

Die Pars tuberalis als Modellsystem eines Melatonin-abhängigen peripheren circadianen Oscillators

Herrn Professor Andreas Oksche
zum 80. Geburtstag gewidmet

Einleitung

Die Rotationsachse der Erde ist gegenüber der Bahnebene der Erde geneigt, dadurch kommt es zu den jahreszeitlichen Veränderungen der Tageslänge. Die Tageslänge dient vielen Organismen dazu, Physiologie und Verhalten an die sich im Laufe der Jahreszeiten verändernden Anforderungen anzupassen bzw. diese zu antizipieren (Übersicht: Schwartz et al., 2001). Darüber hinaus zeigen zahlreiche Körperfunktionen, wie z. B. Schlaf/Wachverhalten, Stoffwechselaktivität, Blutdruck, Körpertemperatur und Hormonproduktion tageszeitliche Schwankungen. Diese Rhythmen werden durch endogene Oszillatoren gesteuert, die sich in nahezu allen Geweben finden und einer strengen Hierarchie unterliegen. An der Spitze der Hierarchie steht der zentrale Oszillator im *Nucleus suprachiasmaticus* (SCN) des Hypothalamus. Die Phasenlage und Periodenlänge des SCN werden über den retino-hypothalamischen Trakt (RHT) auf den astrophysikalischen Tag eingestellt. Ohne die Übertragung von photischen Signalen zum SCN laufen die endogenen Rhythmen mit einer Periodenlänge weiter, die nicht genau, sondern nur ungefähr den 24 Stunden des natürlichen Tages entspricht (*circadian*). Der zentrale Oszillator im SCN synchronisiert und reguliert die Oszillatoren in peripheren Geweben. Die peripheren Oszillatoren steuern die rhythmische Expression von Genen, die für die physiologischen Prozesse im jeweiligen Gewebe benötigt werden (Übersicht: Duffield et al., 2003).

Über einen multisynaptischen Signalweg treibt der SCN u. a. die nächtliche Melatonin-synthese im Pinealorgan an (Abb. 1; Übersicht: Stehle et al., 2001). Die Melatoninsekretion wird durch die Tageslänge moduliert (Übersicht: Malpoux et al., 2001), folglich ist die Dauer der nächtlich erhöhten Melatoninspiegel im Plasma proportional zur Länge der Nacht. Dadurch stellt Melatonin ein wichtiges internes Signal für die Phasenlage und die Tageslänge für alle Zellen und Gewebe dar, die mit Melatoninrezeptoren ausgestattet sind. Bei Säugern sind zwei membranständige, G-Protein gekoppelte Melatoninrezeptorsubtypen bekannt, der MT1- und der MT2-Rezeptor (Übersicht: siehe Weaver und Dallmann in diesem Band). Die hypophysäre *Pars tuberalis* (PT) zeigt eine auffallend hohe Dichte des hochaffinen MT1-Rezeptors (Morgan et al., 1994; Roca et al., 1997). Darüber hinaus findet sich dieser Rezeptor im SCN (Liu et al., 1997)

und in anderen Gehirnregionen sowie in peripheren Geweben (Clemens et al., 2001; Scher et al., 2002; Zhao et al., 2002; Naji et al., 2004; Sallinen et al., 2005) einschließlich der pankreatischen Insel (Peschke et al., 2000, 2002). Der MT2-Rezeptor hingegen findet sich überwiegend in der Retina, z. B. bei Mensch und Krallenfrosch (Reppert et al., 1995; Wiechmann et al., 1999), in der humanen Chorionkarzinom(Jar)-Zelllinie (Shiu et al., 1999) sowie in humanen PAZ6-Adipozyten (Brydon et al., 2001).

Die Aktivierung der Melatoninrezeptoren führt in Zielzellen über die Rekrutierung unterschiedlicher Signaltransduktionsmechanismen zur Regulation genexpressiver Vorgänge. Am besten sind diese Mechanismen in der PT aufgeklärt. Daher widmet sich dieser Übersichtsartikel hauptsächlich der Rolle von Melatonin bei der Regulation von Genexpression in der PT.

Melatonin steuert die Freisetzung von Prolaktin

Melatonin moduliert die endokrine Aktivität der PT, dadurch werden antizipatorisch saisonale Veränderungen in Stoffwechselrate, Felddichte und Reproduktionsverhalten reguliert (Übersicht: Ross und Morgan, 2002). Melatonin unterdrückt die Freisetzung eines Prolaktin *releasing* Faktors in der PT und beeinflusst dadurch die Prolaktin-Freisetzung in der *Pars distalis* (Abb. 1) (Morgan et al., 1996; Wittkowski et al., 1999; Graham et al., 2002). Daher kann diese Struktur als Schnittstelle zwischen der zentralen Uhr im Hypothalamus und der Adenohypophyse bzw. dem endokrinen System angesehen werden (Übersicht: Morgan et al., 1994).

Melatonin beeinflusst Signaltransduktionskaskaden in der Pars tuberalis

Anfängliche Experimente haben gezeigt, dass eine kurzzeitige Applikation von Melatonin (15–30 min) den Forskolin-induzierten Anstieg des cAMP-Spiegels in der PT von Schaf und Hamster hemmt (Carlson et al., 1991; Morgan et al., 1991). Dies geschieht vermutlich durch Blockade der Adenylatzyklase durch den $G_{i/o}$ -gekoppelten MT1-Rezeptor. Seitdem konnte bestätigt werden, dass sich eine kurzfristige Melatoningabe hauptsächlich hemmt

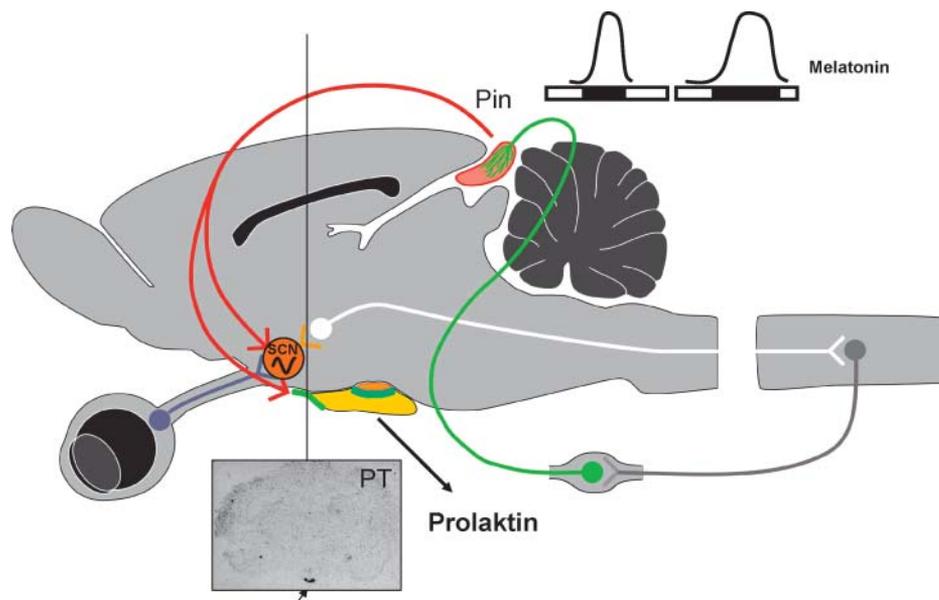


Abb. 1: Modell der Regulation der Prolaktinsekretion durch Melatonin. Die Tageslänge wird in der Retina wahrgenommen und über den retino-hypothalamischen Trakt an den zentralen Oszillator im *Nucleus suprachiasmaticus* (SCN) vermittelt. Über einen multisynaptischen Signalweg treibt der SCN die nächtliche Melatoninsynthese im Pinealorgan (Pin) an. Die Melatoninsekretion wird durch die Tageslänge moduliert, so dass unter Langtagbedingungen weniger Melatonin produziert wird, als unter Kurztagbedingungen. Melatonin reguliert die Uhrgenexpression in der *Pars tuberalis* (PT) und unterdrückt dort die Freisetzung eines Prolaktin-releasing Faktors. Dadurch wird die Prolaktin-Freisetzung in der *Pars distalis* moduliert.

mend auf cAMP-abhängige Signaltransduktionskaskaden auswirkt, wie z. B. auf die Aktivierung der Proteinkinase A (Hazlerigg et al., 1991). Allerdings kann Melatonin in anderen Geweben auch cAMP-unabhängige Signalwege hemmend beeinflussen (Godson und Reppert, 1997; Brydon et al., 1999; Kopp et al., 1999). Im Gegensatz zur kurzfristigen Applikation bewirkt Melatonin über einen Zeitraum von 6 bis 16 Stunden eine Zunahme der Sensitivität der PT gegenüber der Stimulation mit Forskolin, so dass die cAMP-Spiegel in den Melatonin-vorbehandelten (sensitivierten) Zellen bis zu 10 mal höher sind als bei Stimulation mit Forskolin allein (Hazlerigg et al., 1993). Dieses als Sensitivierung bezeichnete Phänomen stellt einen wichtigen Mechanismus dar, durch den sich das ansonsten hemmende Hormon aktivierend auf Signaltransduktionskaskaden auswirken kann.

