

Aus dem
Zentrum für Innere Medizin
des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf
Martinistrasse 52, 20246 Hamburg

Direktor:
Prof. Dr. R. A. Stahl

**Bedeutung der transkriptionellen Regulationsmechanismen
der circadianen Uhr für die Regulation der Genexpression des
mGnRH-Rezeptor-Genes *in vitro***

Dissertation

Zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

dem Fachbereich Medizin der Universität Hamburg

vorgelegt von

Uta Wildemann
aus Uelzen

Hamburg, 2005

Angenommen vom Fachbereich Medizin
der Universität Hamburg am: 21.06.2006

Veröffentlicht mit Genehmigung des Fachbereichs
Medizin der Universität Hamburg

Vorsitzender des Prüfungsausschusses: Prof. Dr. C.M. Bamberger

2. Gutachter: Prof. Dr. M. Beil

3. Gutachterin: Prof. Dr. G. Rune

Abkürzungen und Begriffserklärungen

Abb.	Abbildung
ATP	Adenosintriphosphat
Aqua bidest.	doppelt destilliertes Wasser
bp	Basenpaar
BSA	Bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
c	Konzentration
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
Clock	Uhr
Clock-controlled-gene	durch den circadianen Uhrenmechanismus kontrollierte Gene
consense	übereinstimmend
dCLOCK	Drosophila melanogaster CLOCK
dCYCLE	Drosophila melanogaster CYCLE
d.h.	das heisst
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
dNTP	desoxy Nukleotidtriphosphat
Down-Regulation	Herunter-Regulation
DTT	Dithiothreit
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
Enhancer	Verstärker
Feedback loop	Rückkopplungsschleife
Forward	vorwärts
ggf.	gegebenenfalls
HCl	Salzsäure
IPTG	Isopropyl-beta-D-thiogalactopyranosid
kb	kilo Basen
KCL ₂	Kalium-Chlorid
L	Liter
LH-Peak	Lutinisierendes-Hormon-Spitzenanstieg
Loop	Schleife
M	Molar
Mammalia	Säugetiere
Master-Clock	Haupt-Uhr
max.	maximal
mg	Milligramm
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
m	murin
Mg ²⁺	Magnesium
MgCl ²	Magnesium-Chlorid
mM	millimolar
mut	mutiert
ng	Nanogramm
nM	nanomolar
NaCl	Natrium-Chlorid
NP-40	Nonidet P40
o.g.	oben genannt
oscillator	Oszillator
orphan	Waise
Output	Ausbringung, Leistung
PBS-Puffer	Phosphate Buffered Saline-Puffer
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
pmol	picomolar
PMSF	Phenyl-Methyl-Sulfonyl-Fluorid

Abkürzungen und Begriffserklärungen

Remodelling	Umformung
reverse	rückwärts
RLA	Relative Luciferase Aktivität
SDS	sodium dodecylsulfate polyacrylamid
Slave	Sklave
sog.	sogenannt
steady-state	Dauerzustand
TBE-Puffer	Tris-Borsäure-EDTA-Puffer
TBS-Puffer	Tris Buffered Saline-Puffer
TGS-Puffer	SDS-Tris-Glycin-Puffer
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
TEMED	N,N,N',N'-Tetrametylendiamin
Tween 20	Polyoxyethylensorbitan Monolaurate
U/ml	Units pro Milliliter
UpM	Umdrehungen pro Minute
X-Gal	5-Bromo-4-chloro-3-indoly β -D-galactosid
z.B.	zum Beispiel

1	Einleitung	
1.1	Das Gonadotropin-Releasing Hormon.....	1
1.2	Der GnRH-Rezeptor.....	3
1.3	Regulation der Genexpression.....	7
1.4	Die Zelllinie α T3-1.....	9
1.5	Das circadiane System.....	10
1.6	Fragestellung.....	22
2	Material und Methoden	
2.1	Materialien.....	23
2.2	Methoden	
2.2.1	Konstruktion des mGnRH-Rezeptor Luciferase Reporter Vektors (mGnRH-Rluc).....	25
2.2.2	Erzeugung der Mutationen in mGnRH-Rluc	33
2.2.3	Interner Kontrollvektor.....	40
2.2.4	Positiver Kontrollvektor.....	40
2.2.5	Expressionsvektoren.....	41
2.2.6	Zellkultur.....	41
2.2.7	Transfektion.....	42
2.2.8	Luciferase-Assay.....	45
2.2.9	Beta-Gal-Assay.....	46
2.2.10	Western Blot	47
3	Ergebnisse	
3.1	Der Promotor des mGnRH-Rezeptor-Genes.....	54
3.2	Überprüfung der Luciferase-Reporter-Konstrukte.....	54
3.3	Auswahl und Charakterisierung der Zelllinie α T3-1.....	57
3.4	<i>In vitro</i> -Studien	60
4	Diskussion	65
5	Zusammenfassung	79
6	Literaturverzeichnis	80
7	Danksagung	92
8	Lebenslauf	93
9	Eidesstattliche Versicherung	94

1.1 Das Gonadotropin-Releasing Hormon

Das Gonadotropin-Releasing-Hormon (GnRH oder Gonadolibrin) ist ein Dekapeptid, das erstmals 1971 von Schally und Mitarbeitern beschrieben wurde (Schally et al., 1971). In den folgenden Jahren wurde sehr viel über die Physiologie des Hormons bekannt und zahlreiche Untersuchungen machten die Schlüsselrolle, die GnRH in der Reproduktion der Säugetiere spielt, deutlich. Das Gonadotropin-Releasing-Hormon ist das erste „klassische“ hypothalamische Hormon, welches in breitem Feld in der klinischen Praxis eingesetzt wurde. Mittlerweile existieren zahlreiche synthetisch hergestellte GnRH-Agonisten sowie GnRH-Antagonisten, die erfolgreich in Forschung und Therapie angewendet werden. Ihr Einsatz spielt eine wichtige Rolle in der Therapie der Infertilität insbesondere bei hypogonadotroper Anovulation. Aber auch in der Behandlung onkologischer Erkrankungen, insbesondere hormonsensibler Prostata-, Ovarial- und Mammacarcinome stellen GnRH-Agonisten- bzw. Antagonisten eine effektive Therapiemöglichkeit dar.

Das Gonadotropin-Releasing Hormon ist ein hydrophiles Neurohormon, welches hauptsächlich innerhalb des Hypothalamus gebildet wird. Die Gesamtanzahl der GnRH-Neuronen wurde auf circa 2000-3000 Neurone geschätzt. Diese Neuronen sind in keinem klar abgrenzbaren Kerngebiet lokalisiert, sondern erscheinen vielmehr als ein Zellkontinuum, das vom Bereich des olfaktorischen Tuberkel zum hinteren Hypothalamus verläuft (Martinez de la Escalera et al., 2001). Die Axone der meisten GnRH-Neuronen enden in einem portalen Venenplexus im Bereich der Eminentia mediana. (Schwanzel-Fukuda et al., 1996). Mit Hilfe immunhistochemischer Untersuchungen und in situ Hybridizationen wurde das GnRH-Protein sowie seine mRNA auch in anderen Geweben identifiziert. GnRH wird in den Gonaden und in der Plazenta von verschiedenen Tierarten, einschließlich des Menschen synthetisiert, scheint aber in diesen Organen keine definierte physiologische Aufgabe zu haben (Irvine et al., 1993; Tan et al., 1982). GnRH wird ebenso in einigen Tumorzellen wie z.B. Brust- oder (Seppala et al., 1980) Pankreastumorzellen (Szende et al., 1991) gebildet. Auch in der Hypophyse selbst erfolgt eine Produktion von GnRH und wirkt hier vermutlich bei der lokalen Kontrolle der Gonadotropin-Freisetzung mit (Pagesy et al., 1992). Zudem wurde GnRH-mRNA innerhalb von Lymphozyten sowie des Thymus gefunden (Emanuele et al., 1990).

Als Proteohormon wird GnRH innerhalb der Zelle als ein größeres Prohormon gebildet. Vor der Sekretion wird es durch Endopeptidasen in das wirksame Neuropeptid, sowie ein 59 Aminosäuren großes Gonadotropin-Releasing Hormon-assoziiertes Peptid (GAP) gespalten (Wierman et al., 1996). GnRH wird über das hypothalamo-hypophysäre Portalsystem vom Hypothalamus zur Hypophyse transportiert (Mol et al., 1997). Das Hormon GnRH bindet an spezifische Rezeptoren seines Erfolgsorgans, der Adenohypophyse (Neumann et al., 1992).

Hypothalamisch-Hypophysäre Funktionsachse des GnRH

Die GnRH-produzierenden Neurone, erhalten einen komplexen neuralen Input von einer Vielzahl von chemischen Botenstoffen, wie Neurotransmittern und anderen Neurohormonen. Durch den Einfluss von humoralen und neuralen Stimuli werden die Neurohormone ins hypothalamo-hypophysäre Portalsystem sezerniert und gelangen auf diese Weise in die Adenohypophyse (Mol et al., 1997). Die normale Fortpflanzung ist abhängig von der pulsatilem Freisetzung physiologischer Konzentrationen von GnRH aus dem Hypothalamus, unter dessen Einfluß in den basophilen Zellen der Adenohypophyse zwei Gonadotropine gebildet und freigesetzt werden: das Luteinisierende Hormon (LH) und das Follikelstimulierende Hormon (FSH). Diese beiden Gonadotropine gelangen über den Blutkreislauf in die Gonaden. Im weiblichen Organismus wirken LH und FSH stimulierend auf die Steroidhormonsynthese innerhalb der verschiedenen Zellkompartimente des Follikels. LH kontrolliert innerhalb der Theka- und Granulosazellen die Synthese von Progesteron aus Cholesterin, sowie -beschränkt auf die Thekazellen- die Synthese von Androgenen. Die Granulosazellen verwenden die Androgene, um unter dem FSH-Einfluss Oestrogene zu bilden. Einem Anstieg der Gonadotropinkonzentration im Plasma folgt deshalb eine Erhöhung des Östrogenspiegels im Blut (Allen et al., 1996; Moll et al., 1997). Die pulsatile LH-Sekretion vor dem präovulatorischen LH-Peak fördert die Reifung des antralen Follikels zum sprungrreifen Follikel. Der präovulatorische LH-Peak ist der ovulationsauslösende Faktor des Zyklus. Beim männlichen Organismus stimuliert LH, auch als ICSH (interstitial cell stimulating hormone) bezeichnet, die Synthese und Freisetzung von Testosteron und Dihydrotestosteron in den Leydigischen Zwischenzellen des Hodens. Das FSH wirkt zusammen mit Testosteron auf die Hodenkanälchen und fördert dort die Spermatogenese (Allen et al., 1996). GnRH beeinflusst zudem autoregulatorisch die Synthese seines eigenen Rezeptors. Morphometrische Analysen zeigen außerdem eine trophische Wirkung des Hormons. Unter dem Einfluss von GnRH kommt es neben einer geringen Zunahme der Anzahl der gonadotropinbildenden Zellen zu einer deutlichen Zunahme des Volumens und der Zelloberfläche (Clayton et al., 1981a).

Kontrolle der Sekretion der Gonadotropine

Das Gonadotropin-Releasing Hormon ist essentiell für eine normale Funktion der hypothalamisch-hypophysären Funktionsachse. Eine Unterbrechung der Hormonzufuhr bewirkt eine Abnahme der LH- und FSH-Sekretion, sowie eine Abnahme der mRNA-Level der α , LH- β und FSH- β Untereinheiten. Die GnRH-Sekretion erfolgt physiologischerweise pulstil in das portale System der Hypophyse. Das exakte Muster dieser Pulse ist entscheidend für die Regulation der Sekretion der Gonadotropine. (Mercer et al., 1984; Hamerik et al., 1986) Knobil beschrieb 1989 erstmals ein eigenständiges rhythmisches Verhalten des neuralen GnRH-Systems, welches als

Ursache für die Pulsatilität der Hormonsekretion gilt. Nach Unterbrechung der neuronalen Verbindungen zum mediobasalen Hypothalamus beim weiblichen Affen, zeigte dieser weiterhin eine normale Zyklusaktivität, so dass die Neuronen des Hypothalamus selber in der Lage zu sein scheinen eine Pulsatilität zu erzeugen (Knobil, 1989). Diese Vermutung konnte im Verlauf der Forschung durch Untersuchungen an hypothalamischen Zelllinien bestätigt werden. Diese immortalisierten GnRH-Neuronen sind ebenfalls in der Lage GnRH-Pulse freizusetzen, jedoch nur nach Zellkontakt mit Nachbarzellen. Solche Feststellungen legen die Vermutung nahe, daß auch GnRH-Neuronen in vivo ein Netzwerk bilden, das ihnen eine Synchronisation ihrer Hormonfreisetzung ermöglicht (Martinez de la Escalera et al., 1992).

Die Frage, wie genau es den Neuronen des medio-basalen Hypothalamus gelingt ihre Hormonsekretion zu synchronisieren, ist bislang ungeklärt. Diese Fähigkeit scheint durch Neuromediatoren oder direkte Zellkontakte vermittelt zu werden, wobei die Identität des primären Zeitgebers, der den Rhythmus der Pulse vorgibt, weiterhin unklar bleibt. Unklar ist, ob ein GnRH-Neuron die Rolle eines Schrittmachers innehat oder ob jedes Neuron selbst ein eigener Oszillator ist. Der intrinsische Rhythmus des GnRH-Zellsystems könnte natürlich auch einem übergeordneten Rhythmus, der an anderer Stelle generiert wird, untergeordnet sein. Der GnRH-Puls Generator kann durch extrinsische oder intrinsische Einwirkungen beeinflusst werden. Die Einnahme von Medikamenten wie Dopamin-Antagonisten (Metaclopramid), α_1 -adrenerge Blockern (Phentolamin) oder Opiaten führt zu einer Abnahme der Pulsfrequenz bei Rhesus-Affen (Kesner et al., 1986; Pau et al., 1989). Aber auch psychischer bzw. physischer Stress (Pirke et al., 1989) oder ausgeprägtes Fasten wie bei Patienten mit Anorexia nervosa (Steiner et al., 1987) haben einen negativen Einfluss auf die Aktivität der GnRH-Neuronen und somit auf die Fertilität. Die Sekretion von LH und FSH aus der Hypophyse ist ebenso abhängig von einem Zusammenspiel zwischen Ovarien und hypophysiotropem Hypothalamus. Der Feedback-Mechanismus der ovariellen Steroidhormone bei der Kontrolle der Adenohypophyse ist eines der zentralen Konzepte der Endokrinologie. (Hotchkiss und Knobil, 1996). Die Sekretion von GnRH und somit die Freisetzung der Gonadotropine wird zusätzlich von einer Vielzahl anderer Hormone und Neuromodulatoren, wie z.B. Serotonin, GABA, Substance P, Wachstumsfaktoren und gonadalen Peptiden, wie Activin und Inhibin, beeinflusst (Wierman et al., 1996).

1.2 Der GnRH-Rezeptor

G-Protein gekoppelte Rezeptoren

Der GnRH-Rezeptor gehört zu den G-Protein gekoppelten Rezeptoren (GPGRn), welche die größte Familie der Zelloberflächenrezeptoren bilden. Mehr als 1% aller Gene des menschlichen

Genoms kodieren für Rezeptoren dieser Familie. Die unterschiedlichen Mitglieder der Familie der GPGRs sind in der Lage mit einer Vielzahl verschiedener Liganden wie z.B. Peptide, biogene Amine und Glykoproteine zu interagieren. Trotz ihrer funktionellen Vielfalt besitzen alle GPGRs einen heptahelikalen Aufbau als gemeinsames strukturelles Grundprinzip. Dieser Aufbau ist durch sieben hydrophobe Helices mit einer Länge von ca. 20-25 Aminosäuren gekennzeichnet, die die Zellmembran als weitgehend α -helikale Strukturen durchspannen. Diese Transmembranhelices sind untereinander durch alternierend intra (i1-i3)-und extrazellulär (e1-e3) verlaufende Peptidschleifen verbunden. Der glykosilierte Aminoterminus befindet sich am ersten Transmembranhelix und liegt extrazellulär. Der zytoplasmatische Carboxyterminus befindet sich am siebten Helix und ist über eine Palmitoylgruppe in der Zellmembran verankert, so dass eine vierter intrazellulärer Loop entsteht (Baldwin, 1993; Schertler et al., 1993). Bei den meisten Mitgliedern der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren scheinen sowohl die Länge der sieben Transmembranhelices und der drei intrazellulären Schleifen, als auch die Anordnung bestimmter hochkonservierter Aminosäuren nahezu identisch zu sein. Variationen in diesen oder anderen Regionen könnten die Spezifität des Rezeptors für einen Liganden bzw. ein G-Protein reflektieren (Ballosteros et al., 2001). Nach vorherrschender Lehrmeinung induziert eine Agonistenbindung eine Konformationsänderung des Rezeptor, die auf einer relativen Bewegung der Transmembranhelices zueinander basiert. Diese Bewegung verursacht eine Veränderung der zytoplasmatischen Zelloberfläche des Rezeptors, wodurch, im inaktiven Zustand verdeckte, Bindungsstellen für heterotrimere G-Proteine exponiert werden (Gether und Kolbilka, 1998; Wonerow et al., 1998; Gershengorn und Osman, 2001).

Struktureller Aufbau des GnRH-Rezeptors

Im Jahre 1992 gelang erstmals die Klonierung des Gonadotropin-Releasing-Hormon Rezeptors, wodurch ein besseres Verständnis der Mechanismen, mit deren Hilfe GnRH die Fortpflanzung reguliert, möglich wurde. Tsutsumi und Kollegen benutzten *Xenopus* Oocyten als Expressionssystem und isolierten erfolgreich einen cDNA-Klon des GnRH-Rezeptors aus einer murinen gonadotropen Zelllinie (α T3-1) (Tsutsumi et al., 1992). Kakar und Kollegen isolierten im folgenden Jahr die cDNA des menschlichen GnRH-Rezeptors (Kakar et al., 1992; Chi et al., 1993), ebenso wie die der Ratte (Kakar et al., 1994), der Kuh (Kakar et al., 1993), des Schafes (Brooks et al., 1993) und des Schweines (Weesner und Matteri, 1994). Der humane GnRH-Rezeptor mit 328 Aminosäuren, sowie der murine GnRH-Rezeptor mit 327 Aminosäuren ist einer der kleinsten G-Protein-bindenden-Rezeptoren und gehört zur Unterfamilie der Rhodopsin-ähnlichen Rezeptoren. Die Aminosäuresequenz dieser Rezeptor-Subfamilie ist vermutlich innerhalb der Spezies der Säugetiere zu 85% identisch. Der GnRH-Rezeptor weist einige besondere Rezeptorcharakteristika auf (Chi et al., 1993). Das auffälligste Struktur-

merkmal ist, dass vollkommene Fehlen des funktionell bedeutsamen Carboxyterminus bei den GnRH-Rezeptoren der Säugetiere. Dieser zytoplasmatische C-Terminus bildet bei den meisten heptahelikalen Rezeptoren die vierte intrazelluläre Peptidschleife. Auf diesem Rezeptorabschnitt sind oftmals spezifische Phosphorylierungsstellen für G-Protein gekoppelte Rezeptorkinasen lokalisiert, die eine wichtige Rolle u.a. bei der Regulation der Rezeptorexpression sowie der Desensibilisierung des Rezeptors zu spielen scheinen (Heding et al., 1998; Willars et al., 1999). Außerdem bestehen ungewöhnliche Aminosäuresubstitutionen an, bei anderen G-Protein gekoppelten Rezeptoren, hochkonservierten Genloci. So findet man beim GnRH-Rezeptor die Modifikation einer üblichen DRY-Sequenz, welche als „Signatur-Sequenz“ bekannt ist, in eine DRS-Sequenz. Diese Veränderung scheint Einfluß auf das Bindungs- und Internalisierungsverhalten des Rezeptors zu haben (Arora et al., 1995).

Mit Hilfe von Southern Blot Analysen konnte der GnRH-Rezeptor beim Menschen in einem einzigen Bereich auf Chromosom 4 (4q13.1) lokalisiert werden, was für das Vorhandensein nur einer Kopie des Genes im humanen Genom spricht (Kakar und Neill, 1994). Die Struktur des humanen, murinen und bovinen GnRH-Rezeptor-Genes wurde von verschiedenen Arbeitsgruppen charakterisiert (Albarracin et al., 1994; Fan et al., 1995; Campion et al., 1996; Kakar, 1997). Ein Vergleich der genetischen Sequenz mit der cDNA offenbarte das Vorhandensein von zwei Introns und drei Exons in allen untersuchten Spezies. Das erste Intron hat im humanen Genom eine Größe von 4 kb, bei der Maus 15 kb und bei der Ratte 12 kb. Es ist in der Transmembrandomäne 4 lokalisiert, während sich das zweite Intron zwischen der Transmembrandomäne 5 und 6 befindet. Im menschlichen Genom kodiert Exon 1 für die untranslatierte 5'-Sequenz und Nukleotide + 1 bis + 522 im „open reading frame“; Exon 2 kodiert für die Nukleotide + 523 bis + 742 und Exon 3 für die Nukleotide + 743 bis + 983 und die nicht translatierte 3'-Sequenz. Das menschliche Exon 3 ist drei Nucleotide länger als bei Maus und Ratte, was eine zusätzliche Aminosäure (Lysin) im zweiten extrazellulären Loop zur Folge hat. Es besteht eine 42%-tige Sequenzhomologie unter den Genen des Menschen, der Maus, der Ratte und des Rindes für eine 900 Basenpaar große Region nach dem ATG-Codon (Campion et al., 1996). Ein signifikanter Unterschied im Genom der oben genannten vier Spezies ist die Lokalisation des Transkriptionsstartes. Reverse-Transkriptase-Primer-PCR und 5'-RACE-Analysen menschlicher RNA aus der Hypophyse zeigten das Vorkommen multipler Transkriptionsstartseiten in der 5'-flankierenden Region des Genes (Clay et al., 1995).

Vorkommen des GnRH-Rezeptors

Hauptort der Expression des GnRH-Rezeptor ist die Zellmembran der gonadotropinbildenden, basophilen Zellen der Adenohypophyse (Clayton et al., 1979). GnRH bindet hier sowohl an bihormonale als auch an monohormonale gonadotropinbildende Zellen (Naor et al., 1984). Es

finden sich zudem hochaffine GnRH-Rezeptoren in der Zellmembran der GnRH-Neurone selbst im Hypothalamus (Krsmanovic et al., 1993). Die humane Placenta exprimiert niedrig-affine GnRH-Rezeptoren, die sowohl mit Analoga von GnRH-Agonisten als auch Antagonisten interagieren (Currie et al., 1981). Eine Expression des GnRH-Rezeptors wurde insbesondere innerhalb neoplastischer Gewebe untersucht. Ein Vorkommen wird in Hypophysenadenomen (Snyder et al., 1985), humanen Brustkrebs- und Ovarialkrebszellen (Eidne et al., 1985; Pahwa et al., 1989), sowie innerhalb von Prostatacarcinomen und benignen Prostatahyperplasien (Fekete et al., 1989) beschrieben. Zudem wird der Rezeptor in einigen neuronalen Zelllinien exprimiert. Pamela Mellon und Kollegen etablierten die neuronalen Zelllinien GT1-1, GT1-3 und GT1-7 aus Tumorzellen weiblicher transgener Mäuse (Mellon et al., 1990). In α T3-1 Zellen, einer weiteren, ebenfalls von Pamela Mellon und Kollegen etablierten Zelllinie aus gonadotropen Hypophysenzellen der Maus, wird der GnRH-Rezeptor ebenfalls exprimiert (Windle et al., 1990).

Regulation der Expression des GnRH-Rezeptors auf der Zellmembranoberfläche

Die Regulation der Expression des GnRH-Rezeptors auf der Zelloberfläche spielt eine Schlüsselrolle bei der Kontrolle der reproduktiven Funktionen. Die Sekretion der Gonadotropine, LH und FSH, wird durch die phasische und pulsatile Sekretion von GnRH aus dem Hypothalamus, welches an spezifische GnRH-Rezeptoren in der Hypophyse bindet, bestimmt. Das Ausmaß der Expression des Rezeptors auf der Oberfläche der Neuronen der Adenohypophyse unterliegt einem ständigen Wechsel in Abhängigkeit zum reproduktiven Status des Individuums (Clayton et al., 1981). Im Östrogenzyklus der Ratte besteht z.B. eine zweifach höhere Expression an Rezeptor in der präovulatorischen Zyklusphase, gefolgt von einem Abfall der Rezeptordichte um den Zeitpunkt des LH-Peaks. Andererseits findet man einen Abfall der Rezeptordichte während der Laktation bzw. durch die Gabe von Prolaktin. Durch die Fähigkeit zur Auf- und Abregulation des Rezeptors kann somit die Funktion der Hypophyse moduliert werden. Hierbei scheint GnRH selbst eine wichtige Rolle zu spielen.

