert. Das offene Leseraster (*ORF, open reading frame*) ist 2,5kb groß und codiert für ein Protein von 855As (96,4 kDa, King et al., 1997).

*Clock* ist in vielen Geweben der Maus detektierbar (King et al., 1997). Im Stamm B6C3F1 konnte ich ein 2,4kb *Clock*-Transkript in neuronalen Geweben wie Hypothalamus, Cerebellum und olfaktorischen Bulbi nachweisen. In peripheren Geweben gelang es mir, das Transkript in Leber, Lunge, Milz und weiteren (im Ergebnissteil nicht gezeigten) Organen nachzuweisen. Entgegen anderer Forschergruppen (King et al., 1997) fand ich keinen Hinweis auf *Clock*-Expression in den Hoden der Maus. Die Amplifikation mit den „*Clock delta 18*“ *Primern* ergab ein ähnliches Bild ohne nachweisbare Expression im Hoden. Die in

dieser Studie verwendeten CLOCK-delta18 Primer waren in Exon 15 und Exon 21 lokalisiert.

Die  $\Delta 18$ -Spleissvariante (30As) könnte von Bedeutung sein, denn die *Clock*-Mutante entsteht durch Spleißen von Exon 19 (51As). Es ist nicht bekannt, ob der Verlust von Exon 18 ebenfalls zu einem circadianen Phänotyp führen würde.

Die *Clock*-Mutante zeigt einen ausgeprägten Phänotyp (Antoch et al., 1997; Vitaterna et al., 1994). Die homozygote *Clock*-Mutante zeigt unter DD eine sehr lange Periode  $\tau$  und einen graduierlichen Verlust der Rhythmizität (Vitaterna et al., 1994). Die codierenden Regionen für das bHLH-Motiv von *Clock* sind in Exon 5-6. Die PAS-A codierende Region ist in Exon 7-9, die von PAS-B in Exon 12 und 13.

Exon 19 befindet sich in einer glutaminreichen Domäne. Glutaminreiche Regionen von Transkriptionsfaktoren werden mit der Transaktivierung von Transkriptions-Initiationskomplexen assoziiert (Mitchell & Tjian, 1989). In Anbetracht der Tatsache, dass Exon 18 nicht in dieser oder irgendeiner anderen (essentiellen) Domäne liegt, wäre es möglich, dass sein Fehlen keinen Funktionsverlust bedingt. Das offene Leseraster wird durch Spleißen von Exon 18 unterbrochen. Da alle meine Tiere unter DD-Bedingungen rhythmisch waren, ist es höchstens möglich, dass die  $\Delta 18$ -Variante mit der nativen *Clock*-Form um E-Box-Bindungsstellen konkurriert. Natürlich ist es ebenfalls möglich, dass die  $\Delta 18$ -Spleißvariante nicht oder nur bedingt funktionell ist. Da sie aber nur mit der nativen *Clock*-Variante zusammen auftritt, wäre der Defekt teilweise kompensiert. Es gibt wenige Informationen über die Steuerung der *Clock*-Expression. Das *Clock*-Protein wird negativ durch PER, CRY und möglicherweise TIM-Proteine reguliert (Gekakis et al., 1998; Sangoram et al., 1998; Griffin et al., 1999). Wilsbacher und Mitarbeiter (2000) fanden in der Promotorregion von *Clock* 4 E-Box-Elemente, womit eine positive Autoregulation wahrscheinlich ist. Es ist allerdings umstritten, ob pauschal von einer circadianen Regulierung von *Clock* im SCN von Nagetieren gesprochen werden kann. In der Ratte wird *Clock* im SCN rhythmisch (in Phase mit *Per1*) exprimiert (Tei et al., 1997). Die Amplitude der Oszillation ist allerdings niedrig (Abe et al., 1999). In meinen Versuchen wurde Ähnliches beobachtet: eine sehr niedrige Amplitude, jedoch ähnlich der Phase von *Per1* im Hypothalamus von Mäusen. Kolker und Mitarbeiter (2003) fanden im SCN von Hamstern keinen circadianen Rhythmus der *Clock*-expression. In manchen peripheren Geweben wie Herz und Leber wird *Clock* ebenfalls rhythmisch exprimiert (Young et al., 2001; Preitner et al., 2002). Vielleicht hat die  $\Delta 18$ -Spleissvariante von *Clock* etwas mit der differentiellen Regulierung in neuronalen und peripheren Geweben zu tun. Möglicherweise ist sie an ihrer eigenen Regulierung beteiligt und beeinträchtigt in neuronalen Geweben die rhythmische Expression nach folgendem hypothetischem Schema:

A:

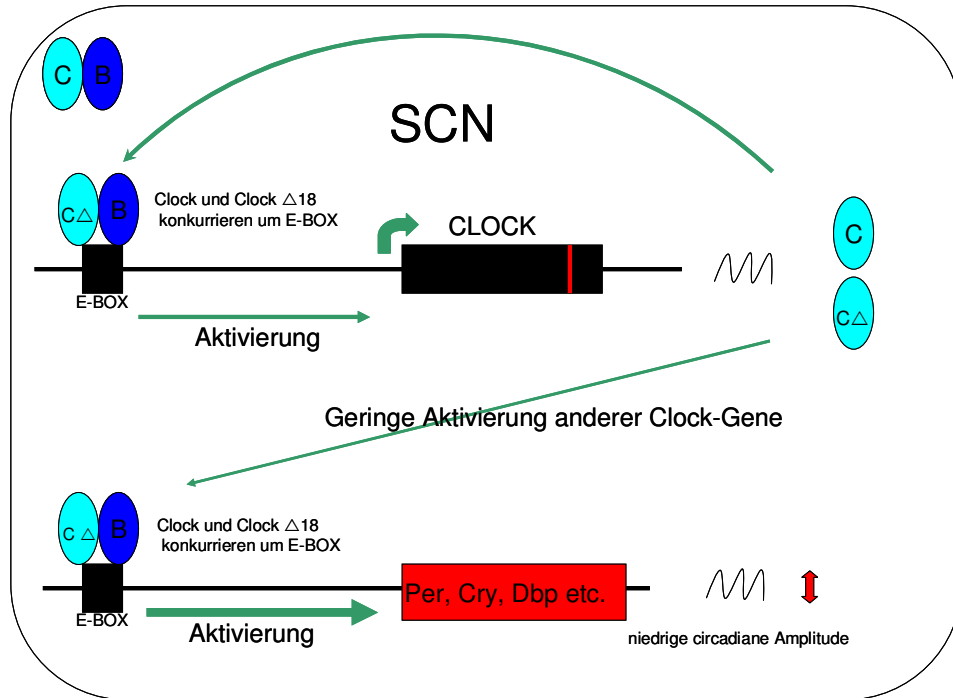


Abb. 4.3.1: hypothetische Autoregulation von Clock im SCN und neuronalen Geweben. C=Clock nativ, B= Bmal1, CΔ=Δ18-Spleissvariante. Clock konkurriert mit der Spleissvariante um E-Boxen.

B:

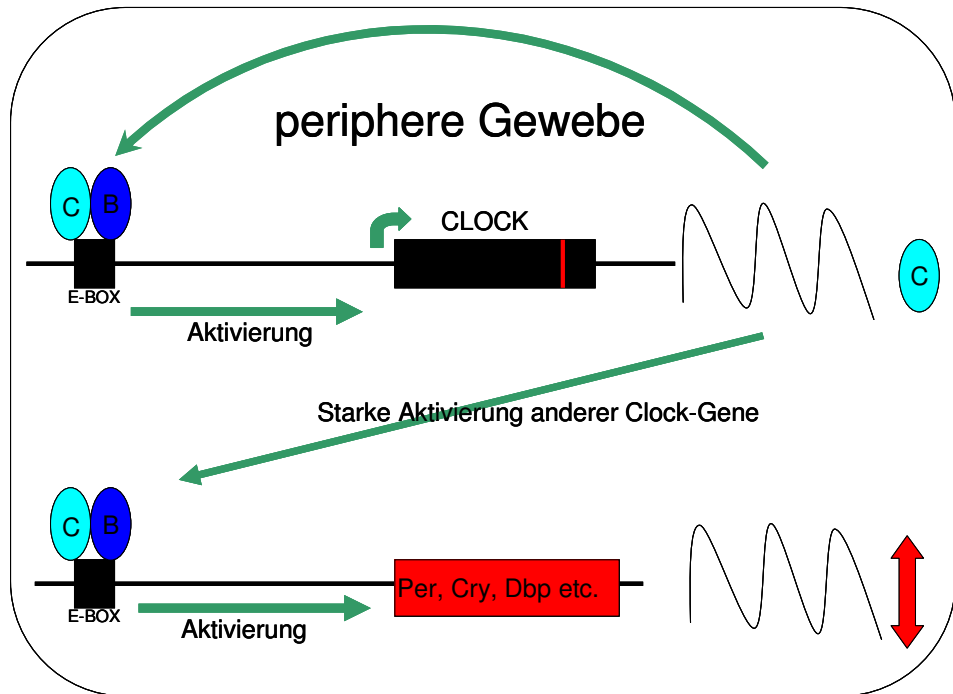


Abb. 4.3.2: hypothetische Autoregulation von Clock in peripheren Geweben. C=Clock nativ, B= Bmal1. Clock steht uneingeschränkt in seiner nativen Form als positiver Aktivator der Transkription zur Verfügung.

Im SCN konkurriert *Clock* mit der  $\Delta 18$ -Spleissvariante um die Bindung an E-Boxen im eigenen Promotorbereich und den von *Clock*-gesteuerten Transkripten (*Per*, *Cry* etc.). Dies führt zu einer geringeren Transkription von *Clock* und einer geringeren Aktivierung der *Clock*-gesteuerten Transkripte. In peripheren Geweben ist nur die native Form von *Clock* vorhanden, also kann es seine volle Aktivierungskapazität (als Dimer mit Bmal1) ausüben. Die Amplitude von sowohl *Clock* als auch aller *Clock*-gesteuerten Transkripte wäre in peripheren Geweben also höher als in neuronalen Geweben. Ähnliches wurde beobachtet, ohne bisher erklärt werden zu können.

In der Bauchspeicheldrüse von Ratten hat *Per1* ein Maximum, welches 13-fach höher als der Minimalwert ist. *Per2* schwankt 4,3-, *Cry1* 10-fach. Das *output*-Gen *DBP* hat einen 28-fach höheren circadianen Maximal- als Minimalwert (Mühlbauer et al., 2004). Auch in Organen wie Leber, Niere, Muskel, Lunge und Herz zeigen Uhr-Gene (vor allem *DBP*) eine hohe circadiane Expression (Young et al., 2001; Oishi et al., 2000; Damiola et al., 2000). Im SCN ist die circadiane Amplitude wesentlich geringer, *DBP* variiert beispielsweise nur 2-3-fach über den circadianen Tag (Ripperger et al., 2000). *Per1* und *Per2* zeigen im Ratten-SCN eine 2-4-fache circadiane Schwankung (Sumova et al., 2003; Asai et al., 2001).

Auch im Hirn des Stammes B6C3F1 fand ich nur eine sehr geringe (nicht signifikante) circadiane Schwankung von *Clock*. Die Amplituden von *DBP* und *Per2* waren zwischen 2- und 4-fach. Nur *Cry2* wies bei den MT-Tieren eine recht hohe circadiane Amplitude auf (>10-fach). In anderen Geweben wurden diese Transkripte nicht nach circadianen Aspekten betrachtet. Das Fehlen der *Clock* $\Delta 18$ -Spleissvariante in peripheren Geweben könnte Ursache für eine stärkere circadiane Expression sein, die entweder nicht oder nur mit geringerer Amplitude im Gehirn vorkommt. Ferner würde hierdurch die Diskrepanz in der Amplitude von *Clock*-gesteuerten Transkripten zwischen neuronalen und peripheren Geweben erklärt werden. Ein Versuch, der interessant für die Aufklärung des Mechanismus der Steuerung von *Clock* sein könnte, wäre das quantitative Erfassen der Transkriptmenge von  $\Delta 18$ - zu normalem *Clock*-Transkript. Da ich die  $\Delta 18$ -Spleissvariante nur in neuronalen Geweben identifizieren konnte, könnte dies weiteren Aufschluss über die Steuerung der *Clock*-Expression in neuronalen und nicht-neuronalen Geweben geben.

#### 4.4 Die MT2-Rezeptor-Sequenz

Da zu Beginn dieser Studie nur ein Teil der murinen MT2-Rezeptorsequenz veröffentlicht war, war ein wichtiges Ziel mittels PCR den unveröffentlichten Teil zu amplifizieren.

In mehreren Etappen gelang es über 700bp der MT2 mRNA zu amplifizieren (und in der Gendatenbank zu veröffentlichen). Kurz darauf veröffentlichten Jin et al. (2003) nicht nur die komplette Rezeptorsequenz, sondern hatten auch transgene Tiere generiert, die diesen Rezeptor nicht mehr besaßen. Der MT2-Rezeptor der Maus besteht dementsprechend aus 1095bp (365As). Die von mir veröffentlichte Sequenz stimmt im überlappenden Bereich bis auf 2 Basenpaare mit der von Jin und Mitarbeitern veröffentlichten überein. Es gibt offensichtlich einige Spezies-spezifische Variationen in der Sequenz des MT2-Rezeptors. Bei einigen Spezies von Hamstern ist der MT2-Rezeptor nicht funktionell (Weaver et al., 1996). Es ist durchaus möglich, dass es zwischen verschiedenen Mäusestämmen Unterschiede in der Sequenz aufgrund von Polymorphismen gibt (Jin et al., 2003) – dies ist im von mir untersuchten Stamm der Fall. In der von mir veröffentlichten Sequenz sind die Transmembrandomänen (TM) IV-VII enthalten. Der Aminosäureaustausch von Threonin zu Glutamat befindet sich in der intrazellulären Schleife (abgeleitet von der humanen MT2-Struktur, Reppert et al., 1995) zwischen TM V und VI.

ICHSTTYHRVCSHWYTPYISLVWLLTLVALVPNFFVGSLEYDPRIYSCTFIQTASTQY  
TAAVVVAIHFLLPMAVVSFCYLRIWVLVLQARRKAKA**E**RKLRLRPSDLRSFLTMFAV**FV**  
VFAICWAPLNCIGLAVAINPEAMALQVPEGLFVTSYFLAYFN**SCLNAIVY**GLLNQNFRR  
 EYKRILLAIWNTRRCIQHASKHCLTEERQGPTPPAARATVPVKEGAL

**Abb. 4.4-1: Auszug aus der Aminosäuresequenz des MT2-Rezeptors im Stamm B6C3F1. Transmembrandomänen sind unterstrichen (beginnend bei TM IV). Rot und Fett ist die ausgetauschte Aminosäure.**

Die für G-Protein-gekoppelte Rezeptoren typischen Motive sind durch den Aminosäureaustausch nicht beeinflusst. Hierzu gehören z.B. in TM VII ein für die Melatoninrezeptoren typisches Motiv NA[I/V][I/V]Y (Jin et al.,2003).

Es gibt keinen profunden Hinweis dafür, dass der MT2-Rezeptor im B6C3F1-Stamm nicht funktionell ist. Überhaupt scheinen die beiden Subtypen MT1 und MT2 bis zu einem gewissen Grad funktionell redundant zu sein. Hamster mit einer natürlichen *nonsense*-Mutation im MT2-Rezeptor zeigen alle normalen circadianen Reaktionen (Weaver et al., 1996). Auch der murine MT2-Rezeptor *knockout* zeigt einen sehr unauffälligen circadianen Phänotyp (Jin et al., 2003). Die Tatsache, dass Melatonin in niedriger Konzentration über MT1, in hoher über MT1 und MT2 wirkt, beruht wahrscheinlich nicht auf einer geringeren Affinität von MT2, sondern auf der geringeren Rezeptorexpression.

Beide MT-Rezeptoren hatten in meinen qRT-PCR Reaktionen sehr hohe Ct-Werte (>33 Zyklen), was auf eine extrem niedrige Expression schliessen lässt. Der MT1-Rezeptor ist für alle autoradiographisch detektierbaren Melatoninbindungen im Gehirn von Mäusen verantwortlich (Liu et al., 1997).