Melatonin vermittelt die rhythmische Uhrgenexpression in der *Pars tuberalis*

Die tages- und jahreszeitliche Steuerung von Genexpression muss durch die differentielle Regulation von Transkriptionsfaktoren bewerkstelligt werden. In der PT hemmt Melatonin die Phosphorylierung und dadurch die Aktivierung des Transkriptionsfaktors CREB (*cAMP response element binding protein*) (McNulty et al., 1994; von Gall et al., 2002) sowie die Expression des *immediate early* AP1-Transkriptionsfaktors c-FOS (Ross et al.,

1996). Darüber hinaus hat Melatonin in der PT einen entscheidenden Einfluss auf die Expression der so genannten Uhrgene, die ebenfalls transkriptionelle Regulatoren darstellen. Die Uhrgene bzw. deren Proteinprodukte sind maßgeblich für die tages- und vermutlich auch für die jahreszeitliche Steuerung von Genexpression verantwortlich. Sie bilden ein fein abgestimmtes Gefüge von aktivierenden und hemmenden Faktoren, das einen endogenen Rhythmus mit einer Periodenlänge von etwa 24 h (*circadian*) generiert. Die beiden Transkriptionsfaktoren der *basic helix-loop-helix* (bHLH)/PAS-Familie, CLOCK und BMAL1, stellen die wichtigsten positiven Elemente einer transkriptionell/translationellen Rückkopplungsschleife dar. CLOCK und BMAL1 heterodimerisieren und aktivieren über E-box-Promotorelemente die Expression der übrigen Uhrgene, *mPer1-2* und *mCry1-2* (Übersicht: Reppert und Weaver, 2002). Die Genprodukte mPER1-2 und mCRY1-2 werden von den Proteinkinasen CKI ϵ und δ phosphoryliert und bilden einen negativen Regulatorkomplex, der die CLOCK:BMAL1-abhängige Transkription hemmt (Lee et al., 2001). Dadurch wird die Rückkopplungsschleife geschlossen. Antiphasisch zur *mPer/mCry*-Expression wird die Expression von *Bmal1* durch die Transkriptionsfaktoren REV-ERB α (Preitner et al., 2002) und ROR α (Akashi und Takumi, 2005) reguliert; dieser Mechanismus verstärkt möglicherweise die erste Rückkopplungsschleife (Abb. 2). Während dieser Rhythmus im zentralen Oszillator, dem SCN, selbsterhaltend ist, muss er in peripheren Oszillatoren

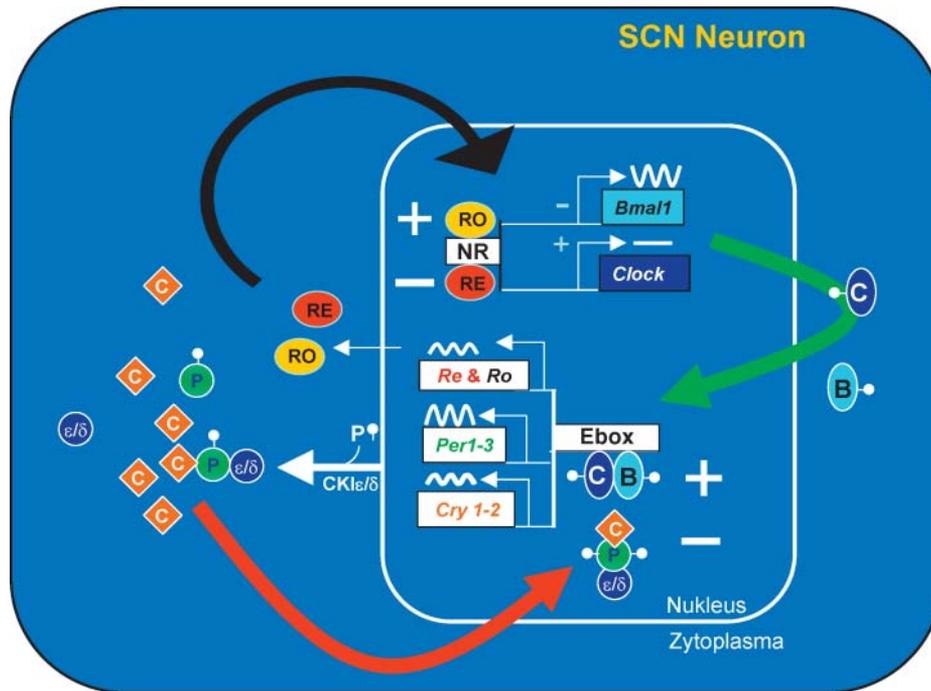


Abb. 2: Modell der molekularen Mechanismen im zentralen Oszillator, dem *Nucleus suprachiasmaticus* (SCN). CLOCK (C) und BMAL1 (B) regulieren als positive Elemente der ersten Rückkopplungsschleife die Expression von *Per1-2*, *Cry1-2* und *Rora* (*Ro*) *Rev-Erbα* (*Re*). Die PER Proteine (P) werden von den Kaseinkinasen CKII ϵ und CKI δ (ϵ/δ) phosphoryliert (p) und bilden einen Komplex mit den CRYs (C). Der CRY-PER-CKI ϵ /CKI δ Komplex hemmt die CLOCK-BMAL1 vermittelte Transkription und schließt dadurch diese Rückkopplungsschleife. In einer zweiten Rückkopplungsschleife wird die Expression von *Bmal1* und *Clock* durch REV-ERB α (RE) gehemmt und durch ROR α (RO) aktiviert. Die Transkription von *Rev-Erbα* wird wiederum vom CRY-PER-CKI ϵ /CKI δ Komplex gehemmt (nach Reppert und Weaver, 2002).

wie in der PT vermutlich durch endogene, rhythmisierende Faktoren angestoßen werden. Dabei gibt es gewebespezifische Unterschiede, wie stark ein peripherer Oszillator von einem endogenen Faktor abhängt, d. h. wie schnell er in Abwesenheit dieses Faktors ausschwingt (Yoo et al., 2004). Zahlreiche Arbeiten in unterschiedlichen Spezies haben gezeigt, dass in der PT Melatonin der wichtigste Taktgeber für den Rhythmus der Uhrenexpression ist. Bereits die Arbeit, in der das Maus (m)*Per1* erstmals charakterisiert wurde (Sun et al., 1997), gab Hinweise darauf, dass dieses Uhren nur in der PT von Melatonin-profizienten 129/SvEvBrd Mäusen, jedoch nicht in der PT von Melatonin-defizienten C57Bl/6 exprimiert wird. Daraufhin wurde in einer Reihe von Experimenten der Einfluss der Photoperiode auf die Uhrenexpression in der PT von Tieren mit saisonalem Fortpflanzungsverhalten untersucht. Sowohl im Sibirischen als auch im Syrischen Hamster gibt es einen tageszeitlichen Rhythmus der *Per1*-Expression in der PT mit einem Maximum kurz nach Beginn des Tages (Messenger et al., 1999, 2000; Nuesslein-Hildesheim et al., 2000; Johnston et al., 2005). Interessanterweise ist die Amplitude dieses Rhythmus in der PT etwa doppelt so hoch, wenn die Tiere unter Langtagbedingungen (kurzes Melatoninsignal) gehalten wurden, als bei Tieren, die unter Kurztag

(langes Melatoninsignal) lebten. Die Photoperiode hatte jedoch keinen Einfluss auf die Amplitude der rhythmischen *Per1*-Expression im SCN (Messenger et al., 1999, 2000). Diese Befunde stützen die Hypothese, dass Melatonin die Uhrenexpression in der PT reguliert. Da die *Per1*-Expression in der PT von pinealektomierten Syrischen Hamstern zum Erliegen kommt (Messenger et al., 2001), kann von einem direkten Einfluss von Melatonin auf die Uhrenexpression in der PT ausgegangen werden.