Der Verlust des Rezeptors auf der Zellmembranoberfläche entsteht durch eine Internalisierung des Rezeptor/Liganden-Komplexes durch Endocytose (Naor et al., 1981). Nach Aufnahme des Rezeptorkomplexes in die Zelle kommt es zum lysosomalen Abbau bzw. zu einer Wiederverwertung eines geringer Anteiles. Aufgrund der o.g. strukturellen Besonderheiten des GnRH-Rezeptors weist dieser im Vergleich zu anderen G-Protein-gekoppelten Rezeptoren außergewöhnlich langsame Internalisierungsraten auf und unterliegt keiner schnellen homologen Desensibilisierung (< 10 min) infolge einer Agonistenstimulation (Heding et al., 1998; Willars et al., 1999). Da nahezu alle GnRH-bildenden Zellen auch GnRH-Rezeptoren auf ihrer Zellmembranoberfläche exprimieren, verfügt das Hormon bzw. seine Agonisten über eine wichtige autoregulatorische Wirkungskomponente. Die Regulation des GnRH-Rezeptor Proteins

erfolgt unter anderem durch die Regulation der Genexpression des GnRH-Rezeptor-Genes. Das Level der GnRH-Rezeptor mRNA zeigt beispielsweise im Östrogenzyklus der Ratte deutliche Variationen. Bei vielen Spezies, einschließlich der Primaten kommt es nach Orchidektomie bzw. Ovariektomie zu einem Anstieg der Rezeptor mRNA (Kaiser et al., 1993; Kakar et al., 1994a; Winters et al., 2001). Auch die Aufregulation des GnRH-Rezeptors durch eine pulsatile Zufuhr von GnRH-Analoga scheint über eine gesteigerte Transkription und somit über eine Zunahme der Rezeptor mRNA zu erfolgen (Kaiser et al., 1993). Gonadale Steroide haben ebenfalls einen wichtigen Einfluß auf die Regulation der Genexpression des GnRH-Rezeptor-Genes. Die Effekte von Östradiol und Progesteron sind vielschichtig und variieren von Spezies zu Spezies.

1.3 Regulation der Genexpression

Regulation der Genexpression bei Eukaryonten

Die Regulation der Transkription der Gene ist aus verschiedensten Gründen von grosser Bedeutung für die Existenz des Organismus. Zum einen ist der gesamte Prozess der Transkription und Translation sehr energieaufwendig und sollte daher auf das notwendige Maß beschränkt sein. Zum anderen kommt es durch die Expression bestimmter Gene zu einer Veränderung im Milieu der Zelle. So wird z.B. durch verstärkte oder verminderte Synthese eines Enzyms dessen Konzentration in der Zelle erhöht oder erniedrigt und es kommt so zu einer veränderten Stoffwechselregulation. Bei höheren Organismen sind viele Merkmale, die im Verlaufe der Entwicklung ausgebildet werden, genetisch determiniert. Die hierfür verantwortlichen Gene müssen also in bestimmten Entwicklungsphasen "angeschaltet" werden, um ihre Funktion zu erfüllen.

Die Transkription von proteinkodierenden Genen wird in Eukaryonten durch die RNA-Polymerase II und die allgemeinen Transkriptionsfaktoren (TFIIA-TFIIH), die an den Promotor eines Klasse-II-Genes in Form eines Transkriptionsinitiations-Komplexes, binden, gestartet. Der Assemblierungsprozeß beginnt meist mit der Bindung von TFIID an eine TATA-Box, welche als ein Schlüsselement fast aller eukaryontischen Klasse-II-Promotoren typischerweise 25 Basenpaare stromaufwärts („upstream“) der Transkriptionsstartstelle liegt. Die Aktivität dieser molekularen Maschinerie wird durch Aktivator-und Repressorproteine, die sequenzspezifisch an regulatorische Sequenzen dieser Gene binden, kontrolliert. Nahezu alle regulierbaren eukaryontischen Gene besitzen Enhancer-Sequenzen, die auch als „Cis-aktivierende Elemente“ bezeichnet werden. Enhancer liegen meist einige hundert Basenpaare oberhalb der Promotorregion, können jedoch auch unterhalb oder innerhalb des Genes liegen. Die Steigerung der Transkription durch Enhancer ist nur durch deren Interaktion mit diffusiblen,

induzierbaren DNA-bindenden Proteinen, die als Trans-Aktivatoren wirken, möglich. Bei den Cis-aktivierenden Elementen handelt es sich meist um Regionen mit einer maximalen Anzahl von 20 Basenpaaren, die oftmals palindromisch oder in sich wiederholenden Sequenzen organisiert sind. Die Gruppe der regulierbaren DNA-Bindungsproteine umfasst Proteine mit typischen Strukturmerkmalen wie basic Helix-Loop-Helix-Motive, Zink-Finger-Motive oder Leucin-Zipper-Motive. Bei der Kontrolle der eukaryontischen Genexpression sind oftmals mehrere regulatorische Sequenzen mit entsprechend interagierenden Bindungsproteinen beteiligt, die ein Gen unter kombinatorischer Kontrolle haben (Alberts et al., 2001; Löffler et al., 1998).

Regulation der Genexpression des GnRH-Rezeptor-Gens

Verschiedene Arbeitsgruppen konnten in Arbeiten mit α T3-1 Zellen sowie anderen Zelllinien aus Tumorgeweben innerhalb des Genes zwei wahrscheinliche Promotor-Regionen, sowie eine negative Regulationsregion identifizieren (Kakar et al., 2002; Kang et al., 2000). Weitere Forschungen deuten auf die Existenz verschiedener Promotoren innerhalb des humanen GnRH-Rezeptor-Genes hin. Diese Unterschiede könnten mit einer gewebespezifischen Regulation der Genexpression assoziiert sein (Ngan et al., 2000; Cheng et al., 2000). Analysen der 5'-flankierenden Region des GnRH-Rezeptor-Genes zeigten zudem, dass Vorhandensein multipler TATA- und CAAT-Sequenzen. Das humane GnRH-Rezeptor-Gen enthält, im Gegensatz zur Maus, sechs TATA-Sequenzen, sowie sechs CAAT-Sequenzen verteilt über einen Bereich von 669 bp entfernt vom Startcodon ATG. Durch die Existenz dieser unterschiedlichen Startregionen der Transkription bestünde die Möglichkeit einer gewebespezifischen Regulation der Transkription verbunden mit der Existenz von variablen Transkriptionsprodukten. Im Verlauf der Forschungen wurden zahlreiche regulatorische Sequenzen gefunden, durch die die Transkription und somit die Aktivität des Genes beeinflusst werden kann. Innerhalb des menschlichen Genoms konnten drei vermutlich gonadotropspezifische Elemente (GSE) identifiziert werden, die für die basale Expression des Genes wichtig zu sein scheinen (Ngan et al., 1999).

GnRH und seine Analoga bewirken eine zeit- und dosisabhängige Down-Regulation der GnRH-Promotoraktivität. Durch Untersuchungen mit fortschreitenden 5'-Deletionskonstrukten konnte ein 248 bp großes DNA-Fragment gefunden werden, das für diesen GnRH vermittelten Effekt verantwortlich zu sein scheint. Innerhalb dieser 248 bp grossen Sequenz wurden zwei AP-1 bindende Regionen identifiziert, nach deren Mutation die GnRH-induzierte Reaktion verschwand (Cheng et al., 2002). Auch in anderen Bereichen des Genes wurden AP-1 und AP-2 bindende Regionen identifiziert, wodurch es zu einer Beeinflussung der Transkription durch

die Effekte der Proteinkinase C zu kommen scheint (Imagawa et al., 1987; White et al., 1999; Norwitz et al., 1999).

Außerdem existieren Bindungsregionen für Pit-1, ein spezifischer Transkriptionsfaktor der Neurohypophyse, der essentiell für die Expression von Wachstumshormonen und Prolaktin zu sein scheint, sowie ein Glucocorticoid/Progesteron response element (GRE/PRE) (Bodner et al., 1988; Ingraham et al., 1990). Im Genom der Maus wurde eine Sequenz gefunden, die neben AP-1 und steroidogenic factor-1 (SF-1) bindenden Bereichen, ein neues Element enthält, welches „GnRH receptor activating sequence (GRAS)“ benannt wurde. Jedes dieser Elemente scheint mit für die Regulation der Genexpression verantwortlich zu sein, denn ihre Mutation bewirkt eine 60-80%-tigen Abnahme der Promotor-Aktivität (Clay et al., 1995; Duval et al., 1997a). In der Ratte ist neben verschiedenen anderen Elementen eine LH-bindende Region an der Regulation der Transkription beteiligt (Duval et al., 1997b). cAMP scheint ebenfalls eine wichtige Rolle in der Regulation der Genexpression des GnRH-Rezeptors zu spielen. Die Existenz von „cAMP response Elementen (CRE)“ wurden beim Menschen, der Maus, sowie der Ratte beschrieben (Albarracin et al., 1994; Fan et al., 1995; Kakar et al., 1997). Am 3'-Ende des Genes wurden zudem fünf Polyadenylierungssignale identifiziert (Fan et al., 1995).

1.4 Die Zelllinie α T3-1

Ein grosses Hindernis in der Erforschung der neuroendokrinen Kontrolle der Reproduktion auf der Ebene der hypothalamisch-hypophysären Funktionsachse war der Mangel einer idealen Zelllinie. In der Vergangenheit wurden Forschungen in diesem Bereich mit Hilfe von Tiermodellen oder primären Zellkulturen durchgeführt. Diese Studien waren jedoch in ihrer Aussagekraft aufgrund der Verschiedenartigkeit der Zelltypen innerhalb der Adenohypophyse stark eingeschränkt. Die Zellen des Hypophysenvorderlappens bestehen aus einer heterogenen Population unterschiedlich differenzierter sekretorischer Zellen. Neben den LH- und FSH-sezernierenden gonadotropen Zellen existieren somatotrope, corticotrope, mammatrope und thyrotrope Zellen. Der prozentuale Anteil der gonadotropen Zellen an der Gesamtzahl der sekretorischen Zellen der Adenohypophyse wird bei ausgewachsenen Tieren auf 6-8% geschätzt (Ibrahim et al., 1986).

Im Jahr 1990 gelang der Arbeitsgruppe J.J. Windle, R.I. Weiner und P.L. Mellon die Etablierung einer stabilen Zelllinie aus dem Hypophysenvorderlappen. Hierzu wurde die Promotor/Enhancer-Region des Genes für die humane Glykoprotein-hormon-Untereinheit α mit der protein-codierenden Sequenz des Simian-Virus 40 (SV-40) T-Antigen Onkogen in einem Fusionsgen verknüpft. Transgene Mäuse, die dieses Fusionsgen trugen, entwickelten Tumoren der Adenohypophyse. Zellen dieses Tumors wurden isoliert und kultiviert. Hieraus gelang

schließlich die Etablierung einer stabilen Zelllinie, α T3-1, die ein kontinuierliches zelluläres Modellsystem für Forschungen im Bereich der Funktionen des Gonadotropin-Releasing Hormons sowie seines Rezeptors darstellt (Windle et al., 1990).

α T3-1 Zellen exprimieren α -Untereinheiten mRNA der Gonadotropine. Sie synthetisieren und sezernieren ein α -Untereinheiten-Protein. Die Zellen können jedoch weder FSH- β -noch LH- β -Untereinheiten mRNA exprimieren, so daß sie nicht in der Lage sind vollständige, gonadotrop-spezifische Proteine zu bilden. Auf Stimulation mit GnRH reagieren die Zellen mit einer vermehrten Bildung von α -Untereinheiten mRNA. Diese GnRH spezifische Zellantwort ist zeit- und dosisabhängig und durch die Gabe von GnRH-Antagonisten hemmbar (Windle et al., 1990). Diese Phänomene sprechen für eine GnRH-Rezeptor vermittelte Reaktion der Zellen. Untersuchungen haben gezeigt, dass α T3-1-Zellen GnRH-Rezeptor mRNA exprimieren und GnRH binden können. Membranpräparationen zeigen das Vorkommen von spezifischen, hoch-affinen Bindungsstellen für GnRH. (Horn et al., 1991)

Zusätzliche Untersuchungen haben gezeigt, dass α T3-1-Zellen weder Thyroidea-stimulierendes-Hormon (TSH- β), Growth Hormon (GH) noch Prolaktin (PRL) exprimieren, d.h. sie können keine Hormone anderer Zelltypen der Adenohypophyse bilden (Windle et al., 1990).

1.5 Das circadiane System

Die Chronobiologie (griech. Chronos = Zeit) ist die Lehre der biologischen Rhythmen. Im biologischen Sinne wird Zeit in Zyklen gemessen, deren Dauer von Millisekunden bis zu Jahren variieren kann. Circadiane Rhythmen, deren Zyklusdauern ungefähr 24 Stunden betragen, beschreiben rhythmische biologischer Prozesse, die in Abwesenheit von Umwelteinflüssen wie z.B. Licht oder Temperatur persistieren. Diese Rhythmen wurden in multiplen Organismen von Prokaryonten bis zu höheren Säugetieren beschrieben und reflektieren die Existenz einer intrinsischen Uhr, die diese Vorgänge steuert. Dieser circadiane Oszillator ermöglicht dem Organismus eine optimale Anpassung in Physiologie und Verhalten an die vorhersehbaren täglichen Veränderungen der Umwelt, wie z.B. Licht/Dunkel-Wechsel.

Circadiane Rhythmen sind ein bedeutender Aspekt innerhalb der Biologie des Menschen. Die Chronobiologie ist wie kaum eine andere Forschungsrichtung durch interdisziplinäre Ansätze geprägt. Die traditionelle Verflechtung von Zellbiologie bis Psychiatrie oder Arbeitsmedizin zeigt die fundamentale Rolle der zeitlichen Regulationssprozesse auf allen biologischen Ebenen. Obwohl chronobiologische Phänomene bereits seit Jahrhunderten Gegenstand wissenschaftlicher Untersuchungen sind, begann erst in den achtziger Jahren die exakte Untersuchung der

inneren Tagesuhr mit molekularbiologischen Methoden. In den letzten Jahren erfolgte eine deutliche Zunahme in der Erforschung des circadianen Systems, wobei sich heute ungefähr ein Prozent aller wissenschaftlichen Arbeiten mit diesem Thema beschäftigen. Insbesondere der Bedeutung, der physiologischen aber auch pathologischen Regulationsmechanismen der inneren Uhr für die Humanmedizin wird zunehmend mehr Beachtung geschenkt. Die Wirkung und Pharmakokinetik vieler Medikamente (z.B. Herz-Kreislaufmittel, Antiasthmatica, Analgetika, Antihistaminika, Zytostatika, Antibiotika, Psychopharmaka, Neuroleptika und Opioide usw.) sind nachweislich circadian unterschiedlich. Aber auch die Bedeutung des circadianen Systems für die Pathophysiologie vieler Erkrankungen wird zunehmend deutlicher. Bereits seit langem ist die tageszeitliche Varianz verschiedener kardiovaskulärer Parameter, wie Blutdruck, Puls oder auch Blutgerinnungsstatus bekannt (Millar-Craig et al., 1978). Aber auch kardiovaskuläre Ereignisse, wie Myokardinfarkt, plötzlicher Herztod oder Cerebralinfarkte zeigen eine deutlich tageszeitliche Rhythmik in ihrem Auftreten (Muller et al., 1989). Störungen im Bereich der inneren Uhr können sich beim Menschen unter anderem als Schlafstörungen, „Jet-Lag“ oder als Probleme bei der Adaptation an Schicht-Arbeit äußern (Reppert et al., 2001).

Circadiane Rhythmen werden von einem weitverbreiteten und bis heute gut untersuchtem System gesteuert. Hierbei handelt es sich um einen komplizierten molekularen Mechanismus, der in vielen verschiedenen peripheren Geweben „tickt“. Das Zentrum dieses Systems ist ein dominanter Schrittmacher im Gehirn, der die Koordination von gewebespezifischen Rhythmen übernimmt und somit das circadiane Programm des Organismus „dirigiert“ (Reppert et al., 2001; 2002).

Der Nucleus Suprachiasmaticus (NSC)

Die Komplexität der circadianen Rhythmen und ihre Koordination führte bereits seit langem zu der Vermutung, dass dieses System von einer endogenen Uhr gesteuert wird. Im Jahr 1972 machten F. Stephan et al. die Beobachtung, dass hypothalamische Läsionen bei Ratten zum Verlust von circadianen Rhythmen führten (Stephan et al., 1972). In Goldhamstern führte die Zerstörung der Neuronen des SCN zum Verlust von circadianen Rhythmen in den Bereichen Nahrungsaufnahme, körperliche Aktivität, Körpertemperatur und Sekretion von Prolaktin, Melatonin, Growth-Hormon und Cortison (Meyer-Bernstein et al., 1999). Im weiteren Verlauf der Forschung konnte der paarig angelegte Nucleus suprachiasmaticus (SCN) als der circadiane Hauptschrittmacher der Säugetiere, einschließlich des Menschen identifiziert werden. Er liegt im Bereich des vorderen Hypothalamus oberhalb des Chiasma opticums und besteht aus einer Ansammlung von circa 10^4 auffällig kleinen Neuronen, die auch als „Clock“-Zellen bezeichnet werden. Es konnte gezeigt werden, dass die signifikanten Merkmale der inneren Uhr, d.h. die Phasenlänge und deren Veränderung in Anpassung an äußere Einflüsse, eine Fähigkeit jeder

einzelnen „Clock“-Zelle ist (Welsh et al., 1995; Liu et al., 2001). Afferente Fasern des retinohypothalamischen Traktes führen direkt aus der Retina zu den suprachiasmatischen Nuclei, was für eine wichtige Bedeutung der Lichtintensität und Beleuchtungsdauer für die Synchronisation des Schrittmachers mit der Umwelt spricht. Efferente Fasern verlassen den SCN zu thalamischen und hypothalamischen Kerngebieten und über cervikale Ganglien zur Epiphyse (Cavallo et al., 1993). Nach chirurgischer Isolierung des SCN *in situ* zeigen die Neuronen weiterhin eine Rhythmik, während Hirnareale außerhalb des SCN arrhythmisch werden (Inouye et al., 1979). Nach dem Ersatz von zerstörtem SCN-Gewebe durch intaktes SCN-Spendergewebe kommt es zu einer Wiederherstellung des verlorenen Rhythmus mit der Periodendauer des Spenders (Ralph et al., 1990).

Die Gesamtheit der Rhythmen der Säugetiere wird durch ein hierarchisch organisiertes Multioszillatoren-System gesteuert, in dessen Mittelpunkt der SCN als sogenannte „Master-Clock“ steht. Im gesamten Körper der Säugetiere scheinen circadiane Oszillatoren als sogenannte „Slave-oscillators“ verteilt zu sein. Außerdem konnte eine rhythmische Expression der Gene, die am intrazellulären SCN-Uhrenmechanismus beteiligt sind, in anderen Hirnarealen, in peripheren Geweben sowie in immortalisierten Zelllinien identifiziert werden. Außerhalb des SCN gelegene „slave-oscillators“ können *in vivo* einen 24-Stunden-Rhythmus ohne Eingabe vom SCN nur über einige Tage aufrechterhalten. (Balsalobre et al., 1998; Yamazaki et al., 2000)

Die Organisation des circadianen Gesamttablaufes erfolgt also über den SCN, der periphere gelegene „slave-oscillators“ synchronisiert und an die Umwelt anpaßt. Die „slave-oscillators“ wiederum regulieren lokale physiologische Rhythmen des Individuums (Panda et al., 2002). Genetische Studien haben gezeigt, dass der molekulare Mechanismus der „Master-Clock“ und der, ihr untergeordneten peripheren, Oszillatoren sehr ähnlich ist (Yagita et al., 2002). Analysen von peripheren Geweben sowie Zelllinien konnten jedoch keine definitiven biochemischen Prinzipien aufdecken, die für die Steuerung der „slave-oscillators“ verantwortlich sind. Bis zum heutigen Stand der Forschung ist die genaue Steuerung der „slave-oscillators“ durch den SCN unklar geblieben.

Das Modell der circadianen Uhr der Säugetiere

Über lange Jahre konnte über die biochemischen und genetischen Grundlagen der auf Einzelzellebene nachweisbaren circadianen Prozesse bei Säugetieren nur spekuliert werden. Dagegen waren bei der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* drei Gene bekannt, die für die Ausbildung von circadianen Uhren bei diesen Tieren essentiell sind. In den folgenden Jahren konnten insgesamt folgende „Clock“-Gene in *Drosophila melanogaster* identifiziert werden:

period (per), *timeless (tim)*, *clock (clk)*, *cycle (cyc)*, *doubletime (dbt)*, *cryptochrome (cry)* und *vrille (vri)* (Übersicht siehe Albrecht, 2002). Die Suche nach homologen Genen bei Säugetieren mit klassischen gentechnischen Methoden war jedoch nicht erfolgreich. Erst die Identifikation einer Mausmutante, deren circadianer Rhythmus im Freilauf wesentlich verlängert und bei konstanter Dunkelheit nicht mehr nachweisbar war, eröffnete die Möglichkeit, das für dieses Phänomen verantwortliche „Uhren-Gen“ *mClock* zu isolieren (Vitaterna et al., 1994). Das Genprodukt des intakten Genes wurde als mCLOCK bezeichnet. Es handelt sich bei diesem Protein um einen Transkriptionsfaktor der Familie der basic-Helix-Loop-Helix(bHLH)-PAS(Period-Arnt-Single-minded)-Faktoren. Inzwischen sind weitere orthologe Gene bzw. Proteine der Maus identifiziert worden, die bei der Ausbildung circadianer Rhythmen eine Rolle spielen. Es konnten drei *Period*-Gene (*mPer1*, *mPer2*, *mPer3*), zwei *Cryptochrom*-Gene (*mCry1*, *mCry2*), sowie *Bmal1* (ortholog zu *cyc*) und *Casein Kinase (Cklε*; ortholog zu *dbt*) gefunden werden (Übersicht siehe Albrecht, 2002).

Der intrazelluläre Uhrmechanismus der Maus besteht aus positiven und negativen transkriptionellen/translationalen Rückkopplungsschleifen, die einen wiederkehrenden Rhythmus der RNA- und Protein-Level der Schlüssel-Komponenten des Mechanismus steuern. Essentiell notwendig für die Funktion des Uhrwerk sind die beiden bHLH-PAS-Transkriptionsfaktoren, CLOCK und BMAL1 (auch als MOP3 bekannt) (King et al., 1997; Gekakis et al., 1998; Bunker et al., 2000). CLOCK und BMAL1 bilden heterodimerische Komplexe, die zu einer Aktivierung der rhythmischen Transkription der drei murinen *Per*-Gene sowie der beiden *Cryptochrom* (*mCry*)-Gene führen. Hierzu binden die Heterodimere hoch selektiv an DNA-Promotor-Elemente sogenannte E-Box-Verstärker-Sequenzen, die durch die Nukleotid-Sequenz CACGTG gekennzeichnet sind (Gekakis et al., 1998). Es kommt zu einer Komplexbildung aus mPER-Protein, mCRY-Protein mittels einer Caseinkinase (CSKε) im Cytoplasma. Dieser phosphorylierte Komplex gelangt in den Zellkern und bindet dort an einen bereits bestehenden Komplex aus CLOCK:BMAL1-Heterodimer und E-Box-Sequenz. Hier wirkt insbesondere mCRY als negativer Regulator in direkter Interaktion mit CLOCK und/oder BMAL1. Es kommt zur Inhibition der Transkription der *mPer*-Gene und *mCry*-Gene. In diesem negativen Teil der Rückkopplungsschleife des circadianen Uhrenmechanismus hemmt mCRY so unter anderem seine eigene Synthese (Kume et al., 1999; Okamura et al., 1999). Der positive Teil der Rückkopplungsschleife besteht in der rhythmischen Regulation der BMAL1-Transkription, deren RNA-Level Höchstwerte in einem circa 12-stündigen Abstand zu maximalen mPER und mCRY-Leveln zeigen (Sherman et al., 2000; Oishi et al., 2000). CLOCK:BMAL1-Heterodimere aktivieren neben der *mPer*- und *mCry*-Transkription auch die Transkription des nukleären „orphan“ Rezeptor-Genes *Rev-Erbα*. Das Rev-ERbα-Protein bindet an ein spezifisches Rev-Erb/ROR response Element im BMAL1-Promotor und supprimiert dessen Transkription (Preitner et al., 2002; Ueda et al., 2002). Hieraus resultieren sinkende BMAL1-RNA-Level, während es zu einem Anstieg der Menge der mPER-RNA und mCRY-RNA kommt. Neben der

Fähigkeit zur Hemmung seiner eigenen, sowie der *mCry*-Transkription, ist mPER in der Lage die Wirkung von Rev-Erb α am Promotor des *Bmal1*-Genes zu inhibieren. Diese Hemmung der negativen Regulation am *Bmal1*-Promotor führt zu einer Aktivierung der Transkription (Preitner et al., 2002; Yu et al., 2002).