## 4.5 Genexpression in der Leber

In Nagetieren, Primaten und Menschen reduziert KR Blut-Glucose, Insulin-Werte und die Höchstkonzentration an Glucose in oralen Glucose-Toleranz-Tests (Weindruch et al., 1982 & 1983). Es gibt einige Hinweise darauf, dass Glucose und Insulin eine Rolle in vielen Pathologien des Alterns spielen. Hyperglykämie wird mit neurologischen Komplikationen, mikrovaskulären Störungen, Verdickung der Basalmembranen und beeinträchtigter zellulärer Immunität in Verbindung gebracht (Barzilai et al., 1995). Hyperinsulinämie ist mit koronarer Herzkrankheit, Bluthochdruck und Arteriosklerose assoziiert (Stout et al., 1990). Alle erwähnten Pathologien gehen mit erhöhten Glucosespiegeln einher und werden durch KR vermindert oder gar vermieden (Dhahbi et al., 1999). Veränderungen im Kohlehydrate-Metabolismus könnten eine wichtige Rolle in der Vermittlung von „*anti-aging*“-Effekten durch KR spielen. Die Untersuchung der Genexpression in der Leber von Mäusen kann dazu beitragen, den Mechanismus wie KR wirkt zu verstehen. Die Untersuchung der Genexpression in der Leber von KR-Mäusen ist schon gut charakterisiert (Dahabi et al., 2004 & 1999), deswegen war dies auch eine gute Bestätigung für den Erfolg der etablierten Restriktionsernährung. Ferner sollte festgestellt werden, ob es Überlappungen in den Expressionsprofilen von KR- und MT-Tieren gibt. Die am stärksten aufgeregelten Gene in der Leber durch KR waren in meinem Versuch die Cytochromoxidasen Cyp3a11, Cyp2a4 und Por. Sie gehören zu einer hochkonservierten Superfamilie von Monooxygenasen, die eine Vielzahl zellulärer Prozesse katalysieren. Hierzu gehören Steroidhormonsynthese und Detoxifikation (Lin et al., 2001). Aufgrund ihrer Teilnahme am xenobiotischen Metabolismus wird Mitgliedern der Cytochrom P450-Familie antineoplastisches Potential nachgesagt. Das Vorkommen von Hepatoma bei alten Tieren steigt, während die Expression dieser Transkripte sinkt (Cao et al., 2001). Da Cyp3a11 durch Testosteron induzierbar ist, wäre anzunehmen, dass die KR-Tiere hohe Testosteronwerte haben – in anderen Studien wurde allerdings festgestellt, dass KR Testosteronwerte senkt (Dhahbi et al., 2004).

Die Cyp3a-Isoformen metabolisieren Testosteron und sind auch durch xenobiotische Faktoren induzierbar (Hagemeyer, 2003). Aus diesem Grund könnte die Expression auch erhöht sein.

Cyp2a4 (15 $\alpha$ -Hydroxylase) ist essentiell für die Steroidhormonsynthese. Miller und Mitarbeiter berichten ebenfalls von einer starken Induktion (>10-fach) bei KR-Mäusen. Auch bei MT-Tieren war Cyp2a4 induziert (ca. 2-fach).

Das Transkript Cyp2a4 ist besonders interessant, da es auch circadian durch DBP (D-Site-Binding Protein) reguliert wird (Akthar et al., 2002; Lavery et al., 1999). In der Leber von Mäusen wird die Detoxifikation zumindest teilweise unter der Kontrolle der inneren Uhr reguliert. Nun könnte man annehmen, dass die Cyp2a4-Expression als Folge eines Einflusses von KR auf die innere Uhr gesteigert wird, da DBP ein *output gen* der Uhr darstellt. Dies würde allerdings bedeuten, dass auch die DBP-Mengen in KR-Maus-Lebern dramatisch gesteigert wären. Ich halte dies für sehr unwahrscheinlich, denn Cyp2a4 (und andere P450-Enzyme) werden auch durch andere Mitglieder der PAR-Familie von Transkriptionsfaktoren wie TEF (*thyroid embryonic factor*) und HLF (*hepatic leukemia factor*) induziert (Lavery et al., 1999).

Ferner wird die Fettsäuresynthetase auch circadian gesteuert (Oishi et al., 2003), welche bei KR-Tieren herabgeregelt wird. Die reduzierte Expression von Fasn (Fettsäuresynthetase) und Fabp1 (Fettsäurebindendes Protein1) deuten auf eine reduzierte Kapazität zur Fettsäurebiosynthese. Die Reduktion von Fasn und Fabp1 durch KR wurden ebenfalls berichtet (Dhahbi et al., 2004, Cao et al. 2001).

Das Transkript Thrsp (SPOT14), welches durch KR stark (4-fach) herabgeregelt wird, ist durch das Schilddrüsenhormon induzierbar. Wenig ist bisher über dieses Transkript bekannt, es wird jedoch angenommen, dass es eine Rolle in der Lipogenese spielt (Grillasca et al., 1997). Da die Niveaus an Schilddrüsenhormon durch KR gesenkt werden (Herlihy et al., 1990), kann die niedrige Thrsp-Transkription so erklärt werden. Bestärkt wird dies weiter durch Beobachtungen von Dhahbi et al. 2004, hier wurden auch abregulierte Thra1 (*thyroid hormone receptor alpha-1*) und Ttr (ein Transportmolekül für T3 in Nagetieren) Expressionen in der Leber von KR-Mäusen festgestellt.

Das Molekül Slc21a1 ist am Transport von organischen Anionen durch die Hepatozytenmembran und an der Bildung von Gallensalzen beteiligt (Wolters et al., 2002). Seine Herabregulierung könnte mit der ernährungsbedingt verringerten Gallenproduktion bei KR-Tieren zusammenhängen. Unterstützt wird diese Annahme durch das Fehlen eines signifikanten Einflusses von Melatonin.

Durch Melatonin wurden keine Transkripte sehr stark beeinflusst. Induziert wurden u.a. P4ha2 (procollagen-prolin, 2-oxoglutarat 4-oxygenase), Slc25a12 (ein mitochondriales Transportmolekül), das bereits diskutierte Enzym Cy2a4, Mgl1 (eine Monoglyceridlipase) und interessanterweise ein Transkript des Zellzyklusses – Cyclin M2 (Cnm2).

Zu den von KR bekannten Effekten gehört die Induktion von Genen, die mit Apoptose und Zellwachstum assoziiert werden. Die Induktion von Cyclin in der Leber als potentiell mitotisches Gewebe würde ich als positiv deuten, denn abgestorbene Hepatozyten könnten schneller durch neue ersetzt werden.

Die Herunterregulierung des Transkriptes Slc37, welches das einzige ist, dass ähnlich stark wie durch KR reguliert wurde, muss auf einem ganz anderen Mechanismus beruhen. Slc37 transportiert Glycerol-3-Phosphat in die Hepatozyten. Es ist von KR bekannt, dass die enzymatische Fähigkeit zur Gluconeogenese und zur Verwertung von Nebenprodukten des extrahepatischen Proteinkatabolismus zur Energiegewinnung gesteigert wird. Die enzymatische Kapazität zur Glycolyse wird verringert (Cao et al., 2001). Es könnte also bei den KR-Tieren sein, dass die Repression von Slc37 eine Folge von verringerter glycolytischer Aktivität ist. Warum auch Melatonin dieses Transkript auf die gleiche Art beeinflusst, ist ungewiss. Es ist interessant, dass Thrsp ebenfalls wie bei den KR-Tieren reprimiert wird. Falls dies mit reduzierten Mengen an Schilddrüsenhormon (T3) zusammenhängt, wäre dies ein sehr vorteilhafter Effekt von Melatonin. T3 beeinflusst eine Menge von Stoffwechselprozessen in Säugetiergeweben, u.a. die oxidative Phosphorylierung und Sauerstoffverbrauch (durch den freie Radikale entstehen können) (Cao et al., 2001).

Die von mir gefundenen Effekte der KR-Behandlung in der Leber von Mäusen stimmen weitestgehend mit der Literatur überein. Dies ist ein Indiz dafür, dass die Applikation der Diät und auch die Analyse der Genexpression mittels *Microarray*-Technologie erfolgreich und verlässlich war. Die Melatoninbehandlung hatte im Vergleich zu KR einen wesentlich subtileren Effekt. Keine der durch KR induzierten oder reprimierten Transkripte waren ähnlich stark durch Melatonin beeinflusst. Nur das Transkript slc37, ein Transportmolekül für Glycerol-3-Phosphat, war mit beinahe 3-facher Repression ähnlich beeinflusst wie durch KR. Da die Mechanismen, durch die Melatonin und KR auf die Genexpression in der Leber von Mäusen wirken, sehr unterschiedlich sein müssen, ist es erstaunlich, dass es Überlappungen in der Beeinflussung einzelner Transkripte gibt.

## 4.6 Hypothalamische Genexpression

### 4.6.1 Expression bekannter Uhr-Gene

Die circadiane Expression der bekannten Uhr-Gene entsprach größtenteils den Beschreibungen in der Literatur.

Von den *Per* und *Cry* Genen ist bekannt, dass ihre mRNA in der Lichtphase (im SCN) ihr Maximum erreicht (Kume et al., 1999; Shearman et al., 2000, Zylka et al., 1999). Die Festlegung des circadianen Maximums für *Per2*, *Cry1*, *Cry2*, *DBP* und *AVP* spät am subjektiven Tag (ca. ZT 12) deckt sich gut mit den Berichten von Oster und Mitarbeitern (2003). Die Expression von *Per1* ist im SCN in ihrer Phase immer leicht vor der von *Per2* und *Per3* (King et al., 2000; Reppert & Weaver, 2001). Dies konnte ich nicht bestätigen - möglicherweise da der Hypothalamus ein recht heterogenes neuronales Gewebe ist. Die Phase von *Per1* scheint bei den KR- und MT-Tieren sogar in Richtung ZT18 verschoben zu sein, allerdings ist dies gegenüber ZT12 nicht signifikant. Die Amplitude der Transkripte von *Per1* und *Per2* ist mit 2-3-fach etwas niedriger als für den SCN beschrieben (o.g. Autoren). Die Expression von *Cry2* weist bei den MT-Tieren eine sehr hohe circadiane Amplitude (ca. 15-fach) auf. Dies ist verwunderlich, denn es konnte entweder kein klar definierter Rhythmus (Oster et al., 2003) oder nur ein schwacher (Okamura et al., 1999) im SCN nachgewiesen werden. Da dies nur ein Effekt bei den MT-Tieren war, könnte dies ein Hinweis auf eine stärkere Ausprägung der negativen Rückkopplungsschleife sein. Die CRY-Proteine sind nämlich (mit den PER Proteinen zusammen) die dominanten negativen Regulatoren der circadianen Rückkopplungsschleife (Kume et al., 1999). Ferner könnte ein Zusammenhang mit dem beobachteten „*phase splitting*“ bestehen. Daan und Mitarbeiter (2001) erweiterten die Duale-Oszillatoren-Hypothese und stellten die These auf, dass die innere Uhr im SCN aus einem nicht-redundanten Doppelkomplex circadianer Gene besteht. Hierbei bilden die Proteine PER1 und CRY1 die schon erwähnte Morgen-Komponente und PER2 und CRY2 die Abendkomponente (*morning & evening oscillators*). Der M-Oszillator (PER1/CRY1) würde durch Licht beschleunigt und durch Dunkelheit gebremst werden. Der E-Oszillator (PER2/CRY2) würde durch Licht gebremst und durch Dunkelheit beschleunigt werden.

Da das *Per2*-Transkript nicht verändert war gegenüber unbehandelten Tieren, bleibt nur *Cry2* als Teil der E-Komponente, dessen stärkere Expression den Abendoszillator so sehr kräftigen könnte, dass er sich wie auf den entsprechenden Aktogrammen sichtbar vom Morgenoszillator abkoppelt.

Die Expression von *Bmal1* ist, wie beschrieben (Oster et al., 2003), antiphasisch zu der von *Per* und *Cry*, mit einem Minimum in der Lichtphase (zwischen ZT6 und ZT12) und einem Maximum gegen ZT18. Die Amplitude von *Bmal1* im Hypothalamus ist sehr gering, es gibt recht hohe Standardabweichungen.

Je nach berichtender Forschergruppe gibt es Diskrepanzen zwischen den Phasen der Uhr-Gene (*Per*, *Cry*, *Bmal* etc.).

Da häufig unterschiedliche Stämme von Mäusen benutzt werden oder die Tiere verschiedene Alter aufweisen, muss davon ausgegangen werden, dass es entweder einen Stamm- oder altersspezifischen Effekt in der Expression der Uhr-Gene gibt.

Das Transkript *AVP* zeigt bei den MT-Tieren einen interessanten circadianen Verlauf. Es scheint im Vergleich zu den Kontroll- und KR-Tieren antiphasisch zu sein. Veränderungen des *AVP* (*arginine vasopressin*)-Gehaltes im SCN und seiner Freisetzung aus der SCN-Kultur zeigen eine circadiane Rhythmik (Gillette et al., 1987; Watanabe et al., 2000; Dardete et al., 2004). Die dorsomedialen Neuronen im SCN enthalten *AVP* und vermitteln circadiane Informationen an andere Hirnareale (u.a. die Pinealdrüse). Die Pinealdrüse von Säugetieren erhält noradrenerge sympathische Efferenzen vom SCN über das obere Cervicalganglion. Melatonin hat eine Funktion an der Synchronisation des zentralen Schrittmachers (Redman et al., 1983), aber seine Rolle bei der Synchronisation von Neurotransmittern des SCN ist nicht völlig geklärt. Melatonin inhibiert den VIP-induzierten (*vasoactive intestinal peptide*) Anstieg von cAMP, hat aber keinen Effekt auf die basale VIP-Konzentration in kultivierten SCN-Zellen (Vanecek et al., 1998). Diese Effekte werden durch die im SCN vorhandenen Melatoninrezeptoren vermittelt (Liu et al., 1997). Im Zellkultursystem mit (Ratten) SCN-Neuronen wurde durch Isobe und Mitarbeiter (2001) festgestellt, dass die *AVP*-Freisetzung durch Melatonin inhibiert wird. Wie circadiane Informationen vom SCN zur Pinealdrüse gelangen ist recht gut geklärt, jedoch ist die reziproke Interaktion der Pinealdrüse mit dem SCN unklar. Das *AVP*-Transkript zeigt im Hypothalamus der MT-Tiere einen reziproken Verlauf im Vergleich mit den KR- und Kontrolltieren. Dieses Resultat ist in der Tat erstaunlich, denn zu erwarten wäre eigentlich, wie bei den KR- und Kontrolltieren, ein hoher Tagwert und ein niedriger Nachtwert. Durch den *AVP*-inhibierenden Effekt von Melatonin würde ein sehr niedriger Nachtwert plausibel erscheinen.

Dies ist schwierig zu erklären. Eine Möglichkeit ist, dass die circadiane Regulation von AVP nicht ausschließlich über Melatonin geschieht. Es könnte sein, dass der AVP-unterdrückende Effekt von Melatonin stark zeitversetzt eintritt und daher erst am Ende der subjektiven Nacht zu einer Verringerung der AVP-mRNA führt.

Wirklich plausibel ist dieses Resultat nicht, da es aber auf *Microarray*-Ebene ähnlich war, ist es relativ verlässlich.

#### 4.6.2 Circadiane Expression von Transkripten im Hypothalamus der Maus - *Microarray*-Analyse

Die *Microarray*-Analyse von circadian exprimierten Transkripten im Hypothalamus der Maus ergab eine Vielzahl von Transkripten aus unterschiedlichen Genkategorien.

Da eine vergleichbare Studie an Hypothalami bislang nicht durchgeführt wurde, ist es mir nur möglich, meine Ergebnisse mit denen aus ähnlichen (neuronalen und nicht-neuronalen) Geweben zu vergleichen.