Obgleich das reproduktive System der Hausmaus (*Mus musculus*) verhältnismäßig unempfindlich gegenüber Änderungen der Photoperiode ist, zeigt diese Spezies u. a. saisonale Änderungen in Morphologie und Funktion des Immunsystems (Bronson, 1979; Yellon und Tran, 2002). Die Maus bietet sich als Versuchstier an, um Mechanismen der Regulation von Uhrenexpression in peripheren Geweben zu untersuchen, da die genetische Manipulation dieser Spezies gut etabliert ist. Daher stehen eine Reihe transgener Tiere zur Verfügung, durch deren Analyse die Funktion einzelner Gene aufgeklärt werden kann. So können z. B. Mäuse mit einer gezielten Deletion des MT1-Rezeptors (MT1^{-/-}) herangezogen werden, um die Funktion dieses Rezeptors für die Regulation der Uhrenexpression in der PT zu analysieren. Diese transgenen Tiere zeigen im Gegensatz zum Wildtyp eine stark redu-

zierte Expression von *mPer1* in der PT und einen erhöhten Prolaktinspiegel im Plasma (von Gall et al., 2002). Melatonin ist daher offensichtlich auch in der PT der Maus ein wichtiges Signal für die rhythmische *mPer1*-Expression und für die Regulation der Prolaktinsekretion. Auch pinealektomierte Mäuse zeigen wie erwartet eine drastische Abnahme der *mPer1*-Expression in der PT gegenüber Kontrolltieren. Durch einzelne oder wiederholte Injektion von Melatonin kann jedoch der Rhythmus der *mPer1*-Expression dann nicht wieder hergestellt werden, wenn die Pinealektomie einige Zeit zurückliegt (Messenger et al., 2001; von Gall et al., 2002). Nur wenn die Injektion direkt in der nächsten Nacht nach dem Eingriff erfolgt, kann die rhythmische Expression von *mPer1* in der PT von pinealektomierten Tieren aufrechterhalten werden (von Gall et al., 2002). Daraus lässt sich schließen, dass ein längerfristiges Fehlen des Melatoninsignals zum Verlust der Empfindlichkeit der PT, im Sinne einer Desensitivierung gegenüber diesem Hormon, führt. In einem *in vitro*-Experiment konnte gezeigt werden, dass das nächtlich freigesetzte Melatonin die circadiane Expression von *mPer1* in der PT akut inhibiert, indem es den cAMP-Signaltransduktionsweg und die Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors CREB hemmt (von Gall et al., 2002). Ein weiteres *in vitro*-Experiment liefert eine mögliche Erklärung für das Paradoxon, wie durch das Fehlen des hemmenden Signals Melatonin die rhythmische *mPer1*-Expression zum Erliegen kommt. Die PT verfügt über eine ausgesprochen hohe Dichte des G_s-Protein gekoppelten A_{2b}-Rezeptors für den ubiquitär vorkommenden Botenstoff Adenosin (Stehle et al., 1992). NECA, ein A_{2b}-Rezeptoragonist, bewirkt eine deutliche Zunahme des mPER1-Proteingehaltes in PT Gewebekulturen, wenn diese mit Melatonin vorinkubiert wurden (von Gall et al., 2002). Daher sensitiviert Melatonin offenbar, ähnlich wie oben für Forskolin beschrieben, auch den Adenosin-induzierten cAMP-Signaltransduktionsweg. Daraus lässt sich folgendes Modell ableiten: während der Nacht hemmt Melatonin die cAMP-Signaltransduktionskaskade und sensitiviert gleichzeitig den A_{2b}-Rezeptor. In den frühen Morgenstunden, wenn Melatonin aus der Zirkulation verschwindet, entfällt der hemmende Effekt auf die cAMP-Signaltransduktionskaskade in den PT Zellen und Adenosin bewirkt, durch Aktivierung des sensitivierten A_{2b}-Rezeptors eine Zunahme der intrazellulären cAMP-Konzentration. Als Konsequenz werden die Phosphorylierung von CREB aktiviert und die *mPer1*-Expression angeregt. Im Laufe des Tages kommt es zur Desensitivierung des A_{2b}-Rezeptors, und die cAMP-Konzentration nimmt ab. Mit Zunahme der Plasma-Melatoninkonzentration während der Nacht startet ein neuer Zyklus (von Gall et al., 2002; von Gall, 2003).

Mittlerweile konnte nachgewiesen werden, dass der MT2-Rezeptor entbehrlich für die Regulation der Uhrenexpression in der PT der Maus ist (von Gall et al., 2005). Die Deletion des MT1-Rezeptors führt jedoch

nicht nur zu einer geminderten Expression von *mPer1* sondern hat auch drastische Auswirkungen auf die Expression der übrigen Uhrengene in der PT. Über einen bislang noch ungeklärten Mechanismus kann Melatonin offenbar, direkt oder indirekt, die Expression von *Cry1* in der PT aktivieren. In der PT von Ratte, Hamster und Schaf liegt das Maximum der *Cry1*-Expression in der Mitte der Nacht parallel zum Anstieg der Melatoninkonzentration im Blutplasma (Dardente et al., 2003; Johnston et al., 2005; Lincoln et al., 2005). Nach einer akuten Injektion von Melatonin am Ende des Tages kann ein vorzeitiger Anstieg von *Cry1* in der PT der Ratte beobachtet werden. Gleichzeitig führt eine Injektion von Melatonin am Ende der Nacht zu einer verminderten *Per1*-Expression (Dardente et al., 2003). Melatonin hat also gegensätzliche Wirkungen auf die Expression von *Cry1* und *Per1*. Auch in der PT der Maus liegt das Maximum der *mCry1*-Expression in der PT in der Mitte der Nacht zu Beginn der steigenden Melatoninkonzentration (Abb. 3; von Gall et al., 2005). Offensichtlich korrelieren das Maximum der *mCry1*-Expression mit dem Anstieg und das Maximum der *mPer1*-Expression mit dem Abfall der Melatoninkonzentration im Serum. Darin ist die PT einzigartig, denn in allen bislang untersuchten Geweben gibt es ein gemeinsames Maximum der RNA von *Per1*, *Per2*, *Cry1* und *Cry2* (Balsalobre et al., 1998; Kume et al., 1999; Bae et al., 2001; Lee et al., 2001). In der PT der MT1^{-/-} Maus ist die Expression von *mCry1* gegenüber dem Wildtyp und der MT2^{-/-} Maus stark reduziert (Abb. 3; von Gall et al., 2005). Aber auch die Expression der positiven Regulatoren *Bmal1* und *Clock* ist in der PT von MT1^{-/-} Mäusen gegenüber dem Wildtyp und der MT2^{-/-} Maus drastisch reduziert (Abb. 4; von Gall et al., 2005). Daher ist der MT1-Rezeptor offensichtlich maßgeblich für die Aktivierung der Expression dieser Uhrengene in der PT. Im Gegensatz dazu sind jedoch sowohl die *mPer2*- als auch die *mCry2*-mRNA in der PT durch die Deletion des MT1-Rezeptors nicht beeinträchtigt (Abb. 5; Jilg et al., 2005). Da die Uhrenproteine letztlich die entscheidenden Faktoren für die Regulation der Genexpression sind, wurde von Jilg und Mitarb. (2005) der Rhythmus der Uhrenproteine in der PT im Tagesgang untersucht. Diese Arbeit lieferte neben neuen Befunden zur Interaktion von Uhrenproteinen auch wichtige Erkenntnisse über Unterschiede und Gemeinsamkeiten der Regulation von Uhrenexpression im zentralen (SCN) und in einem peripheren Oszillator (PT).