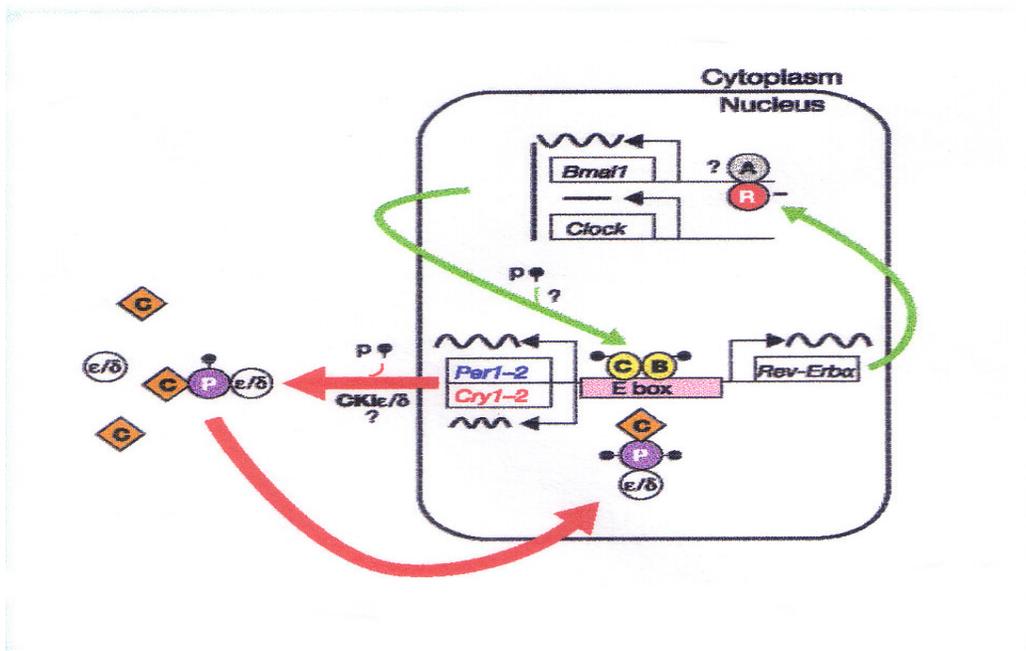


Abb. 1 : Das Uhrenmodell der Säugetiere (aus Reppert et al., 2002)

Das *clock*-Gen war das erste klonierte Uhren-Gen der Säugetiere (King et al., 1997), dessen Identifizierung über die Untersuchung von Mausmutanten mit veränderter circadianer Rhythmik erfolgte. Bei der *clock* Mutation handelt es sich um eine semidominante, autosomal vererbte Mutation im Bereich des Exons 19, die zu einem veränderten Genprodukt führt. Den Proteinen der Mausmutante, die als CLOCK Δ 19 bezeichnet werden, fehlen 51 Aminosäuren im Bereich der glutaminreichen PAS-Domäne. CLOCK Δ 19 ist nach wie vor in der Lage Komplexe mit dem bHLH-Transkriptionsfaktor BMAL1 zu bilden und im Bereich der E-Box-Enhancer-Sequenzen an die DNA zu binden. Durch die Veränderung in der vermutlich transkriptions-aktivierenden Domäne des Proteins kommt es jedoch nicht zur verstärkten Aktivierung der Transkription. In der Bindung des Heterodimers CLOCK:BMAL1 an E-Box-Sequenzen scheint also CLOCK die Rolle des, für die Aktivierung der Transkription, verantwortlichen Elementes zu spielen (Vitaterna et al., 1994; Gekakis et al., 1998). Um die Bedeutung des CLOCK-Proteins für die Regulation der circadianen Uhrenmechanismus weiter zu klären, erfolgten zahlreiche Untersuchungen an Mäusen mit homozygoten *clock/clock*-Mutationen. Es konnte gezeigt werden, daß es innerhalb des SCN der Mausmutanten zu einer signifikanten Reduzierung der

mRNA der *mPer1-3*- und *mCry1-2*-Gene kommt (Gekakis et al., 1998; Jin et al., 1999; Kume et al., 1999; Kuhlmann et al., 2000).

Aber nicht nur die direkte Interaktion der o.g. Transkriptionsfaktoren führt zu einer Regulation des „Uhrwerkes“, sondern auch post-translationale Modifikationen spielen eine wichtige Rolle bei der Kontrolle des Systems. CLOCK, BMAL1, mPER1 und mPER2 unterliegen in vivo einem zeitlichen Wechsel innerhalb ihres Phosphorylierungsstatus. Hierbei besteht eine Korrelation zwischen maximaler Phosphorylierung und der Zeit des negativen Feedbacks auf die Transkription von *mPer/mCry*. Der Phosphorylierungsstatus der Transkriptionsfaktoren CLOCK:BMAL1 hat vermutlich einen Einfluß auf die Wirksamkeit des Heterodimers bei der Regulation der Transkription und scheint wichtig für die Translokation der Proteine in den Zellkern zu sein (Lee et al., 2001; Eide et al., 2002). Für die Phosphorylierung sind zwei Casein-Kinasen (CKI1 ϵ und CKI1 δ) verantwortlich. Eine Mutation des *CKI1 ϵ* -Genes beim syrischen Hamster führt zu einer Veränderung der circadianen Rhythmik im Sinne einer „short-period tau mutation“ (Lowrey et al., 2000).

Das Arbeitsmodell des SCN Uhrwerkes startet bei CT 0 (Circadian Time 0) mit der CLOCK:BMAL1-verstärkten Transkription von *mPer* und *mCry*. Die RNA-Level dieser Transkripte zeigen ein deutlich temporales Profil mit einer Hauptexpression von *mPer1* bei CT 4-6, *mPer3* bei CT 4-8, *mPer2* bei CT 10 und *mCry1* bei CT 10. In der Mitte des circadianen Tages (CT 12) sind mPER und mCRY-Proteine zusammen im Nukleus exprimiert, wo sie die CLOCK:BMAL1-vermittelte Transkription inhibieren. Zur gleichen Zeit kommt es zu einer verstärkten Transkription des *Bmal1*-Genes, die zu einem Peak im *Bmal1*-RNA-Level bei CT 15-18 führt. Vermutlich kommt es so circa sechs bis acht Stunden später zu einem Anstieg des BMAL1-Proteins. Der Wiederanstieg der BMAL1-Konzentration zum Ende der circadianen Nacht bewirkt vermutlich eine vermehrte Bildung von CLOCK:BMAL1-Heterodimeren, welche zu einer gesteigerten Transkription von *mPer/mCry* führt. Scheinbar ist also die BMAL1-Verfügbarkeit der limitierende Faktor für die Formation der Heterodimere bzw. den erneuten Start der Transkriptionsschleife am Beginn eines neuen circadianen Tages (Reppert et al., 2001).

Synchronisation der „slave-oscillators“ mit der „Master-Clock“ im SCN

Im Jahr 1996 gelang der Arbeitsgruppe um G.Tosini und M. Menaker die erste direkte Demonstration eines circadianen Oszillators in Säugetieren, der außerhalb des SCN gelegen ist. Es konnte gezeigt werden, dass die neurale Retina eine stabile Rhythmik in der Melatonin-freisetzung, welche durch Lichteinfluß verändert werden kann, aufweist. Dieser circadiane Rhythmus wird von isolierten, retinalen Zellkulturen in vitro über einen Zeitraum von fünf Tagen

beibehalten (Tosini et al., 1996; 1998). Daraufhin konnte in einer Reihe verschiedener Experimente die Existenz einer biologischen Uhr in Fibroblasten der Ratte (rat1-fibroblast-cells) gezeigt werden. Innerhalb dieser immortalisierten, nicht-neuronalen Zellpopulation kam es nach Induktion durch einen kurzen Serum-Schock zur circadianen Expression einer Reihe verschiedener Gene (Balsalobre et al., 1998). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die Stimulation unterschiedlicher Signalwege einschließlich PKC, cAMP-abhängige Kinasen, Ca^{2+} und des Glucocorticoid-Rezeptor eine circadiane Oszillation der Genexpression induziert (Yagita et al., 2000; Balsalobre et al., 2000). S. Yamazaki et al. fanden im Jahr 2000 circadiane Rhythmen in verschiedenen peripheren Säugetier-Geweben. Mit Hilfe von transgenen Ratten, die das Glühwürmchen-Luciferase-Gen unter der Kontrolle des murinen *Per1*-Promotors exprimierten, konnten circadiane Rhythmen in Lunge, Leber, Niere und Skelettmuskulatur gefunden werden. Diese Rhythmik verschwindet in isolierten Zellkulturen nach circa sieben Tagen, während Zellkulturen des SCN über einen Zeitraum von 32 Tagen oszillieren können. Obwohl periphere Gewebe dieselbe Periodizität wie der SCN zeigen, müssen also entscheidende Unterschiede zwischen den Geweben bestehen (Yamazaki et al., 2000). Einigen peripheren Oszillatoren ist unter bestimmten Bedingungen eine Entkopplung vom SCN-Schrittmacher möglich. Wird beispielsweise nachtaktiven Mäusen Futter ausschliesslich während des Tages angeboten, kommt es zu einer Phasenverschiebung der Oszillatoren in Herz, Leber und Pankreas. Im Gegensatz dazu hat die Fütterungszeit keinen Einfluss auf die Rhythmik des SCN (Damiola et al., 2000). Auch Phasenverschiebungen innerhalb der Licht/Dunkel-Exposition können zu Entkopplungen zwischen Peripherie und SCN führen. Während die Neuronen des SCN sofort auf einen veränderten Hell/Dunkel-Zyklus reagieren, scheinen die Zellen der peripheren Gewebe einer Art „Jet-Lag“ zu unterliegen. Insbesondere Hepatozyten benötigen bis zu sieben Tage, um ihren Rhythmus erneut mit dem des SNC in Einklang zu bringen (Yamazaki et al., 2000). In Hirnarealen, die ausserhalb des SCN liegen, scheinen Na^{2+} -abhängige Aktionspotentiale eine wichtige Rolle als Überträger des circadianen „Outputs“ des SCN zu spielen (Reppert et al., 2001). Zudem scheinen an den Efferenzen des SCN Neurotransmitter und neurosekretorische Faktoren beteiligt zu sein. Bislang konnten zwei Neuropeptide, Transforming-growth factor- α (TGF- α) und Prokineticin-2 (PK2), als mögliche Übermittler des circadianen Rhythmus des SCN identifiziert werden. (Cheng et al., 2002; Kramer et al., 2001)

Die Mechanismen, mit denen der SCN-Schrittmacher außerhalb des Gehirns gelegene Oszillatoren kontrolliert, bleibt weiterhin unklar. Es scheinen neurale Efferenzen aus dem SCN zu peripheren Organen über das autonome Nervensystem zu existieren (Bartness et al., 2001). Auch humorale Faktoren können Signaltransduktionswege, die molekulare Oszillatoren in Zellen peripherer Gewebe beeinflussen, stimulieren. Hormone, wie z.B. der Glucocorticoid-Agonist Dexamethason, sind in der Lage periphere Oszillatoren über eine Beeinflussung der Transkription der *mPer*-Gene zu „verstellen“ (Basalobre et al., 2000)

Ein weiterer wichtiger Faktor für die Synchronisation der „slave-oscillators“ scheint die Existenz der „clock-controlled-genes (ccgs)“ zu sein. Als „ccgs“ werden Gene bezeichnet, deren Expression durch die circadiane Uhr kontrolliert wird, die aber selbst nicht für das Fortbestehen der Uhr notwendig sind. Die Regulation ihrer Genexpression kann auf transkriptioneller, translationaler, sowie post-transkriptioneller bzw. post-translationaler Ebene erfolgen. Eines der bis heute am besten untersuchten „ccg“ der Säugetiere ist das Gen des Neuropeptids Arginin-Vasopressin (AVP). Vasopressin, auch als Adiuretin oder Antidiuretisches Hormon (ADH) bezeichnet, wird im Hypothalamus (Nucleus supraopticus (SON) und Nucleus paraventricularis (PVN)) produziert. Das Neurohormon wird an Neurophysin gebunden, über den Tractus supraopticohypophysialis in die Neurohypophyse transportiert und dort bei Bedarf in das Blut abgegeben. Es handelt sich um ein Peptidhormon mit diuresehemmender Funktion (Steigerung von Permeabilität und Wasserrückresorption im distalen Nephron) und vasokonstriktorischer Wirkung auf Arterien einschließlich Koronarien, Kapillaren, kleine Venen sowie Darmgefäße (Roche Lexikon Medizin, 1999). Neben diesen Effekten verfügt Vasopressin zusätzlich über eine Reihe weiterer Funktionen innerhalb des zentralen Nervensystems (ZNS) (Ferris et al., 1984; Mihai et al., 1994, 1995; Kalsbeek et al., 1996a, 1996b).

Vasopressin wird ebenfalls von Neuronen des SCN freigesetzt. Das hier abgegebene Vasopressin verfügt physiologischerweise lediglich über spezifische Funktionen innerhalb des ZNS (Reppert et al., 1987). Vasopressin wird in einem circadianen Rhythmus synthetisiert und sezerniert, der durch die periodische Transkription des Genes reguliert wird (Carter et al., 1992). Vasopressinerge Efferenzen projizieren circadiane Signale vom SCN zu hypothalamischen Gebieten sowie zu anderen Hirnregionen (Kalsbeek et al., 1996a; 1996b). Im Jahr 1999 untersuchte die Arbeitsgruppe um X. Jin, ob die Regulation der „clock-controlled-genes“ mit Hilfe derselben positiven bzw. negativen Rückkopplungsschleifen erfolgt, die die Transkriptionsmechanismen der Neuronen der „Master-Clock“ innerhalb des SCN kontrollieren. Mit Hilfe von *in situ* Hybridizationen und immunochemischen Methoden wurden zunächst die mRNA- und Protein-Level von Vasopressin in Wildtyp-Mäusen und Mäusen mit homozygoten Mutationen des *mClock*-Genes (*Clock/Clock* double knockout mice) untersucht. Es zeigte sich eine spezifische Erniedrigung der RNA- und Protein-Level in *Clock/Clock*-Mäusen für die Vasopressin-Expression im SCN. Innerhalb des SON wurde die Expression des Genes durch die Mutation der *mClock*-Gene nicht beeinflusst. Untersuchungen der 5'-flankierenden Region des AVP-Genes zeigen, dass die Promotor-Region des Genes eine CACGTG-E-Box-Enhancer-Sequenz enthält. *In vitro* Studien konnten eine positive Regulation der Transkription durch CLOCK:BMAL1-Heterodimere demonstrieren (Jin et al., 1999). Die positive Regulation des Genes kann durch mCRY, mPER1-3 und mTIM antagonisiert werden (Jin et al., 1999; Kume et al., 1999). Bei der Regulation der Transkription des AVP-Genes wirken also dieselben regulatorischen Faktoren und Elemente mit, die die autoregulatorischen Rückkopplungsschleifen im Zentrum des „Uhrenmechanismus“ generieren. Diese Erkenntnisse könnten ein

erster Schritt bei der Aufklärung der Mechanismen sein, die es den „clock“-Zellen des SCN ermöglichen, Zellen peripherer Gewebe in einem circadianen Rhythmus „ticken“ zu lassen (Hastings et al., 2000).

Mit Hilfe der Microarray-Technologie ist es möglich Gewebe auf die Expression von „clock“-Genen sowie insbesondere von „clock-controlled-genes“ zu untersuchen. Diese Techniken wurden bislang zur Untersuchung der circadianen Genexpression in rat-1-Fibroblasten (Duffield et al., 2002), sowie in verschiedenen Geweben von Ratte und Maus (Kita et al., 2002; Akhtar et al., 2001; Panda et al., 2002; Storch et al., 2002) angewandt. Überraschenderweise zeigen die Daten, dass ein circadianes Muster der Genexpression ein signifikantes Phänomen darstellt, dass hunderte von Genen des SCN sowie peripherer Organe einschliesst. Zusammengefasst demonstrieren die Untersuchungen, die sich auf ungefähr ein Drittel des Genomes von Maus bzw. Ratte beziehen, dass circa 2-10% aller untersuchten Gene eine circadiane Oszillation in ihren „steady-state“ RNA-Leveln zeigen. Die circadiane Genexpression ist sehr gewebe-spezifisch. Im Vergleich zwischen rhythmisch exprimierten Genen in SCN und Leber konnten in zwei unterschiedlichen Studien lediglich 5% der Gene als periodisch schwankend in beiden Geweben identifiziert werden (Panda et al., 2002; Ueda et al., 2002). Die Arbeitsgruppe um K.-F. Storch kam beim Vergleich der circadianen Transkription in Leber und Herz zu einem ähnlichen Ergebnis: auch hier scheinen weniger als 5% der untersuchten Gene gleichermaßen in beiden Organen periodisch exprimiert zu werden (Storch et al., 2002). In vielen Fällen scheinen oszillierende Gene für eine Reihe von entscheidenden Schlüssel-funktionen der Organfunktionen zu kodieren (Delaunay et al., 2002). Es konnte gezeigt werden, dass Transkription, Translation, Protein-Stoffwechsel, Zell-Zyklus, Apoptose, Vesikel-Transport, Ionen-Transport, Signal-Transduktion und Metabolismus in vielen spezifisch limitierenden Schritte unter der Kontrolle der circadianen Uhr zu stehen scheinen. Die Hoch-Phasen der Expression dieser Schlüssel-Transkripte sind untereinander zeitlich abgestimmt, so dass die circadiane Regulation verschiedenster Gene scheinbar koordiniert verläuft (Panda et al., 2002). Ein Vergleich der circadianen Transkription zwischen *Drosophila melanogaster* und Säugetieren zeigte, dass die circadiane Kontrolle verschiedener Schlüsselfunktionen wie z.B. der Häm-Biosynthese (Alas1), Cholesteroll-Stoffwechsel (HMGCoA-Lyase), Energie-Stoffwechsel (Hexokinase) in der Evolution über 600 Millionen Jahre konserviert wurde (Claridge-Chang et al., 2001; McDonald et al., 2001).

Die periodische Genexpression der „clock-controlled-genes“ scheint lediglich bei einer Teilmenge als sogenannte „ccgs erster Ordnung“ unter der direkten transkriptionellen Kontrolle durch CLOCK:BMAL1-Heterodimere zu stehen. Den meisten „ccgs“ scheint das sogenannte „E-Box-response element“, das für eine direkte Regulation des Genes durch den circadianen Schrittmacher verantwortlich gemacht wird, zu fehlen. Dies lässt vermuten, dass der größte Teil der circadianen Kontrolle auf indirektem Wege erfolgt, und dass sich circadiane Signalwege

einer Reihe von Genexpressions-Kaskaden bedienen, an denen verschiedene Faktoren beteiligt sind (Panda et al., 2002). Wie bereits beschrieben scheinen REV-erb α , aber auch REV-erb β , eine wichtige Rolle innerhalb der circadianen Regulationsmechanismen zu spielen. Die Gene für diese beiden nukleären „orphan“ Rezeptoren scheinen ubiquitär exprimierte „clock-controlled-genes“ zu sein. Ihre Funktion liegt in der transkriptionellen Repression und für REV-erb α konnte eine essentielle Bedeutung bei der Kontrolle der circadianen Periodendauer und Phasenverschiebung gezeigt werden (Laudet et al., 2002; Preitner et al., 2002). Die beiden nukleären Rezeptoren scheinen gemeinsam mit weiteren Transkriptionsfaktoren, albumin D-box-binding protein (DBP) und E4BP4 eine kleine Gruppe des „molekularen Outputs“ zu bilden, die vom circadianen Schrittmacher im SCN und peripheren Oszillatoren zur Kontrolle von „untergeordneten“ Genen benutzt werden (Brown et al., 1999). Neben Transkriptionsfaktoren wie DBP, ein „ccg“ erster Ordnung, und E4BP4 sind unter den, durch Microarray identifizierten circadian exprimierten Genen, viele nukleäre Transkriptionsfaktoren zu finden. In der Arbeit von G.E. Duffield und Mitarbeitern bilden die Transkriptionsfaktoren die größte Gruppe der neu identifizierten „ccgs“ bei der Untersuchung von rat1-Fibroblasten mittels cDNA-Microarray (Duffield et al., 2002). Mit Hilfe bioinformatischer Untersuchungen konnten in einer Reihe von Genen „response“ Elemente für einige dieser Faktoren identifiziert werden (Ueda et al., 2002).

Die Bedeutung der E-Box-Enhancer-Sequenzen für die circadiane Genexpression

Als E(Enhancer)-Box-Sequenzen werden hexamerische DNA-Sequenzen mit der Nukleotidfolge CANNTG bezeichnet, wobei N für jedes beliebige der vier Nukleotide Adenosin, Thymin, Cytidin und Guanin steht. Im Jahr 1985 wurde die E-Box-Sequenz erstmals als ein Kontrollelement im Promotor des Schwere-Ketten-Immunglobulin-Genes identifiziert (Church et al., 1985). Im Verlauf der Forschung zeigte sich ein Einfluss auf die Expression einer grossen Anzahl verschiedenster Gene. Zu diesen Genen zählen u.a. Actin (Biber et al., 1994), TGF- β (Scholtz et al., 1996), Ornithin-Decarboxylase (Walhout et al., 1997) und Vasopressin (Jin et al., 1999). Die E-Box ist ein weitverbreitetes DNA-Kontrollelement, das trotz seiner Kürze eine ausgeprägte regulatorische Plastizität zeigt und viele verschiedene genetische Programme wie Proliferation, Zelldifferenzierung, gewebespezifische Zellantworten und Zelltod beeinflusst (Munoz et al., 2002). Die Komplexität der E-Box-abhängigen Prozesse zeigt sich ebenso in der Vielfalt der trans-aktivierenden Faktoren, die mit einem E-Box-Motiv interagieren können. Basic helix-loop-helix(bHLH)-Proteine gehören mit über 250 Repräsentanten zu der wichtigsten und vielseitigsten Familie der eukaryontischen Transkriptionsfaktoren. Sie sind durch hoch konservierte strukturelle Motive charakterisiert. Die sogenannte Basis Region, die als eine DNA-bindende Sequenz organisiert ist (Voronova et al., 1990) und die dimerisierende Domäne, die zwei amphipatische α -Helices, die durch einen Loop variabler Länge geteilt werden, aufweist.

bHLH-Proteine assoziieren zu homo-oder hetero-dimerischen Komplexen, die in der Lage sind an CANNTG-E-Box-Sequenzen zu binden, um dort ggf. mit Hilfe weiteren Co-Faktoren die Transkription vieler verschiedener Gene zu aktivieren oder zu inhibieren. Die selektive Dimerisierung ist ein regulatorischer Mechanismus, der eine Erweiterung der Funktionalität der bHLH-Transkriptionsfaktoren bedeutet. Zusätzlich besteht die Möglichkeit einer Feinabstimmung der Genexpression durch die Bindung verschiedenartiger bHLH-Protein-Komplexe, die in der Lage sind im Bereich derselben DNA-Sequenz zu binden (Massari et al., 2000).

E. Munoz und Mitarbeiter bezeichnen die E-Box-Sequenz als einen „transkriptionellen Homographen“: ein kurzes DNA-Element (Wort), das in Abhängigkeit von den Merkmalen, der es umgebenden Sequenz und der zellulären Umgebung (sprachlicher Kontext), sehr verschiedene transkriptionelle Outputs (Botschaften) vermitteln kann (Munoz et al., 2002). E-Box-Motive wirken nicht nur bei der Steuerung vieler verschiedener genetischer Programme mit, sondern ihr Wirkungsmechanismus scheint ebenfalls sehr komplex zu sein. Neben der hexamerischen E-Box selbst, scheint insbesondere der sequentielle Kontext, in dem die E-Box liegt, von großer Bedeutung für die Funktion zu sein (Massari et al., 2002). Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Kombination aus der Anzahl und Position der E-Boxen (Desbarats et al., 1996; Kraner et al., 1998), deren flankierende Regionen (Fisher et al., 1993; Swanson et al., 1995; Bendall et al., 1994; Blackwell, 1990), sowie spezifisch interagierenden Proteinen (Swanson et al., 1995; French et al., 1991) die Effekte auf die Genexpression vermittelt.