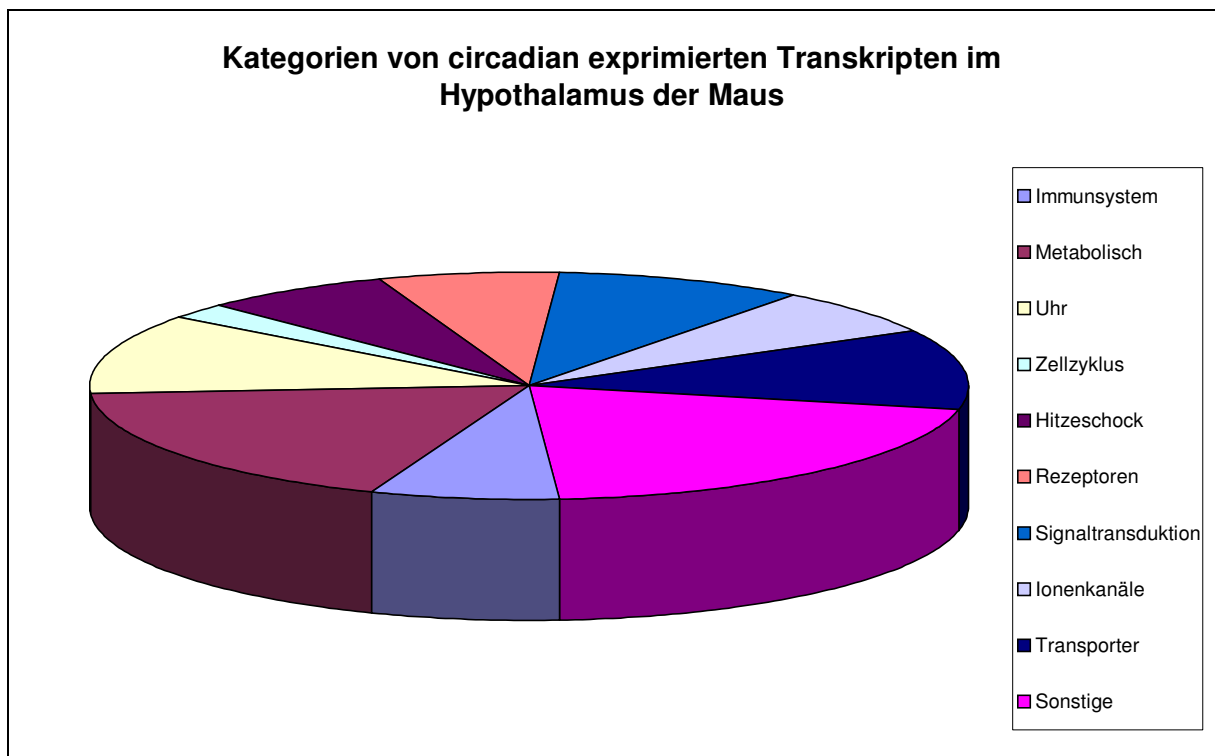


Abb. 4.6.2-1: Kategorien circadian exprimierter Transkripte im Hypothalamus der Maus, aus *Microarray*-Experimenten erhalten.

Von den untersuchten 1000 Genen erfüllten nach Datenreduktion noch 4,3% das Kriterium für „circadian reguliert“ (43 Gene). In anderen *Microarray*-Studien werden je nach Spezies

und Gewebe bis zu 8,8% circadian regulierte Transkripte berichtet (Akhtar, Reddy et al. 2002), es kommen aber auch nur 2% vor (Duffield, Best et al. 2002). Dies ist stark vom untersuchten Gewebe und vor allem von der Art der verwendeten *Microarrays* abhängig.

Aus der Kategorie Signaltransduktion werden u.a. eine Adenylatkinase (AK4) und das Oncogen Junb im Hypothalamus rhythmisch exprimiert. Diese beiden Transkripte wurden in der Mäuseleber von Oishi und Mitarbeitern (2003) ebenfalls als circadian exprimiert beschrieben, für den Hypothalamus ist diese Information neu. Im Promotorbereich von Junb gibt es zwei putative E-Boxen, ein Hinweis auf eine positive Steuerung durch CLOCK/Bmal1. Ob im Promotor von AK4 ebenfalls E-Boxen vorhanden sind, ist nicht bekannt. Auch das Gen Cyclin T1 besitzt eine E-Box und ist im Hypothalamus (wie in der Leber) rhythmisch.

Es gibt weitere Übereinstimmungen zwischen in der Leber (Oishi, Miyazaki et al. 2003) und im Hypothalamus rhythmischen Transkripten.

Hierzu gehören das Hitzeschockprotein Dnaj1, ein Transkript des Immunsystems (complement component C1SB), einige Transportmoleküle (Slco, *solute carrier*) und die schon beschriebenen *Output-Gene* AVP und DBP. Ferner ist die Casein Kinase 1 $\epsilon$  meinen Untersuchungen nach rhythmisch. Wie in der Einleitung erwähnt, phosphoryliert diese Kinase PER und CRY Proteine, mutiert entsteht der  $\tau$ -Phänotyp bei Hamstern (Ralph and Menaker 1988). Eine circadiane Expression dieses Enzyms würde in der Tat sinnvoll erscheinen, denn seine Zielproteine (PER, CRY) sind über den Tag verteilt in unterschiedlichen Mengen verfügbar.

Eine interessante Entdeckung ist die circadiane Regulierung von Untereinheiten von Ionenkanälen (Gja3, Gja10) und des Glutamatrezeptors. Die Neuronen des SCN empfangen Lichtinformationen über den RHT (Retinohypothalamischer Trakt) durch die Neurotransmitter PACAP (*pituitary adenylyl cyclase-activating peptide*) und Glutamat (Reppert & Weaver 2002). Die hohe Expression um ZT18, der Mitte der Aktivitätsphase, könnte zu einer Sensibilisierung des photopischen Systems gegenüber Licht beitragen. Nur die angemessene Reaktion auf eine Veränderung des Lichtregimes (z.B. ein Lichtpuls) kann ein Tier optimal an seine Umwelt anpassen. Die hohe Expression dieses Rezeptors bei den MT-Tieren zu zwei Zeiten des Tages könnte die Sensitivität für Zeitgeberreize über das Glutamat/PACAP-System erhöhen und somit schnellere Anpassungen an Phasenverschiebungen begünstigen.

Die alten Tiere hatten um ZT6 von allen Gruppen die höchste Expression des Glutamatrezeptors, zeigen aber eine schlechtere Anpassung an wechselnde Lichtverhältnisse. Da im alternden Tier die Sehfähigkeit abnimmt, könnte dies also eine Kompensation des verminderten photopischen Einganges sein.

Natriumabhängige Aktionspotentiale bilden das primäre Signal, mit dem der SCN circadiane *output-Signale* an andere Hirnregionen vermittelt, und sind für seine Rolle als Schrittmacher essentiell (Repper & Weaver, 2001). Mindestens zwei ionische Mechanismen sind unter der Kontrolle des SCN – ein *L-type*  $Ca^{2+}$  und ein  $K^+$  -Strom, der essentiell für die Aufrechterhaltung des Membranpotentials ist (Pennartz et al., 2002). Die summierte Aktivität dieser Ströme könnte zur starken Entladungsrate in den SCN-Neuronen beitragen (Welsch et al., 1995). Wie die circadiane Variation in der SCN-Entladung zustande kommt, ist bisher unklar. Reppert (2002) schlägt vor, dass Untereinheiten von Ionenkanälen rhythmisch reguliert sein könnten und somit die tagsüber hohe, nachts niedrige Entladungsrate beeinflussen.

Die Regulierung der Untereinheiten Gja3, Gja10 und des spannungsabhängigen Natriumkanals Scn1a im Hypothalamus könnte diese Annahme festigen. Ein Teil der Signalmoleküle aus SCN-Efferenzen sind Neurotransmitter und sekretierte Faktoren, die inhibitorische oder exzitatorische Wirkungen auf die lokomotorische Aktivität ausüben.

TGF- $\alpha$  wirkt bei Infusion in den dritten Ventrikel (über dem SCN) inhibierend auf die Aktivität von Mäusen (Kramer et al., 2001). Im Hypothalamus wurde eine circadian variierende Expression von TGF- $\beta$ 3 beobachtet – und zwar bei allen untersuchten Tiergruppen. Nur um ZT6 war die Expression von TGF- $\beta$ 3 bei den KR-Tieren um etwa 53% reduziert, ansonsten waren keine eindeutigen Behandlungseffekte erkennbar. Die alten Tiere hatten ebenfalls eine niedrigere TGF- $\beta$ 3 Expression (ZT12). Wird angenommen, dass auch das erwähnte Transkript einen inhibitorischen Effekt auf die lokomotorische Aktivität hat, passt sein Expressionsmaximum um ZT6 (Mitte der Lichtphase) sehr gut ins Bild. Ferner ist bekannt, dass Tgf- $\beta$ 3 als neurotropher Faktor Neuronen vor exzitatorischen und metabolischen Defekten schützen kann (Mattson et al., 1997). Die beobachtete Abregulierung bei KR-Tieren tagsüber steht im Gegensatz zur Aufregulierung im Neocortex (Lee et al., 2000). Allerdings wurde bei der zuletzt erwähnten Studie nicht nur ein anderes Gewebe, sondern auch nur ein Zeitpunkt untersucht, der allerdings (wie häufig in solchen Studien) nicht genannt wurde.

Die circadiane Transkription von Translationsfaktoren (Eif2b, Eif4bp2) oder deren Untereinheiten ist aus pathologischer Hinsicht sehr interessant. Eif2b spielt eine entscheidende Rolle in der Einleitung der Translation (Abbott et al., 2004).

Mutationen in diesem Gen lösen eine schwere Krankheit aus, die „Leukoencephalopathie mit schwindender weißer Masse“ bzw. Kindheits-Ataxie mit zentraler Hypomyelierung (Leegwater et al., 2001, 2003) genannt wird. Träger von Mutationen in diesem Gen entwickeln sich erst normal, erfahren aber später progressiven, neurologischen Verfall in Verbindung mit Ataxien und Spastiken. In Kontrolltieren zeigt Eif2b ein circadianes Maximum um ZT6 und Minimum um ZT18. Bei alten Tieren ist die Expression um ZT6 auf etwa 60% gegenüber den Kontrolltieren reduziert. Allerdings zeigt die Melatoninsubstitution an ZT0, 6 und 12 ebenfalls eine Abregulierung dieses Transkriptes. In Anbetracht der gravierenden neurologischen Bedeutung dieses Translationsfaktors wäre es sicherlich interessant, festzustellen ob eine altersbedingte Veränderung ebenfalls an Pathologien gekoppelt ist.

Mit einem beinahe 3,5-fachen Expressionsmaximum an ZT6 ist der Insulinrezeptor (Insrr) aufgefallen. Insulin und sein Rezeptor kommt weit verbreitet im zentralen Nervensystem vor, insbesondere in Regionen, die an der Regelung der Energie Homöostase beteiligt sind (Gerozissis et al., 2004). Eine circadiane Schwankung der Rezeptorexpression wurde in den Hypothalami aller betrachteten Tiere festgestellt. Der Zeitpunkt maximaler Expression war um ZT6. Bei den KR-Tieren war die Expression zu diesem Zeitpunkt ca. 50% höher als bei Kontrolltieren. Insulin agiert als Mediator in der Kommunikation zwischen dem peripheren endokrinen System und dem Gehirn über verschiedene Teilschritte der Neuroendokrinen Achse (Unger & Betz, 1998). Intracerebroventrikuläre oder hypothalamische Infusion von Insulin stoppt die Nahrungsaufnahme (anorexigenischer Effekt) und verursacht eine Gewichtsreduktion (leptogenisch) bei Nagetieren und Primaten (McGowan et al., 1990; Schwartz et al., 1992). Es gibt zunehmende Hinweise darauf, dass Insulin diverse metabolische, neurotrophe, neuromodulatorische und neuroendokrine biologische Effekte vermittelt (Barbaccia et al., 1982; Boyd et al., 1986; Duarte et al., 2003). Die beobachtete circadiane Insulinrezeptorexpression ist in Antiphase zu der (angenommenen) Insulinsekretion, die erst nach Nahrungsaufnahme steigt. Dies würde bedeuten, dass der Insulinrezeptor durch seinen Liganden negativ reguliert wird. Eine Störung in der Verfügbarkeit von Hirn-Insulin oder der Signalübertragung (über seinen Rezeptor) führt zu schwerwiegenden Erkrankungen wie z.B. Diabetes, mentale oder reproduktive Störungen und

schwerem Übergewicht. Störungen des circadianen Systems könnten ebenfalls den Insulin-Signalweg beeinträchtigen und zu entsprechenden Erkrankungen führen.

Diverse Transkripte von Transportmolekülen der Kategorie Slco waren im Hypothalamus circadian reguliert. Amplitude und Phase waren hierbei variabel. In der Leber beobachteten Akhtar und Mitarbeiter (2002) ebenfalls eine Reihe circadianer Transkripte dieser Kategorie. Es gab zwischen der von mir durchgeführten Studie keine Übereinstimmungen der spezifischen Transkripte. Dies ist aufgrund des unterschiedlichen hepatischen und hypothalamischen Transkriptoms nicht verwunderlich. Es scheint plausibel, dass der Transport von Glukose, Anionen etc. dem zellulären Bedarf im Verlaufe des Tags angepasst wird. Ferner wird aufgrund der verschiedenen Phasen der Transkripte deutlich, dass auch funktionell verwandte Transkripte nicht unbedingt in Phase exprimiert werden. Dies legt die Annahme nahe, dass funktionelle Kaskaden einer temporalen feinkörnigen circadianen Regulation unterliegen.

Die Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase (G6pdx) weist bei KR-Tieren eine besonders starke circadiane Schwankung mit einem Minimum um ZT12 und Maximum um ZT18 auf. Sie ist ein Enzym des Pentosephosphat-zyklus. Ferner ist die Glutamin-Fruktose-6-Phosphat-Transaminase (*Glutamine:fructose-6-phosphate amidotransferase, GFAT*) circadian reguliert. Sie ist das geschwindigkeits-bestimmende Enzym in der Synthese von Glucosaminen und Hexosaminen (Sayeski et al., 1997). Der Hexosamin-Biosyntheseweg reguliert eine diverse Anzahl zellulärer Vorgänge, einschließlich glucose-induzierter Insulin-Desensibilisierung in Adipozyten (Marshall et al., 1991), Glycogensynthese-aktivität (Crook et al., 1993), Pyruvatkinase-aktivität (Traxinger et al., 1992) und Glucose-induzierte Expression von Wachstumsfaktoren (McClain et al., 1992). Glucosamine, die Produkte der *GFAT*-Aktivität können den Effekt von Glucose mimen. Im Hypothalamus von KR-Tieren scheinen diese beiden Enzyme des Stoffwechsels eine hervorgehobene Rolle zu spielen, denn bei Kontroll- und MT-Tieren ist bei diesen kaum eine tageszeitliche Variation zu erkennen. Dies entspricht einer geringeren Bedeutung dieser metabolischen Wege in (neuronaalem) Gewebe bei diesen Gruppen. Die restriktive Fütterung scheint also auch in neuronalen Geweben stoffwechselrelevante Transkripte zu beeinflussen.

Üblicherweise gehören zu Effekten des Alterns bei Mäusen eine Veränderung der Expression vieler Transkripte aus diversen Kategorien. Diese Veränderungen sind durch KR größtenteils

verhinderbar. Metabolische Enzyme aus der mitochondriellen Atmungskette sind im Alter erhöht, welches zu vermehrter Bildung von Sauerstoffradikalen führen kann (Sohal et al., 1996).

Einige NADH-ubiquinon oxidoreduktasen, Cytochrom-c-Oxidasen und Untereinheiten von ATP-Synthasen wurden als erhöht im murinen Hypothalamus beschrieben (Jiang et al., 2001). Leider existierten zum Zeitpunkt der Anfertigung dieser Arbeit keine Studien, in denen mehrere Zeitpunkte und Behandlungen untersucht wurden. Ferner wurde wie erwähnt meist nicht einmal die Zeit der Probennahme erwähnt. Die meisten der berichteten Effekte sind extrem an den Beobachtungszeitpunkt gebunden. Ich kann z.B. den Effekt der Aufregulierung einer ATP-Synthase Untereinheit bei 30 Monate alten Mäusen nicht bestätigen (ZT6).

Allerdings ist der abregulierende Effekt von KR auf die ATP-Synthase, verglichen mit gleich alten Kontrolltieren, an drei von vier untersuchten Zeitpunkten wie in der Literatur beschrieben. Synuclein, dem eine Rolle in der Alzheimer Erkrankung zugesprochen wird (Bertoli-Avella et al., 2004) ist bei alten Mäusen erhöht und durch KR an drei von vier Zeitpunkten reduziert. Bei MT-Tieren ist nur um ZT18 eine Reduktion der Synuclein-expression beobachtet worden.