Erstaunlicherweise findet sich ein gemeinsames Maximum der Proteingehalte von mPER1, mPER2 und mCRY1 am späten subjektiven Tag, obwohl die Maxima der Genexpression von *mPer1* und *mCry1* am frühen Tag bzw. in der Mitte der Nacht liegen (Abb. 3; von Gall et al., 2002, 2005; Jilg et al., 2005). Daraus ergibt sich eine ungewöhnlich große Verzögerung von 14 Stunden zwischen maximaler *mCry*-Expression und maximalem

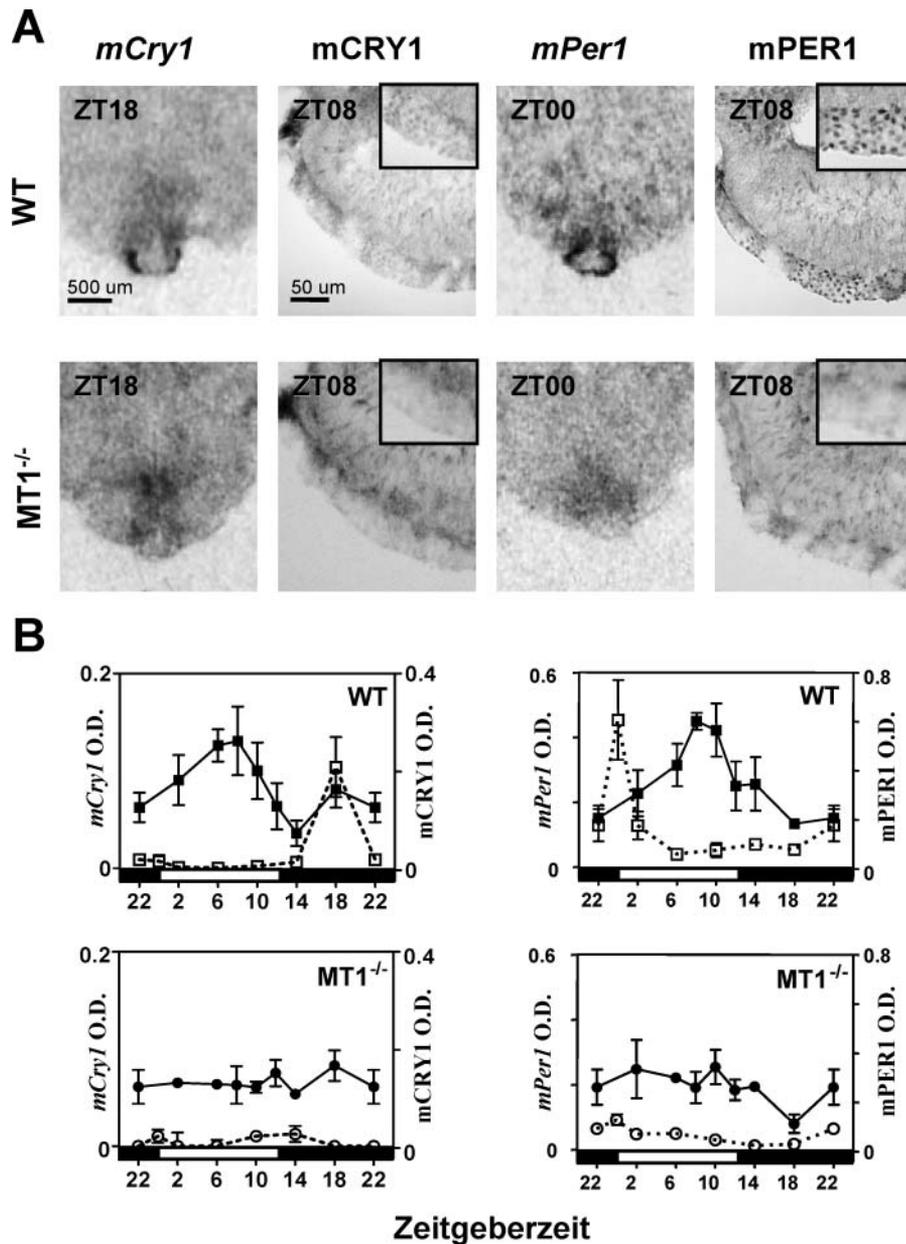


Abb. 3: *mCry1*/*mCRY1* und *mPer1*/*mPER1* Gehalt in der PT von Wildtyp (WT) und MT1-defizienten Mäusen (MT1^{-/-}). (A) Repräsentative Autoradiogramme der *in situ* Hybridisierung für *mCry1*- und *mPer1*-mRNA in der PT von WT und MT1^{-/-} Mäusen in der späten Nacht (ZT18) und am frühen Tag (ZT00). Repräsentative Mikrophotographien der mCRY1- und mPER1-Immunoreaktion (IR) in der PT von WT- und MT1^{-/-} Mäusen am späten Tag (ZT08). (B) Quantitative Analyse der optischen Dichte (O.D.) der *in situ*-Hybridisierung für *mCry1*- und *mPer1*-mRNA (ungefüllte Symbole, gestrichelte Linien) und der IR für mCRY1 und mPER1 (gefüllte Symbole, durchgezogene Linien) in der PT des WT (obere Spalte) und des MT1^{-/-} (untere Spalte). Die Werte geben die mittlere O.D. \pm SEM von 3 Tieren pro Zeitpunkt an. Die weißen und schwarzen Balken symbolisieren den Tag bzw. die Nacht. One-way ANOVA zeigt signifikante Rhythmen für *mCry1* ($p = 0.0002$), *mPer1* ($p = 0.0006$), mCRY1 ($p = 0.0002$) und mPER1 ($p = 0.0011$) in der PT vom WT. Two way ANOVA zeigt eine signifikante Reduktion von *mCry1* ($p < 0.0001$), *mPer1* ($p < 0.0001$), mCRY1 ($p = 0.045$) und mPER1 ($p = 0.0079$) in der PT vom MT1^{-/-} gegenüber dem WT (nach von Gall et al., 2005 sowie Jilg et al., 2005).

mCRY1-Proteingehalt. Nur die Verzögerung von 6 bis 8 Stunden zwischen *mPer1*-mRNA und mPER1-Protein korreliert mit dem Zeitrahmen im SCN (Hastings et al., 1999) und in der Leber (Lee et al., 2001) und ist daher eine gewebsunabhängige Konstante. Bereits für andere

Zellsysteme und Gewebe konnte gezeigt werden, dass die PER-Proteine wichtig für den Transport von mCRY1 in den Zellkern bzw. für die Stabilisierung des nukleären mCRY1-Proteins sind (Kume et al., 1999; Yagita et al., 2000; Lee et al., 2001; Miyazaki et al., 2001). Dadurch