Der Einfluss von E-Box-Sequenzen bei der Regulation der circadianen Uhr wurde erstmals 1997 bei der Untersuchung der rhythmischen Expression des *period* Genes in *Drosophila* deutlich. Nach und nach wurde das E-Box-Motiv als ein zentraler Integrator der transkriptionellen Rückkopplungsschleifen des circadianen Uhrenmechanismus identifiziert (Jin et al., 1999; Hogenesch et al., 1998; Darlington et al., 1998; Gekakis et al., 1998). Auch „clock-controlled-genes“ verfügen als sogenannte „ccgs“ erster Ordnung über E-Boxen. Studien der „ccgs“ Arginin-Vasopressin (Jin et al., 1999), Albumin D-box-binding protein (DBP) (Ripperger et al., 2000) und Serotonin N-Acetyltransferase (Baler et al., 1999) zeigen die Bedeutung der E-Box-Sequenzen bei der circadianen Regulation der Transkription dieser Gene. Viele nicht-circadian exprimierte Gene weisen ebenfalls multiple E-Boxen in ihren Promotorbereichen auf, so dass neben dem E-Box-Motiv zusätzliche Faktoren existieren müssen, deren Zusammenspiel ein circadianes Programm aktiviert.

Ein wichtiges Charakteristikum, das von allen bekannten circadianen E-Boxen geteilt wird, ist ihre Fähigkeit zur Interaktion mit den bHLH-Transkriptionsfaktoren CLOCK und BMAL1 (Jin et al., 1999; Hogenesch et al., 1998; Darlington et al., 1998; Gekakis et al., 1998). In vitro müssen spezifische Basen in der E-Box-flankierenden Region präsent sein, um eine hochaffine Bindung des CLOCK:BMAL1-Komplexes zu unterstützen (Hogenesch et al., 1998). Hao *et al.* gelang die

Identifizierung eines 69bp „circadian regulatory sequence (CRS)“ im *per*-Promotor der Fruchtfliege. Das CRS-Element enthält ein E-Box-Motiv und ist in der Lage eine normale zyklische *per*-ähnliche Genexpression zu ermöglichen (Hao et al., 1997; 1999). Die Entfernung der E-Box, sowie sechs bis sieben flankierende Basen zu jeder Seite, führt zu einer dramatischen Reduzierung der Transkription, nicht jedoch zum kompletten Verlust der Periodizität (Hao et al., 1997). Mutationen im Bereich der flankierenden Basen bei intakter E-Box bewirken ebenfalls eine Veränderung der Transkription (Lyons et al., 2000; Hao et al., 1997).

Eine vergleichende Studie zwischen zwei E-Box enthaltenen Minimal-Promotoren, dem circadian kontrollierten Arginin-Vasopressin (AVP)-Gen-Promotor und dem Cyclin B1 (CYC)-Gen-Promotor, dessen Aktivität vom Zellzyklus gesteuert wird (Hwang et al., 1995), konnte einige Faktoren identifizieren, die notwendig zu sein scheinen, um eine circadiane Genexpression mit Hilfe von E-Box-Kontroll-Elementen zu erreichen. Insbesondere konnte im 5'-Bereich des AVP-Promotors das erste Beispiel für ein sog. "non E-Box-like element" gezeigt werden, das eine maximale Antwort des Promotors auf CLOCK:BMAL1-Heterodimere zu vermitteln scheint (Munoz et al., 2002).

Dennoch stellt sich insbesondere bei der circadianen Kontrolle der Genexpression die Frage nach der exakten Bedeutung der E-Boxen. Trotz zahlreicher Studien auf diesem Gebiet, ist eine vollständige Klärung dieser Frage bis heute nicht möglich.

1.6 Fragestellung

Die Entstehung des circadianen Rhythmus der „Master-Clock“ im SCN der Säugetiere setzt die Interaktion verschiedener sog. „Clock“-Gene in mindestens zwei gekoppelten transkriptionell/translationalen Rückkopplungsschleifen voraus. Diese Rückkopplungsschleifen enthalten positiv regulatorische Komponenten (CLOCK, BMAL1) und hemmende Elemente (mPER1, 2, 3; mCRY1,2), die jeweils Homo-oder Heterodimere bilden können, um ihre Wirkungen als Transkriptionsfaktoren nach Translokation in den Zellkern zu entfalten. Die Menge und damit die Funktion der „Clock“-Gen-kodierten Proteine kann zudem durch post-translationale Modifikation beeinflusst werden. Neben der „Master-Clock“ des SCN existieren zudem zahlreiche untergeordnete „slave-Oszillatoren“, die eine gewebespezifische Expression biologischer Rhythmen vermitteln. Die Mechanismen, mit denen der SCN-Schrittmacher ausserhalb des Gehirns gelegene Oszillatoren kontrolliert, ist bis heute nicht vollständig aufgeklärt. Es scheint neben neuronalen Efferenzen, sowie verschiedensten humoralen Faktoren, die direkte Regulation der Genexpression spezifischer Gene von entscheidender Bedeutung zu sein. Diese oszillierend exprimierten Gene werden als „clock-controlled-genes“ bezeichnet und scheinen teilweise den gleichen transkriptionellen/translationalen Regulationsmechanismen zu unterliegen wie die „Master-Clock“ des SCN.

Der Hauptschwerpunkt dieser Arbeit ist die Untersuchung der Bedeutung der Interaktionsmechanismen des intrazellulären Uhrenmechanismus für die Regulation der Transkription des mGnRH-Rezeptor-Genes. Die zentrale Fragestellung und das Ziel ist die mögliche Identifikation des mGnRH-Rezeptor-Genes als ein „clock-controlled-gene“.

Hierzu wird zunächst eine stabile hypophysäre Zelllinie (α T3-1) auf die mögliche Expression „clock“-spezifischer Proteine, wie CLOCK und mBMAL1 untersucht. Im weiteren Vorgehen soll innerhalb dieser Zelllinie die Bedeutung der positiv regulatorischen Komponenten der transkriptionellen/translationalen Rückkopplungsschleifen, CLOCK und mBMAL1, untersucht werden. Ebenso wird der Frage nach einem möglicher Einfluss der negativ regulatorisch wirksamen Elemente, mPER1 und mPER2, bei der Kontrolle der Genexpression des mGnRH-Rezeptor-Genes nachgegangen.

2.1 Materialien

Geräte

- Elektrophoresegerät Electrophoresis Power Suply-EPS 600 (Pharmacia Biotech)
- Elektrophoresekammer und Gelkämme (Owl Separation Systems Inc.)
- Imago Compact Imaging System (B&L Systems)
- Inkubator mit Flachbettschüttler Typ 3033 (Gesellschaft für Labortechnik mbH)
- Inkubator Typ B12 (Heraeus Instruments)
- Luminometer (Sirius)
- Mikrozentrifuge Typ 5451C (Eppendorf)
- Minigel-Twin Typ 842 (Biometra)
- RoboCycler® Gradient 96 (Stratagene)
- Semi-Dry-Blotter „Pegasus“ (PHASE)
- Sterilbank LaminAir® (Heraeus Instruments)
- Thermocycler (Perkin Elmer Gene Amp PCR System 2400)
- Thermomixer für 0,5 ml bzw. 1,5 ml Eppendorf Gefäße (Eppendorf)
- UV-Spektrophotometer Ultraspec 3000 (Pharmacia Biotech)
- UV-Tisch (Roth Laborbedarf)
- Vortexer Reax 2000 (Heidolph)
- Wasserbad Typ 1002 (Gesellschaft für Labortechnik mbH)
- Zentrifuge Megafuge 2.0R (Heraeus Instruments)

Verbrauchsmaterialien

- Sterile Pipettenspitzen (Biozym Diagnostik GmbH)
- Serologische Pipetten (Sarstedt)
- Petrischalen (Nunc™ Brand Products)
- Reaktionsgefäße 0,5 ml bzw. 1,5 ml (Eppendorf)
- Konische Röhrchen 15 ml bzw. 50 ml (Sarstedt)
- Pasteur Pipetten (Hilgenberg)
- Filter Stericup™ Filter units 500 ml (Millipore)
- Zellkulturflaschen Nunc™ 25; 80; 175 (Nunc™ Brand Products)
- Nunclon™ 24 Well Platten (Nunc™ Brand Products)
- Zellschraber (Nunc™ Brand Products)
- Plexiglasröhren (Sarstedt)

- Parafilm (BRAND)
- PVDF-Membran Porengrösse 0,45µm (Millipore)
- Gel-Blotting Papier (Schleicher und Schuell)

Chemikalien

- Alle Chemikalien wurden, wenn nicht anders bezeichnet , über Sigma; USA bezogen.

Kommerzielle Kits

- QIAgen PCR Cloning Kit (Qiagen)
- QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen)
- JETSTAR Plasmid Midiprep Kit (Genomed)
- UltraClean™ 15 Kit (Mobio)
- QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen)
- Luciferase Assay System (Promega)
- Beta-Gal Reporter Gene Assay, chemiluminescent (Roche)

2.2 Methoden

2.2.1 Konstruktion des mGnRH-Rezeptor Luciferase Reporter Vektors

Amplifikation des ausgewählten mGnRH-Rezeptor-Fragments mittels PCR aus genomischer Maus-DNA

Durchführung:

Primer:

mGnRH-Rezeptor forward: 5'-GTC CGT CGT GTG ACT ATT CAG-3' (MWG-Biotech-AG)

mGnRH-Rezeptor reverse: 5'-CTC CAA GGA CAG GCT TCA AGA G-3' (MWG-Biotech AG)

PCR-Ansatz:

Genomische DNA Maus (0,1 µg/µl)	3,0 µl
Taq-Polymerase Biotherm (Genecraft)	0,3 µl
10 x Biotherm Puffer (Genecraft)	3,0 µl
Primer mGnRH-Rezeptor forward (10 pmol/µl)	2,0 µl
Primer mGnRH-Rezeptor reverse (10 pmol/µl)	2,0 µl
10 mM dNTP-Mix (Genecraft)	1,0 µl
MgCl ₂ (25 mM) (Roche)	3,0 µl
Aqua bidest.	15,7 µl
<i>Gesamtvolumen</i>	<i>30,0 µl</i>

PCR-Programm am Thermocycler :

Denaturierung:	95°C	5 Minuten	1 Zyklus
Denaturierung:	95°C	20 Sekunden	32 Zyklen
Annealing:	62°C	30 Sekunden	32 Zyklen
Elongation:	72°C	30 Sekunden	32 Zyklen
Elongation:	72°C	7 Minuten	1 Zyklus
Abkühlung:	4°C	beliebig lange	

Identifikation und Auftrennung von DNA im Agarose-Gel

Durchführung:

0,8-1,2 g Agarose (Gibco BRL) werden zusammen mit 100 ml 1 x TBE-Puffer in der Mikrowelle erhitzt, bis sich die Agarose vollständig gelöst hat. Nach Abkühlung auf ca. 40°C werden der Lösung 1% Ethidiumbromid zugesetzt. Dieses Gemisch wird nun unverzüglich in den Gelschlitten der Elektrophoresekammer gegossen, in welchen vorher Plastikämme zur Herstellung der späteren Geltaschen verbracht wurden. Die Flüssigkeit muss nun ca. 30 Minuten auspolymerisieren. Danach können die Plastikämme, die der Formung der Taschen dienten, entfernt werden. Das Gel wird nun mitsamt Gelschlitten in die Elektrophoresekammer überführt und vollständig mit TBE-Puffer bedeckt. Die DNA-Proben werden mit DNA-Beladungspuffer (Gibco BRL) versetzt und vorsichtig in die Geltaschen pipettiert. Zur späteren Grösseneinordnung und Identifikation der DNA-Fragmente wird zusätzlich ein DNA-Grössenmarker (Eurogentec, Belgium) aufgetragen. Es wird nun für ca. 45-60 Minuten eine elektrische Spannung von 100 Volt angelegt. Danach kann das Gel einem UV-Tisch betrachtet und das Ergebnis per Foto dokumentiert werden.

10 x TBE-Puffer:

108 g Tris-Base

55 g Borsäure

40 ml 0,5 M EDTA

mit Aqua bidest. auf 1 Liter auffüllen

DNA-Beladungspuffer (Gibco BRL)

0, 41% Bromphenolblau

0, 41% Xylene Cyanole

50% Glycerol

Extraktion der DNA aus dem Agarose-Gel

Nach der Elektrophorese ist es möglich die DNA wieder aus dem Agarose-Gel zu extrahieren. In dieser Arbeit wurde für diese Zweck das UltraClean™ 15 Kit (Mobio) verwendet.

Durchführung:

Die gewünschte DNA-Bande wird unter UV-Licht aus dem Gel ausgeschnitten und in ein Eppendorf Reaktionsgefäss überführt. Nun wird die ausgeschnittene Gel-Bande zunächst unter

Hoch-Salz-Bedingungen geschmolzen. Dazu wird das Gel-Fragment gewogen, mit dem 0,5-fachen Volumen an TBE-Melt® und dem 4,5-fachen Volumen an Ultrasalt® versetzt und ca. 5-10 Minuten bei 50 °C eingeschmolzen.

Nachdem ein homogenes Gemisch entstanden ist, werden 20 µl Ultra-Bind® zugefügt, welches Silicia-Partikel enthält, an die die DNA gebunden wird. Der DNA-Silicia-Komplex wird nun 5 Sekunden bei 7000 UpM in der Tischzentrifuge pelletiert und der Überstand verworfen.

Das Pellet wird mit 1 ml Ultra Wash® gewaschen, um Salz-und Agarosereste zu entfernen. Hierzu wird Ultra Wash® auf das Pellet gegeben und, nach kurzem Vortexen, 5 Sekunden bei 7000 UpM zentrifugiert. Nach diesem erneuten Pelletieren wird der Überstand wiederum verworfen und die DNA kann nun aus dem Siliciakomplex eluiert werden.

Hierzu werden 35 µl Aqua bidest. auf das Pellet gegeben. Während einer fünfminütigen Inkubationszeit bei Raumtemperatur wird die DNA unter den nun vorherrschenden Niedrig-Salz-Bedingungen aus dem DNA-Silicia-Komplex eluiert. Die verbliebenen Silicia-Partikel werden 5 Sekunden bei 7000 UpM pelletiert und der Überstand, in dem sich nun die gelöste DNA befindet, wird in ein sauberes Reaktionsgefäß überführt.

Konzentrationsbestimmung der DNA

Nukleinsäuren absorbieren bei einer Wellenlänge von 260 nm UV-Licht. Mit Hilfe eines UV-Spektrophotometers können deshalb Nukleinsäurekonzentrationen gemessen werden. Hierzu werden Quarzküvetten mit einem Volumen von 100 µl und einer Schichtdicke von 10 mm verwendet. Bei einer optischen Dichte von 1 bei 260 nm entspricht dies 50 µg/ml DNA.

Durchführung:

Es werden hierzu zunächst 100 µl Aqua bidest. zur Eichung in die Quarzküvette des Photometers gegeben und nach der Messung wieder entfernt. Im Anschluss wird die Absorbtion der DNA-Probe in einer 1:50 bzw. 1:20 Vedünnung gemessen.

Die Konzentration wird nun anhand folgender Formel berechnet:

Gemessene OD_{260} x Faktor 50 x Vedünnungsfaktor : 1000 = DNA in µg/µl

Klonierung des mGnRH-Rezeptorgenfragments in einen pDrive Cloning Vector (Qiagen PCR Cloning Kit)

Durchführung:

Ligationsansatz:

pDrive Cloning Vector	1,0 µl
PCR-Produkt mGnRH-Rezeptor (92,5 ng/µl)	2,7 µl
Aqua bidest.	1,3 µl
Ligationsmastermix 2x	5,0 µl
<i>Gesamtvolumen</i>	<i>10,0 µl</i>

Alle o.g. Komponenten werden entsprechend der Mengenangaben in ein 0,5 ml Reaktionsgefäß pipettiert, dabei sollten alle Komponenten auf Eis gehalten werden. Danach wird der gesamte Ansatz für 2 Stunden im Wasserbad bei 16°C inkubiert.

Transformation des pDrive Cloning Vector/mGnRH-Rezeptor-Konstruktes in kompetente DH5α-Zellen

Durchführung:

Zunächst werden 50 µl kompetente DH5α-Zellen, die sich in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß befinden, von - 80°C circa 7-8 Minuten auf Eis aufgetaut. Es werden nun vorsichtig 3 µl Ligationsansatz (s.o.) (im folgenden als pDrive/GnRH-R) bezeichnet, hinzupipettiert.

Nach einer 30-minütigen Inkubation auf Eis, erfolgt der sog. Hitzeschock. Hierzu wird der Ansatz für 45 Sekunden in ein Wasserbad mit einer Temperatur von 42°C gebracht und danach unverzüglich wieder für circa zwei Minuten auf Eis gelegt. In das Reaktionsgefäß werden nun 250 µl LB-Medium (Gibco BRL) hinzugeben und für 1 Stunde bei 37°C im Inkubator mit Flachbettschüttler bei ca. 200-300 UpM inkubiert.

Im Anschluss erfolgt das Ausplattieren von 50 µl des Transformationsansatzes auf eine, mit X-Gal und IPTG vorbehandelte, LB-Ampicillin-Agarplatte (Gibco BRL), welche über Nacht bei 37°C im Inkubator verbleibt.

Am darauffolgenden Tag wird jeweils eine einzelne der gewachsenen Bakterienkolonien mit einer sterilen Pipettenspitze von der LB-Ampicillin-Agarplatte (Gibco BRL) „gepickt“ und in ein 15 ml Gefäß mit jeweils 2ml LB-Medium (Gibco BRL) mit Ampicillin überführt.

Es erfolgt nun eine Inkubation der einzelnen Klone, hier insgesamt fünf, für max. 18-20 Stunden bei 37°C im Inkubator mit Flachbettschüttler bei ca. 200-300 UpM.

LB-Medium

20 g LB-broth-base (Gibco BRL) auf 1 Liter Aqua bidest. geben und autoklavieren

Blau-Weiss-Selektion

Ein, in das Plasmid eingebautes, Selektionsgen ermöglicht die Identifizierung von Klonen, welche das gewünschte Insert enthalten. Die Insertionsstelle innerhalb des pDrive Cloning Vectors enthält das α -Fragment des Lac-Z-Gens, welches für das Enzym β -Galactosidase codiert. Der Einbau eines fremden DNA-Fragments inaktiviert das Enzym und erlaubt die Identifizierung rekombinanter Klone durch eine sogenannte Blau/Weiss-Selektion. Bakterienkolonien, in denen das Lac-Z-Gen durch Insertion des DNA-Fragments zerstört wurde, bleiben weiss, da hier X-Gal nicht in einen Indigofarbstoff umgewandelt werden kann (Mülhardt, 2002b).

Isolierung der Plasmid-DNA

In dem oben beschriebenen Kulturansatz sollen sich theoretisch nur die transformierten Bakterien vermehrt haben, die das Plasmid, welches eine Ampicillin-Antibiotikaresistenz trägt, in sich aufgenommen haben. Es entwickeln sich über Nacht aus jeder einzelnen erfolgreich transformierten Bakterienzelle eine Bakterienkolonien. Die identischen Klone einer einzelnen Kolonie werden nun nochmals in flüssigem LB-Medium unter Zugabe von Ampicillin vermehrt. An diesem Punkt kann über die Menge der später zu isolierenden Plasmid-DNA entschieden werden. Werden nur kleine Mengen benötigt, erfolgt ein Ansatz des einzelnen Klons in circa 1-3 ml LB-Medium. Eine sogenannte Minipräparation (siehe unten) erbringt dann eine DNA-Ausbeute von 3-20 μ g. Hierfür wurde in dieser Arbeit das QIAprep Spin Miniprep Kit benutzt. Bei Bedarf grösserer DNA-Mengen kann entweder eine Midi-oder Maxipräparation erfolgen, die DNA-Ausbeuten von 45-100 μ g (Midi) oder 300-500 μ g (Maxi) ermöglichen. Dafür wurde im späteren Verlauf dieser Arbeit das JETSTAR® Plasmid Midiprep Kit verwendet.

Durchführung:

Die Isolation der Plasmid-DNA erfolgt mit dem Qiaprep®Spin Miniprep Kit. Alle hierfür verwendeten Puffer sind im Kit enthalten.

Nach Inkubation einer Bakterienkolonie in 2 ml LB-Ampicillin-Medium über Nacht werden durch

5-minütiges Zentrifugieren bei 7000 UpM die enthaltenen Bakterien pelletiert.

Nach vorsichtigen Entfernen des überstehenden Mediums erfolgt eine Resuspension des Pellets in 250 µl Puffer 1. Nach Zugabe von 250 µl Puffer 2 kommt es nach mehrmaligem vorsichtigen Mischen zur Lyse der Bakterien.

Die Reaktion wird durch Zugabe von 350 µl Puffer 3 nach ca. 5 Minuten gestoppt. Nach 10-minütigem Zentrifugieren bei 14000 UpM wird der Überstand in die Zentrifugationssäulen mit der Silikamembran überführt und für ca. 30-60 Sekunden zentrifugiert.

Danach wird die Säule zunächst mit 0,5 ml PB Puffer gewaschen, wiederum ca. 30-60 Sekunden zentrifugiert, nochmals mit 0,75 ml PE Puffer gewaschen und ebenfalls ca. 30-60 zentrifugiert. Zur vollständigen Entfernung des Waschpuffers erfolgt danach nochmals eine ca. 1-minütige Zentrifugation.

Schließlich wird die DNA in 50 µl Aqua bidest. eluiert. Die Ausbeute kann dann in einer 1:50 Verdünnung am UV-Spektrophotometer bei einer optischen Dichte (O_D) von 260 nm bestimmt.

Diagnostischer Restriktionsverdau der Plasmid-DNA

Durchführung:

DNA-Proben	1 µg
EcoRI (10 units/µl) (New England Biolabs)	1 µg
EcoRI-Reaktionspuffer (New England Biolabs)	1 µg
Aqua bidest.	Je nach Konzentration der DNA-Proben wurde der Ansatz auf das Gesamtvolumen aufgefüllt
<i>Gesamtvolumen</i>	<i>10 µg</i>

Alle o.g. Komponenten werden entsprechend der Mengenangaben in ein 0,5 ml Reaktionsgefäß pipettiert und für 1 Stunde bei 37°C im Heizblock inkubiert.

Anschließend werden die Proben elektrophoretisch in einem 1%-tigen Agarose-Gel bei einer elektrischen Spannung von 100 Volt für eine Stunde aufgetrennt und auf dem UV-Tisch sichtbar gemacht.

Sequenzierung der DNA

Ausgewählte Proben, bei denen ein Restriktionsenzymverdau ergab, dass sie ein Insert enthielten, wurden sequenziert.

Die Sequenzierungen innerhalb dieser Arbeit wurden vom Institut für Zellbiochemie und klinische Neurobiologie der Universität Hamburg durchgeführt. Es wurde hierzu ein ABI-Sequentator 377 benutzt.

Klonierung des mGnRH-Rezeptor-Fragments in den pGL3-Basic Luciferase Reporter Vektor (Promega)

In dieser Arbeit wurde der pGL3-Basic Luciferase Reporter Vektor (Promega) verwendet.

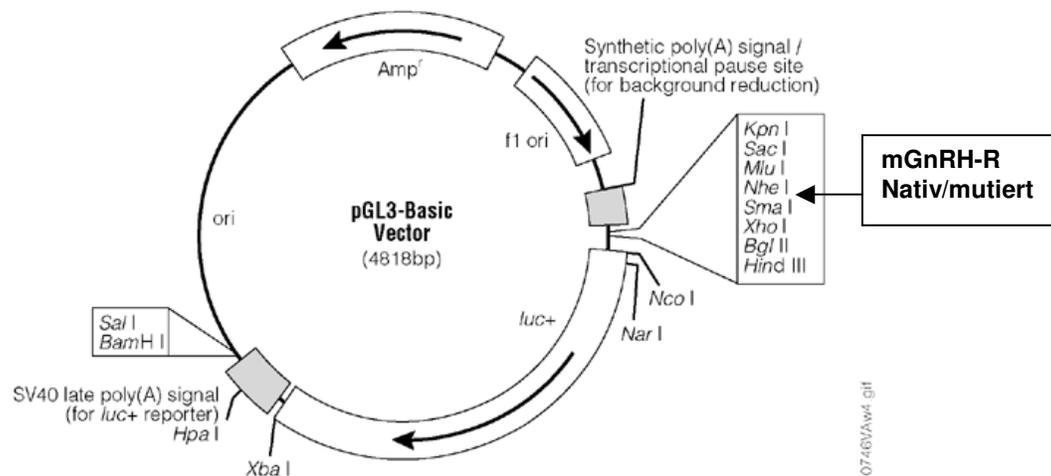


Abb. 2: Vektorkarte des pGL3-Basic Vektors (Promega)

Durchführung:

Restriktionsverdau des pGL3-Basic Luciferase Reporter Vektors

pGL3-Basic (1µg/µl) (Promega)	2,0 µl
KpnI (New England Biolabs)	1,0 µl
SacI (New England Biolabs)	1,0 µl
Puffer 2 (New England Biolabs)	3,0 µl
BSA (Gibco BRL)	1,5 µl
Aqua bidest.	21,5 µl
<i>Gesamtvolumen</i>	<i>30,0 µl</i>

Alle o.g. Komponenten werden entsprechend der Mengenangaben in ein 0,5 ml Reaktionsgefäß pipetiert und bei 37°C für 2 Stunden im Heizblock inkubiert.