Altern ist ferner mit der Abregulierung vieler Gene verbunden, die eine Rolle in der Synaptischen Informationsübertragung im Hypothalamus und Cortex von Mäusen haben (Jiang et al., 2000).

Calmodulin ist ein Calcium Signalprotein, welches eine essentielle Rolle an der Regulierung neuronaler Aktivität hat. Es steuert z.B. die Verteilung von Neurotransmitter-Rezeptoren an Synapsen (Masuko et al., 1999). Bei den untersuchten 30 Monate alten Mäusen (gegenüber 14 Monate alten) ist Calmodulin1 im Widerspruch zur Literatur (Jiang et al., 2001) leicht erhöht. Bei KR-Tieren ist die Calm1 Expression um ZT0-6 niedriger und um ZT12 und 18 höher als bei Kontrolltieren. Bei den MT-Tieren ist Calm1 um ZT0 hoch exprimiert, nimmt bis ZT12 ab und bis ZT18 wieder zu. Auch Calmodulin2 zeigt einen interessanten circadianen Rhythmus und individuellen Behandlungseffekt. Möglicherweise hat die circadiane Expression von Calmodulin auch etwas mit der beobachteten circadianen Expression vom Glutamat- oder *Gastrin releasing peptide receptor* zu tun.

In vorherigen Studien der Genexpression im Neocortex und Cerebellum (Lee et al., 2000) wurden nur etwa 1% der untersuchten Gene durch das Altern beeinflusst. Es wurden bei den 30 Monate alten Kontrolltieren kaum genetische Veränderungen entdeckt, die offensichtlich pathologischen Ursprungs waren. Dies mag daran liegen, dass der B6C3F1-Stamm sehr

langlebig ist (Dhahbi et al., 2004) und die Tiere erst im fortgeschrittenen Alter ein solches Erscheinungsbild aufweisen.

Eine interessante Beobachtung war die circadiane Expression der Calcium/Calmodulin-abhängigen Proteinkinase II delta (Camk2d) bei den MT-Tieren und die der MAP-Kinase (Map2k4) bei den KR-Tieren. Der MAPK Signalweg spielt im SCN eine wichtige Rolle in der Transduktion des photopischen *input*-Signals zum Kern-Oszillator (Hirota, 2004). Die MAPK wird durch Licht phosphoryliert und synchronisiert die Uhr durch Induktion von Per1 über den CREB/CRE Transkriptionsweg. Andererseits attenuiert die Camk2d die photopische Induktion der MAPK-phosphorylierung, welches den Camk2d-Signalweg als übergeordneten Regulator des MAPK-Signalweges impliziert (Butcher et al., 2002). Mit der MAPK und der Camk2d wurden zwei Komponenten aus dem tiefen Inneren der circadianen Uhr identifiziert, die durch die applizierte Behandlung individuell reguliert wurden. Die offensichtlich höhere Amplitude von Camk2d bei den MT-Tieren bzw. der MAPK bei den KR-Tieren könnte Grund für die beobachtete Sensitivierung des circadianen Systems gegenüber wechselnden Lichtverhältnissen sein.

Altern ist mit einer Induktion von Hitzeschockproteinen assoziiert, welcher durch Melatonin und KR entgegengewirkt werden kann (Sharman et al., 2004, Lee et al. 2000). Die in der vorliegenden Studie betrachteten Hitzeschockproteine Hsp70-4 und Dnaja1 wurden nach circadianen Kriterien ausgewählt, nicht nach ihrer Induktion oder Inhibition. Daher ist es möglich, dass weitere Transkripte dieser Kategorie durch den Datenerfassungsfilter gegliedert sind. Es wurde keine nennenswerte Induktion durch das Altern beobachtet. Verglichen mit Kontrolltieren hatte Melatonin zu allen Zeitpunkten einen inhibitorischen Effekt auf die Dnaja1 Expression, KR hatte keinen konsistenten Einfluss in Verläufe des Tages. Auf Hsp70-4 hatten weder Melatonin noch KR einen relevanten Einfluss. Die Immunkomponente C4 (*complement component*) wurde von Weindruch und Mitarbeitern (2003) als durch das Altern auf- und KR abregulierbar beobachtet. Proteine dieser Kategorie kommen charakteristischerweise in senilen Plaques von Alzheimer-Patienten vor (Akiyama et al., 2000). Altern löste an ZT6 untersucht keine C4-Expression aus, es wurde eine fast 3-fache Inhibition beobachtet. KR hatte je nach Beobachtungszeitpunkt einen auf- oder abregulierenden Effekt auf die Induktion von C4. Melatonin hingegen unterdrückte die C4-Expression mehr als 2-fach an ZT0 und ZT6, geringer an ZT12 und ZT18. Eine Möglichkeit warum dieses Ergebnis dem aus dem Neocortex und Cerebellum von Weindruch und Mitarbeitern (2003) widerspricht ist die geringe Überlappung einzelner Transkripte zwischen

untersuchten Geweben, die benutzte *Microarray*-Technologie und die elektronische Datenauswertung; hierauf wird später eingegangen.

Die induzierbare Stickoxidsynthetase NOS2 wird durch Melatonin an drei von vier Zeitpunkten ab-, durch KR aufgeregelt. Ein Einfluss von Melatonin auf NOS ist schon in Extrakten von Ratten-Cerebellum beschrieben worden (Lahiri et al., 1999). Es wurde beobachtet, dass es während des Altersprozesses (im Cortex) zu einer Steigerung der NOS-Aktivität und der Menge an Proteinen mit nitrosilierten Tyrosinresten kommt (Sharman et al., 2002). Nitrosativer Stress wird mit Altern und der Pathogenese diverser neurodegenerativer Erkrankungen in Zusammenhang gebracht (Calabrese et al., 2000). Die durch Entzündungsreize induzierbare NOS könnte eine Hauptrolle beim Alterungsprozess vieler Organsysteme, einschließlich des Gehirns einnehmen (McCann et al., 1999). Die stark gegensätzliche Beeinflussung von NOS2 durch KR und MT würde nach bisherigen Erkenntnissen bedeuten, dass Melatonin auch in dieser Studie einen neuroprotektiven Effekt hat und KR einen neurodegenerativen Effekt, da NOS2 induziert wird. Was nicht schlüssig ist, ist die Tatsache, dass NOS2 bei den alten Tieren ebenfalls abreguliert wurde. Da aber nur ein Zeitpunkt untersucht wurde, könnte es sein, dass dies ein Artefakt des Versuches ist.

Die Transkripte *Rgs7* und *RGs19* sind bei MT-Tieren an allen Zeitpunkten bis auf ZT18 fast 2-fach abreguliert, bei den KR-Tieren an allen Zeitpunkten bis auf ZT18 über 2-fach aufreguliert. Beide Transkripte partizipieren als Regulatoren am G-Protein-gekoppelten Signalweg. Melatonin agiert wie schon beschrieben über G-Protein-gekoppelte Rezeptoren, daher ist diese Beobachtung sehr aufschlussreich. Die Regulatoren des G-Protein Signalweges (*RGS*, *regulator of G-Protein signaling*) regulieren die  $\alpha$ -Untereinheit von G-Proteinen negativ, indem die intrinsische Guanosin-Triphosphatase-Aktivität des G-Proteins beschleunigt wird (Nagata et al., 2001). Der G-Protein-Signalweg ist die Basis einer der wichtigsten Signalkaskaden, um extrazelluläre Signale und sensorische Stimuli in eukaryotischen Zellen zu übertragen (Angleon et al., 1993). Die Isoformen der  $\alpha$ -Untereinheit des G-Proteins werden in vier Subfamilien unterteilt:  $G\alpha_i$ ,  $G\alpha_s$ ,  $G\alpha_q$ ,  $G\alpha_{12}$  (Hamm et al., 1996). Es wurden bislang 26 verschiedene RGS-Proteine in Säugetieren beschrieben, die alle (wenn aktiviert) mit der G- $\alpha$ -Untereinheit interagieren. Die meisten RGS-Proteine inhibieren Signalwege, die  $G\alpha_i$  und  $G\alpha_q$  als Signalvermittler nutzen. Der MT1-Rezeptor ist an  $G_i$ - und  $G_q$ -Proteine gekoppelt. Seine Aktivierung führt zur Inhibition der Adenylatzyklase und zum Sinken von intrazellulärem cAMP (Brydon et al., 1999). Der MT2-Rezeptor inhibiert ebenfalls die Adenylatzyklase (Reppert et al., 1995) und zusätzlich die Bildung von cGMP (Petit et al., 1999).

Die Abregulierung der beiden ( $G\alpha_i$  und  $G\alpha_q$  inhibierenden) RGS-Transkripte bei den MT-Tieren bedeutet, dass Melatonin ungehinderter über den cAMP-Signalweg wirken kann. Bei den KR-Tieren ist der Effekt umgekehrt.

Über einen bisher unbekanntem Mechanismus führt Melatoninsubstitution zur Sensitivierung und KR zur Desensitivierung des cAMP und cGMP Signalweges. Für das circadiane System bedeutet dies eindeutig, dass die synchronisierende Wirkung von Melatonin bei den MT-Tieren erhöht und bei den KR-Tieren vermindert ist.

#### **4.7 *Microarray*-Technologie und Chronobiologie – eine Evaluierung**

Beim Vergleich von circadian exprimierten Transkripten des SCN (und anderer Gewebe) durch unterschiedliche Forschergruppen stellte sich heraus, dass nur wenige der als circadian eingestuften Transkripte zwischen den Experimenten überlappten (Duffield, 2003). Natürlich müssen hierbei Faktoren wie die benutzte *Microarray*-Technologie (Plattform), Markierung und vor allem die applizierte Datenanalyse beachtet werden. Je stringenter die Kriterien sind, um ein Gen als rhythmisch exprimiert einzustufen, desto weniger Kandidaten bleiben am Ende übrig. Diese Aussage unterstützen, (ähnlich meiner Studie) einige der bekannten Uhr-Gene in der *Microarray*-Evaluierung. Im Vergleich von „rhythmischen“ Genen des SCN, 101 (Ueda et al., 2002), gegenüber 337 (Panda et al., 2002) wurden nur 23 Übereinstimmungen gefunden. Auch bei Nutzung derselben *Microarray*-Technologie (Affymetrix™) wurden in demselben untersuchten Gewebe maximal 7-43% Übereinstimmungen gefunden (Panda et al., 2002; Storch et al., 2002; Ueda et al., 2002). Trotz der niedrigen Übereinstimmung einzelner Transkripte gibt es größere Gemeinsamkeiten, wenn komplexe biochemische Prozesse betrachtet werden (Akthar et al., 2002; Duffield et al., 2002).

Das von mir genutzte System (Xeotron™) hat sich sowohl in der Anwendung als auch in der Bestätigung der Ergebnisse (mittels qRT-PCR) als sehr zuverlässig erwiesen.

Auch wenn nur 1000 (ausgewählte) Transkripte untersucht wurden, so konnte eine Fülle von bisher nicht als circadian reguliert bekannten Transkripten identifiziert werden.

## 5 Zusammenfassung

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Beobachtung von verhaltensbiologischen und molekularbiologischen Veränderungen in Mäusen unterschiedlichen Alters und verschiedener Haltungsbedingungen.

Mäuse des Stammes B6C3F1 wurden in drei Gruppen (je 20 Tiere) aufgeteilt: Kontroll-, KR- (Diät) und MT-Tiere (Melatoninsubstituiert) und in Einzelhaltung lokomotorisch überwacht. Die molekularbiologische Aufgabe war die Untersuchung von Uhr-Genen im Hypothalamus und die Identifizierung anderer circadian aktiver Gene. Zusätzlich wurde die Genexpression in der Leber betrachtet, um den Einfluss der applizierten Behandlungen einzuschätzen. Diverse chronobiologische Experimente mit unterschiedlichen Beleuchtungsprotokollen wurden durchgeführt. Im Anschluss an die verhaltensbiologischen Untersuchungen wurden die Tiere im Alter von 14 Monaten zu jeweils vier Tageszeitpunkten (ZT0, 6, 12, 18) getötet und Gehirn, Leber und andere Gewebe für molekularbiologische Experimente präpariert. 6 Tiere hatten bei der Tötung ein Alter von 30 Monaten.

Das Körpergewicht der KR-Tiere lag bei Versuchende weit unter dem der anderen Gruppen. Im Vergleich mit den Kontrolltieren hatten die MT-Tiere ebenfalls ein niedrigeres Körpergewicht. Die lokomotorische Aktivitätsüberwachung ergab eine altersabhängige Zunahme der endogenen Periode  $\tau$  im Freilauf unter Dauerdunkel-Bedingungen (DD). Dieser Alterseffekt war weder durch KR noch durch MT aufhaltbar. Die Gesamtaktivität von Mäusen nahm mit dem Alter ab. Tiere der KR-Gruppe zeigten einen fragmentierten Aktivitätsrhythmus, mit viel Aktivität während der Lichtphase, der eigentlichen Ruhephase von nachtaktiven Tieren. Kontroll- und MT-Tiere zeigten sehr wenig Aktivität während der Lichtphase. Die Gewöhnung an neue Lichtverhältnisse (nach einer Phasenverschiebung) geschah bei gleich alten Tieren der KR- und MT-Gruppen schneller als bei den Kontrolltieren. Bei alten Mäusen nahm die Anpassung an Hell/Dunkel-Verhältnisse ab und die Fragmentierung der Aktivität zu. Ebenfalls dauerte eine Anpassung an neue Lichtverhältnisse mit zunehmendem Alter länger. Einige Tiere zeigten unter DD-Bedingungen einen biphasischen Aktivitätsrhythmus (*rhythm splitting*) mit zwei auseinanderweichenden Aktivitätsmaxima. Die Wiederherstellung von LD eliminierte eine Aktivitätskomponente und stellte den ursprünglichen Rhythmus wieder her. Dieses Phänomen trat bei den MT-Tieren am häufigsten auf.

Die Expression des Uhr-Gens *Clock* wurde in diversen neuronalen und peripheren Geweben wie z.B. Cerebellum, olfaktorische Bulbi, Hypothalamus, Milz, Leber, Lunge Herz und Niere

nachgewiesen, es gab keinen Hinweis auf seine Expression im Hoden der Maus. Es wurde festgestellt, dass eine Variante des Genes (als Spleissvariante) nur in neuronalen Geweben der untersuchten Mäuse vorkommt. Ein hypothetisches Modell wurde entworfen, indem diese Variante eine regulative Funktion an der Feinsteuerung der molekularen inneren Uhr hat.

Eine zu Beginn dieser Arbeit unbekannte Teilsequenz des Typ 2 Melatoninrezeptors wurde sequenziert.

Hierbei wurde ein Polymorphismus entdeckt, der den Austausch einer Aminosäure (Threonin → Glutamat) verursacht. Ob dies die Bindungsfähigkeit des Rezeptors für Melatonin beeinflusst ist ungewiss.

Die Untersuchung der Genexpression in der Leber von Kontroll-, KR- und MT-Tieren mittels *Microarray*-Technologie und qRT-PCR ergab eine starke Veränderung des hepatischen Transkriptoms durch KR, weniger stark durch MT. Die am stärksten durch KR aufregulierten Transkripte gehörten zu den P450 Cytochromoxidasen, die am stärksten abregulierten partizipieren am Fettsäurestoffwechsel. MT induzierte Transkripte gehören z.B. zum Zellzyklus und der Detoxifikation, die meisten abregulierten Transkripte waren Transportmoleküle. Es gab in den Genexpressionsprofilen der Lebern zwischen der KR- und MT-Gruppe wenige Übereinstimmungen.

Die Untersuchung der hypothalamischen Genexpression mittels *Microarray*-Technologie und qRT-PCR ergab eine Vielzahl an circadian regulierten Genen. Über 40 neue Transkripte mit einer circadianen Expression wurden identifiziert. Die Expression der bekannten Uhr-Gene entsprach größtenteils den Beschreibungen in der Literatur. Bei alten Mäusen (30 Monate) wurde eine verringerte Expression vieler Uhr-Gene (ZT6) beobachtet. Ansonsten zeigten sie sehr wenige für Mäuse typische, altersbedingte Veränderungen in der Genexpression.