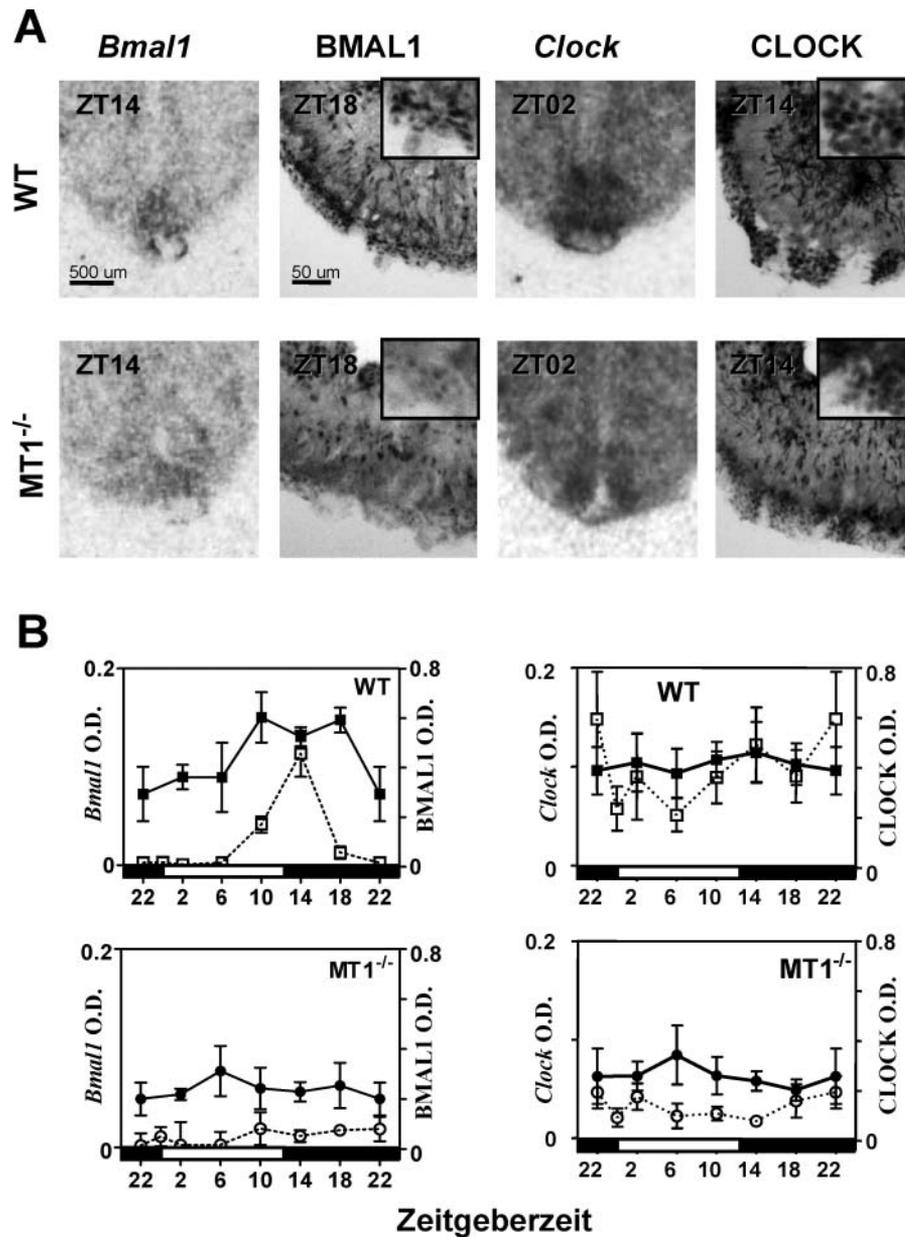


Abb. 4: *Bmal1*/BMAL1 und *Clock*/CLOCK Gehalt in der PT von Wildtyp (WT) und MT1-defizienten Mäusen (MT1^{-/-}). (A) Repräsentative Autoradiogramme der *in situ*-Hybridisierung für *Bmal1*- und *Clock*-mRNA in der PT von WT und MT1^{-/-} Mäusen in der frühen Nacht (ZT14) und am frühen Tag (ZT02). Repräsentative Mikrophotographien der BMAL1- und CLOCK-Immunoreaktion (IR) in der PT von WT- und MT1^{-/-} Mäusen in der späten (ZT18) und frühen Nacht (ZT14). (B) Quantitative Analyse der optischen Dichte (O.D.) der *in situ* Hybridisierung für *Bmal1*- und *Clock*-mRNA (ungefüllte Symbole, gestrichelte Linien) und der IR für BMAL1 und CLOCK (gefüllte Symbole, durchgezogene Linien) in der PT des WT (obere Spalte) und des MT1^{-/-} (untere Spalte). Die Werte geben die mittlere O.D. \pm SEM von drei Tieren pro Zeitpunkt an. Die weißen und schwarzen Balken symbolisieren den Tag bzw. die Nacht. One-way ANOVA zeigt einen signifikanten Rhythmus für *Bmal1* ($p = 0.001$) in der PT vom WT. Two way ANOVA zeigt eine signifikante Reduktion von *Bmal1* ($p = 0.048$), *Clock* ($p < 0.0001$), BMAL1 ($p = 0.0002$) und CLOCK ($p = 0.0021$) in der PT vom MT1^{-/-} gegenüber dem WT (nach von Gall et al., 2005 sowie Jilg et al., 2005).

ergibt sich die Notwendigkeit für ein gemeinsames Maximum des Proteingehaltes von mPER1, mPER2 und mCRY1. Obwohl das Maximum der *mCry1*-Expression 6 bis 8 Stunden vor dem Maximum der *mPer1*-Expression liegt, kann das mCRY1-Protein nur dann im Zellkern ak-

kumulieren, wenn dort bereits ausreichend große Mengen von mPER1 und mPER2 vorliegen.

Die *Bmal1*-mRNA erreicht in der PT von Schaf und Maus maximale Werte in der frühen Nacht (Lincoln et al., 2002; von Gall et al., 2005) ca. 6 Stunden nach dem Ma-

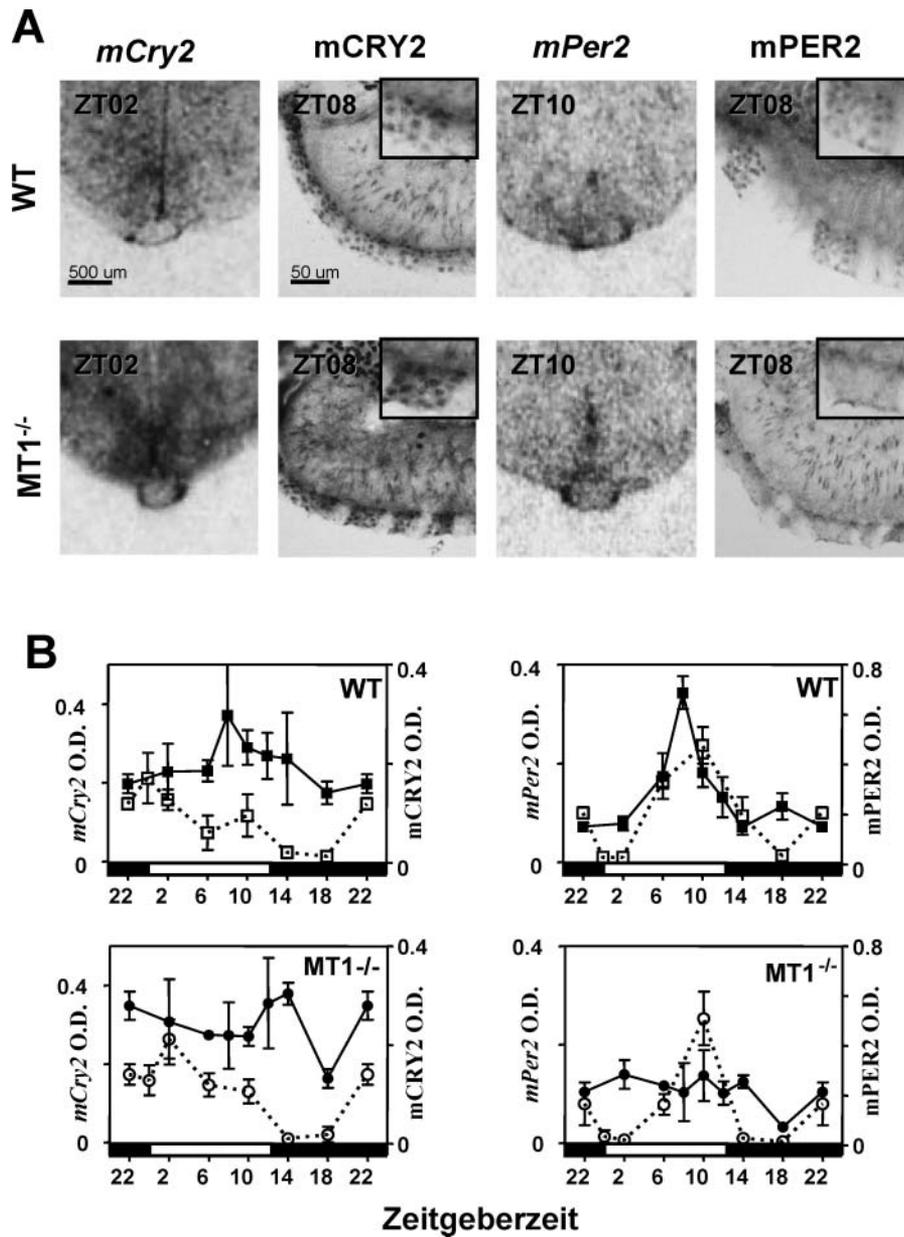


Abb. 5: *mCry2*/*mCRY2* und *mPer2*/*mPER2* Gehalt in der PT von Wildtyp (WT) und *MT1*^{-/-} Mäusen (*MT1*^{-/-}). (A) Repräsentative Autoradiogramme der *in situ*-Hybridisierung für *mCry2*- und *mPer2*-mRNA in der PT von WT und *MT1*^{-/-} Mäusen am frühen (ZT02) und am späten Tag (ZT10). Repräsentative Mikrophotographien der mCRY2- und mPER2-Immunoreaktion (IR) in der PT von WT- und *MT1*^{-/-} Mäusen am späten Tag (ZT08). (B) Quantitative Analyse der optischen Dichte (O.D.) der *in situ*-Hybridisierung für *mCry2*- und *mPer2*-mRNA (ungefüllte Symbole, gestrichelte Linien) und der IR für mCRY2 und mPER2 (gefüllte Symbole, durchgezogene Linien) in der PT des WT (obere Spalte) und des *MT1*^{-/-} (untere Spalte). Die Werte geben die mittlere O.D. \pm SEM von drei Tieren pro Zeitpunkt an. Die weißen und schwarzen Balken symbolisieren den Tag bzw. die Nacht. One-way ANOVA zeigt einen signifikanten Rhythmus für *mCry2* und *mPer2* ($p < 0.0001$) in der PT von WT und von *MT1*^{-/-}. mPER2-IR ist rhythmisch in der PT von WT ($p < 0.0001$) und signifikant reduziert in der PT von *MT1*^{-/-} ($p = 0.0387$) (nach von Gall et al., 2005 sowie Jilg et al., 2005).