Restriktionsverdau des pDrive Cloning Vektor/GnRH-Rezeptor-Konstrukts

pDrive Cloning Vector/mGnRH-Rezeptor-Konstrukt (232,5 ng DNA/µl)	10,0 µl
KpnI (New England Biolabs)	1,0 µl
SacI (New England Biolabs)	1,0 µl
Puffer 2 (New England Biolabs)	3,0 µl
BSA (Gibco BRL)	1,5 µl
Aqua bidest.	13,5 µl
<i>Gesamtvolumen</i>	<i>30,0 µl</i>

Alle o.g. Komponenten werden entsprechend der Mengenangaben in ein 0,5 ml Reaktionsgefäß pipetiert und bei 37°C für 2 Stunden im Heizblock inkubiert. Nach dem Restriktionsenzymverdau wurden die Produkte in einem Agarosegellauf sichtbar gemacht. Die korrekt geschnittene DNA wurde aus dem Agarosegel isoliert und mittels UltraClean™ 15 Kit (Mobio) aufgereinigt. Die Konzentration wurde in einer 1:50 Verdünnung im UV-Spektrophotometer bestimmt.

Ligation des pGL3-Basic-Vektors mit dem mGnRH-Rezeptor-Insert

pGL3-Basic (7,5 ng DNA/ μ l)	11 μ l
mGnRH-Rezeptor-Insert (27,5 ng DNA/ μ l)	1 μ l
T ₄ -DNA Ligase (Gibco BRL)	2 μ l
T ₄ -DNA Ligase-Puffer (Gibco BRL)	3 μ l
Aqua bidest.	2 μ l
<i>Gesamtvolumen</i>	<i>20 μl</i>

Alle o.g. Komponenten werden entsprechend der Mengenangaben in ein 0,5 ml Reaktionsgefäß pipetiert und bei 16°C im Wasserbad über Nacht inkubiert.

Transformation des mGnRH-Rezeptor/pGL3-Basic in kompetente DH5 α -Zellen

Zur Vervielfältigung dieses Vektorkonstruktes erfolgte nun wiederum eine Transformation in DH5 α -Zellen. (genaues Protokoll s.o.) Nach der erfolgreichen Transformation wurde die DNA von 10 Klonen mit Hilfe des QIAprep Spin Miniprep Kit isoliert (genaues Protokoll s.o.). Zur Überprüfung der isolierten Plasmide wurde ein Restriktionsenzymverdau mit den Enzymen SacI und KpnI durchgeführt. Ein Klon, bei dem der Restriktionsenzymverdau zeigte, dass ein Insert enthalten war, wurde sequenziert. Dieses Plasmid, im weiteren Text als mGnRH-Rluc bezeichnet, wurde nun mittels JETSTAR Plasmid Midiprep Kit (genaues Protokoll s.o.) vermehrt und für die folgenden Transfektionsversuche benutzt.

2.2.2 Erzeugung der Mutationen in mGnRH-Rluc

In dieser Arbeit wurden die fünf unterschiedlichen CANNTG-E-Box-Motive des ausgewählten Promotorbereiches des mGnRH-Rezeptor-Genes in die Nukleotidsequenz GGACCT mutiert. Die Erzeugung von spezifischen Mutationen in DNA-Fragmenten kann mit Hilfe der PCR-Methode erfolgen. Bei der Einführung der insgesamt fünf Mutationen in den ausgewählten Bereich des Promotors des mGnRH-Rezeptor-Genes wurde folgende Strategie angewendet:

Der gesamte DNA-Abschnitt wurde in 3 Mutationsfragmente untergliedert, deren Enden sich jedoch um circa 8-10 Nukleotide überlappen müssen.

1. Mutationsfragment: mGnRH-Rezeptor ⁽¹⁾
2. Mutationsfragment: mGnRH-Rezeptor ⁽²⁾
3. Mutationsfragment: mGnRH-Rezeptor ⁽³⁾

Diese Fragmente wurden so gewählt, dass bei einer Amplifikation mittels PCR die ausgewählten Primer im Bereich der E-Box-Motive liegen. Mit Hilfe der synthetisch generierten Primer, die die veränderte Nukleotidsequenz GGACCT enthielten, wurden so zunächst die gewünschten Mutationen in die Einzelfragmente eingeführt. Entscheidend für die spätere Zusammenführung der Einzelfragmente ist deren Überlappung im Bereich ihrer „Schnittstellen“. Es werden daraufhin in einer PCR-Reaktion jeweils zwei Einzelfragmente als Template DNA eingesetzt. Als äussere Primer dieser Reaktion dienen die beiden, jetzt aussen flankierenden, Primer der Einzelreaktionen. Im Verlauf der PCR kommt es im Bereich der sich überlappenden 3'-Sequenzen zu einem Annealing mit dem jeweils komplementären Strang, so dass das freie 3'-Ende jetzt als Primer für die weitere Verlängerung dient, wodurch ein Gesamtprodukt entsteht (Ho et al., 1989).

Herstellung des 1. Mutationsfragments: mGnRH-Rezeptor ⁽¹⁾

Primer:

mGnRH-Rezeptor₍₁₎ forward: 5'- GAG GGG CTA CGG TTA GGA CCT GCC TTC AGG-3'
(MWG-Biotech AG)

mGnRH-Rezeptor₍₁₎ reverse: 5'- TCT CCA AGG ACA GGC TTC AAG AG-3'
(MWG-Biotech AG)

PCR-Ansatz:

mGnRH-Rluc (50 ng/μl)	1,0 μl
10 x Ex Taq™ Reaktionspuffer (TaKaRa)	5,0 μl
Ex Taq™ (TaKaRa)	0,5 μl
10 mM dNTP-Mix (TaKaRa)	2,0 μl
Primer mGnRH-Rezeptor ₍₁₎ forward (10 pmol/μl)	2,0 μl
Primer mGnRH-Rezeptor ₍₁₎ reverse (10 pmol/μl)	2,0 μl
Aqua bidest.	37,5 μl
<i>Gesamtvolumen</i>	<i>50,0 μl</i>

PCR-Programm am Robocycler

Denaturierung:	95°C	1 Minute	1 Zyklus
Denaturierung	95°C	20 Sekunden	35 Zyklen
Annealing	60°C	30 Sekunden	35 Zyklen
Elongation	72°C	60 Sekunden	35 Zyklen
Elongation	72°C	10 Minuten	1 Zyklus
Abkühlung	4°C	beliebig lange	

Das erhaltene PCR-Produkt wurde in einem 1,2%-tigen Agarosegel sichtbar gemacht. Nachdem das Produkt anhand des ebenfalls aufgetragenen DNA-Größenmarkers als korrekt identifiziert wurde, wird die gewünschte Bande aus dem Gel ausgeschnitten und mit Hilfe des UltraClean™ 15 Kit (Mobio) aufgereinigt. Das mGnRH-Rezeptor-Fragment₍₁₎ wird nun mit Hilfe des Qiagen PCR Cloning Kit (Qiagen) in einen pDrive Cloning Vector (Qiagen) kloniert und in kompetente DH5α-Zellen transformiert. Es wurden insgesamt 6 Klone mit Hilfe des Qiaprep® Spin Miniprep Kit (Qiagen) isoliert und zur Kontrolle mit EcoRI verdaut. Dieser diagnostische Verdau zeigte, daß alle 6 Klone ein Insert enthielten. Daraufhin wurde einer der Klone mittels T7 und SP6 Promotor Primern, deren komplementäre Sequenzen innerhalb des pDrive Cloning Vectors liegen, sequenziert.

Herstellung des 2. Mutationsfragments : mGnRH-Rezeptor ⁽²⁾

Primer:

mGnRH-Rezeptor ⁽²⁾ forward: 5'-GAA TTA GAC TCG GAC CTT CTT TCC TCA CC-3'
(MWG Biotech AG)

mGnRH-Rezeptor ⁽²⁾ reverse: 5'-GTA GCC CCT CAG AGG TCC GCC CGT C-3'
(MWG Biotech AG)

PCR-Ansatz:

mGnRH-Rluc (50 ng/μl)	1,0 μl
10 x Ex Taq™ Reaktionspuffer (TaKaRa)	5,0 μl
Ex Taq™ (TaKaRa)	0,5 μl
10 mM dNTP-Mix (TaKaRa)	2,0 μl
Primer mGnRH-Rezeptor ₍₂₎ forward (10 pmol/μl)	2,0 μl
Primer mGnRH-Rezeptor ₍₂₎ reverse (10 pmol/μl)	2,0 μl
Aqua bidest.	37,5 μl
<i>Gesamtvolumen</i>	<i>50,0 μl</i>

PCR-Programm am Robocycler

Denaturierung:	95°C	1 Minute	1 Zyklus
Denaturierung	95°C	20 Sekunden	35 Zyklen
Annealing	60°C	30 Sekunden	35 Zyklen
Elongation	72°C	60 Sekunden	35 Zyklen
Elongation	72°C	10 Minuten	1 Zyklus
Abkühlung	4°C	beliebig lange	

Das erhaltene PCR-Produkt Mutationsfragment₍₂₎ wurde in einem 1,2%-tigen Agarosegel sichtbar gemacht und anhand des ebenfalls aufgetragenen DNA-Größenmarkers als korrekt identifiziert. Das Produkt wurde nun mit dem QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen) aufgereinigt und ohne Subsequenzierung für die folgende Fusion mit dem Mutationsfragment₍₁₎ eingesetzt.

Fusion von Mutationsfragment₍₁₎ mit Mutationsfragment₍₂₎

Als Template-DNA werden nun die beiden aufgereinigten PCR-Produkte der o.g. Reaktionen eingesetzt.

PCR-Ansatz:

DNA-Fragment ⁽¹⁾ (50ng/μl)	1,0 μl
DNA-Fragment ⁽²⁾ (50ng/μl)	1,0 μl
10 x Ex Taq™ Reaktionspuffer (TaKaRa)	5,0 μl
Ex Taq™ (TaKaRa)	0,5 μl
10 mM dNTP-Mix (TaKaRa)	2,0 μl
Primer mGnRH-Rezeptor ⁽¹⁾ forward (10 pmol/μl)	2,0 μl
Primer mGnRH-Rezeptor ⁽²⁾ reverse (10 pmol/μl)	2,0 μl
Aqua bidest.	36,5 μl
<i>Gesamtvolumen</i>	<i>50,0 μl</i>

PCR-Programm am Robocycler

Denaturierung:	95°C	1 Minute	1 Zyklus
Denaturierung	95°C	20 Sekunden	35 Zyklen
Annealing	60°C	30 Sekunden	35 Zyklen
Elongation	72°C	60 Sekunden	35 Zyklen
Elongation	72°C	10 Minuten	1 Zyklus
Abkühlung	4°C	beliebig lange	

Das erhaltene PCR-Produkt wurde in einem 1,2%-tigen Agarosegel sichtbar gemacht. Die korrekte Bande wurde aus dem Gel ausgeschnitten und mit Hilfe des UltraClean™ 15 Kit (Mobio) aufgereinigt. Das mGnRH-Rezeptor-Fragment ⁽¹⁺²⁾ wird nun mit Hilfe des Qiagen PCR Cloning Kit (Qiagen) in einen pDrive Cloning Vector kloniert und in kompetente DH5α-Zellen transformiert. Es wurde die DNA von 10 Klonen mit dem Qiaprep® Spin Miniprep Kit (Qiagen) isoliert. Ein Restriktionsenzymverdau mit EcoRI ergab, dass 2 Klone ein Insert enthielten. Daraufhin wurden beide Klone mittels T7 und SP6 Promotor Primern, deren komplementäre Sequenzen innerhalb des pDrive Cloning Vectors liegen, sequenziert.

Herstellung des 3. Mutationsfragments: mGnRH-Rezeptor ⁽³⁾

Primer:

mGnRH-Rezeptor ⁽³⁾ forward: 5'-AGT CCG TCG TGT GAC TAT TCA GCA AAA ATG GGA
CCT AAA AGG GAC CTT TTT GAG AAG TAT GG-3'
 (IBA GmbH)

mGnRH-Rezeptor ⁽³⁾ reverse: 5'-GTC TAA TTC TGA TGT CGA AAG TGA CTC ATA ATA
 TCA TCC AAT TAG CCT TAA TG-3' (IBA GmbH)

PCR-Ansatz:

mGnRH-Rluc (50 ng/μl)	1 μl
10 x Ex Taq™ Reaktionspuffer (TaKaRa)	5 μl
Ex Taq™ (TaKaRa)	0,5 μl
10 mM dNTP-Mix (TaKaRa)	2,0 μl
Primer mGnRH-Rezeptor ⁽³⁾ forward (10 pmol/μl)	2,0 μl
Primer mGnRH-Rezeptor ⁽³⁾ reverse (10 pmol/μl)	2,0 μl
Aqua bidest	37,5 μl
<i>Gesamtvolumen</i>	<i>50,0 μl</i>

PCR-Programm am Robocycler

Denaturierung:	95°C	1 Minute	1 Zyklus
Denaturierung	95°C	20 Sekunden	35 Zyklen
Annealing	60°C	30 Sekunden	35 Zyklen
Elongation	72°C	60 Sekunden	35 Zyklen
Elongation	72°C	10 Minuten	1 Zyklus
Abkühlung	4°C	beliebig lange	

Das erhaltene PCR-Produkt wurde in einem 1,2%-tigen Agarosegel sichtbar gemacht. Nachdem das Produkt anhand des aufgetragenen DNA-Größenmarkers als korrekt identifiziert wurde, wird die Bande aus dem Gel ausgeschnitten und mit Hilfe des UltraClean™ 15 Kit (Mobio) aufgereinigt. Das mGnRH-Rezeptor-Fragment ⁽³⁾ wird nun mit Hilfe des Qiagen PCR Cloning Kit (Qiagen) in einen pDrive Cloning Vector kloniert und in kompetente DH5α-Zellen

transformiert. Mit dem Qiaprep® Spin Miniprep Kit (Qiagen) wurde die DNA von 10 Klone isoliert. Ein Restriktionsenzymverdau mit EcoRI ergab, dass 4 Klone ein Insert enthielten. Daraufhin wurde ein Klon mittels T7 und SP6 Promotor Primern, deren komplementäre Sequenzen innerhalb des pDrive Cloning Vectors liegen, sequenziert.

Fusion von Mutationsfragment ₍₁₊₂₎ mit Mutationsfragment ₍₃₎

PCR-Ansatz:

DNA-Fragment ₍₁₊₂₎ (50ng/μl)	1,0 μl
DNA-Fragment ₍₃₎ (50ng/μl)	1,0 μl
10 x Ex Taq™ Reaktionspuffer (TaKaRa)	5,0 μl
Ex Taq™ (TaKaRa)	0,5 μl
10 mM dNTP-Mix (TaKaRa)	2,0 μl
Primer mGnRH-Rezeptor ₍₁₎ forward (10 pmol/μl)	2,0 μl
Primer mGnRH-Rezeptor ₍₃₎ reverse (10 pmol/μl)	2,0 μl
Aqua bidest.	36,5 μl
<i>Gesamtvolumen</i>	<i>50,0 μl</i>

PCR-Programm am Robocycler

Denaturierung:	95°C	1 Minute	1 Zyklus
Denaturierung	95°C	20 Sekunden	35 Zyklen
Annealing	60°C	30 Sekunden	35 Zyklen
Elongation	72°C	60 Sekunden	35 Zyklen
Elongation	72°C	10 Minuten	1 Zyklus
Abkühlung	4°C	beliebig lange	

Das erhaltene PCR-Produkt wurde in einem 1%-tigen Agarosegel sichtbar gemacht. Durch den ebenfalls aufgetragenen DNA-Größenmarker konnte das Produkt als korrekt identifiziert werden, woraufhin die entsprechende Bande aus dem Gel ausgeschnitten und mit Hilfe des UltraClean™ 15 Kit (Mobio) aufgereinigt wurde. Das mGnRH-Rezeptor-Fragment ₍₁₊₂₊₃₎ wurde nun mit Hilfe des Qiagen PCR Cloning Kit (Qiagen) in einen pDrive Cloning Vector kloniert und in kompetente DH5α-Zellen transformiert. Nach der DNA-Mini-Präparation mit dem Qiaprep®

Spin Miniprep Kit (Qiagen) von insgesamt 14 Klonen wurde, nach Restriktionsenzymverdau mit EcoRI, in 2 Klonen ein Insert gefunden. Beide Klone wurden mit T7 und SP6 Promotor Primern sequenziert.

Klonierung des mutierten mGnRH-Rezeptor-Genes₍₁₊₂₊₃₎ in den pGL3-Basic Luciferase Reporter Vektor

Die Klonierung des mutierten Teilbereiches der Promotorregion des mGnRH-Rezeptor-Genes₍₁₊₂₊₃₎, im weiteren Text als mGnRH-Rluc/mut bezeichnet, wurde entsprechend der oben, bei der Klonierung des nicht mutierten DNA-Abschnittes, angewandten Strategie durchgeführt.

2.2.3 Interner Kontrollvektor

Um den Einfluss der Transfektionseffizienz auf die Ergebnisse des Luciferase-Assays abschätzen zu können, wurde eine Kotransfektion von Luciferase-Vektor und pCMV-pLacZ-Vektor (Invitrogen) durchgeführt. (Genaue Durchführung siehe unten)

2.2.4 Positiver Kontrollvektor

Als Kontrollvektoren zur Validierung der Transfektionsversuche wurden zwei Plasmide verwendet, die in der Arbeit „A Molecular Mechanism Regulating Rhythmic Output from the Suprachiasmatic Circadian Clock“ (Jin et al., 1999) benutzt wurden.

Ein Plasmid enthält drei Kopien der CACGTG-E-Box des Arginin-Vasopressin-Genes samt flankierender Sequenzen, welche hintereinander in einen Luciferase Reporter Vektor (pGL3 Promotor Vektor (Promega) kloniert wurden.

Nukleotidsequenz des AVP-3-E-Boxluc:

5'-GATCTCAGGCCCACGTGTGTCCCCAGGCCCACGTGTGTCCCCAGGCCCACGTGGT
GTCCA-3'

Im zweiten Kontrollplasmid wurde die E-Box-Sequenz in GGACCT mutiert und ebenfalls in dreifacher Kopie samt flankierender Sequenzen in den pGL3 Promotor Luciferase Vektor (Promega) kloniert.

Nukleotidsequenz des AVP-3-E-Boxluc mutiert:

5'-GATCTCAGGCCGGACCTTGTCCCCAGGCCGGACCTTGTCCCCAGGCCGGACCTGT
GTCCA-3'

Diese Plasmide wurden mir freundlicherweise von Steven M. Reppert, Department of Neurobiology, University of Massachusetts Medical School zur Verfügung gestellt.

2.2.5 Expressionsvektoren

Als Expressionsvektoren für die Überexpressionsstudien dienten die folgenden Vektoren:

- 1) mousePER1-HA pcDNA 3.1.+
- 2) mousePER2-HA pcDNA 3.1.+
- 3) mouseCLOCK(C.Weitz) pcDNA 3.1.+ mutiert

Diese Expressionsvektoren wurden mir freundlicherweise von Steven M. Reppert, Department of Neurobiology, University of Massachusetts Medical School zur Verfügung gestellt.

2.2.6 Zellkultur

Die Zelllinie α T3-1

Für die Durchführung der Promotorstudien wurde die Zelllinie α T3-1, eine stabile Tumorzelllinie aus der Hypophyse der Maus ausgewählt.

Kultivierung

Die α T3-1-Zellen werden als Monolayer wachsende Zellen in Zellkulturflaschen mit 25 oder 75 cm² Bodenfläche bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Je nach Konfluenzgrad werden die Zellen circa ein-oder zweimal pro Woche 1:2 passagiert. Hierzu wird das Kulturmedium abgezogen und durch 1-2 ml vorgewärmtes Trypsin-EDTA ersetzt. Nach dreiminütiger Inkubation bei 37°C wird das Trypsin durch Zugabe des zehnfachen Volumens von frischem, serumhaltigem Kulturmedium inaktiviert. Zur vollständigen Ablösung und Vereinzelung der Zellverbände wird die Suspension mehrfach auf-und abpipettiert und schliesslich in ein steriles 50 ml Röhrchen

überführt. Nach vierminütiger Zentrifugation bei 1200 UpM wird der Überstand verworfen und das Pellet in frischem Zellkulturmedium resuspendiert. Die Zellsuspension wird 1:2 geteilt und in neue Zellkulturflaschen ausgesät.

Für die unten beschriebenen Transfektionen wurden Zellen der Passagen 23-25 verwendet.

Zellkulturmedium:

DMEM (4,500 mg/L D-Glucose, mit Phenolrot, ohne L-Glutamin, Sigma)	440 ml
Fötale Kälber Serum „Gold“ (PAA Laboratories GmbH)	50 ml
L-Glutamin 200 mM (Gibco BRL)	50 ml
Penicillin (10000 U/ml) (Gibco BRL)	5 ml
Streptomycin (100 µg/ml) (Gibco BRL)	5 ml

Aussaat der Zellen für die Transfektion

Die α T3-1-Zellen werden 24 Stunden vor der Transfektion in 24 Well Platten ausgesät. Hierzu werden die Zellen, wie oben beschrieben, trypsinisiert und nach der Zentrifugation in 10ml antibiotikafreiem Kulturmedium resuspendiert und mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer gezählt. Die Zellsuspension wird mit antibiotikafreiem Zellkulturmedium auf eine Zellzahl von 5×10^5 Zellen/ml eingestellt und mit einem Milliliter pro Well ausgesät.

2.2.7 Transfektion

Für diese Arbeit wurde das kationische Lipidreagenz Lipofectamin® (Invitrogen) benutzt, welches das polykationische Lipid 2,3-dioleyloxy-N-[2(spermincarboxamido)ethyl-N,N-dimethyl-1-propanaminium trifluoroacetate (DOSPA) sowie das neutrale Lipid Dioleoylphosphatidyl-ethanolamine (DOPE) enthält.

Für die durchgeführten Transfektionen gelten folgende allgemeine Prinzipien:

- ❖ Es wurden pro Transfektion 700 ng DNA pro Well eingesetzt, wobei die verwendeten Plasmide auf eine Konzentration von 100 ng/µl eingestellt wurden.
- ❖ Um die transfizierte DNA-Menge während jeder Transfektion identisch bei 700 ng zu halten, wurde je nach Versuchsanordnung die entsprechende Menge des Vektors pcDNA 3.1.+ (Invitrogen) kotransfiziert.

- ❖ Für die Transfektion von 700 ng DNA wurden 3,5 µl Lipofectamin® benutzt.
- ❖ Während der gesamten Transfektion wurde auf die Zugabe von Antibiotika verzichtet.
- ❖ Alle Transfektionen wurden innerhalb eines Versuches in dreifacher Ausführung, d.h. als Triplikate durchgeführt.
- ❖ Alle beschriebenen Versuche wurden mindestens dreimal wiederholt.
Im Ergebnisteil erfolgt die Präsentation eines exemplarischen Ergebnisses.

Durchführung:

Zunächst wurden die verschiedenen Plasmide entsprechend der unten beschriebenen Mengenangaben mit 18 µl Opti-MEM® I Reduced Serum Media (Gibco BRL) auf ein Gesamtvolumen von 25 µl verdünnt.

Für jedes zu transfizierende Well wurden 3,5 µl Lipofectamin® mit 21,5 µl Opti-MEM® I Reduced Serum Media (Gibco BRL) auf ein Gesamtvolumen von 25 µl verdünnt. Die beiden Lösungen wurden in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß vereint und 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

Während der Inkubationszeit wurde von den, am vorherigen Tag ausgesäten, Zellen das Kulturmedium abgezogen und durch 200 µl vorgewärmtes Opti-MEM® I Reduced Serum Media (Gibco BRL) pro Well ersetzt.

Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde der DNA/Lipofectamin®-Komplex vorsichtig auf die Zellen pipettiert und durch leichtes Schwenken der Zellkulturplatte über die Zellen verteilt.

Die Zellen wurden nun 3 Stunden bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert.

Danach wurde Transfektionsgemisch von den Zellen abgezogen und durch 1ml frisches Zellkulturmedium ohne Antibiotika pro Well ersetzt und für weitere 48 Stunden bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Im Anschluss erfolgte die Auswertung der Transfektionen mit Hilfe der unten beschriebenen Assays.

Im Weiteren erfolgt die tabellarische Darstellung der eingesetzten DNA-Mengen der einzelnen Transfektionsexperimente :

Untersuchung der Bedeutung der E-Box-Motive für den mGnRH-Rezeptor-Promotor

	Probe 1	Probe 2	Probe 3	Probe 4	Probe 5
pGL3-Basic	100 ng				
mGnRH-Rluc		100 ng			
mGnRH-Rluc/mut			100 ng		
AVP-3-E-Boxluc				100 ng	
AVP-3-E-Boxluc/mutiert					100 ng
pCMV-Lac-Z	100 ng				
pcDNA 3.1.+	500 ng				

Untersuchung des Einflusses von mutiertem CLOCK auf den mGnRH-Rezeptor-Promotor

	Probe 1	Probe 2	Probe 3	Probe 4	Probe 5
pGL3-Basic	100 ng				
mGnRH-Rluc		100 ng	100 ng	100 ng	100 ng
pCMV-Lac-Z	100 ng				
pcDNA3.1.+	500 ng	500 ng	450 ng	250 ng	-
CLOCK pcDNA3.1.+ mut			50 ng	250ng	500 ng

Untersuchung des Einflusses von mPER1 auf den mGnRH-Rezeptor-Promotor

	Probe 1	Probe 2	Probe 3	Probe 4	Probe 5
pGL3-Basic	100 ng				
mGnRH-Rluc		100 ng	100 ng	100 ng	100 ng
pCMV-Lac-Z	100 ng				
pcDNA3.1.+	500 ng	500 ng	450 ng	250 ng	-
mPER1-HA pcDNA 3.1.+			50 ng	250 ng	500 ng

Untersuchung des Einflusses von mPER2 auf den mGnRH-Rezeptor-Promotor

	Probe 1	Probe 2	Probe 3	Probe 4	Probe 5
pGL3Basic	100ng				
mGnRH-Rluc		100ng	100ng	100ng	100ng
pCMV-Lac-Z	100ng	100ng	100ng	100ng	100ng
pcDNA 3.1.+	500ng	500ng	450ng	250ng	-
mPER2-HA pcDNA 3.1.+			50ng	250ng	500ng

2.2.8 Luciferase-Assay

Durchführung:

Nach Ablauf der 48-stündigen Inkubationszeit im Anschluss an die Transfektion wird das Kulturmedium von den Zellen abgezogen und die Zellen werden vorsichtig mit vorgewärmtem D-PBS (Dulbecco's Phosphate-Buffered salines) (Gibco BRL) gewaschen, um Mediumreste vollständig zu entfernen.

Die Zellen werden nun mit 100 µl Reporter-Lysis-Puffer bedeckt, für fünf Minuten bei -80°C eingefroren und im Anschluß circa 20 Minuten auf Eis aufgetaut.

Das entstandene Zellysat wird in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und eine Minute bei 7000 UpM zentrifugiert. Es erfolgt nun eine Überführung des Überstandes in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß.

Die Messung der Luciferase-Aktivität erfolgt mit einer Messdauer von drei Sekunden im Luminometer. Vor der jeweiligen Messung muss zunächst eine Eichung des Gerätes durchgeführt werden. Hierzu wird zunächst ein leeres Plexiglasröhrchen in das Gerät eingebracht und eine erste Messung durchführt. Die gemessenen Lichteinheiten werden als sogenannter Hintergrund gespeichert und jeweils von den eigentlichen Messergebnissen der Einzelproben abgezogen.

Zur Messung der Luciferase-Aktivität der vorbereiteten Proben werden jeweils 50 µl Luciferase Assay Reagenz in ein Plexiglasröhrchen vorgelegt, mit 20 µl des Zellextraktes vermischt und sofort im Luminometer gemessen.

2.2.9 Beta-Gal-Assay

Durchführung:

Der Test wurde mit den unter Punkt 2.2.8 beschriebenen Zellysaten durchgeführt. Zunächst werden die Zellextrakte (nach Entnahme der 20 µl für den Luciferase-Assay) für eine Stunde bei 50°C im Heizblock inkubiert, um die Aktivität der eukaryontischen β -Galactosidase zu verringern.

Für die enzymatische Reaktion werden nun je 100 µl des Substrat-Reagenz des Assay-Systems mit je 25 µl der verschiedenen Zellextrakte in einem Plexiglasröhrchen vermischt. Die Röhrchen werden danach mit einem Parafilm verschlossen und für 45 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

Die Messung der β -Galactosidase-Aktivität erfolgt am Luminometer. Das Gerät muss hierzu vor der Messung geeicht werden (siehe Punkt 2.2.8). Es werden dann jeweils 50 µl Initiations-Reagenz des Assay-Systems zu einer Probe gegeben und sofort für fünf Sekunden gemessen.

2.2.10 Western Blot

Isolierung der Gesamt-Proteine aus α -T3-1-Zellen

Die Isolierung der cytosolischen und nukleären Proteinfractionen der α -T3-1-Zellen erfolgt nach einer modifizierten Methode nach Sadamitsu et al., 2001.

Zunächst werden die α T3-1-Zellkulturen, die sich in Kulturflaschen mit einer Oberfläche von 75 cm² befinden, mit 5 ml kaltem PBS gewaschen. Die Zellen werden nun wiederum mit 5 ml kaltem PBS (Gibco BRL) bedeckt und mit einem Zellschraber von der Oberfläche der Kulturflasche abgelöst. Diese Lösung wird in ein Sarstedt-Röhrchen überführt und bei 800 UpM bei 4°C für 5 Minuten zentrifugiert.

Das entstandene Pellet wird in 100 μ l Puffer A resuspendiert, wobei der Überstand verworfen wird und für 5 Minuten auf Eis inkubiert. Nach erfolgter Homogenisierung im Glashomogenisator werden 100 μ l Puffer B hinzugefügt. Die Lösung wird nun bei 1000 UpM bei 4°C für 5 Minuten zentrifugiert. Der entstandene Überstand enthält die cytosolische Proteinfraction. Das Pellet enthält die nukleäre Proteinfraction und wird in 100 μ l Puffer C resuspendiert und bei 4°C für eine Stunde inkubiert.

Diese Lösung wird nun bei 1400 UpM bei 4°C für 5 Minuten zentrifugiert. Der entstandene Überstand enthält die Kernfraction der Proteine der Zellen.

Die Konzentration der Proteine wird mit Hilfe der Bradford-Methode gemessen.

Die Proteinlysate werden bei -80°C eingefroren und für die spätere SDS-Page-Elektrophorese sowie den Western-Blot benutzt.

Puffer A:

10 mM HEPES (pH 7,9)

10 mM KCl

1,5 mM MgCl₂

0,25 % NP-40

1mM DTT

0,1 mM PMSF

1x cOmplete Protease Inhibitor Cocktail Tablets (Roche)

Puffer B:

10 mM HEPES (pH 7,9)
10 mM KCl
1,5 mM MgCl₂
0,5 M Sucrose
0,1mM PMSF
1x cOmplete Protease Inhibitor Cocktail Tablets (Roche)

Puffer C:

20 mM HEPES (pH 7,9)
1,5 mM MgCl₂
1mM DTT
0,2 mM PMSF
1x cOmplete Protease Inhibitor Cocktail Tablets (Roche)
0,42 M NaCl
15% Glycerol

Messung der Proteinkonzentration

Die Messung der Proteinkonzentration der Proteinlysate der α T3-1-Zellen erfolgte mit Hilfe des BioRad-Protein-Assays (Biorad) nach der Bradford-Methode unter Verwendung von BSA als Proteinstandard. Die Auswertung des Assays wurde im Spectrophotometer im Programm „Bradford Coomassie Blue Binding at 595 nm“ durchgeführt.

Gemessene Konzentration der cytoplasmatischen Proteinfraktion: c = 5,3 mg/ml

Gemessene Konzentration der nukleären Proteinfraktion: c = 5,7 mg/ml

SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page)

Durchführung:

Die Lösung für das 12%-tige SDS-Trenngel wird vorsichtig in die vorbereitete Gelgiessform eingegossen und mit Aqua bidest. bedeckt. Nach der Polymerisation des Trenngels (circa 1 Stunde) erfolgt eine Überschichtung mit unpolymersiertem 5%-tigem Sammelgel, in welches ein Probenkamm zur Formung der späteren Probenaschen am oberen Rand der Gelgiessform eingebracht wird. Nach abgeschlossener Polymerisation des Sammelgels (circa 1 Stunde) wird der Probenkamm vorsichtig entfernt und das Gel-Glas-Sandwich wird in der Minigel-Twin-Apparatur befestigt. Die untere Pufferkammer wird so weit mit 1 x TGS-Puffer (Gibco BRL) be-

füllt, dass das Gel circa 1 cm in die Flüssigkeit eintaucht. Die obere Pufferkammer wird ebenfalls mit 1x TGS-Puffer (Gibco BRL) befüllt, wobei das Gel gut überschichtet sein sollte.

12% SDS-Trenngel (10ml)

3,3 ml Aqua bidest.
4,0 ml 30% Acrylamid/Bisacrylamid Mix (Carl Roth)
0,1 ml 1,5 M Tris (pH 8,8)
0,1 ml 10% Ammoniumpersulfat
0,004 ml TEMED

5% Sammelgel (5ml)

3,4 ml Aqua bidest.
0,83 ml 30% Acrylamid/Bisacrylamid Mix (Carl Roth)
0,63 ml 1,0 M Tris (pH 6,8)
0,05 ml 10% SDS
0,05 ml 10% Ammoniumpersulfat
0,005 ml TEMED

Probenvorbereitung:

Cytoplasmatische Proteinfraktion

15µl Cytoplasmatische Proteinfraktion α T3-1 (c = 5,3 mg/ml)
5µl SDS-Probenpuffer

Dieser Probenansatz wird insgesamt viermal vorbereitet.

Nukleäre Proteinfraktion

14µl Nukleäre Proteinfraktion α T3-1 (c = 5,7 mg/ml)
4µl SDS-Probenpuffer

Dieser Probenansatz wird insgesamt viermal vorbereitet.

Proteinmarker

8µl Bench Mark™ Prestained Protein Ladder (Invitrogen)

SDS-Probenpuffer

40 mM TrisHCl (pH 6,8)

2% SDS

8% Glycerin

3% β -Mercaptoethanol

0,01% Bromphenolblau

1mM EDTA

Alle Proben, außer dem Protein Marker, zunächst mit 4 x SDS-Probenpuffer mischen, für fünf Minuten bei 94°C erhitzen, eine Minute bei Raumtemperatur abkühlen und danach für 30 Sekunden bei Höchstgeschwindigkeit vortexen. Danach werden die Proben in die Probentaschen des Geles eingebracht und es erfolgt die elektrophoretische Auftrennung für circa eine Stunde bei 125 Volt.

Proteintransfer

Durchführung:

Der Proteintransfer aus dem Polyacrylamidgel auf eine PVDF-Membran erfolgt im SemiDry-Blotting Verfahren unter Verwendung eines kontinuierlichen Puffersystems nach Bjerrum und Schafer Nielsen (1986).

Die PVDF-Membran wird kurz in 100%-tigem Methanol eingeweicht, mit Aqua bidest. gewaschen und in SemiDry-Blotting Puffer eingelegt. Zunächst werden nun drei, in SemiDry-Blotting Puffer eingeweichte, Blotting-Papiere luftblasenfrei auf die untere Elektrodenplatte der Blotting-Apparatur aufgelegt. Das äquilibrierte Gel wird sorgfältig luftblasenfrei und glatt auf die Blotting-Papiere aufgelegt. Die PVDF-Membran wird auf das Gel plaziert und mit drei, ebenfalls in Blotting-Puffer eingeweichten, Blotting-Papieren bedeckt. Der Western-Blot erfolgt mit einer Stromstärke von 150 mA über einen Zeitraum von einer Stunde.

Die PVDF-Membran wird für das weitere Vorgehen in vier Streifen geschnitten, so dass entsprechend dem vorherigen Auftragen der Proben jeweils zwei PVDF-Streifen mit Kern- und Cytoplasmafraktion für die spätere Detektion des CLOCK-Proteins, sowie zwei Streifen für die Detektion von BMAL1 zur Verfügung stehen.

SemiDry Blotting Puffer (nach Bjerrum, 1986) (pH 9,0 - 9,4)

48 mM Tris-Base (TRIZMA)

39 mM Glycin (Merck)

0,0375% SDS

20% Methanol

Immundetektion

Durchführung:

Blockierung unspezifischer Bindungsstellen auf der PVDF-Membran

Die vier PVDF-Membranstreifen werden nach dem Abschluss des Blottens circa 1 Minute in 1 x TBS gewaschen. Danach werden die Membranen in Blocking Reagenz (Roche) eingelegt und für eine Stunde unter sanftem Schütteln in einer flachen Plastikschaale bei Raumtemperatur inkubiert.

1 x TBS-Puffer

20 mM Tris

137 mM NaCl

mit HCl pH auf 7,6 einstellen

Blocking Reagenz

1% Blocking Reagenz (Roche) in Puffer (0,15 M NaCl; 0,1 M Maleinsäure; pH 7,5) gelöst

Bindung des Primärantikörpers

Die PVDF-Membranen werden aus der Blockierungslösung genommen und direkt mit dem primären Antikörper inkubiert.

Vorbereitung der primären Antikörperlösungen:

- Probe 1) 15 µl CLOCK (S-19)(Santa Cruz) in 3 ml TBS (auf eine Antikörperkonzentration von 1:200) verdünnen
- Probe 2) 15 µl CLOCK (S-19) (Santa Cruz) + 20 µl Neutralizing Peptide CLOCK (sc-6927) (Santa Cruz) in 3 ml TBS (auf eine Antikörperkonzentration von 1:200) verdünnen und über Nacht bei 4 °C inkubieren
- Probe 3) 10 µl BMAL1 (BioReagents) in 3 ml TBS (auf eine Antikörperkonzentration 1:300) verdünnen
- Probe 4) 10 µl BMAL1 (BioReagent) + 20 µl Neutralizing Peptide BMAL1 PEP-075 (BioReagent) in 3 ml TBS (auf eine Antikörperkonzentration von 1:300 verdünnen) und über Nacht bei 4 °C inkubieren

Jeweils eine der vier Blot-Membranen wird mit einer der oben beschriebenen Antikörperlösungen in einer flachen Plastikschiene unter sanftem Schütteln bei 4 °C über Nacht inkubiert.

Bindung des Sekundärantikörpers

Die PVDF-Membranen werden dreimal jeweils für 5-10 Minuten in TBST gewaschen. Im Anschluss erfolgt die Inkubation mit dem sekundären Antikörper für eine Stunde unter sanftem Schütteln in einer flachen Plastikschiene bei Raumtemperatur.

1x TBST-Puffer

1x TBS-Puffer + 0,05% Tween 20

Vorbereitung der sekundären Antikörperlösung:

Alle Verdünnungen der Antikörperlösungen werden in TBS-Puffer vorgenommen.

Primärer Antikörper CLOCK:

Probe 1) CyTM 5-conjugated Rabbit Anti-Goat IgG (Dianova) in der Konzentration 1:200

Probe 2) CyTM 5-conjugated Rabbit Anti-Goat IgG (Dianova) in der Konzentration 1:200

Primärer Antikörper Bmal1:

Probe 3) CyTM5-conjugated Goat Anti-Rabbit IgG (Dianova) in der Konzentration 1:200

Probe 4) CyTM5-conjugated Goat Anti-Rabbit IgG (Dianova) in der Konzentration 1:200

Danach werden alle Membranen dreimal für 10 Minuten in TBST gewaschen. Die Auswertung des gesamten Verfahrens erfolgt daraufhin im Scanner Typ Storm 860 im Red Fluorescence/ Chemifluorescence Bereich mit Hilfe des Programms IMAGE Quant 5.0 (Molecular Dynamics).

3 Ergebnisse

3.1 Der Promotor des mGnRH-Rezeptors-Gens

Zur Überprüfung der Frage, ob das mGnRH-Rezeptor-Gen zu den sog. „clock-controlled genes“ zählt, wurde zunächst die Promotorregion des Genes *Mus musculus gonadotropin releasing hormone receptor*, 5'-flanking region (Genbank NCBI; Accessionnumber: L35109) auf das Vorhandensein von CANNTG-E-Box-Motiven überprüft, die als klassische Bindungsstellen für die Transkriptionsfaktoren CLOCK und BMAL1 gelten.

Für die Studien dieser Arbeit wurde daraufhin ein Bereich der Promotorregion ausgewählt, der fünf dieser CANNTG-E-Box-Motive enthält:

```
5'-(-48)1agccgcgtgtgactattcagcaaaatgcaattgaaaagcaattgtttgagaagtatggtcttcaaacaacagatttaaatt
ggatcgggattttaaacttttctgtatttcattttgtatctgtctagtcacaacagtttttagaaaacctattcattaaggctaattggatgaa
tatgagtcactttcgacatagaattagactcaagtgccctcctcacctacgataaaaagacgggcacatctgctgaggggctacggta
cacttggccttcaggagggcttggcatgtctgttagcactcttttagataaaaccgaaaacaagtttaccttgatctttcacgtaagtc
cagagtatcttgggaaaaataaattaggcagaaatgtaacctgtgacgtttccatctaaaggaggcgacatcaacagcgcttcgcgt
tcagttatgataaaacatcagaAGTaacagggactccactcttgaagcctgtccttgaga39-3'
```

3.2 Überprüfung der klonierten Luciferase-Reporter-Konstrukte

Die für die Promotor-Studien klonierten Vektor-Konstrukte müssen vor ihrer Verwendung auf Korrektheit überprüft werden. Die Überprüfung der Luciferase-Reporter-Konstrukte mGnRH-Rluc und mGnRH-luc/mut erfolgt mit Hilfe von Restriktionsenzymverdau und Sequenzierung. Das klonierte Insert aus der Promotorregion des mGnRH-Rezeptorgens hat eine Größe von 520 bp. Dieses Fragment wurde zunächst in einen pDrive Cloning Vector (Qiagen) eingeführt und dann mittels Restriktionsenzymen aus diesem Vektor ausgeschnitten. Durch die Auswahl der Restriktionsendonucleasen KpnI und SacI entstand nach dem Verdau des mGnRH-Rezeptor/pDrive Cloning Vektors ein 633 bp grosses Genfragment, welches mit Hilfe einer T₄-DNA-Ligase in einen pGL3-Basic Luciferase Reporter Vektor (Promega) kloniert wurde.

Während der Klonierung (Ligation und Transformation) bestehen kaum Möglichkeiten zur Kontrolle, ob dieser Vorgang in allen Teilschritten erfolgreich war. Deshalb wurde ein sog. diagnostischer Restriktionsenzymverdau durchgeführt werden, mit dem überprüft wird, ob die isolierten Klone wirklich das gewünschte Insert beinhalten. Zu diesem Zweck werden die oben beschriebenen Klone mit EcoRI verdaut, dessen Schnittstelle sich im pDrive Cloning Vector auf

beiden Seiten der Multi-cloning-site, jedoch nicht im klonierten Insert, befindet. Enthält das verdaute Plasmid also das gewünschte Insert, so ist dieses später im Agarosegel als spezifische Bande sichtbar.

Gelelektrophoretische Darstellung des Restriktionsenzymverdaus der mGnRH-RIuc-Klone

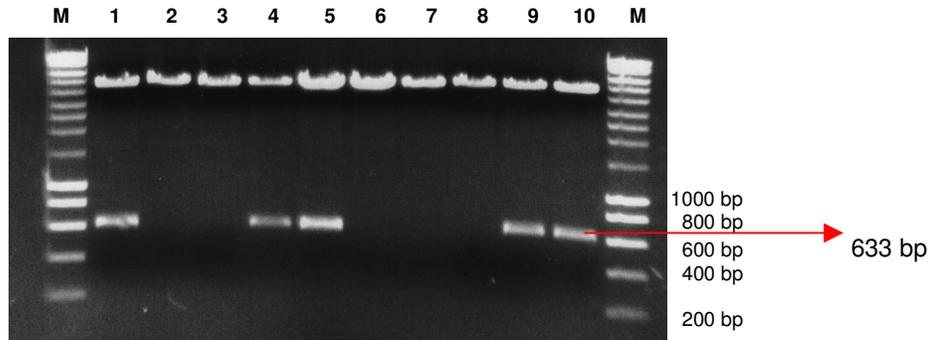


Abb. 3: Restriktionsenzymverdaus der Klone 1-10 mGnRH-luc (mGnRH-Rezeptor/pGL3-Basic) mit *SacI* und *KpnI* (M = Marker)

Sequenzierung des Luciferase-Reporter-Konstruktes mGnRH-RIuc

Aufgrund der Ergebnisse des Restriktionsverdaus und der gelelektrophoretischen Darstellung wurde deutlich, dass sich das gewünschte Insert in insgesamt fünf Klonen befand. Es wurde daraufhin Klon Nr. 10 willkürlich ausgewählt und sequenziert. Die Ergebnisse der Sequenzanalysen wurden mit Hilfe des NCBI Standard Nucleotide BLAST überprüft. Es zeigte sich, dass das klonierte Luciferase-Reporter-Konstrukt die korrekte Sequenz (siehe 3.1) des ausgewählten Promotorbereiches des mGnRH-Rezeptorgens enthielt.

Gelelektrophoretische Darstellung des Restriktionsenzymverdaus der mGnRH-Rluc/mut-Klone

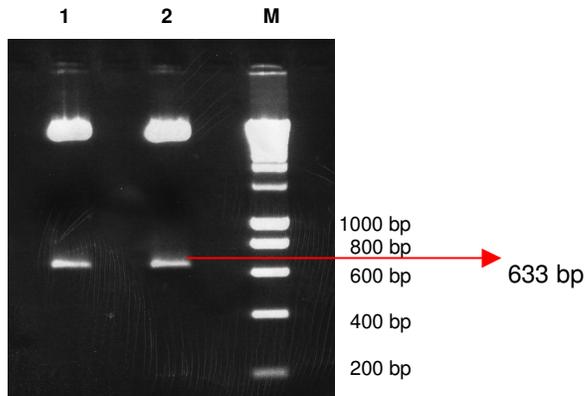


Abb. 4: Restriktionsenzymverdaus der Klone 1-2 des mGnRH-Rluc/mut mit *SacI* und *KpnI* (M = Marker)

Sequenzierung des Luciferase-Reporter-Konstruktes mGnRH-Rluc/mut

Aufgrund der Ergebnisse des Restriktionsverdaus wurde Klon C1-5 sequenziert. Die Ergebnisse der Sequenzanalyse durch Abgleich mit der Sequenz des Genes „*Mus musculus gonadotropin-releasing hormone receptor*, 5'-flanking region“ (Genbank NCBI; Accession: L35109) überprüft. Es zeigte sich, dass alle Mutationen in gewünschter Weise in die ansonsten unverändert erhaltene Sequenz eingeführt worden sind, d.h. der Bereich der CANNTG-E-Box-Motive wurde jeweils in eine GGACCT-Sequenz verändert.

Es ergibt sich für das Reporterplasmid mGnRH-Rluc/mut folgende Sequenz, die die veränderte Promotorregion mit fünf mutierten E-Box-Motiven enthält:

```
5'(-)481 agtccgctcgtgtgactattcagcaaaatgggacctaaaagggaccttttgagaagtatggtcttcaaacaacagattttaa
gatcgggatttttaattacttttctgtatttcattttgtatctgtctagtcacaacagtttttagaaaacctattcattaaggctaattggatgata
tatgagtcactttcgacatagaattagactcggaccttcctcctcacctacgataaaaagacgggcggacctctgaggggctacggg
aggacctgccttcaggaggcctggcatgttctgtagcactcttttagattataaacgaaaaacaagttaccttgatctttcacgtagt
ccagagtatctgggaaaaataaattaggcagaaatgtaacctgtgacgtttccatctaaaggaggcgacatcaacagcgcttcgc
gttcagttatgataaaacatcagaAGTaacagggactccactctgaagcctgtccttgagaa(39)-3'
```

3.3 Auswahl und Charakterisierung der Zelllinie α T3-1

Für die Durchführung der Promotorstudien wurde die Zelllinie α T3-1, eine Tumorzelllinie aus der Hypophyse der Maus ausgewählt. Zur genaueren Charakterisierung der Zelllinie α T3-1 erfolgte ein Nachweis der Transkriptionsfaktoren CLOCK und BMAL1 mit Hilfe der Western-Blot Technologie.