KR- und MT-Behandlungen zeigten wenige Effekte auf die gut untersuchten Kernkomponenten der inneren Uhr. Der Vergleich der circadianen Genexpression zwischen den Versuchstiergruppen mittels *Microarray*-Technologie ergab hingegen ein komplexes Bild differentieller Regulation. Alle neu identifizierten, rhythmischen Transkripte, zeigten bei den KR- und MT-Tieren ebenfalls eine circadiane Regulation. Allerdings gab es hier gruppenabhängige Variationen in der Phase und Amplitude des circadianen Expressionsverlaufes. Einige rhythmische Komponenten wurden bisher in anderen Geweben wie z.B. der Leber identifiziert, andere sind völlig neu. Das Vorkommen von E-Box-Elementen in den Promotorbereichen einiger der identifizierten Transkripte spricht für eine direkte Steuerung durch die positiven Elemente (Clock/Bmal1) der inneren Uhr.

Es wurden neue Transkripte identifiziert, die eine Beteiligung von Untereinheiten von Ionenkanälen (wie derzeit von der wissenschaftlichen Gemeinschaft angenommen) an der Etablierung des circadianen Rhythmus wahrscheinlich macht. Ferner gab es beim Vergleich der Genexpression mit anderen Studien, sowohl für KR- als auch für MT-Behandlung Übereinstimmungen. Die Mechanismen, durch die KR- und MT-Behandlungen wirken sind, gemessen an den Expressionsprofilen, völlig unterschiedlicher Natur.

KR verändert u.a. die Expression metabolischer Transkripte (aus der Gluconeogenese und Glycolyse). MT beeinflusst viele Transkripte der (G-Protein gekoppelten) Signaltransduktion (RGS, Camk2d, Calmodulin). Melatonin scheint einige Komponenten aus Signalwegen der circadianen Uhr zu beeinflussen, aus der eine Sensitivierung des Zeitmessungssystems resultiert. Dies könnte den positiven Effekt von Melatonin auf das murine circadiane System erklären. KR hatte in einigen Fällen den gegensätzlichen Effekt von Melatonin, welches für eine Abstumpfung oder Maskierung des circadianen Systems spricht.

## **5.1 Summary**

The aim of the presented study was the assessment of the influence of melatonin (MT) and caloric restriction (CR) on behavioral and molecular biological traits in mice of different ages. Mice of the strain B6C3F1 were divided into three groups, control, CR and MT. The animals were housed singly and their locomotor activity was monitored. The molecular biological assignment was the examination of clock-genes in the hypothalamus of the mouse and the identification of new circadian transcripts. The gene expression in the liver was also assessed, to evaluate the influence of the applied treatments. Diverse chronobiological experiments with different lighting protocols were conducted. Following the behavioral studies, the mice were sacrificed at four timepoints during the day (ZT0, 6, 12, 18) at the age of 14 months. Six “old” mice were 30 months old. Brains, livers and other tissues were excised for further analysis.

The body weight of the CR-animals was far lower than that of the other groups. Compared to the controls, the MT-animals also displayed a reduced body weight. The monitoring of locomotor activity revealed that the endogenous period  $\tau$  increases with age in mice under DD-conditions. This aging-effect was not affected by either CR- or MT-treatment. The total locomotor activity in aged mice was also reduced. Mice of the CR-group displayed a fragmented activity rhythm with a lot of activity during the light phase, the actual resting phase of nocturnal animals. Control- and MT-animals showed little activity during the light

phase. The adaptation to new lighting conditions (due to phase shifts) occurred faster in CR- and MT-animals than in age-matched controls. Old mice were less well adapted to the light/dark-phase and needed longer to adjust to a changed photopic environment. Some animals, most of which were from the MT-group, displayed a split activity rhythm under DD-conditions. The split component was abolished after re-entrainment to LD-conditions.

The expression of the clock-gene “Clock” was demonstrated in many tissues such as: cerebellum, olfactory bulbs, hypothalamus, spleen, liver, lung, heart and kidney. There was no evidence for the expression of “Clock” in testes. It was observed that a splice variant of this gene was specific to neuronal tissue. A hypothetical model was established, in which this variant plays a role in the fine-tuning and the regulation of the circadian clockwork.

A partial sequence of the mouse MT2 melatonin receptor was amplified and sequenced. This revealed a polymorphism, which leads to the exchange of an amino acid (threonine→glutamate). Whether this has an impact on the receptor’s ability to bind melatonin needs to be further assessed. The analysis of the gene expression in the liver of control, CR- and MT-mice with *microarrays* and qRT-PCR revealed a strong change of the hepatic transcriptome by CR, less severe by MT. The most upregulated genes by CR were P450 cytochrome oxidases, the most reduced transcripts belonged to the fatty acid metabolism. MT induced transcripts for instance belonged to the cell cycle and detoxification, most of the downregulated transcripts belonged to the solute carrier family. There was only little consensus in the gene expression-profile of CR and MT treated animals. The analysis of the hypothalamic gene expression with *microarrays* and qRT-PCR yielded a multitude of circadian regulated genes. The expression of the canonical clock-genes was mostly as described in the literature. Old mice (30 months) displayed a reduced expression of many of these genes (at ZT6). Otherwise there were only few age-related changes in gene expression. CR- and MT-treatments showed little effects on the well-studied core components of the circadian system. However, *microarray* analysis of the circadian gene expression revealed a complex network of differential regulation. All newly identified rhythmical transcripts were also rhythmical in the hypothalami of CR- and MT-mice, although there were group dependent variations in the phase and amplitude of circadian expression. Some rhythmic components have previously been identified in other tissues such as liver, for others this finding is novel. The occurrence of E-Box elements in the promoter regions of some of the identified transcripts suggests a direct regulation by positive elements (Clock/Bmal1) of the molecular clock. Transcripts were identified that imply an involvement of subunits of ion channels in the generation of circadian rhythms – this has been assumed by

the scientific community. Furthermore, a comparison of gene expression in this study with previous ones has revealed some similarities. The mechanisms through which CR and MT exert their effect are indeed of a completely different nature. CR changes primarily the expression of genes involved in energy metabolism, MT influences genes that are involved in (G-protein coupled) signal transduction. Melatonin seems to influence components of the circadian system, resulting in a sensitization of the inner clock. This may help explain the beneficial effect of melatonin on the murine circadian system. CR in some instances had the opposite effect of melatonin, which may contribute to a desensitization or masking of the circadian system.

## 6 Anhang

### 6.1 Abkürzungen

A	Adenin
aA-NAT	Arylalkylamin-N-Acetyltransferase
Abb.	Abbildung
AC	Adenylatzyklase ( <i>adenylate cyclase</i> )
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
bp	Basenpaare
BCIP	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-Phosphat
C	Cytosin
°C	Grad Celsius
cAMP	zyklisches ( <i>cyclic</i> ) Adenosin-3',5'-monophosphat
cGMP	zyklisches Guanosin-3',5'-monophosphat
cDNA	komplementäre DNA ( <i>complementary DNA</i> )
cGMP	zyklisches ( <i>cyclic</i> ) Guanosin-3',5'-monophosphat
CREB	engl. <i>cyclic AMP response element binding protein</i>
dATP	Desoxyadenosin-5'-triphosphat
dCTP	Desoxycytidin-5'-triphosphat
DD	Dauerdunkel
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dGTP	Desoxyguanosin-5'-triphosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure ( <i>deoxyribonucleic acid</i> )
DNase I	Desoxyribonuclease I
dNTP	Desoxyribonukleosid-5'-triphosphat
ds	doppelsträngig
DTT	Dithiothreitol
dTTP	Desoxythymidin-5'-triphosphat
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EtBr	Ethidiumbromid
G	Guanosin
GABA	<i>gamma amino butyric acid</i>
GAPDH	Glycerinaldehydphosphat-Dehydrogenase
GC	Guanylatzyklase ( <i>guanylate cyclase</i> )
GTP	Guanosin-5'-triphosphat
HPG-Achse	Hypothalamo-hypophysär-gonadale Achse ( <i>hypothalamic-pituitary-gonadal axis</i> )
HPRT	engl. <i>hypoxanthinephosphoribosyltransferase</i>
G-Protein	Guanin-nukleotid-bindendes regulatorisches Protein
hsp	Hitzeschockprotein ( <i>heat shock protein</i> )
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -Galactopyranosid
kb	Kilobasen (RNA), Kilobasenpaare (DNA)
kD	Kilodalton
KR	kalorisch Restriktiv (gefütterte Tiere)
LL	Dauerlicht
LD	Licht-Dunkel-Zyklus

LB	Luria Bertami
M	Molar
MCS	multiple Klonierungsstelle ( <i>multiple cloning site</i> )
mg	Milligramm
ml	Milliliter
mM	Millimolar
min	Minuten
MT1-R	MT1-Rezeptor
MT2-R	MT2-Rezeptor
µl	Mikroliter
mRNA	Boten-RNA ( <i>messenger RNA</i> )
MT	Melatonin (substituierte Tiere)
MW	Molekulargewicht ( <i>molecular weight</i> )
n	Stoffmenge
NaAc	Natriumacetat
NBT	Nitroblau-Tetrazolium
nm	Nanometer
nt	Nukleotide
N-terminus	Amino-Terminus
OD	optische Dichte
ORF	Offener Leserahmen ( <i>open reading frame</i> )
PACAP	<i>pituitary adenyl cyclase-activating peptide</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion ( <i>polymerase chain reaction</i> )
pH	Hydrogenanion-Exponent ( <i>potentia hydrogenii</i> )
RFU	Relative Fluoreszenzeinheiten ( <i>relative fluorescence units</i> )
RNase	Ribonuklease
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	PCR nach reverser Transkription der mRNA in cDNA
s	Sekunden
T	Thymidin
T <sub>M</sub>	Schmelztemperatur
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TE	Tris-EDTA-Puffer
N-Terminus	Amino-Terminus
C-Terminus	Carboxy-Terminus
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
U	Einheit ( <i>unit</i> )
Upm	Umdrehungen pro Minute
ü.N.	über Nacht
UTR	untranslatierte Region
UV	Ultraviolett
V	Volt
Vol.	Volumen
(v/v)	Volumen/Volumen
(w/v)	Masse/Volumen
(w/w)	Masse/Masse
X-Gal	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-Galactopyranosid
ZT	Zeitgeberzeit

## 6.2 Glossar

<i>annealing</i>	Anlagerung eines <i>Primers</i> an sein <i>Template</i> (engl.)
<i>antisense-Strang</i>	zu der mRNA komplementäre DNA-Strang (engl.)
<i>antisense-Primer</i>	der Sequenz des <i>antisense</i> -Stranges entsprechender <i>Primer</i> (engl.)
<i>Array</i>	Anordnung (engl.), in Bezug auf <i>Microarray</i> -Technologie
blotten	Übertragen von DNA/RNA/Protein auf Membranen
Elongation	Verlängerung von DNA mittels Polymerasen (lat.)
EST	ansequenzierte cDNAs, <i>expressed sequence tags</i> (engl.)
<i>heat shock</i> -Proteine (hsp)	Proteine, welche andere Proteine in ihrer Konformation stabilisieren (engl.)
<i>Insert</i>	in einen Plasmidvektor einkloniertes dsDNA-Fragment (engl.)
<i>knock-out (K.O.)</i>	gezieltes Ausschalten eines Gens durch homologe Rekombination (engl.)
<i>mismatch</i>	ungepaarte Basen in einer doppelsträngigen DNA (engl.)
<i>Pellet</i>	Präzipitat, Kügelchen (engl.), beim Zentrifugieren entstehende Ansammlung am Boden
<i>Primer</i>	Oligonukleotid, welches als Startermolekül für DNA-Polymerasen dient (engl.)
<i>Robocycler</i>	best. Art von PCR-Maschine,
<i>sense-Strang</i>	der mRNA entsprechende DNA-Strang (engl.)
<i>sense-Primer</i>	der Sequenz des <i>sense</i> -Stranges entsprechender <i>Primer</i> (engl.)
<i>Template</i>	Matrizen-DNA (engl.) z.B. für eine PCR
<i>Thermocycler</i>	PCR-Machine (engl.), siehe <i>Robocycler</i>
Transkripte	die mRNA eines umgeschriebenen Gens (lat.)
Vortexer	Apparatur zum Durchmischen kleiner Reaktionsgefäße

## 6.3 Literaturverzeichnis

- Abbott, C. M. and C. G. Proud (2004). "Translation factors: in sickness and in health." *Trends Biochem Sci* **29**(1): 25-31.  
Abe, H., S. Honma, et al. (1999). "Functional diversities of two activity components of circadian rhythm in genetical splitting mice (CS strain)." *J Comp Physiol [A]* **184**(3): 243-51.

- Abe, H., S. Honma, et al. (2001). "Behavioural rhythm splitting in the CS mouse is related to clock gene expression outside the suprachiasmatic nucleus." *Eur J Neurosci* **14**(7): 1121-8.
- Abe, H., S. Honma, et al. (2001). "Clock gene expressions in the suprachiasmatic nucleus and other areas of the brain during rhythm splitting in CS mice." *Brain Res Mol Brain Res* **87**(1): 92-9.
- Akhtar, R. A., A. B. Reddy, et al. (2002). "Circadian cycling of the mouse liver transcriptome, as revealed by cDNA microarray, is driven by the suprachiasmatic nucleus." *Curr Biol* **12**(7): 540-50.
- Akiyama, H., S. Barger, et al. (2000). "Inflammation and Alzheimer's disease." *Neurobiol Aging* **21**(3): 383-421.
- Albrecht, U. (2001). "Circadian rhythms: a fine c(l)ocktail!" *Curr Biol* **11**(13): R517-9.
- Albrecht, U. and H. Oster (2001). "The circadian clock and behavior." *Behav Brain Res* **125**(1-2): 89-91.
- Albrecht, U., Z. S. Sun, et al. (1997). "A differential response of two putative mammalian circadian regulators, mper1 and mper2, to light." *Cell* **91**(7): 1055-64.
- Albrecht, U., B. Zheng, et al. (2001). "MPer1 and mper2 are essential for normal resetting of the circadian clock." *J Biol Rhythms* **16**(2): 100-4.
- Angleson, J. K. and T. G. Wensel (1993). "A GTPase-accelerating factor for transducin, distinct from its effector cGMP phosphodiesterase, in rod outer segment membranes." *Neuron* **11**(5): 939-49.
- Antoch, M. P., E. J. Song, et al. (1997). "Functional identification of the mouse circadian Clock gene by transgenic BAC rescue." *Cell* **89**(4): 655-67.
- Arendt, J., S. Deacon, et al. (1995). "Melatonin and adjustment to phase shift." *J Sleep Res* **4**(S2): 74-79.
- Arendt, J. 2002 online THE PINEAL GLAND AND PINEAL TUMOURS  
<http://www.endotext.org/neuroendo/neuroendo15/neuroendo15.htm>
- Asai, M., Y. Yoshinobu, et al. (2001). "Circadian profile of Per gene mRNA expression in the suprachiasmatic nucleus, paraventricular nucleus, and pineal body of aged rats." *J Neurosci Res* **66**(6): 1133-9.
- Aschoff, J. (1976). "Circadian systems in man and their implications." *Hosp Pract* **11**(5): 51-97.
- Aschoff, J. (1981). "A survey on biological rhythms." *Biological Rhythms* **4**: 3-10.
- Aschoff, J., U. von Saint Paul, et al. (1971). "[Lifetime of flies under influence of time displacement]." *Naturwissenschaften* **58**(11): 574.
- Blask, D. E., C. A. Leadem, et al. (1984). "Differential responsiveness of the reproductive system of blind or melatonin-treated male hamsters to injections of gonadotrophin-releasing hormone (GnRH) and/or prolactin." *J Pineal Res* **1**(2): 149-61.
- Barbaccia, M. L., D. M. Chuang, et al. (1982). "Is insulin a neuromodulator?" *Adv Biochem Psychopharmacol* **33**: 511-8.
- Barja, G. (2002). "Rate of generation of oxidative stress-related damage and animal longevity." *Free Radic Biol Med* **33**(9): 1167-72.
- Barja, G. (2002). "The quantitative measurement of H2O2 generation in isolated mitochondria." *J Bioenerg Biomembr* **34**(3): 227-33.
- Barja, G. (2002). "Endogenous oxidative stress: relationship to aging, longevity and caloric restriction." *Ageing Res Rev* **1**(3): 397-411.
- Barrett, P., S. Conway, et al. (2003). "Digging deep--structure-function relationships in the melatonin receptor family." *J Pineal Res* **35**(4): 221-30.
- Barrett, P., C. Schuster, et al. (2003). "Sensitization: a mechanism for melatonin action in the pars tuberalis." *J Neuroendocrinol* **15**(4): 415-21.
- Barzilai, N. and L. Rossetti (1995). "Relationship between changes in body composition and insulin responsiveness in models of the aging rat." *Am J Physiol* **269**(3 Pt 1): E591-7.
- Bertoli-Avella, A. M., B. A. Oostra, et al. (2004). "Chasing genes in Alzheimer's and Parkinson's disease." *Hum Genet* **114**(5): 413-38.
- Blumenthal, H. T. (1997). "Fidelity assurance mechanisms of the brain with special reference to its immunogenic CNS compartment: their role in aging and aging-associated neurological disease." *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* **52**(1): B1-9.
- Boyd, F. T., Jr., D. W. Clarke, et al. (1986). "Insulin inhibits specific norepinephrine uptake in neuronal cultures from rat brain." *Brain Res* **398**(1): 1-5.
- Brydon, L., L. Petit, et al. (1999). "Polymorphism and signalling of melatonin receptors." *Reprod Nutr Dev* **39**(3): 315-24.
- Butcher, G. Q., H. Dziema, et al. (2002). "The p42/44 mitogen-activated protein kinase pathway couples photic input to circadian clock entrainment." *J Biol Chem* **277**(33): 29519-25.
- Calabrese, V., T. E. Bates, et al. (2000). "NO synthase and NO-dependent signal pathways in brain aging and neurodegenerative disorders: the role of oxidant/antioxidant balance." *Neurochem Res* **25**(9-10): 1315-41.
- Cao, S. X., J. M. Dhahbi, et al. (2001). "Genomic profiling of short- and long-term caloric restriction effects in the liver of aging mice." *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(19): 10630-5.
- Caroleo, M. C., D. Frasca, et al. (1992). "Melatonin as immunomodulator in immunodeficient mice." *Immunopharmacology* **23**(2): 81-9.
- Caroleo, M. C., G. Nistico, et al. (1992). "Effect of melatonin on the immune system." *Pharmacol Res* **26 Suppl 2**: 34-7.
- Choi, S., L. S. Wong, et al. (1998). "Hypothalamic ventromedial nuclei amplify circadian rhythms: do they contain a food-entrained endogenous oscillator?" *J Neurosci* **18**(10): 3843-52.
- Conway, S., S. J. Canning, et al. (2000). "Characterisation of human melatonin mt(1) and MT(2) receptors by CRE-luciferase reporter assay." *Eur J Pharmacol* **390**(1-2): 15-24.
- Conway, S., J. E. Drew, et al. (2000). "Chimeric melatonin mt1 and melatonin-related receptors. Identification of domains and residues participating in ligand binding and receptor activation of the melatonin mt1 receptor." *J Biol Chem* **275**(27): 20602-9.
- Daan, S., U. Albrecht, et al. (2001). "Assembling a clock for all seasons: are there M and E oscillators in the genes?" *J Biol Rhythms* **16**(2): 105-16.
- Daan, S. and C. Berde (1978). "Two coupled oscillators: simulations of the circadian pacemaker in mammalian activity rhythms." *J Theor Biol* **70**(3): 297-313.
- Damiola, F., N. Le Minh, et al. (2000). "Restricted feeding uncouples circadian oscillators in peripheral tissues from the central pacemaker in the suprachiasmatic nucleus." *Genes Dev* **14**(23): 2950-61.
- Dardente, H., J. S. Menet, et al. (2004). "Daily and circadian expression of neuropeptides in the suprachiasmatic nuclei of nocturnal and diurnal rodents." *Brain Res Mol Brain Res* **124**(2): 143-51.
- Davis, F. C. and N. Viswanathan (1998). "Stability of circadian timing with age in Syrian hamsters." *Am J Physiol* **275**(4 Pt 2): R960-8.