ximum der negativen Regulatoren mPER1, mPER2 und mCRY1. Diese zeitliche Abfolge ist ähnlich wie im SCN (Shearman et al., 2000a). Daher lässt sich vermuten, dass die Expression von *Bmal1* in der PT, ähnlich wie im SCN, durch REV-ERB α und ROR α (Preitner et al., 2002; Ueda

et al., 2002; Sato et al., 2004; Akashi und Takumi 2005) reguliert wird. Tatsächlich kann *Rev-Erb α* -mRNA in der PT von Hamster und Schaf nachgewiesen werden (Johnston et al., 2005; Lincoln et al., 2005). Ähnlich wie im SCN (Shearman et al., 2000b; Maywood et al., 2003;

von Gall et al., 2003) gibt es auch in der PT keinen deutlichen circadianen Rhythmus von BMAL1- oder CLOCK-Protein (Jilg et al., 2005). Lediglich die Anwesenheit des negativen Regulatorkomplexes bestehend aus mPER1, mPER2 und mCRY1 ist ausschlaggebend für den Rhythmus der uhrenabhängigen Genexpression.

Die verminderte Expression von *mPer1*, *mCry1*, *Clock* und *Bmal1* in der PT von *MT1^{-/-}* Mäusen führt, wie erwartet, auch zu einer deutlichen Reduktion des Proteingehaltes von mPER1, mCRY1, CLOCK und BMAL1 (Abb. 3 und 4; von Gall et al., 2002b; Jilg et al., 2005).

Die geringe Expression von *Clock* und *Bmal1* in der PT von *MT1^{-/-}* Mäusen (Abb. 4) ist möglicherweise ein sekundäres Phänomen, was auf den reduzierten Proteingehalt von mPER1, mPER2 und mCRY1 in der PT dieser Mäuse zurückzuführen ist. Da die mPERs und mCRY1 die *Rev-Erb α* -Expression hemmen und REV-ERB α wiederum ein Inhibitor der Expression von *Clock* und *Bmal1* ist (Preitner et al., 2002), könnte die Reduktion des negativen PER:CRY-Regulatorkomplexes zu einer Desinhibition der *Rev-Erb α* -Expression und dadurch zu einer verstärkten Hemmung der *Clock*- und *Bmal1*-Expression führen.

Interessanterweise ist die Expression von *mPer2* und *mCry2* in der PT von *MT1^{-/-}*-Mäusen nicht beeinträchtigt (Abb. 5). Daraus kann man zum einen folgern, dass die Expression dieser Gene unabhängig von einem rhythmischen, MT1-vermittelten Melatoninsignal abläuft. Zum anderen kann man daraus ableiten, dass die geringe Menge von CLOCK und BMAL1 in der PT der *MT1^{-/-}*-Maus ausreicht, die Expression von *mPer2* und *mCry2* anzutreiben, möglicherweise unter Beteiligung anderer transkriptioneller Aktivatoren wie HIF1 α und ARNT (Yoo et al., 2005).

Obwohl die Expression von *mPer2* unabhängig von einem rhythmischen Melatoninsignal ist, ist der mPER2-Proteingehalt in der PT von *MT1^{-/-}*-Mäusen gegenüber dem Wildtyp deutlich reduziert (Abb. 5; Jilg et al., 2005). Eine ähnliche Situation findet sich im SCN von mPER1- oder mCRY1-defizienten Mäusen. In mPER1-defizienten Mäusen beobachtet man eine Reduktion des mCRY1- und des mPER2-Proteingehaltes (Bae et al., 2001), in mCRY1-defizienten Mäusen eine Reduktion des mPER1- und des mPER2-Proteingehaltes (Shearman et al., 2000a), obwohl die jeweiligen mRNA-Mengen unbeeinflusst sind. Offenbar benötigt mPER2 auch in der PT die Interaktionspartner mPER1 und mCRY1 für die nukleäre Translokation bzw. für die Stabilität im Zellkern (Miyazaki et al., 2001).

Im Gegensatz zu mPER1, mPER2 und mCRY1 zeigt das mCRY2-Protein keinen Rhythmus in der PT (Abb. 5). Möglicherweise ist mCRY2 in der PT, anders als im SCN (Kume et al., 1999), nicht am negativen Regulatorkomplex beteiligt. Dafür spricht auch, dass der mCRY2 Proteingehalt in der PT von *MT1^{-/-}*-Mäusen nicht beeinträchtigt ist.

Zusammenfassung und Ausblick

Im Gegensatz zum zentralen Oszillator im SCN ist die rhythmische Expression von Uhrengenen in peripheren Oszillatoren abhängig von einem rhythmischen endokrinen und/oder neuronalen Signal. Interessanterweise gibt es gewebsspezifische Unterschiede, wie stark ein peripherer Oszillator von einem endogenen Faktor abhängt, d. h. wie schnell er in Abwesenheit dieses Faktors ausschwingt (Yoo et al., 2004). So weist z. B. die Leber einen sehr stabilen Rhythmus der *mPer2*-Expression *in vitro* auf (Yoo et al., 2004). Im Gegensatz dazu schwingt der Rhythmus der *mPer2*-Expression in anderen Geweben, wie z. B. der Lunge, der Cornea und der Niere, *in vitro* relativ schnell aus (Yoo et al., 2004). Diese stark abhängigen Oszillatoren benötigen offensichtlich rhythmische Signale, um die Uhrengenenexpression wieder anzustoßen. Die Natur dieser Taktgeber ist bislang in den meisten Fällen noch unbekannt. Einige periphere Oszillatoren, wie beispielsweise in Leber und Niere, scheinen hauptsächlich von endokrinen Faktoren abzuhängen, während andere in Herz, Milz und Skelettmuskel ein neuronales Signal brauchen (Guo et al., 2005). Prinzipiell dienen offenbar stets mehrere Signale als Taktgeber in einem Gewebe; z. B. wird die circadiane Uhrengenenexpression in der Leber durch Kortisol und die Fütterungszeiten (Balsalobre et al., 2000; Stokkan et al., 2001), aber auch durch neuronale Signale (Terazono et al., 2003) synchronisiert.

Zahlreiche Untersuchungen an unterschiedlichen Spezies belegen, dass Melatonin der entscheidende Taktgeber für die PT ist (Messenger et al., 1999, 2000, 2001; von Gall et al., 2002, 2005; Dardente et al., 2003; Jilg et al., 2005; Johnston et al., 2005; Lincoln et al., 2005). Ohne ein kontinuierliches, rhythmisches Melatoninsignal kommt die Uhrengenenexpression in diesem stark abhängigen peripheren Oszillator sofort zum Erliegen (Messenger et al., 2001; von Gall et al., 2002). Die Analyse der Regulation von Uhrengenenproteinen in der PT durch Melatonin liefert wichtige Hinweise für das Verständnis dafür, wie ein rhythmisches endokrines Signal in peripheren Geweben entschlüsselt und interpretiert wird. Tatsächlich findet sich der MT1-Rezeptor in vielen peripheren Geweben, wie beispielsweise pankreatischer β -Zelle, Herz, Lunge und Niere (Peschke et al., 2000, 2002; Naji et al., 2004; Sallinen et al., 2005). Melatonin stellt mit großer Wahrscheinlichkeit einen wichtigen Botenstoff dar, der gemeinsam mit anderen Taktgebern sowohl die Phasenlage als auch die Länge der Nacht an periphere Oszillatoren vermittelt. Melatonin kann entweder synergistisch mit, bzw. antagonistisch zu anderen rhythmischen humoralen Faktoren wie Kortisol (Balsalobre et al., 2000) wirken. Alternativ dazu kann Melatonin durch die Sensitivierung von Rezeptoren den Schwellenwert für tonische humorale Faktoren, ähnlich wie für Adenosin gezeigt, verändern und dadurch eine rhythmische Reizantwort hervorrufen.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die PT ein exzellentes Modellsystem für die Analyse der Regulation von uhrenabhängiger Genexpression in peripheren Oszillatoren durch endokrine Faktoren darstellt. Die hier gewonnenen Erkenntnisse könnten u. a. einen wichtigen Beitrag für das Verständnis von molekularen Grundlagen der Chronopharmakologie liefern.