Mittels Western Blot ist es möglich einzelne Proteine spezifisch nachzuweisen. Diese Methode basiert zunächst auf einer Trennung der Proteine. Im weiteren Verlauf werden die Proteine von Interesse mit Hilfe immunologischer Verfahren nachgewiesen. Die Proben z.B. Zellextrakte werden auf ein SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetragen, um die Proteine elektrophoretisch nach ihrer Größe aufzutrennen. Im nächsten Arbeitsschritt, dem eigentlichen Blotten, werden die aufgetrennten Proteine mittels Elektrotransfer auf eine Nitrocellulose-oder PVDF (Polyvinylidenfluorid)-Membran übertragen. Als Kontrolle des Transfers ist eine Färbung des Geles mit Coomassie oder der Membran mit Ponceau Red möglich. Vor der Inkubation mit spezifischen Antikörpern muss die Blockierung unspezifischer Bindungsstellen auf der Membran erfolgen. Die Membran wird nun mit dem primären Antikörper inkubiert. Hierbei handelt es sich um einen spezifischen Antikörper, der mit dem zu analysierenden Protein einen Protein-Antikörper-Komplex bildet, welcher weiterhin auf der Membran anhaftet. Zum meßbaren Nachweis des Proteins ist ein zweiter Antikörper notwendig. Dieser zweite Antikörper kann mit einem Enzym z.B. Horse Radish Peroxidase (HRP) oder wie in dieser Arbeit verwendet, mit CyTM-5 verknüpft sein. Cyanin (CyTM-5) ist ein fluoreszierender Farbstoff, welcher Licht im Bereich von 649-670 nm emittiert. Nach der Bindung des zweiten Antikörpers an den Protein-Antikörper-Komplex auf der Membran, erfolgt eine Detektion des zu untersuchenden Proteins (Gassen et al., 1999).

Nachweis von CLOCK-Protein in α T3-1-Zellen

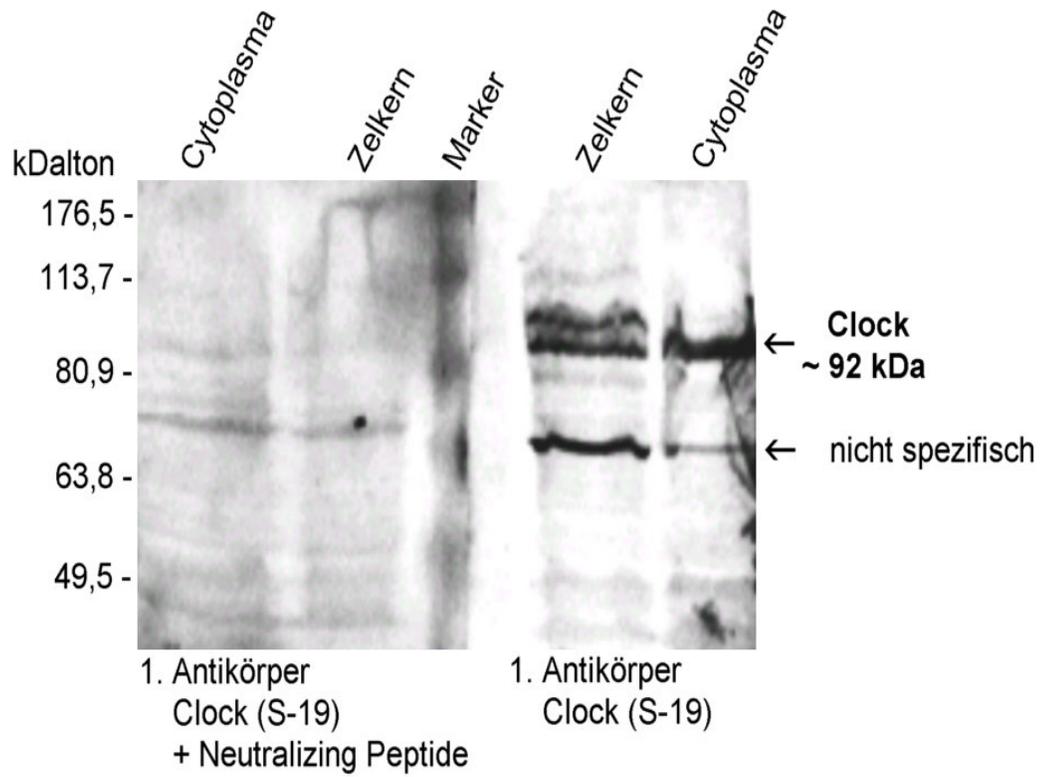
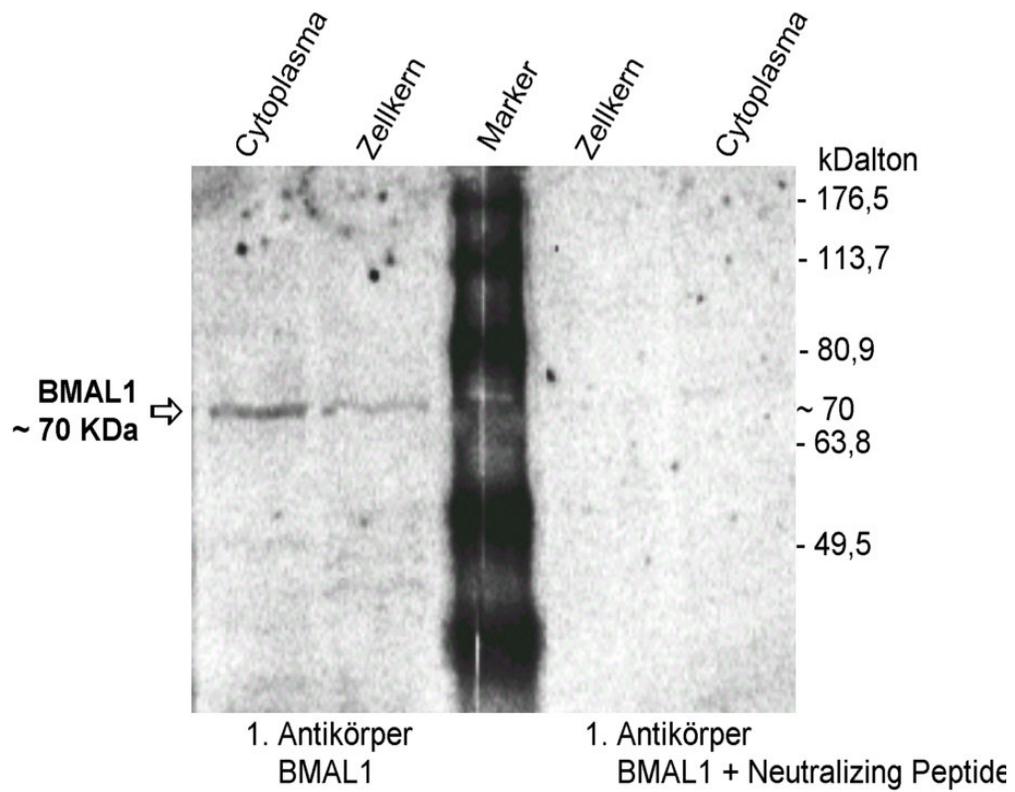


Abb. 5: Western-Blot mit CLOCK (s-19)-Antikörpern in α T3-1-Zellysaten

Nachweis von BMAL1-Protein in α T3-1-Zellen**Abb. 6:** Western-Blot mit BMAL1-Antikörpern in α T3-1-Zelllysaten

3.4 *In vitro*-Studien

Die Messung der Luciferase-Aktivität der transfizierten Zellen erfolgte mit Hilfe des Luciferase Assay Systems (Promega). Das Enzym Luciferase aus dem nordamerikanischen Leuchtkäfer *Photinus pyralis* katalysiert in Gegenwart von ATP und Mg^{2+} die oxidative Decarboxylierung von Luciferin. Dabei entstehen Lichtblitze, die sich zum Leuchten dieser Tiere aufaddieren. Zum Nachweis der Luciferaseexpression in transfizierten Zellen, werden die Zellen lysiert, und das Zellhomogenat wird mit Luciferin und ATP gemischt. Die dabei auftretende Lumineszenz zeigt die Expression von Luciferase an.

Die Messung der Beta-Galactosidase-Aktivität erfolgte mit Hilfe des Beta-Gal Reporter Gene Assay, chemiluminescent (Roche). Das Testprinzip des Beta-Gal-Assays beruht auf einem zweischrittigen Verfahren. Im ersten Schritt wird das, im Substrat-Reagenz des Tests enthaltene, Galacton PlusTM durch die, in der Probe vorkommende, β -Galactosidase deglykosiliert. Diese Reaktion, bei der als stabiles Zwischenprodukt 1,2-Dioxetan entsteht, erfolgt bei einem pH von 7,8. Bei diesem pH-Wert emittiert Dioxetan kein Licht. Durch Zugabe des Initiations-Reagenz im zweiten Schritt des Assays kommt es zu einer pH-Wertverschiebung in den stark basischen Bereich. Daraufhin erfolgt eine Deprotonierung von 1,2-Dioxetan, welches nun Licht mit einer Wellenlänge von 475 nm emittiert.

Normalisierung der Testergebnisse

Um die Transfektionseffizienz mit in die Beurteilung der Luciferase-Aktivität der Reportergen-Konstrukte einbeziehen zu können, wurden die Testergebnisse der Luciferase-Assays (Luc) und β -Galactosidase-Assays (Gal) miteinander verrechnet. Zur Einordnung der Stärke der Promotoraktivität der Luciferase-Konstrukte erfolgte die graphische Darstellung der gemessenen Luciferaseaktivität in RLA (Relative Luciferase Aktivität) im Ergebnisteil dieser Arbeit.

Die Einheit RLA ist hierbei folgendermaßen definiert:

$$RLA = \text{Luc}_{(\text{Konstrukt})} / \text{Gal} / \text{Luc}_{(\text{pGL3-Basic})} / \text{Gal}$$

Statistische Analysen

Für die *in vitro*-Studien wurden dreifache Werte (Triplikate) für jeden Datenpunkt errechnet. Die Präsentation der Daten innerhalb der Graphiken erfolgte als Mittelwert \pm Standardfehler des

Mittelwertes (SEM = standard error of the mean). Die statistische Analyse der Daten einer Versuchsserie erfolgte mit dem Student-t-Test. Eine Irrtumswahrscheinlichkeit von 5% ($p < 0,05$) wurde als statistisch signifikant betrachtet. Für die Durchführung der Berechnungen sowie die Erstellung der Graphiken wurde das Software-Programm GraphPad Prism (GraphPad Software, Inc., CA, USA) benutzt.

Bedeutung der CANNTG-E-Box-Motive für den mGnRH-Rezeptor-Promotor

Zunächst wurde die Bedeutung der CANNTG-E-Box-Motive für den mGnRH-Rezeptor-Promotor untersucht. Es erfolgten transiente Transfektionen des unmutierten sowie des mutierten mGnRH-Rezeptor Luciferase-Reporter-Konstruktes in α T3-1-Zellen.

Zur Validierung der Ergebnisse der mGnRH-Rluc bzw. mGnRH-Rluc/mut-Konstrukte wurden zusätzliche Transfektionsexperimente mit CACGTG-Arginin-Vasopressin(AVP)E-Box-Luciferase-Reporter-Konstrukten durchgeführt.

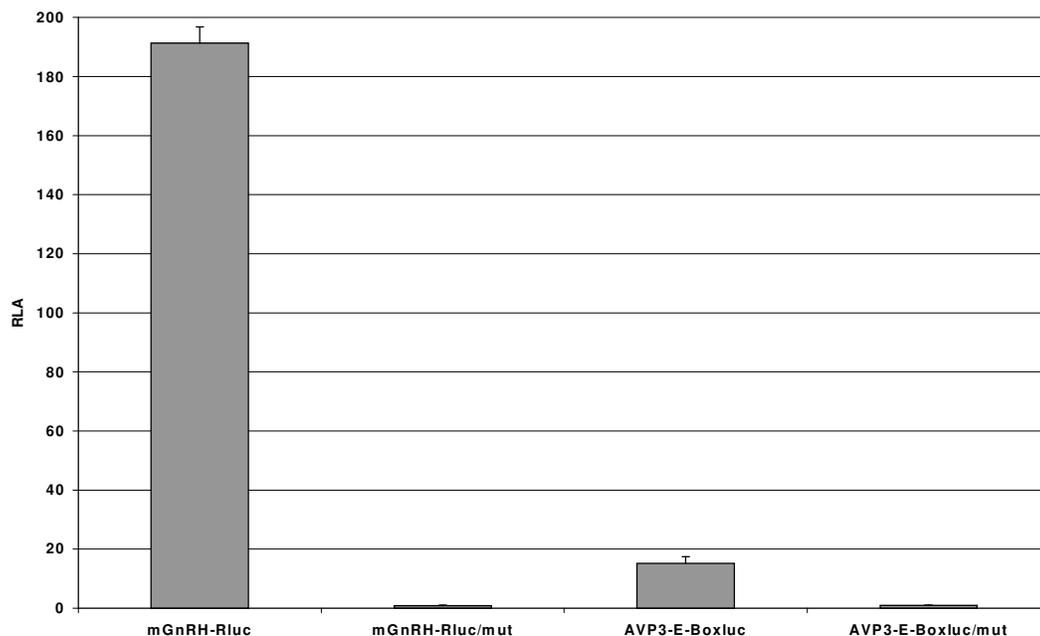


Abb. 7: Bedeutung der CANNTG-E-Box-Motive für den mGnRH-Rezeptor-Promotor. Darstellung der normalisierten Luciferaseaktivität in RLA als Mittelwert aus drei Einzelmessungen \pm SEM (Standardfehler des Mittelwertes)

Der Promotor des mGnRH-Rluc-Reporter-Konstruktes zeigt innerhalb von α T3-1-Zellen eine 191,3-fach höhere Aktivität als der virale SV40-Promotor des pGL3-Basic Luciferase Vektor.

Die Promotor des mutierten mGnRH-Rluc/mut-Reportergenes zeigt nach Transfektion nur eine sehr geringe Aktivität (RLA = 0,85).

Die Transkriptionsaktivität des AVP3-E-Box-Luciferase-Reporter-Konstruktes ist in α T3-1-Zellen signifikant erhöht (RLA = 15,2), während das mutierte AVP3-E-Box-Luciferase-Reporter-Konstrukt nur eine minimale Promotoraktivität zeigt (RLA = 0,99).

Überexpressionsversuche mit mutiertem CLOCK- Δ -19

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Transkription des mGnRH-Rezeptor-Genes über eine Aktivierung der CANNTG-E-Box-Elemente reguliert zu werden scheint. Klassischerweise erfolgt die Aktivierung der CANNTG-E-Box-Elemente über Bindung von CLOCK:BMAL1-Heterodimeren. Ob diese Art der Signaltransduktion auch für das mGnRH-Rezeptor-Gen gilt, wurde in weiteren Transfektionsexperimenten untersucht. Es erfolgte eine Cotransfektion von mGnRH-Rluc und einem Expressionsvektor, der für ein mutiertes CLOCK-Protein (CLOCK- Δ -19) kodiert.

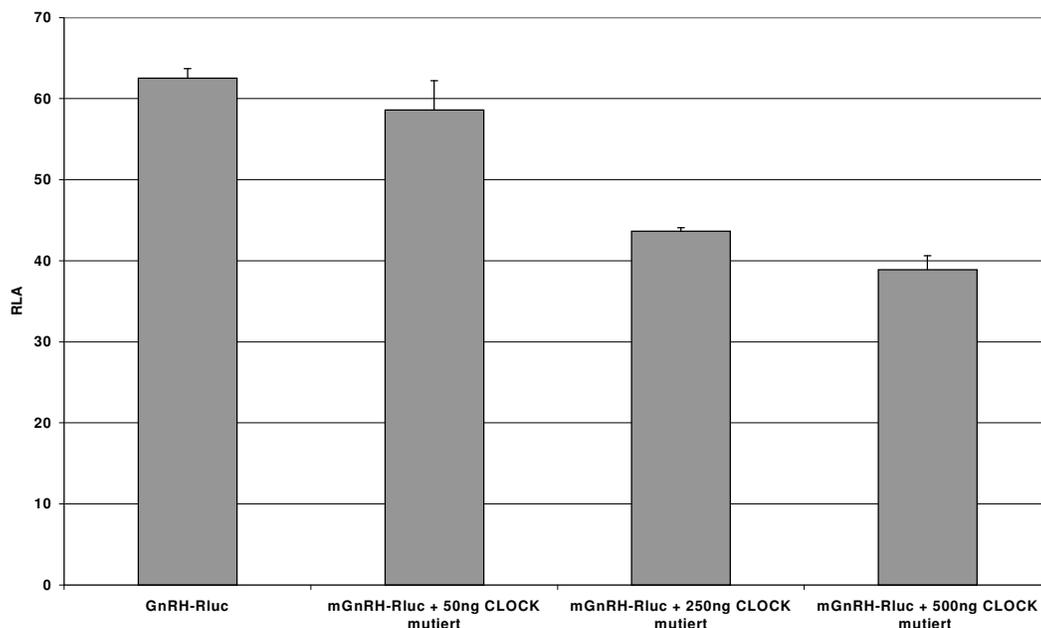


Abb. 8: Dosis-abhängiger Einfluss von mutiertem mCLOCK- Δ -19 auf die Aktivität des mGnRH-Rezeptor-Promotors. Darstellung der normalisierten Luciferaseaktivität in RLA als Mittelwert aus drei Einzelmessungen \pm SEM (Standardfehler des Mittelwertes)

Die Überexpression von mCLOCK- Δ -19 (CLOCK mutiert) in unterschiedlichen Dosen bewirkt eine signifikante Abnahme der Transkriptionaktivität des mGnRH-Rluc-Reporterplasmides in Abhängigkeit zur Menge der transfizierten Expressionsplasmide.

Überexpressionsversuche mPER1 und mPER2

Im nächsten Schritt der Untersuchungen wurde der Frage nachgegangen, ob negative Elemente der transkriptionalen/translationalen Feedback-Schleife des intrazellulären Uhrenmechanismus bei der Regulation der Genexpression des mGnRH-Rezeptors-Genes eine Rolle spielen. Hierzu wurden Cotransfektionen des Reporterplasmids mGnRH-Rluc mit den Expressionsvektoren mPER1 sowie mPER2 in unterschiedlichen Dosen durchgeführt.

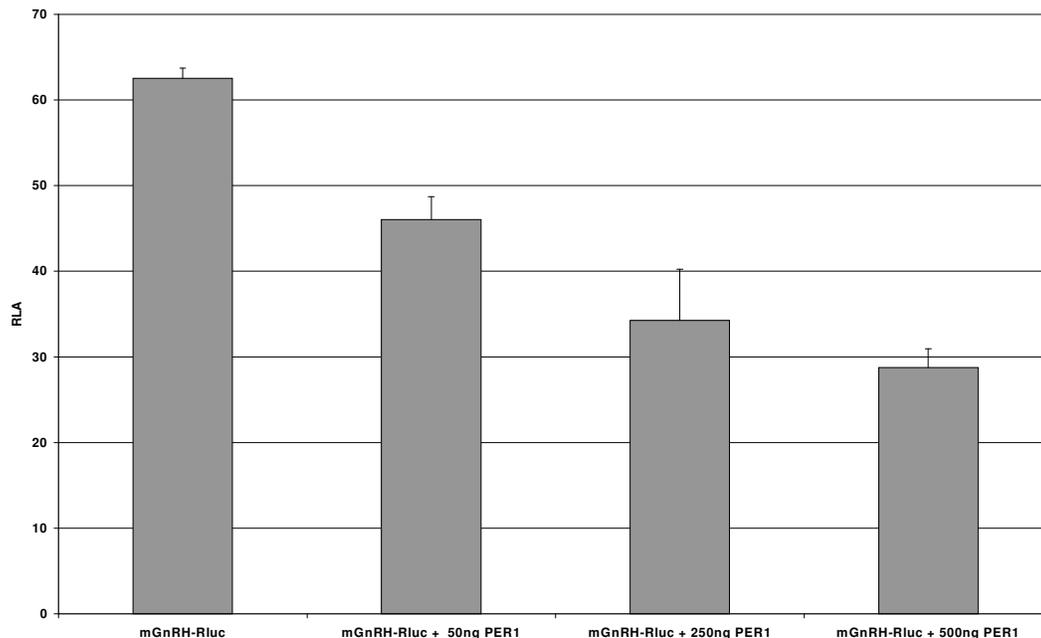


Abb.9: Dosis-abhängiger Einfluss von mPER1 auf die Aktivität des mGnRH-Rezeptor-Promotors. Darstellung der normalisierten Luciferaseaktivität in RLA als Mittelwert aus drei Einzelmessungen \pm SEM (Standardfehler des Mittelwertes)

Die Überexpression von mPER1 in unterschiedlichen Dosen bewirkte eine signifikante Abnahme der Aktivität des Promotors des mGnRH-Rluc-Reporter-Konstruktes in Abhängigkeit zur Menge des transfizierten Expressionsvektors.

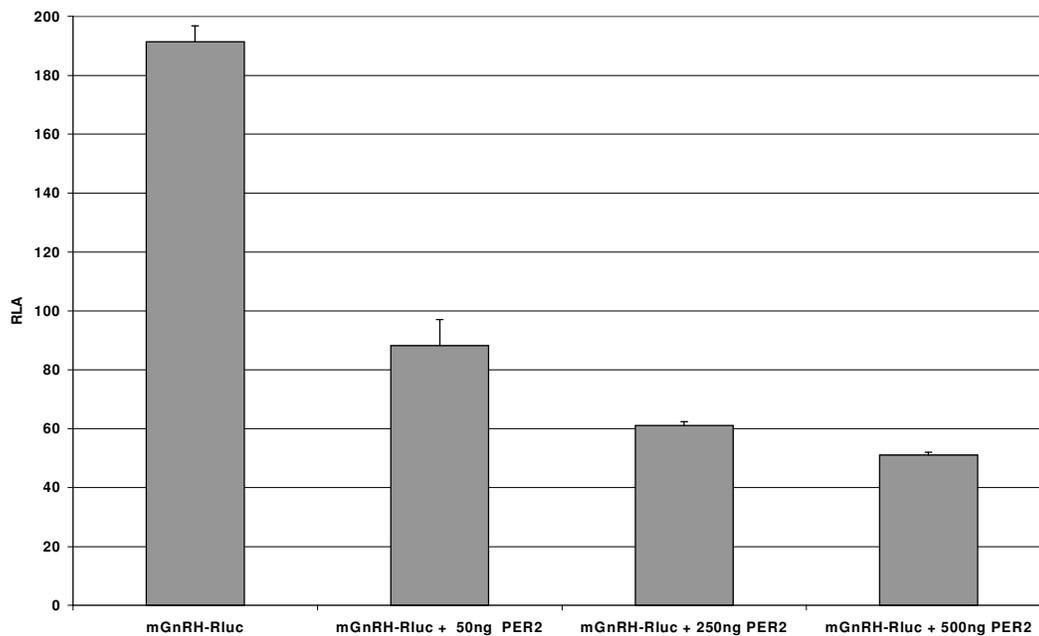


Abb.10: Dosis-abhängiger Einfluss von mPER2 auf die Aktivität des mGnRH-Rezeptor-Promotors. Darstellung der normalisierten Luciferaseaktivität in RLA als Mittelwert aus drei Einzelmessungen \pm SEM (Standardfehler des Mittelwertes)

Die Überexpression von mPER2 in unterschiedlichen Dosen bewirkte eine signifikante Abnahme der Transkriptionaktivität des Reporterplasmides mGnRH-Rluc in Abhängigkeit zur Menge des transfizierten Expressionsvektors.