- de la Iglesia, H. O., J. Meyer, et al. (2000). "Antiphase oscillation of the left and right suprachiasmatic nuclei." *Science* **290**(5492): 799-801.
- Devlin, P. F. and S. A. Kay (2001). "Circadian photoperception." *Annu Rev Physiol* **63**: 677-94.
- Dhahbi, J. M., H. J. Kim, et al. (2004). "Temporal linkage between the phenotypic and genomic responses to caloric restriction." *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(15): 5524-9.
- Dhahbi, J. M., P. L. Mote, et al. (1999). "Calories and aging alter gene expression for gluconeogenic, glycolytic, and nitrogen-metabolizing enzymes." *Am J Physiol* **277**(2 Pt 1): E352-60.
- Disterhoft, J. F., J. R. Moyer, Jr., et al. (1994). "The calcium rationale in aging and Alzheimer's disease. Evidence from an animal model of normal aging." *Ann N Y Acad Sci* **747**: 382-406.
- Doolen, S., D. N. Krause, et al. (1998). "Melatonin mediates two distinct responses in vascular smooth muscle." *Eur J Pharmacol* **345**(1): 67-9.
- Duarte, A. I., M. S. Santos, et al. (2003). "Insulin affects synaptosomal GABA and glutamate transport under oxidative stress conditions." *Brain Res* **977**(1): 23-30.
- Dubocovich, M. L., K. Yun, et al. (1998). "Selective MT2 melatonin receptor antagonists block melatonin-mediated phase advances of circadian rhythms." *Faseb J* **12**(12): 1211-20.
- Dudoit, S., R. C. Gentleman, et al. (2003). "Open source software for the analysis of microarray data." *Biotechniques Suppl*: 45-51.
- Duffield, G. E. (2003). "DNA microarray analyses of circadian timing: the genomic basis of biological time." *J Neuroendocrinol* **15**(10): 991-1002.
- Duffield, G. E., J. D. Best, et al. (2002). "Circadian programs of transcriptional activation, signaling, and protein turnover revealed by microarray analysis of mammalian cells." *Curr Biol* **12**(7): 551-7.
- Ebisawa, T., S. Karne, et al. (1994). "Expression cloning of a high-affinity melatonin receptor from *Xenopus* dermal melanophores." *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**(13): 6133-7.
- Gaubatz, J. W. and B. H. Tan (1994). "Aging affects the levels of DNA damage in postmitotic cells." *Ann N Y Acad Sci* **719**: 97-107.
- Gekakis, N., D. Staknis, et al. (1998). "Role of the CLOCK protein in the mammalian circadian mechanism." *Science* **280**(5369): 1564-9.
- Gerozissis, K. (2004). "Brain insulin and feeding: a bi-directional communication." *Eur J Pharmacol* **490**(1-3): 59-70.
- Gillette, M. U. and S. M. Reppert (1987). "The hypothalamic suprachiasmatic nuclei: circadian patterns of vasopressin secretion and neuronal activity in vitro." *Brain Res Bull* **19**(1): 135-9.
- Godson, C. and S. M. Reppert (1997). "The Mel1a melatonin receptor is coupled to parallel signal transduction pathways." *Endocrinology* **138**(1): 397-404.
- Griffin, E. A., Jr., D. Staknis, et al. (1999). "Light-independent role of CRY1 and CRY2 in the mammalian circadian clock." *Science* **286**(5440): 768-71.
- Grillasca, J. P., M. Gastaldi, et al. (1997). "Cloning and initial characterization of human and mouse Spot 14 genes." *FEBS Lett* **401**(1): 38-42.
- Gwinner, E. (1974). "Endogenous temporal control of migratory restlessness in warblers." *Naturwissenschaften* **61**(9): 405.
- Gwinner, E. (1974). "Testosterone induces 'splitting' of circadian locomotor activity rhythms in birds." *Science* **185**(4145): 72-4.
- Hagemeyer, C. H., S. Shima, et al. (2003). "Coenzyme F420-dependent methylenetetrahydromethanopterin dehydrogenase (Mtd) from *Methanopyrus kandleri*: a methanogenic enzyme with an unusual quaternary structure." *J Mol Biol* **332**(5): 1047-57.
- Hamada, T., J. LeSauter, et al. (2001). "Expression of Period genes: rhythmic and nonrhythmic compartments of the suprachiasmatic nucleus pacemaker." *J Neurosci* **21**(19): 7742-50.
- Hamm, H. E. and A. Gilchrist (1996). "Heterotrimeric G proteins." *Curr Opin Cell Biol* **8**(2): 189-96.
- Hattar, S., H. W. Liao, et al. (2002). "Melanopsin-containing retinal ganglion cells: architecture, projections, and intrinsic photosensitivity." *Science* **295**(5557): 1065-70.
- Herlihy, J. T., C. Stacy, et al. (1990). "Long-term food restriction depresses serum thyroid hormone concentrations in the rat." *Mech Ageing Dev* **53**(1): 9-16.
- Hirota, T. and Y. Fukada (2004). "Resetting mechanism of central and peripheral circadian clocks in mammals." *Zoolog Sci* **21**(4): 359-68.
- Hogenesch, J. B., W. K. Chan, et al. (1997). "Characterization of a subset of the basic-helix-loop-helix-PAS superfamily that interacts with components of the dioxin signaling pathway." *J Biol Chem* **272**(13): 8581-93.
- Hunt, A. E., W. M. Al-Ghoul, et al. (2001). "Activation of MT(2) melatonin receptors in rat suprachiasmatic nucleus phase advances the circadian clock." *Am J Physiol Cell Physiol* **280**(1): C110-8.
- Iguchi, H. (1981). "[Age dependent changes in the serum melatonin concentrations in healthy human subjects and in patients with endocrine and hepatic disorders and renal failure (author's transl)]." *Fukuoka Igaku Zasshi* **72**(7): 423-30.
- Isobe, Y., J. Fujioi, et al. (2001). "Circadian rhythm of melatonin release in pineal gland culture: arg-vasopressin inhibits melatonin release." *Brain Res* **918**(1-2): 67-73.
- Isobe, Y., T. Torii, et al. (2001). "Melatonin inhibits Arg-vasopressin release via MT(2) receptor in the suprachiasmatic nucleus-slice culture of rats." *Brain Res* **889**(1-2): 214-9.
- Jiang, C. H., J. Z. Tsien, et al. (2001). "The effects of aging on gene expression in the hypothalamus and cortex of mice." *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(4): 1930-4.
- Jiang, J. C., E. Jaruga, et al. (2000). "An intervention resembling caloric restriction prolongs life span and retards aging in yeast." *Faseb J* **14**(14): 2135-7.
- Jin, X., L. P. Shearman, et al. (1999). "A molecular mechanism regulating rhythmic output from the suprachiasmatic circadian clock." *Cell* **96**(1): 57-68.
- Jin, X., C. von Gall, et al. (2003). "Targeted disruption of the mouse Mel(1b) melatonin receptor." *Mol Cell Biol* **23**(3): 1054-60.
- Jockers, R., L. Petit, et al. (1997). "Novel isoforms of Mel1c melatonin receptors modulating intracellular cyclic guanosine 3',5'-monophosphate levels." *Mol Endocrinol* **11**(8): 1070-81.
- King, D. P. and J. S. Takahashi (2000). "Molecular genetics of circadian rhythms in mammals." *Annu Rev Neurosci* **23**: 713-42.
- King, D. P., M. H. Vitaterna, et al. (1997). "The mouse Clock mutation behaves as an antimorph and maps within the W19H deletion, distal of Kit." *Genetics* **146**(3): 1049-60.
- King, D. P., Y. Zhao, et al. (1997). "Positional cloning of the mouse circadian clock gene." *Cell* **89**(4): 641-53.
- Klein, D. C., M. A. Namboodiri, et al. (1981). "The melatonin rhythm generating system: developmental aspects." *Life Sci* **28**(18): 1975-86.

- Kolker, D. E., H. Fukuyama, et al. (2003). "Aging alters circadian and light-induced expression of clock genes in golden hamsters." *J Biol Rhythms* **18**(2): 159-69.
- Kopp, M., H. Meissl, et al. (1997). "The pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide-induced phosphorylation of the transcription factor CREB (cAMP response element binding protein) in the rat suprachiasmatic nucleus is inhibited by melatonin." *Neurosci Lett* **227**(3): 145-8.
- Koster-van Hoffen, G. C., M. Mirmiran, et al. (1993). "Effects of a novel melatonin analog on circadian rhythms of body temperature and activity in young, middle-aged, and old rats." *Neurobiol Aging* **14**(6): 565-9.
- Kramer, A., F. C. Yang, et al. (2001). "Regulation of daily locomotor activity and sleep by hypothalamic EGF receptor signaling." *Science* **294**(5551): 2511-5.
- Kume, K., M. J. Zylka, et al. (1999). "mCRY1 and mCRY2 are essential components of the negative limb of the circadian clock feedback loop." *Cell* **98**(2): 193-205.
- Lahiri, D. K. (1999). "Melatonin affects the metabolism of the beta-amyloid precursor protein in different cell types." *J Pineal Res* **26**(3): 137-46.
- Lahiri, D. K., D. Davis, et al. (1999). "Detection of specific protein bands with melatonin-like immunoreactivity in different cell lines and human brain regions." *IUBMB Life* **48**(1): 127-32.
- Lane, M. A., D. J. Baer, et al. (1996). "Calorie restriction lowers body temperature in rhesus monkeys, consistent with a postulated anti-aging mechanism in rodents." *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(9): 4159-64.
- Lavery, D. J., L. Lopez-Molina, et al. (1999). "Circadian expression of the steroid 15 alpha-hydroxylase (Cyp2a4) and coumarin 7-hydroxylase (Cyp2a5) genes in mouse liver is regulated by the PAR leucine zipper transcription factor DBP." *Mol Cell Biol* **19**(10): 6488-99.
- Lee, C., D. R. Weaver, et al. (2004). "Direct Association between Mouse PERIOD and CKIepsilon Is Critical for a Functioning Circadian Clock." *Mol Cell Biol* **24**(2): 584-94.
- Lee, C. K., D. B. Allison, et al. (2002). "Transcriptional profiles associated with aging and middle age-onset caloric restriction in mouse hearts." *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(23): 14988-93.
- Lee, C. K., R. Weindruch, et al. (2000). "Gene-expression profile of the ageing brain in mice." *Nat Genet* **25**(3): 294-7.
- Leegwater, P. A., J. C. Pronk, et al. (2003). "Leukoencephalopathy with vanishing white matter: from magnetic resonance imaging pattern to five genes." *J Child Neurol* **18**(9): 639-45.
- Lerner, A. B., J. D. Case, et al. (1959). "Melatonin in peripheral nerve." *Nature* **183**: 1821.
- Lerner, A. B., J. D. Case, et al. (1960). "Isolation of melatonin and 5-methoxyindole-3-acetic acid from bovine pineal glands." *J Biol Chem* **235**: 1992-7.
- Lin, J. H. and A. Y. Lu (2001). "Interindividual variability in inhibition and induction of cytochrome P450 enzymes." *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **41**: 535-67.
- Lindberg, R., B. Burkhart, et al. (1989). "The structure and characterization of type I P-450(15) alpha gene as major steroid 15 alpha-hydroxylase and its comparison with type II P-450(15) alpha gene." *J Biol Chem* **264**(11): 6465-71.
- Liu, C. and S. M. Reppert (2000). "GABA synchronizes clock cells within the suprachiasmatic circadian clock." *Neuron* **25**(1): 123-8.
- Liu, C., D. R. Weaver, et al. (1997). "Molecular dissection of two distinct actions of melatonin on the suprachiasmatic circadian clock." *Neuron* **19**(1): 91-102.
- Liu, C., D. R. Weaver, et al. (1997). "Cellular construction of a circadian clock: period determination in the suprachiasmatic nuclei." *Cell* **91**(6): 855-60.
- Lok, E., E. A. Nera, et al. (1988). "Dietary restriction, cell proliferation and carcinogenesis: a preliminary study." *Cancer Lett* **38**(3): 249-55.
- Lowrey, P. L. and J. S. Takahashi (2000). "Genetics of the mammalian circadian system: Photic entrainment, circadian pacemaker mechanisms, and posttranslational regulation." *Annu Rev Genet* **34**: 533-562.
- Mason, R. (1991). "The effects of continuous light exposure on Syrian hamster suprachiasmatic (SCN) neuronal discharge activity in vitro." *Neurosci Lett* **123**(2): 160-3.
- Mason, R., S. M. Biello, et al. (1991). "The effects of GABA and benzodiazepines on neurones in the suprachiasmatic nucleus (SCN) of Syrian hamsters." *Brain Res* **552**(1): 53-7.
- Masuko, N., K. Makino, et al. (1999). "Interaction of NE-dlg/SAP102, a neuronal and endocrine tissue-specific membrane-associated guanylate kinase protein, with calmodulin and PSD-95/SAP90. A possible regulatory role in molecular clustering at synaptic sites." *J Biol Chem* **274**(9): 5782-90.
- Mattson, M. P., S. W. Barger, et al. (1997). "Cellular signaling roles of TGF beta, TNF alpha and beta APP in brain injury responses and Alzheimer's disease." *Brain Res Brain Res Rev* **23**(1-2): 47-61.
- Maurizi, C. P. (1985). "Could supplementary dietary tryptophan and taurine prevent epileptic seizures?" *Med Hypotheses* **18**(4): 411-5.
- McAuley, J. D., J. P. Miller, et al. (2002). "Age-related disruptions in circadian timing: evidence for "split" activity rhythms in the SAMP8." *Neurobiol Aging* **23**(4): 625-32.
- McAuley, J. D., J. P. Miller, et al. (2004). "Age-related changes in the spontaneous motor rhythms of the senescence-accelerated mouse(SAMP8)." *Exp Aging Res* **30**(1): 113-27.
- McCann, S. M., J. Licinio, et al. (1998). "The nitric oxide hypothesis of aging." *Exp Gerontol* **33**(7-8): 813-26.
- McEwen, B. S. (1998). "Stress, adaptation, and disease. Allostasis and allostatic load." *Ann N Y Acad Sci* **840**: 33-44.
- McGowan, M. K., K. M. Andrews, et al. (1990). "Effects of chronic intrahypothalamic infusion of insulin on food intake and diurnal meal patterning in the rat." *Behav Neurosci* **104**(2): 373-85.
- Miller, R. A., Y. Chang, et al. (2002). "Gene expression patterns in calorically restricted mice: partial overlap with long-lived mutant mice." *Mol Endocrinol* **16**(11): 2657-66.
- Mistlberger, R. E. (1994). "Circadian food-anticipatory activity: formal models and physiological mechanisms." *Neurosci Biobehav Rev* **18**(2): 171-95.
- Mitchell, P. J. and R. Tjian (1989). "Transcriptional regulation in mammalian cells by sequence-specific DNA binding proteins." *Science* **245**(4916): 371-8.
- Molinari, E. J., P. C. North, et al. (1996). "2-[125I]iodo-5-methoxycarbonylamino-N-acetyltryptamine: a selective radioligand for the characterization of melatonin ML2 binding sites." *Eur J Pharmacol* **301**(1-3): 159-68.
- Molis, T. M., L. L. Spriggs, et al. (1994). "Modulation of estrogen receptor mRNA expression by melatonin in MCF-7 human breast cancer cells." *Mol Endocrinol* **8**(12): 1681-90.
- Moore, R. Y. and R. L. Danchenko (2002). "Paraventricular-subparaventricular hypothalamic lesions selectively affect circadian function." *Chronobiol Int* **19**(2): 345-60.
- Moore, R. Y., J. C. Speh, et al. (2002). "Suprachiasmatic nucleus organization." *Cell Tissue Res* **309**(1): 89-98.