Danksagung

Ich danke herzlich den jetzigen und ehemaligen Mitgliedern des Institutes für Anatomie II, die durch ihre Arbeit zu den hier dargestellten Befunden beigetragen haben. Mein besonderer Dank gilt Frau A. von Gall für ihre technische Unterstützung.

Literatur

- Akashi M, Takumi T. 2005. The orphan nuclear receptor ROR-alpha regulates circadian transcription of the mammalian core-clock *Bmal1*. *Nature Struct Mol Biol* 12:441–448.
- Bae K, Jin X, Maywood ES, Hastings MH, Reppert SM, Weaver DR. 2001. Differential functions of *mPer1*, *mPer2*, and *mPer3* in the SCN circadian clock. *Neuron* 30:525–536.
- Balsalobre A, Brown A, Marcacci L, Tronche F, Kellendonk C, Reichardt HM, Schutz G, Schibler U. 2000. Resetting of circadian time in peripheral tissues by glucocorticoid signaling. *Science* 289:2344–2347.
- Balsalobre A, Damiola F, Schibler U. 1998. A serum shock induces circadian gene expression in mammalian tissue culture cells. *Cell* 93:929–937.
- Bronson FH. 1979. The reproductive ecology of the house mouse. *Q Rev Biol* 54:265–299.
- Brydon L, Petit L, Delagrèze P, Strosberg AD, Jockers R. 2001. Functional expression of MT2 (*Mel1b*) melatonin receptors in human PAZ6 adipocytes. *Endocrinology* 10:4264–4271.
- Brydon L, Roka F, Petit L, de Coppet P, Tissot M, Barrett P, Morgan PJ, Nanoff C, Strosberg AD, Jockers R. 1999. Dual signaling of human *Mel1a* melatonin receptors via *G(i2)*, *G(i3)*, and *G(q11)* proteins. *Mol Endocrinol* 12:2025–2038.
- Carlson L, Weaver DR, Reppert SM. 1991. Melatonin receptors and signal transduction during development in Siberian hamsters (*Phodopus sungorus*). *Brain Res Dev Brain Res* 1:83–88.
- Clemens JW, Jarzynka MJ, Witt-Enderby PA. 2001. Down-regulation of *mt1* melatonin receptors in rat ovary following estrogen exposure. *Life Sci* 1:27–35.
- Dardente H, Menet JS, Poirel VJ, Streicher D, Gauer F, Vivien-Roels B, Klosen P, Pevet P, Masson-Pevet M. 2003. Melatonin induces *Cry1* expression in the pars tuberalis of the rat. *Brain Res Mol Brain Res* 114:101–106.
- Duffield GE. 2003. DNA microarray analyses of circadian timing: the genomic basis of biological time. *J Neuroendocrinol* 15:991–1002.
- von Gall C. 2003. Rhythmic clock gene expression in the hypothyseal pars tuberalis is regulated by melatonin. *Ann Anat* 4:301–302.
- von Gall C, Duffield GE, Hastings MH, Kopp MD, Dehghani F, Korf HW, Stehle JH. 1998. CREB in the mouse SCN: a molecular interface coding the phase-adjusting stimuli light, glutamate, PACAP, and melatonin for clockwork access. *J Neurosci* 24:10389–10397.
- von Gall C, Garabette ML, Kell CA, Frenzel S, Dehghani F, Schumm-Draeger PM, Weaver DR, Korf HW, Hastings MH, Stehle JH. 2002. Rhythmic gene expression in pituitary depends on heterologous sensitization by the neurohormone melatonin. *Nat Neurosci* 3:234–238.
- von Gall C, Noton ES, Lee C, Weaver DR. 2003. Light does not degrade the constitutively expressed *BMAL1* protein in the mouse suprachiasmatic nucleus. *Eur J Neurosci* 18:125–133.
- von Gall C, Weaver DR, Moek J, Jilg A, Stehle JH, Korf HW. 2005. Melatonin plays a crucial role in the regulation of rhythmic clock gene expression in the mouse pars tuberalis. *Ann N Y Acad Sci* 1040:508–511.
- Godson C, Reppert SM. 1997. The *Mel1a* melatonin receptor is coupled to parallel signal transduction pathways. *Endocrinology* 1:397–404.
- Graham ES, Webster CA, Hazlerigg DG, Morgan PJ. 2002. Evidence for the biosynthesis of a prolactin-releasing factor from the ovine pars tuberalis, which is distinct from thyrotropin-releasing hormone. *J Neuroendocrinol* 12:945–954.
- Guo H, Brewer JM, Champhekar A, Harris RB, Bittman EL. 2005. Differential control of peripheral circadian rhythms by suprachiasmatic-dependent neural signals. *Proc Natl Acad Sci USA* 102:3111–3116.
- Hastings MH, Field MD, Maywood ES, Weaver DR, Reppert SM. 1999. Differential regulation of *mPER1* and *mTIM* proteins in the mouse suprachiasmatic nuclei: new insights into a core clock mechanism. *J Neurosci* 19:RC11.
- Hazlerigg DG, Gonzalez-Brito A, Lawson W, Hastings MH, Morgan PJ. 1993. Prolonged exposure to melatonin leads to time-dependent sensitization of adenylate cyclase and down-regulates melatonin receptors in pars tuberalis cells from ovine pituitary. *Endocrinology* 1:285–292.
- Jilg A, Moek J, Weaver DR, Korf HW, Stehle JH, von Gall C. 2005. Rhythms in clock proteins in the mouse pars tuberalis depend on *MT1* melatonin receptor signalling. *Eur J Neurosci* 11:2845–2854.
- Johnston JD, Ebling FJ, Hazlerigg DG. 2005. Photoperiod regulates multiple gene expression in the suprachiasmatic nuclei and pars tuberalis of the Siberian hamster (*Phodopus sungorus*). *Eur J Neurosci* 21:2967–2974.
- Kopp M, Meissl H, Korf HW. 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* 3:145–148.
- Kopp MD, Schomerus C, Dehghani F, Korf HW, Meissl H. 1999. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide and melatonin in the suprachiasmatic nucleus: effects on the calcium signal transduction cascade. *J Neurosci* 1:206–219.
- Kume K, Zylka MJ, Sriram S, Shearman LP, Weaver DR, Jin X, Maywood ES, Hastings MH, Reppert SM. 1999. *mCRY1* and *mCRY2* are essential components of the negative limb of the circadian clock feedback loop. *Cell* 98:193–205.
- Lee C, Etchegaray JP, Cagampang FR, Loudon AS, Reppert SM. 2001. Posttranslational mechanisms regulate the mammalian circadian clock. *Cell* 107:855–867.
- Lincoln GA, Johnston JD, Andersson H, Wagner G, Hazlerigg DG. 2005. Photorefractoriness in mammals: dissociating a seasonal timer from the circadian-based photoperiod response. *Endocrinology* 146:3782–3790.