- Morioka, N., Y. Okatani, et al. (1999). "Melatonin protects against age-related DNA damage in the brains of female senescence-accelerated mice." *J Pineal Res* **27**(4): 202-9.
- Morrison, J. H. and P. R. Hof (1997). "Life and death of neurons in the aging brain." *Science* **278**(5337): 412-9.
- Mühlbauer, E., S. Wolgast, et al. (2004). "Indication of circadian oscillations in the rat pancreas." *FEBS Lett* **564**(1-2): 91-6.
- Mülhardt, C. (2000). "Der Experimentator, Molekularbiologie". Spektrum Akademischer Verlag, 2. Auflage Gustav Fischer
- Nagata, Y., M. Oda, et al. (2001). "A novel regulator of G-protein signaling bearing GAP activity for Galphai and Galphaq in megakaryocytes." *Blood* **97**(10): 3051-60.
- Naji, L., A. Carrillo-Vico, et al. (2004). "Expression of membrane and nuclear melatonin receptors in mouse peripheral organs." *Life Sci* **74**(18): 2227-36.
- Nelson, W. (1988). "Food restriction, circadian disorder and longevity of rats and mice." *J Nutr* **118**(3): 286-9.
- Oishi, K., H. Fukui, et al. (2000). "Rhythmic expression of BMAL1 mRNA is altered in Clock mutant mice: differential regulation in the suprachiasmatic nucleus and peripheral tissues." *Biochem Biophys Res Commun* **268**(1): 164-71.
- Oishi, K., K. Miyazaki, et al. (2003). "Genome-wide expression analysis of mouse liver reveals CLOCK-regulated circadian output genes." *J Biol Chem* **278**(42): 41519-27.
- Okamura, H., S. Miyake, et al. (1999). "Photic induction of mPer1 and mPer2 in cry-deficient mice lacking a biological clock." *Science* **286**(5449): 2531-4.
- Oldani, A., L. Ferini-Strambi, et al. (1994). "Melatonin and delayed sleep phase syndrome: ambulatory polygraphic evaluation." *Neuroreport* **6**(1): 132-4.
- Oster, H., S. Baeriswyl, et al. (2003). "Loss of circadian rhythmicity in aging mPer1<sup>-/-</sup>-mCry2<sup>-/-</sup> mutant mice." *Genes Dev* **17**(11): 1366-79.
- Oster, H., C. Werner, et al. (2003). "cGMP-dependent protein kinase II modulates mPer1 and mPer2 gene induction and influences phase shifts of the circadian clock." *Curr Biol* **13**(9): 725-33.
- Panda, S., M. P. Antoch, et al. (2002). "Coordinated transcription of key pathways in the mouse by the circadian clock." *Cell* **109**(3): 307-20.
- Pang, S. F., F. Tang, et al. (1984). "Negative correlation of age and the levels of pineal melatonin, pineal N-acetylserotonin, and serum melatonin in male rats." *J Exp Zool* **229**(1): 41-7.
- Pappolla, M. A., M. Sos, et al. (1997). "Melatonin prevents death of neuroblastoma cells exposed to the Alzheimer amyloid peptide." *J Neurosci* **17**(5): 1683-90.
- Pennartz, C. M., M. T. de Jeu, et al. (2002). "Diurnal modulation of pacemaker potentials and calcium current in the mammalian circadian clock." *Nature* **416**(6878): 286-90.
- Petit, L., I. Lacroix, et al. (1999). "Differential signaling of human Mel1a and Mel1b melatonin receptors through the cyclic guanosine 3'-5'-monophosphate pathway." *Biochem Pharmacol* **58**(4): 633-9.
- Petrie, K., J. V. Conaglen, et al. (1989). "Effect of melatonin on jet lag after long haul flights." *Bmj* **298**(6675): 705-7.
- Pierpaoli, W. (1994). "The pineal gland as ontogenetic scanner of reproduction, immunity, and aging. The aging clock." *Ann N Y Acad Sci* **741**: 46-9.
- Pierpaoli, W., A. Dall'Ara, et al. (1991). "The pineal control of aging. The effects of melatonin and pineal grafting on the survival of older mice." *Ann N Y Acad Sci* **621**: 291-313.
- Pierpaoli, W. and W. Regelson (1994). "Pineal control of aging: effect of melatonin and pineal grafting on aging mice." *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**(2): 787-91.
- Pittendrigh, C. S. (1960). "On temporal organization in living systems." *Harvey Lect* **56**: 93-125.
- Pittendrigh, C. S. (1960). "Circadian rhythms and the circadian organization of living systems." *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **25**: 159-84.
- Pittendrigh, C. S. and S. Daan (1974). "Circadian oscillations in rodents: a systematic increase of their frequency with age." *Science* **186**(4163): 548-50.
- Possidente, B., S. McEldowney, et al. (1995). "Aging lengthens circadian period for wheel-running activity in C57BL mice." *Physiol Behav* **57**(3): 575-9.
- Preitner, N., F. Damiola, et al. (2002). "The orphan nuclear receptor REV-ERB $\alpha$  controls circadian transcription within the positive limb of the mammalian circadian oscillator." *Cell* **110**(2): 251-60.
- Pugh, T. D., R. G. Klopp, et al. (1999). "Controlling caloric consumption: protocols for rodents and rhesus monkeys." *Neurobiol Aging* **20**(2): 157-65.
- Pugh, T. D., T. D. Oberley, et al. (1999). "Dietary intervention at middle age: caloric restriction but not dehydroepiandrosterone sulfate increases lifespan and lifetime cancer incidence in mice." *Cancer Res* **59**(7): 1642-8.
- Putilov, A. A., G. S. Russkikh, et al. (1999). "Phase of melatonin rhythm in winter depression." *Adv Exp Med Biol* **460**: 441-58.
- Ralph, M. R. and M. Menaker (1988). "A mutation of the circadian system in golden hamsters." *Science* **241**(4870): 1225-7.
- Ramsey, J. J., R. J. Colman, et al. (2000). "Dietary restriction and aging in rhesus monkeys: the University of Wisconsin study." *Exp Gerontol* **35**(9-10): 1131-49.
- Ramsey, J. J., J. L. Laatsch, et al. (2000). "Age and gender differences in body composition, energy expenditure, and glucoregulation of adult rhesus monkeys." *J Med Primatol* **29**(1): 11-9.
- Redlin, U. (2001). "Neural basis and biological function of masking by light in mammals: suppression of melatonin and locomotor activity." *Chronobiol Int* **18**(5): 737-58.
- Redman, J., S. Armstrong, et al. (1983). "Free-running activity rhythms in the rat: entrainment by melatonin." *Science* **219**(4588): 1089-91.
- Reiter, R. J. (1994). "Melatonin suppression by static and extremely low frequency electromagnetic fields: relationship to the reported increased incidence of cancer." *Rev Environ Health* **10**(3-4): 171-86.
- Reiter, R. J. (1994). "Pineal function during aging: attenuation of the melatonin rhythm and its neurobiological consequences." *Acta Neurobiol Exp (Wars)* **54 Suppl**: 31-9.
- Reiter, R. J. (1996). "Functional aspects of the pineal hormone melatonin in combating cell and tissue damage induced by free radicals." *Eur J Endocrinol* **134**(4): 412-20.
- Reiter, R. J. (1996). "The indoleamine melatonin as a free radical scavenger, electron donor, and antioxidant. In vitro and in vivo studies." *Adv Exp Med Biol* **398**: 307-13.
- Reiter, R. J. (1996). "Functional diversity of the pineal hormone melatonin: its role as an antioxidant." *Exp Clin Endocrinol Diabetes* **104**(1): 10-6.
- Reiter, R. J., L. Barlow-Walden, et al. (1996). "Twenty-four hour urinary excretion of 6-hydroxymelatonin sulfate in Down syndrome subjects." *J Pineal Res* **20**(1): 45-50.
- Reiter, R. J., M. I. Pablos, et al. (1996). "Melatonin in the context of the free radical theory of aging." *Ann N Y Acad Sci* **786**:

362-78.

- Reiter, R. J., M. N. Reiter, et al. (1994). "The pineal melatonin rhythm and its regulation by light in a subterranean rodent, the valley pocket gopher (*Thomomys bottae*)." *J Pineal Res* **16**(3): 145-53.
- Reiter, R. J., D. X. Tan, et al. (1994). "Melatonin as a free radical scavenger: implications for aging and age-related diseases." *Ann N Y Acad Sci* **719**: 1-12.
- Reppert, S. M., C. Godson, et al. (1995). "Molecular characterization of a second melatonin receptor expressed in human retina and brain: the Mel1b melatonin receptor." *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**(19): 8734-8.
- Reppert, S. M. and I. Sauman (1995). "period and timeless tango: a dance of two clock genes." *Neuron* **15**(5): 983-6.
- Reppert, S. M., T. Tsai, et al. (1994). "Cloning of a structural and functional homolog of the circadian clock gene period from the giant silkworm *Antheraea pernyi*." *Neuron* **13**(5): 1167-76.
- Reppert, S. M. and D. R. Weaver (1995). "Melatonin madness." *Cell* **83**(7): 1059-62.
- Reppert, S. M. and D. R. Weaver (2000). "Comparing clockworks: mouse versus fly." *J Biol Rhythms* **15**(5): 357-64.
- Reppert, S. M. and D. R. Weaver (2001). "Molecular analysis of mammalian circadian rhythms." *Annu Rev Physiol* **63**: 647-76.
- Reppert, S. M. and D. R. Weaver (2002). "Coordination of circadian timing in mammals." *Nature* **418**(6901): 935-41.
- Reppert, S. M., D. R. Weaver, et al. (1995). "Melatonin receptors are for the birds: molecular analysis of two receptor subtypes differentially expressed in chick brain." *Neuron* **15**(5): 1003-15.
- Reppert, S. M., D. R. Weaver, et al. (1994). "Cloning and characterization of a mammalian melatonin receptor that mediates reproductive and circadian responses." *Neuron* **13**(5): 1177-85.
- Resuehr, D. and A. N. Spiess (2003). "A real-time polymerase chain reaction-based evaluation of cDNA synthesis priming methods." *Anal Biochem* **322**(2): 287-91.
- Ripperger, J. A., L. P. Shearman, et al. (2000). "CLOCK, an essential pacemaker component, controls expression of the circadian transcription factor DBP." *Genes Dev* **14**(6): 679-89.
- Roca, A. L., C. Godson, et al. (1996). "Structure, characterization, and expression of the gene encoding the mouse Mel1a melatonin receptor." *Endocrinology* **137**(8): 3469-77.
- Ross, A. W., P. Barrett, et al. (1996). "Melatonin suppresses the induction of AP-1 transcription factor components in the pars tuberalis of the pituitary." *Mol Cell Endocrinol* **123**(1): 71-80.
- Ross, A. W., P. Barrett, et al. (1996). "Melatonin regulated gene expression in pars tuberalis cells of the ovine pituitary investigated by differential display." *Biochem Soc Trans* **24**(2): 227S.
- Ruby, N. F., M. L. Dubocovich, et al. (2000). "Siberian hamsters that fail to reentrain to the photocycle have suppressed melatonin levels." *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **278**(3): R757-62.
- Saiki, R. K., C. A. Chang, et al. (1988). "Diagnosis of sickle cell anemia and beta-thalassemia with enzymatically amplified DNA and nonradioactive allele-specific oligonucleotide probes." *N Engl J Med* **319**(9): 537-41.
- Saiki, R. K., D. H. Gelfand, et al. (1988). "Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase." *Science* **239**(4839): 487-91.
- Sandyk, R., P. G. Anastasiadis, et al. (1992). "Is postmenopausal osteoporosis related to pineal gland functions?" *Int J Neurosci* **62**(3-4): 215-25.
- Sandyk, R. and G. I. Awerbuch (1994). "Pineal calcification and its relationship to the fatigue of multiple sclerosis." *Int J Neurosci* **74**(1-4): 95-103.
- Sandyk, R. and G. I. Awerbuch (1994). "The relationship between melatonin secretion and serum cholesterol in patients with multiple sclerosis." *Int J Neurosci* **76**(1-2): 81-6.
- Sangoram, A. M., L. Saez, et al. (1998). "Mammalian circadian autoregulatory loop: a timeless ortholog and mPer1 interact and negatively regulate CLOCK-BMAL1-induced transcription." *Neuron* **21**(5): 1101-13.
- Schwartz, W. J. (1991). "Further evaluation of the tetrodotoxin-resistant circadian pacemaker in the suprachiasmatic nuclei." *J Biol Rhythms* **6**(2): 149-58.
- Schwartz, W. J., R. A. Gross, et al. (1987). "The suprachiasmatic nuclei contain a tetrodotoxin-resistant circadian pacemaker." *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**(6): 1694-8.
- Sharman, E. H., K. G. Sharman, et al. (2004). "Age-related changes in murine CNS mRNA gene expression are modulated by dietary melatonin." *J Pineal Res* **36**(3): 165-70.
- Sharman, E. H., N. D. Vaziri, et al. (2002). "Reversal of biochemical and behavioral parameters of brain aging by melatonin and acetyl L-carnitine." *Brain Res* **957**(2): 223-30.
- Sharman, K. G., E. H. Sharman, et al. (2002). "Dietary melatonin selectively reverses age-related changes in cortical cytokine mRNA levels, and their responses to an inflammatory stimulus." *Neurobiol Aging* **23**(4): 633-8.
- Shearman, L. P., X. Jin, et al. (2000). "Targeted disruption of the mPer3 gene: subtle effects on circadian clock function." *Mol Cell Biol* **20**(17): 6269-75.
- Shearman, L. P., S. Sriram, et al. (2000). "Interacting molecular loops in the mammalian circadian clock." *Science* **288**(5468): 1013-9.
- Shearman, L. P., M. J. Zylka, et al. (1997). "Two period homologs: circadian expression and photic regulation in the suprachiasmatic nuclei." *Neuron* **19**(6): 1261-9.
- Shinohara, K., S. Honma, et al. (1995). "Two distinct oscillators in the rat suprachiasmatic nucleus in vitro." *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**(16): 7396-400.
- Shinohara, K. and S. T. Inouye (1995). "Photic information coded by vasoactive intestinal polypeptide and neuropeptide Y." *Neurosci Biobehav Rev* **19**(3): 349-52.
- Silver, R., J. LeSauter, et al. (1996). "A diffusible coupling signal from the transplanted suprachiasmatic nucleus controlling circadian locomotor rhythms." *Nature* **382**(6594): 810-3.
- Sohal, R. S. and R. Weindrich (1996). "Oxidative stress, caloric restriction, and aging." *Science* **273**(5271): 59-63.
- Steinhilber, D., M. Brungs, et al. (1995). "The nuclear receptor for melatonin represses 5-lipoxygenase gene expression in human B lymphocytes." *J Biol Chem* **270**(13): 7037-40.
- Steinlechner, S., B. Jacobmeier, et al. (2002). "Robust circadian rhythmicity of Per1 and Per2 mutant mice in constant light, and dynamics of Per1 and Per2 gene expression under long and short photoperiods." *J Biol Rhythms* **17**(3): 202-9.
- Stephan, F. K., J. M. Swann, et al. (1979). "Entrainment of circadian rhythms by feeding schedules in rats with suprachiasmatic lesions." *Behav Neural Biol* **25**(4): 545-54.
- Stephan, F. K., J. M. Swann, et al. (1979). "Anticipation of 24-hr feeding schedules in rats with lesions of the suprachiasmatic nucleus." *Behav Neural Biol* **25**(3): 346-63.
- Stokkan, K. A., K. O. Nonaka, et al. (1991). "Low temperature stimulates pineal activity in Syrian hamsters." *J Pineal Res* **10**(1): 43-8.

- Stokkan, K. A., R. J. Reiter, et al. (1991). "Food restriction retards aging of the pineal gland." *Brain Res* **545**(1-2): 66-72.
- Stokkan, K. A., R. J. Reiter, et al. (1991). "Endocrine and metabolic effects of life-long food restriction in rats." *Acta Endocrinol (Copenh)* **125**(1): 93-100.
- Storch, K. F., O. Lipan, et al. (2002). "Extensive and divergent circadian gene expression in liver and heart." *Nature* **417**(6884): 78-83.
- Stout, R. W. (1990). "Insulin and atheroma. 20-yr perspective." *Diabetes Care* **13**(6): 631-54.
- Sturner, W. Q., H. J. Lynch, et al. (1990). "Melatonin concentrations in the sudden infant death syndrome." *Forensic Sci Int* **45**(1-2): 171-80.
- Sumova, A., M. Jac, et al. (2003). "Clock gene daily profiles and their phase relationship in the rat suprachiasmatic nucleus are affected by photoperiod." *J Biol Rhythms* **18**(2): 134-44.
- Teena, and Wax, M. A. (1975). "Runwheel activity patterns in mature-young and senescent mice: the effect of constant lighting conditions". *J Gerontol*. 30:22-27
- Tei, H., H. Okamura, et al. (1997). "Circadian oscillation of a mammalian homologue of the Drosophila period gene." *Nature* **389**(6650): 512-6.
- Ueda, H. R., W. Chen, et al. (2002). "A transcription factor response element for gene expression during circadian night." *Nature* **418**(6897): 534-9.
- Unger, J. W. and M. Betz (1998). "Insulin receptors and signal transduction proteins in the hypothalamo-hypophyseal system: a review on morphological findings and functional implications." *Histol Histopathol* **13**(4): 1215-24.
- Valentinuzzi, V. S., K. Scarbrough, et al. (1997). "Effects of aging on the circadian rhythm of wheel-running activity in C57BL/6 mice." *Am J Physiol* **273**(6 Pt 2): R1957-64.
- van der Horst, G. T., M. Muijtjens, et al. (1999). "Mammalian Cry1 and Cry2 are essential for maintenance of circadian rhythms." *Nature* **398**(6728): 627-30.
- van der Knaap, M. S., P. A. Leegwater, et al. (2002). "Mutations in each of the five subunits of translation initiation factor eIF2B can cause leukoencephalopathy with vanishing white matter." *Ann Neurol* **51**(2): 264-70.
- Van Reeth, O. (2001). "[Biological rhythm and man's environment: work and jet lag]." *Rev Med Interne* **22 Suppl 1**: 26s-28s.
- Van Reeth, O. and F. W. Turek (1992). "Changes in the phase response curve of the circadian clock to a phase-shifting stimulus." *J Biol Rhythms* **7**(2): 137-47.
- Van Reeth, O., L. Weibel, et al. (2001). "Melatonin or a melatonin agonist corrects age-related changes in circadian response to environmental stimulus." *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **280**(5): R1582-91.
- Van Reeth, O., Y. Zhang, et al. (1993). "Aging alters the entraining effects of an activity-inducing stimulus on the circadian clock." *Brain Res* **607**(1-2): 286-92.
- Van Reeth, O., Y. Zhang, et al. (1992). "Aging alters feedback effects of the activity-rest cycle on the circadian clock." *Am J Physiol* **263**(4 Pt 2): R981-6.
- Vanecek, J. and K. Watanabe (1998). "Melatonin inhibits the increase of cyclic AMP in rat suprachiasmatic neurons induced by vasoactive intestinal peptide." *Neurosci Lett* **252**(1): 21-4.
- Viswanathan, M., J. T. Laitinen, et al. (1990). "Expression of melatonin receptors in arteries involved in thermoregulation." *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**(16): 6200-3.
- Vitaterna, M. H., D. P. King, et al. (1994). "Mutagenesis and mapping of a mouse gene, Clock, essential for circadian behavior." *Science* **264**(5159): 719-25.
- von Gall, C., G. E. Duffield, et al. (1998). "CREB in the mouse SCN: a molecular interface coding the phase-adjusting stimuli light, glutamate, PACAP, and melatonin for clockwork access." *J Neurosci* **18**(24): 10389-97.
- von Gall, C., D. R. Weaver, et al. (2000). "Melatonin limits transcriptional impact of phosphoCREB in the mouse SCN via the Mel1a receptor." *Neuroreport* **11**(9): 1803-7.
- Wakamatsu, H., Y. Yoshinobu, et al. (2001). "Restricted-feeding-induced anticipatory activity rhythm is associated with a phase-shift of the expression of mPer1 and mPer2 mRNA in the cerebral cortex and hippocampus but not in the suprachiasmatic nucleus of mice." *Eur J Neurosci* **13**(6): 1190-6.
- Watanabe, K., J. Vanecek, et al. (2000). "In vitro entrainment of the circadian rhythm of vasopressin-releasing cells in suprachiasmatic nucleus by vasoactive intestinal polypeptide." *Brain Res* **877**(2): 361-6.
- Weaver, D. R., C. Liu, et al. (1996). "Nature's knockout: the Mel1b receptor is not necessary for reproductive and circadian responses to melatonin in Siberian hamsters." *Mol Endocrinol* **10**(11): 1478-87.
- Weaver, D. R. and S. M. Reppert (1996). "The Mel1a melatonin receptor gene is expressed in human suprachiasmatic nuclei." *Neuroreport* **8**(1): 109-12.
- Weaver, D. R., S. A. Rivkees, et al. (1989). "Localization and characterization of melatonin receptors in rodent brain by in vitro autoradiography." *J Neurosci* **9**(7): 2581-90.
- Weindruch, R. (1992). "Effect of caloric restriction on age-associated cancers." *Exp Gerontol* **27**(5-6): 575-81.
- Weindruch, R. (1995). "Interventions based on the possibility that oxidative stress contributes to sarcopenia." *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* **50 Spec No**: 157-61.
- Weindruch, R. (1996). "The retardation of aging by caloric restriction: studies in rodents and primates." *Toxicol Pathol* **24**(6): 742-5.
- Weindruch, R. (1996). "Caloric restriction and aging." *Sci Am* **274**(1): 46-52.
- Weindruch, R. (2003). "Caloric restriction, gene expression, and aging." *Alzheimer Dis Assoc Disord* **17 Suppl 2**: S58-9.
- Weindruch, R., B. H. Devens, et al. (1983). "Influence of dietary restriction and aging on natural killer cell activity in mice." *J Immunol* **130**(2): 993-6.
- Weindruch, R., S. R. Gottesman, et al. (1982). "Modification of age-related immune decline in mice dietarily restricted from or after midadulthood." *Proc Natl Acad Sci U S A* **79**(3): 898-902.
- Weindruch, R., T. Kayo, et al. (2001). "Microarray profiling of gene expression in aging and its alteration by caloric restriction in mice." *J Nutr* **131**(3): 918S-923S.
- Weindruch, R., T. Kayo, et al. (2002). "Gene expression profiling of aging using DNA microarrays." *Mech Ageing Dev* **123**(2-3): 177-93.
- Weindruch, R., K. P. Keenan, et al. (2001). "Caloric restriction mimetics: metabolic interventions." *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* **56 Spec No 1**: 20-33.
- Weindruch, R. H., M. K. Cheung, et al. (1980). "Modification of mitochondrial respiration by aging and dietary restriction." *Mech Ageing Dev* **12**(4): 375-92.
- Weindruch, R. H. and S. C. Sufin (1980). "Quantitative histologic effects on mouse thymus of controlled dietary restriction." *J Gerontol* **35**(4): 525-31.
- Welsh, D. K., D. E. Logothetis, et al. (1995). "Individual neurons dissociated from rat suprachiasmatic nucleus express

- independently phased circadian firing rhythms." *Neuron* **14**(4): 697-706.
- Welsh, D. K. and S. M. Reppert (1996). "Gap junctions couple astrocytes but not neurons in dissociated cultures of rat suprachiasmatic nucleus." *Brain Res* **706**(1): 30-6.
- Williams, D. W., M. Tyrer, et al. (2000). "Tau and tau reporters disrupt central projections of sensory neurons in *Drosophila*." *J Comp Neurol* **428**(4): 630-40.
- Wilsbacher, L. D., A. M. Sangoram, et al. (2000). "The mouse Clock locus: sequence and comparative analysis of 204 kb from mouse chromosome 5." *Genome Res* **10**(12): 1928-40.
- Wirz-Justice, A., R. A. Wever, et al. (1984). "Seasonality in freerunning circadian rhythms in man." *Naturwissenschaften* **71**(6): 316-9.
- Witting, W., M. Mirmiran, et al. (1994). "The effect of old age on the free-running period of circadian rhythms in rat." *Chronobiol Int* **11**(2): 103-12.
- Wolters, H., B. M. Elzinga, et al. (2002). "Effects of bile salt flux variations on the expression of hepatic bile salt transporters in vivo in mice." *J Hepatol* **37**(5): 556-63.
- Young, M. E., P. Razeghi, et al. (2001). "Clock genes in the heart: characterization and attenuation with hypertrophy." *Circ Res* **88**(11): 1142-50.
- Young, M. W. (2000). "Life's 24-hour clock: molecular control of circadian rhythms in animal cells." *Trends Biochem Sci* **25**(12): 601-6.
- Zheng, B., D. W. Larkin, et al. (1999). "The mPer2 gene encodes a functional component of the mammalian circadian clock." *Nature* **400**(6740): 169-73.
- Zlomanczuk, P., R. R. Margraf, et al. (1991). "In vitro electrical activity in the suprachiasmatic nucleus following splitting and masking of wheel-running behavior." *Brain Res* **559**(1): 94-9.
- Zylka, M. J. and S. M. Reppert (1999). "Discovery of a putative heme-binding protein family (SOUL/HBP) by two-tissue suppression subtractive hybridization and database searches." *Brain Res Mol Brain Res* **74**(1-2): 175-81.
- Zylka, M. J., L. P. Shearman, et al. (1998). "Molecular analysis of mammalian timeless." *Neuron* **21**(5): 1115-22.
- Zylka, M. J., L. P. Shearman, et al. (1998). "Three period homologs in mammals: differential light responses in the suprachiasmatic circadian clock and oscillating transcripts outside of brain." *Neuron* **20**(6): 1103-10.

## 6.4 Danksagung (in weder emotionaler noch alphabetischer Reihenfolge)

### Hamburg

Danke an meine Familie, meine Eltern und meinen Bruder. Ihr habt mich immer unterstützt und ermuntert in den letzten Jahren. Ihr habt mir Mut gemacht, wenn ich verzweifelt war und ward stolz auf mich, wenn alles toll klappte. Danke vor allem Nils, meinem Bruder. Big Bro – Du warst immer für mich da, nicht nur in geographischer Nähe – danke. Danke auch für Deine Hilfe beim Kampf gegen Word®.

Vielen Dank an Dr. James Olcese, meinen Doktorvater, Mentor und Freund. Danke, dass Du mich als HiWi aufgenommen hast und mir im direkten Anschluss daran die Möglichkeit gegeben hast, bei Dir zu promovieren. Von allen möglichen Betreuern habe ich echt Glück mit Dir gehabt. Ja, wir sind ein gutes Team! Danke, dass du mich mit in die USA genommen hast, die Entscheidung war aus multipler Hinsicht absolut richtig! Ich freue mich darauf, noch eine gute, produktive Zeit im schönen Florida zu verbringen.

Danke an Dr. Andrej-Nikolai Spiess! Andrej (Digger), danke, danke, danke für Deine guten Vorschläge und das Korrekturlesen meiner Arbeit. Du warst immer eine super Hilfe bei meinen fachlichen Fragen und hattest immer ein Protokoll im Kopf, das viel besser als das des Herstellers war. Es hat einen riesigen Spaß mit Dir im IHF gemacht, der Faktor, den ich am meisten vermissen werde, ist der Spiess-Faktor! Thanks!

Mein ausgesprochener Dank gebührt Herrn Prof. Dr. Wiese. Vielen Dank, dass Sie sich so selbstlos für mich und das Gelingen meiner Promotion eingesetzt haben. Ihr spontaner, unbürokratischer und kompetenter Einsatz bei der Anmeldung meiner Dissertation war sehr hilfreich. Danke für die weitere Unterstützung während meines USA-Aufenthaltes!

Vielen Dank an alle Mitarbeiter, Kollegen und Freunde, die ich im Laufe der Zeit gewonnen habe! Die Zeit am Grandweg war super. Euch allen, Nadine, Sandra, Anja, Ralph und Olaf wünsche ich alles Gute für die Zukunft!

Danke an unsere netten TA-Schülerinnen, insbesondere Jenny Behrens, Lena Fischer und Sandra Fredericks, die immer sehr gelehrig, fleissig und vor allem geduldig waren!

Dir Roger danke ich dafür, dass Du immer ein offenes Ohr für mich hattest. Du bist der beste Zuhörer und Berater, den ich mir vorstellen kann.  
Ich werde alle Kollegen aus dem IHF vermissen. Das Leben geht weiter, für uns alle. Denn:  
*Tempus fugit!*

Danke an Herrn Prof. Dr. Seitz vom GRK 336. Ihr Einsatz für junge Doktoranden ist bewundernswert. Ich danke Ihnen.  
Danke an die DFG, dessen finanzielle Unterstützung (auch über das GRK 336) maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat.

### **Tallahassee USA**

First of all I'd like to thank Dr. James Olcese again – you were in Germany and now in the States, I just keep following you around - thanks for everything again! It was/is great working with you!

Holly, well – thanks for everything.

Dr. Curtis Altmann. Curtis, you are one of the most amazing scientists I have met. In particular, thanks for your help with the Xeotron® *Microarrays*.

Dr. Yoichi Kato. It was a real pleasure meeting you. Thank you for guiding me through the indirect labeling, the scanning and the data acquisition. You were a great help. Thanks for everything.

And last, but not least, thanks to Trent and Malcolm and everyone else in the department who has helped me.