- Liu C, Weaver DR, Jin X, Shearman LP, Pieschl RL, Gribkoff VK, Reppert SM. 1997. Molecular dissection of two distinct actions of melatonin on the suprachiasmatic circadian clock. *Neuron* 19:91–102.
- Malpaux B, Migaud M, Tricoire H, Chemineau P. 2001. Biology of mammalian photoperiodism and the critical role of the pineal gland and melatonin. *J Biol Rhythms* 4:336–347.
- Maywood ES, O'Brien JA, Hastings MH. 2003. Expression of mCLOCK and other circadian clock-relevant proteins in the mouse suprachiasmatic nucleus. *J Neuroendocrinol* 15:329–334.
- McNulty S, Ross AW, Barrett P, Hastings MH, Morgan PJ. 1994. Melatonin regulates the phosphorylation of CREB in ovine pars tuberalis. *J Neuroendocrinol* 5:523–532.
- Messenger S, Garabette ML, Hastings MH, Hazlerigg DG. 2001. Tissue-specific abolition of Per1 expression in the pars tuberalis by pinealectomy in the Syrian hamster. *Neuroreport* 12:579–582.
- Messenger S, Hazlerigg DG, Mercer JG, Morgan PJ. 2000. Photoperiod differentially regulates the expression of Per1 and ICER in the pars tuberalis and the suprachiasmatic nucleus of the Siberian hamster. *Eur J Neurosci* 12:2865–2870.
- Messenger S, Ross AW, Barrett P, Morgan PJ. 1999. Decoding photoperiodic time through Per1 and ICER gene amplitude. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:9938–9943.
- Miyazaki K, Mesaki M, Ishida N. 2001. Nuclear entry mechanism of rat PER2 (rPER2): role of rPER2 in nuclear localization of CRY protein. *Mol Cell Biol* 21:6651–6659.
- Morgan PJ, Barrett P, Howell HE, Helliwell R. 1994. Melatonin receptors: localization, molecular pharmacology and physiological significance. *Neurochem Int* 24:101–146.
- Morgan PJ, Hastings MH, Thompson M, Barrett P, Lawson W, Davidson G. 1991. Intracellular signalling in the ovine pars tuberalis: an investigation using aluminium fluoride and melatonin. *J Mol Endocrinol* 2:137–144.
- Morgan PJ, Webster CA, Mercer JG, Ross AW, Hazlerigg DG, MacLean A, Barrett P. 1996. The ovine pars tuberalis secretes a factor(s) that regulates gene expression in both lactotropic and nonlactotropic pituitary cells. *Endocrinology* 9:4018–4026.
- Naji L, Carrillo-Vico A, Guerrero JM, Calvo JR. 2004. Expression of membrane and nuclear melatonin receptors in mouse peripheral organs. *Life Sci* 74:2227–2236.
- Nuesslein-Hildesheim B, O'Brien JA, Ebling FJ, Maywood ES, Hastings MH. 2000. The circadian cycle of mPER clock gene products in the suprachiasmatic nucleus of the siberian hamster encodes both daily and seasonal time. *Eur J Neurosci* 12:2856–2864.
- Peschke E, Fauteck JD, Musshoff U, Schmidt F, Beckmann A, Peschke D. 2000. Evidence for a melatonin receptor within pancreatic islets of neonate rats: functional, autoradiographic, and molecular investigations. *J Pineal Res* 28:156–164.
- Peschke E, Mühlbauer E, Mußhoff U, Csernus V, Chankiewicz E, Peschke D. 2002. Receptor (MT1) mediated influence of melatonin on cAMP concentration and insulin secretion of rat insulinoma cells INS-1. *J Pineal Res* 33:63–71.
- Preitner N, Damiola F, Lopez-Molina L, Zakany J, Duboule D, Albrecht U, Schibler U. 2002. The orphan nuclear receptor REV-ERB α controls circadian transcription within the positive limb of the mammalian circadian oscillator. *Cell* 110:251–260.
- Reppert SM, Godson C, Mahle CD, Weaver DR, Slangenaupt SA, Gusella JF. 1995. Molecular characterization of a second melatonin receptor expressed in human retina and brain: the Mel1b melatonin receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 19:8734–8738.
- Reppert SM, Weaver DR. 2002. Coordination of circadian timing in mammals. *Nature* 418:935–941.
- Roca AL, Godson C, Weaver DR, Reppert SM. 1997. Structure, characterization, and expression of the gene encoding the mouse Mel1a melatonin receptor. *Endocrinology* 138:3469–3477.
- Ross AW, Barrett P, Mercer JG, Morgan PJ. 1996. Melatonin suppresses the induction of AP-1 transcription factor components in the pars tuberalis of the pituitary. *Mol Cell Endocrinol* 1:71–80.
- Sallinen P, Saarela S, Ilves M, Vakkuri O, Leppaluoto J. 2005. The expression of MT1 and MT2 melatonin receptor mRNA in several rat tissues. *Life Sci* 76:1123–1134.
- Sato TK, Panda S, Miraglia LJ, Reyes TM, Rudic RD, McNamara P, Naik KA, FitzGerald GA, Kay SA, Hogenesch JB. 2004. A functional genomics strategy reveals Rora as a component of the mammalian circadian clock. *Neuron* 43:527–537.
- Scher J, Wankiewicz E, Brown GM, Fujieda H. 2002. MT(1) melatonin receptor in the human retina: expression and localization. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 3:889–897.
- Schwartz WJ, de la Iglesia HO, Zlomanczuk P, Illnerova H. 2001. Encoding le quattro stagioni within the mammalian brain: photoperiodic orchestration through the suprachiasmatic nucleus. *J Biol Rhythms* 4:302–311.
- Shearman LP, Jin X, Lee C, Reppert SM, Weaver DR. 2000b. Targeted disruption of the mPer3 gene: subtle effects on circadian clock function. *Mol Cell Biol* 20:6269–6275.
- Shearman LP, Sriram S, Weaver DR, Maywood ES, Chaves I, Zheng B, Kume K, Lee CC, van der Horst GT, Hastings MH, Reppert SM. 2000a. Interacting molecular loops in the mammalian circadian clock. *Science* 288:1013–1019.
- Shiu SY, Li L, Xu JN, Pang CS, Wong JT, Pang SF. 1999. Melatonin-induced inhibition of proliferation and G1/S cell cycle transition delay of human choriocarcinoma JAr cells: possible involvement of MT2 (MEL1B) receptor. *J Pineal Res* 3:183–192.
- Stokkan KA, Yamazaki S, Tei H, Sakaki Y, Menaker M. 2001. Entrainment of the circadian clock in the liver by feeding. *Science* 291:490–493.
- Stehle JH, Rivkees SA, Lee JJ, Weaver DR, Deeds JD, Reppert SM. 1992. Molecular cloning and expression of the cDNA for a novel A2-adenosine receptor subtype. *Mol Endocrinol* 6:384–393.
- Stehle JH, von Gall C, Schomerus C, Korf HW. 2001. Of rodents and ungulates and melatonin: creating a uniform code for darkness by different signaling mechanisms. *J Biol Rhythms* 4:312–325.
- Sun ZS, Albrecht U, Zhuchenko O, Bailey J, Eichele G, Lee CC. 1997. RIGUI, a putative mammalian ortholog of the *Drosophila* period gene. *Cell* 90:1003–1011.
- Terazono H, Mutoh T, Yamaguchi S, Kobayashi M, Akiyama M, Udo R, Ohdo S, Okamura H, Shibata S. 2003. Adrenergic regulation of clock gene expression in mouse liver. *Proc Natl Acad Sci USA* 100:6795–6800.
- Ueda HR, Chen W, Adachi A, Wakamatsu H, Hayashi S, Takasugi T, Nagano M, Nakahama K, Suzuki Y, Sugano S, Iino M, Shigeyoshi Y, Hashimoto S. 2002. A transcription factor response element for gene expression during circadian night. *Nature* 418:534–539.

- Wiechmann AF, Campbell LD, Defoe DM. 1999. Melatonin receptor RNA expression in *Xenopus* retina. *Brain Res Mol Brain Res* 2:297–303.
- Wittkowski W, Bockmann J, Kreutz MR, Bockers TM. 1999. Cell and molecular biology of the pars tuberalis of the pituitary. *Int Rev Cytol* 185:157–94.
- Yagita K, Yamaguchi S, Tamanini F, van Der Horst GT, Hoeijmakers JH, Yasui A, Loros JJ, Dunlap JC, Okamura H. 2000. Dimerization and nuclear entry of mPER proteins in mammalian cells. *Genes Dev* 14:1353–1363.
- Yellon SM, Tran LT. 2002. Photoperiod, reproduction, and immunity in select strains of inbred mice. *J Biol Rhythms* 17:65–75.
- Yoo SH, Ko CH, Lowrey PL, Buhr ED, Song EJ, Chang S, Yoo OJ, Yamazaki S, Lee C, Takahashi JS. 2005. A noncanonical E-box enhancer drives mouse *Period2* circadian oscillations in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 102:2608–2613.
- Yoo SH, Yamazaki S, Lowrey PL, Shimomura K, Ko CH, Buhr ED, Sieppka SM, Hong HK, Oh WJ, Yoo OJ, Menaker M, Takahashi JS. 2004. *Period2*: luciferase real-time reporting of circadian dynamics reveals persistent circadian oscillations in mouse peripheral tissues. *Proc Natl Acad Sci USA* 101:5339–5346.
- Zhao H, Pang SF, Poon AM. 2002. *mt(1)* Receptor-mediated antiproliferative effects of melatonin on the rat uterine antimesometrial stromal cells. *Mol Reprod Dev* 2:192–199.