4 Diskussion

Methodik der Arbeit

Zur Untersuchung der Funktion von DNA-Sequenzen und deren Interaktion mit Proteinen stehen verschiedenste molekularbiologische Methoden zur Verfügung. In dieser Arbeit wurden etablierte Standardmethoden eingesetzt, mit deren Hilfe die Funktion der E-Box-Sequenzen innerhalb des Promotors des mGnRH-Rezeptor-Genes, sowie deren Interaktion mit den Transkriptionsfaktoren CLOCK, BMAL1, mPER1 und mPER2 untersucht werden konnten. Es erfolgte eine Cotransfektion verschiedener Reportergene in Kombination mit unterschiedlichen Expressionsvektoren innerhalb eines spezifischen Expressionssystems. Als homologes Expressionssystem der Versuche wurde eine immortalisierte murine Zelllinie der Hypophyse gewählt. Die Zelllinie α T3-1 exprimiert selbst den mGnRH-Rezeptor auf ihrer Zelloberfläche und scheint ebenfalls insbesondere die Proteine der klassischen „Clock“-Gene zu bilden. Zudem wurde diese Zelllinie ausgewählt, um auf möglichen Ergebnisse dieser Arbeit weitergehende Forschungen mit Hilfe anderer Methoden aufbauen zu können, die sich z.B. mit einer möglichen Veränderung der Transkription des zelleigenen mGnRH-Rezeptor-Genes nach Überexpression der o.g. Transkriptionsfaktoren beschäftigen könnte. Der Einsatz der Luciferase des *Photinus pyralis* als Reportergen ist eine, für Promotor-Studien weithin etablierte und akzeptierte Methode mit einer hohen Sensitivität. Die Verwendung allgemein anerkannter molekularbiologischer Methoden ermöglicht eine Diskussion der Ergebnisse dieser Arbeit sowohl inhaltlich als auch methodisch im Hinblick auf andere Promotorstudien, die sich ebenfalls mit der Untersuchung der Kontrolle der circadianen Genexpression beschäftigen. Ein weiterer wichtiger methodischer Aspekt ist die Verwendung von zwei positiven Kontrollvektoren innerhalb der Transfektionsversuche. Diese Plasmide enthalten jeweils drei native bzw. drei mutierte Kopien der CACGTG-E-Box des Promotors des Arginin-Vasopressin (AVP)-Genes samt flankierender Sequenzen, welche hintereinander in einen Luciferase Reporter Vektor kloniert wurden. X. Jin und Kollegen konnten in ihren Studien mit Hilfe der Verwendung der o.g. Plasmide die Regulation der Genexpression des AVP-Genes durch die Heterodimere CLOCK:BMAL1 über die Interaktion mit E-Box-Sequenzen sowie einen Einfluss der mPER-Proteine auf den AVP-Promotor zeigen (Jin et al., 1999). Diese Ergebnisse konnten innerhalb des in dieser Arbeit verwendeten Expressionssystems bestätigt bzw. ebenfalls gezeigt werden. Durch die Verwendung dieser Plasmide als Positiv-Kontrollen innerhalb jeder durchgeführten Transfektion nimmt die Validität der Ergebnisse in Bezug auf den mGnRH-Promotor deutlich zu. Zur Bestimmung der Effizienz der Transfektionsversuche erfolgte eine Cotransfektion von Luciferase-Vektor-Konstrukt und pCMV-pLacZ-Vektor. Dieser Kontroll-Vektor enthält das Gen für das Enzym β -Galactosidase, dessen Transkription von einem starken viralen Promotor

(Cytomegalie-Virus) reguliert wird. Dieses Plasmid gilt als stabiles Reporter-Plasmid, da seine Transkriptionsaktivität, anders als beim klonierten Luciferase-Vektor, konstant ist. Unter der Annahme, dass eine gleichzeitige Transfektion von zwei Vektoren für beide Vektoren mit gleicher Effizienz erfolgt, kann über die Messung der β -Galactosidase der cotransfizierten Zellen eine interne Standardisierung der gemessenen Luciferase-Aktivität bezüglich der Transfektionseffizienz erfolgen.

Der murine GnRH-Rezeptor

Im Rahmen dieser Arbeit erfolgte eine Promotorstudie eines Teilbereiches des mGnRH-Rezeptor-Genes. Zu diesem Zweck wurde ein Luciferase-Reportergen konstruiert, in das der ausgewählte Bereich des mGnRH-Rezeptor-Promotors kloniert wurde. Dieser DNA-Abschnitt wurde mit Hilfe der PCR-Technik aus genomischer DNA der Maus isoliert. Wie bereits unter Punkt 1.2 beschrieben, ist die Struktur des humanen, murinen und bovinen GnRH-Rezeptor-Genes von verschiedenen Arbeitsgruppen charakterisiert worden (Albarracin et al.; 1994; Fan et al., 1995; Campion et al., 1996; Kakar, 1997), wobei die Existenz signifikanter Unterschiede im strukturellen Aufbau innerhalb des Genomes der verschiedenen Spezies deutlich wurden. Das humane GnRH-Rezeptor-Gen weist in Exon 3 gegenüber der Maus eine zusätzliche Aminosäure auf und verfügt zudem in der 5'-flankierenden Region des Genes über multiple Transkriptionsstartseiten. Diese Unterschiede im Aufbau des humanen und murinen GnRH-Rezeptor-Genes machen eine Übertragung der Ergebnisse dieser Arbeit auf den Menschen nur stark eingeschränkt möglich. Die hier vorgelegten Ergebnisse können also als Grundlagen einer möglichen zukünftigen Identifizierung einer Verbindung zwischen circadianen Uhrenmechanismus und der Regulation der Genexpression des humanen GnRH-Rezeptor-Genes angesehen werden.

Expression von „Clock“-Genen in α T3-1-Zellen

Die Promotorstudien des mGnRH-Rezeptor-Genes erfolgten mit Hilfe der immortalisierten, murinen Zelllinie α T3-1. Im Rahmen dieser Arbeit wurde zunächst die Zelllinie in Hinblick auf die Expression „clock“-relevanter Proteine charakterisiert. Die Ergebnisse, der hierzu durchgeführten, Western Blot Versuche zeigen die Expression der bHLH-Transkriptionsfaktoren CLOCK und BMAL1 innerhalb der α T3-1-Zellen. Die Genexpression circadian regulierter Gene wird u.a. als ein Resultat der Interaktion dieser Transkriptionsfaktoren mit regulatorischen Elementen im Sinne eines E-Box-Motives verstanden. Die Tatsache, dass Zellen einer stabilen Zelllinie, deren Ursprung in Neuronen des Hypophysenvorderlappen liegt, „clock“-relevante Transkriptionsfaktoren exprimieren, kann als ein Hinweis auf eine Verknüpfung der transkriptionellen

Regulationsmechanismen der inneren Uhr mit der Transkriptionsmaschinerie dieser Neuronen gedeutet werden. Zunächst würde diese mögliche Verbindung nur auf das hier vorhandene in vitro-System der Zellkultur anwendbar sein. Die Frage der Regulation der Transkription des mGnRH-Rezeptor-Genes in vivo müsste in weitergehenden Untersuchungen näher beleuchtet werden.

Bedeutung der E-Box-Sequenzen für den mGnRH-Rezeptor-Promotor

Spezifische Gene nahezu alle Organismen weisen in ihrer Expression eine circadiane Rhythmik auf. In Pflanzen und Pilzen konnten bis heute verschiedene dieser Gene identifiziert und untersucht werden. Dennoch konnten im Vergleich einiger dieser Gene keine allgemeinen regulatorischen Sequenzen gefunden werden, die an der Vermittlung des circadianen Rhythmus beteiligt sind (Bell-Pedersen et al., 1996). Auch innerhalb der Wirbeltiere ist eine circadian kontrollierte Genexpression weitverbreitet. Die molekulargenetischen Funktionsmechanismen der inneren Uhr sind insbesondere am Säugetier-Modell gut erforscht. Hier konnten verschiedene transkriptionelle/translationale Rückkopplungsschleifen, sowie spezifische regulatorische DNA-Sequenzen identifiziert werden, die bei der Regulation der circadianen Genexpression wirksam sind (King et al., 1997; Gekakis et al., 1998; Bunger et al., 2000).

Die Daten dieser Arbeit zeigen eine Verknüpfung zwischen dem zentralen circadianen molekularen Mechanismen des SCN (siehe Einleitung Punkt 1.5) mit der Regulation peripher exprimierter Gene. Die Transkription des mGnRH-Rezeptor-Genes scheint insbesondere über die Bindung von Transkriptionsfaktoren an E-Box-Enhancer-Sequenzen gesteuert zu werden. Der für diese Arbeit ausgewählte Promotor-Bereich des Genes enthält fünf dieser E-Box-Motive: CATTG, CAATTG, CAAGTG, CATGTG, CACTTG und umfasst insgesamt eine Grösse von 520 Basenpaaren.

Interessanterweise handelt es sich bei keiner der fünf E-Box-Sequenzen des untersuchten mGnRH-Rezeptor-Promotors um eine klassische CACGTG-E-Box. Im Rahmen dieser Arbeit wurde insbesondere die Bedeutung dieser E-Box-Elemente für die Regulation der Transkription des mGnRH-Rezeptor-Genes untersucht. Nach transienter Transfektion des ausgewählten Bereiches des Wild-Typ-Promotors, welcher in einen Luciferase-Vektor kloniert wurde, zeigte sich eine signifikante Aktivierung der Transkription im Vergleich zur Transkriptionsaktivität des viralen SV40 Promotors des Luciferase-Kontrollvektor. Zur Klärung der Frage, ob die E-Box-Motive des mGnRH-Rezeptor-Promotors in diesem Zusammenhang für den deutlichen Anstieg der Transkriptionsaktivität verantwortlich sind, erfolgte eine Mutation aller enthaltenden E-Boxes. Zu diesem Zweck wurden die Sequenzen aller E-Box-Elemente in die einheitliche Nukleotidsequenz GGACCT umgewandelt, wobei die flankierenden Regionen unverändert

blieben. Das Hexamer GGACCT enthält die Nukleotide des CACGTG-E-Box-Motiv in veränderter Reihenfolge, so dass insgesamt die Anzahl an Purin-bzw. Pyrimidinbasen konstant gehalten wurde. Die mutierte Promotorregion wurde ebenfalls in einen Luciferase-Vektor kloniert und in α T3-1-Zellen transfiziert. Nach transienter Transfektion der Luciferase-Konstrukte, die den mutierten mGnRH-Rezeptor-Promotor enthielten, konnte im Gegensatz zum mGnRH-Rluc-Wild-Typ Promotor keine signifikante Aktivierung der Transkription gezeigt werden. Der Promotor des mGnRH-Rluc/mut-Reportergenes zeigte eine, dem viralen SV40-Promotor des Kontrollplasmides pGL3-Basic vergleichbare, Aktivität. Die vorhandenen E-Box-Sequenzen scheinen trotz ihrer Beschaffenheit eine Bedeutung bei der Regulation der Expression des mGnRH-Rezeptor-Genes zu haben.

CLOCK:BMAL1-Heterodimere scheinen zu einer promiskutiven Interaktion mit hexamerischen CANNTG-E-Box-Motiven befähigt zu sein. Diese Fähigkeit wurde ebenfalls bereits in anderen Arbeiten u.a. am Beispiel der Interaktion von CLOCK und BMAL1 mit dem Promotor des *mdbp* Genes beschrieben. DBP ist ein PAP leucin zipper Transkriptionsfaktor, dessen Promotor vier E-Box-Motive aufweist. Alle vier E-Box-Sequenzen, u.a. eine nicht-kanonische CACATG-Sequenz, sind in vitro in der Lage nach Cotransfektion mit CLOCK und BMAL1 die Transkription von Luciferase-Reportergenen zu aktivieren (Lavery et al., 1999). Der *mPer1*-Promotor enthält fünf kanonische CACGTG-E-Box-Motive, wobei *mPer2* sieben und *mPer3* vier CANNTG-E-Box-Sequenzen aufweisen. Promotorstudien mit Luciferase-Reporter-Konstrukten zeigen eine signifikante Stimulation aller *mPer*-Promotoren durch CLOCK:BMAL1 (Hida et al., 2000). Die Aktivierung des *mPer1*-Promotors ist jedoch deutlich ausgeprägter, so dass ein Einfluss der Beschaffenheit des Enhancer-Motives wahrscheinlich ist (Travnickova-Bendova et al., 2002). Es konnte gezeigt werden, dass eine Mutation aller E-Boxes einen Einbruch der Transkriptionsaktivität zur Folge hat. Dennoch bleibt weiterhin ungeklar, wie die Nukleotidsequenz des E-Box-Hexamers die Interaktion mit CLOCK:BMAL1-Dimeren und die daraus resultierenden Effekte beeinflusst.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die fünf E-Box-Motive des ausgewählten Bereiches des mGnRH-Rezeptor-Promotors eine Rolle bei der Regulation der Transkription des Genes haben. Innerhalb eines Promotors, der verschiedene E-Box-Motive enthält, wäre ein Zusammenspiel der E-Box-Sequenzen im Sinne einer allosterischen Interaktion oder einer additiven bzw. nicht-additiven Verstärkung denkbar. Untersuchungen haben gezeigt, dass CLOCK:BMAL1-Heterodimere über die Bindung an eine einzelne E-Box in der Lage sind die Transkription eines Genes zu verstärken (Kume et al., 1999; Gekakis et al., 1998). Kommt es zur Bindung an mehr als eine E-Box innerhalb eines Promotors, erfolgt eine additive Verstärkung der Transkription, wobei es vermutlich keine allosterischen Interaktionen zwischen verschiedenen E-Box-Motiven innerhalb eines Genes gibt. Die Verstärkung der Transkription

nach Bindung an eine E-Box erfolgt wahrscheinlich unabhängig vom Bindungsstatus anderer E-Box-Sequenzen (Gekakis et al., 1998; Forger et al., 2003).

In der vorliegenden Arbeit wurde ein Promotorbereich eines Genes untersucht, der fünf verschiedenartige E-Box-Sequenzen aufweist, so dass gerade hier die Frage nach einer möglichen Interaktion der unterschiedlichen E-Boxes untereinander nach wie vor von Bedeutung ist. Die Bindung von CLOCK:BMAL1 an eine bestimmte E-Box könnte beispielsweise die Bindung weiterer E-Box-Sequenzen faszilitieren. Die Bedeutung der einzelnen E-Box-Motive in ihrer Fähigkeit zur Interaktion mit CLOCK:BMAL1-Heterodimeren und ihrer Beteiligung an der Gesamtheit des Regulationsprozesses wurde im Kontext dieser Arbeit nicht untersucht. Fortlaufende Untersuchungen dieser Thematik könnten insbesondere versuchen die spezifische Funktion der einzelnen E-Box-Motive mit ihren spezifischen Sequenzen CATTG, CAATTG, CAAGTG, CATGTG, CACTTG zu beleuchten.

Die circadiane „E-Box-Kontroverse“

Seit der Entdeckung von *period (per)*, dem ersten bekannten „Clock“-Gen sind enorme Fortschritte bei der Aufklärung der molekularen Wirkmechanismen der inneren Uhr gemacht worden. Durch zahlreiche Untersuchungen wurde deutlich, dass zyklisch exprimierte Genprodukte eine entscheidende Rolle bei der Entstehung von circadianen Rhythmen spielen. Dennoch bleibt die zentrale Frage der Chronobiologie bis heute unbeantwortet: Wodurch entsteht die zyklische Expression eines Genproduktes in erster Linie? Nach wie vor gelang keine exakte Identifikation der DNA-Sequenzen, die für die transkriptionelle Rhythmik eines Genes verantwortlich gemacht werden können. Ebenso wenig konnte bislang die E-Box-Sequenz als *das* kritische Element identifiziert werden, welches eine circadiane Genexpression *in vivo* steuert. Innerhalb der wissenschaftlichen Weltliteratur existieren insbesondere über die Bedeutung der E-Box-Motive kontroverse Meinungen. Hierbei werden vor allem die Bedeutungen der E-Box-flankierenden Gen-Regionen im Vergleich zum eigentlichen E-Box-DNA-Motiv, sowie die mögliche Beteiligung weiterer Faktoren an den Regulationsmechanismen der inneren Uhr kritisch diskutiert (Kyriacou et al., 2000).

Die E-Box-Enhancer-Sequenz ist ein wichtiges regulatorisches Element im Rahmen der molekulargenetischen Prozesse der „Master-Clock“ des SCN, sowie anderer circadian exprimierter Gene. Die Tatsache, dass das E-Box-Motiv ein weitverbreitetes DNA-Kontrollelement ist, das eine ausgeprägte regulatorische Vielfalt besitzt und viele verschiedene genetische Programme beeinflusst, führt unausweichlich zu der Frage, welcher exakte Mechanismus Gene zum Zyklieren bringt. Eine E-Box-Sequenz innerhalb des 69-bp CRS (Circadian Regulatory Sequence)-Elements des *per*-Promotors ist für eine hoch-amplitude

Genexpression *in vivo* erforderlich, jedoch bleibt der circadiane Rhythmus der Transkription, wenn auch bei deutlich geringerem Expressions-Level, nach Mutation der E-Box weiterhin bestehen (Hao et al., 1997). Innerhalb der *Drosophila* Zelllinie S2 können dCLK und dCYC über ein 18bp E-Box-Element die Transkription der Gene *period*, *timeless* und *vriille* beeinflussen. Mit Hilfe der *in vivo* Luciferase Technologie unter Einsatz transgener Fruchtfliegen konnte die Bedeutung dieses 18 bp E-Box-Elementes für den *period* Promotor gezeigt werden. Fliegen, die ein fusioniertes Luciferase/Wild-Typ *period* E-Box-Gen trugen, zeigten hohe Level einer robust zyklischen Lumineszenz. Im Gegensatz dazu waren bei Fliegen, die eine mutierte E-Box trugen, keine erhöhten oder zyklischen Lumineszenzen messbar (Darlington et al., 2000). Deletionsanalysen des CRS (Circadian Regulatory Sequence)-Elementes haben gezeigt, dass DNA-Sequenzen ausserhalb des E-Box-Motives für eine circadiane Regulation der Transkription von Bedeutung sind. Eine Veränderung der Nukleotidsequenz 10 bp stromaufwärts vom E-Box-Motiv innerhalb des *per*-Genes reduziert das Transkriptions-Level und zerstört den Zyklus der Expression, wobei eine entsprechende Veränderung 10 bp stromabwärts nahezu keinen Effekt zeigt. Zudem scheinen Genregionen, die innerhalb des CRS > 10bp von der *per* E-Box entfernt liegen, eine Bedeutung für die korrekte räumliche Expression des Genes innerhalb transgener Fruchtfliegen zu haben. Vermutlich unterstützen andere, gewebespezifische Transkriptionsfaktoren über die Bindung an diese Sequenzen die dCLK-CYC vermittelte Generierung des kompletten *per*-Expressionsmusters (Lyons et al., 2000). E-Box-flankierende Sequenzen scheinen also eine Bedeutung für die Expression circadianer Rhythmen zu haben, wobei bis heute eine vollständige Identifikation begleitender Sequenzen, sowie ihrer Funktionen nicht möglich ist.

E-Box-Motive oder deren flankierende Regionen scheinen jedoch nicht die einzigen DNA-Kontrollelemente zu sein, die eine zyklische Genexpression ermöglichen. Das cAMP response element (CRE) ist ebenfalls in der Lage circadian exprimierte mRNA-Level für spezifische Gene zu vermitteln. Bei Ratten erfolgt die Transkription des AA-NAT(Arylalkylamin N-Acetyl-transferase)-Genes während der Nacht. Die Expression dieses Genes wird teilweise durch Bindung von cAMP an ein CRE, welches stromaufwärts vom Transkriptionsstartpunkt des Genes liegt, reguliert (Burke et al., 1999). Innerhalb von transgenen Mäusen erfolgt nach Bindung an den Transkriptionsfaktor CRE binding protein (CREB-P), welcher ebenfalls zyklisch exprimiert wird, an sechs Tandem-Kopien des CRE-Elementes die zyklische Expression eines Reportergenes (Obrian et al., 1999). Das CRE-Element spielt ebenfalls eine Rolle bei der Regulation der „clock-controlled-genes“ wie z.B. c-fos oder Arginin Vasopressin (Robertson et al., 1995; Iwasaki et al., 1997). Innerhalb von *Drosophila* wird ein CRE-gekoppeltes Reporter gen in einem circadianem Rhythmus exprimiert, wobei eine Mutation dieses CRE-Elementes zu einer signifikanten Veränderung der Amplitude des Zyklus führt. Zudem zeigen sich nach Mutation des cAMP response binding-element protein (dCREB2) signifikante Veränderungen innerhalb der circadianen Verhaltensmuster, der CRE-Reporter gene sowie interessanterweise ebenfalls

Veränderungen des *per*-mRNA Rhythmus (Belvin et al., 1999). Es scheinen also wenigstens zwei regulatorische Systeme in Fliegen und Säugetieren zu existieren, die an der Entstehung des circadianen Rhythmus im Organismus beteiligt sind. Zudem ist es wahrscheinlich, dass innerhalb verschiedener Zellarten gewebespezifische Co-Aktivatoren existieren, die mit dem Promotor ihrer Gene interagieren und so eine Modulation der inneren Uhr vermitteln. Die Entstehung eines circadianen Rhythmus innerhalb der Genexpression, sowie die Feineinstellung der inneren Uhr und ihre Synchronisation mit der äusseren Umwelt stellen also sehr komplexe Vorgänge dar, die scheinbar durch eine Vernetzung vielfältiger regulatorischer Elemente erfolgt.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die nicht-kanonischen E-Box-Sequenzen innerhalb der 5'-flankierenden Region des mGnRH-Rezeptor Genes zur Regulierung der Expression dieses Genes beitragen. Dennoch kann das murine GnRH-Rezeptor Gen allein durch die Identifikation regulatorisch bedeutsamer E-Box-Enhancer-Sequenzen nicht abschließend als ein „clock-controlled-gene“ identifiziert werden. Der gezeigte Einfluss stellt jedoch einen wichtigen Hinweis auf eine mögliche circadiane Rhythmik der Genexpression dar.

Interaktion von CLOCK und BMAL1 mit dem mGnRH-Rezeptor-Promotor

Zur Klärung der Frage, ob die E-Box-Motive des ausgewählten Bereiches des mGnRH-Rezeptor-Genes zu einer Interaktion mit CLOCK:BMAL1-Heterodimeren befähigt sind, erfolgte eine Expression der mGnRH-Luciferase-Reportergene innerhalb von α T3-1-Zellen. Unter der Annahme, dass in α T3-1-Zellen endogen exprimiertes CLOCK und BMAL1 als Heterodimer an die E-Box-Motive des mGnRH-Luciferase-Reporters bindet, erfolgte eine Transfektion des mGnRH-Luciferase-Reportergenes. Parallel wurden unter gleichen Bedingungen Transfektionen des Luciferase-Reporters ohne mGnRH-Promotorfragment, sowie Transfektionen mit dem oben beschriebenen mutierten mGnRH-Reporter-Konstrukt durchgeführt. Im Vergleich zum leeren Kontrollvektor sowie zum mGnRH-Reporter gen mit mutierten E-Box-Motiven zeigte sich innerhalb dieser Versuchsanordnung eine signifikante Erhöhung der Transkription des Luciferase-Reportergenes. Wie bereits beschrieben haben also die E-Box-Sequenzen einen Einfluss auf die Regulation des mGnRH-Rezeptor-Genes. Um der Hypothese nachzugehen, dass die regulatorische Funktion dieser E-Box-Motive über eine Interaktion mit CLOCK:BMAL1-Heterodimeren erfolgt, wurden Cotransfektionen der genannten Reportergene in Kombination mit dem Expressionsvektor CLOCK- Δ -19 durchgeführt. Nach Transfektion von Expressionsvektoren in zelluläre Systeme kommt es unter Benutzung der Transkriptionsmaschinerie der Zellen zur Expression der Proteine, deren DNA mit Hilfe des Vektors in die Zelle transferiert wurde. Parallel zu mGnRH-Reporter-Konstrukten exprimierten die α T3-1-Zellen innerhalb

dieses Experimentes CLOCK- Δ -19, eine mutierte Variante des CLOCK-Proteins. Durch eine Veränderung in der vermutlich transkriptions-aktivierenden Domäne des Proteins kommt es nach Bindung von CLOCK- Δ -19:BMAL1-Komplexen an E-Box-Sequenzen nicht zur verstärkten Aktivierung der Transkription (Vitaterna et al., 1994; Gekakis et al., 1998). Da das veränderte CLOCK-Protein nachwievor zur Bildung von Komplexen mit anderen Transkriptionsfaktoren fähig ist, kann es durch die gemeinsame Expression von nativem, endogenem CLOCK und mutiertem, exogenem CLOCK- Δ -19 innerhalb der Zelle zu einer Bildung von CLOCK-BMAL1- bzw. CLOCK- Δ -19:BMAL1-Heterodimeren kommen. Hypothetisch kommt es nach Transfektion steigender Mengen des Expressionsplasmides in die Zellen zu zunehmenden Mengen an mutiertem CLOCK-Protein, welches die Bildung von regulatorisch unwirksamen CLOCK- Δ -19:BMAL1-Komplexen statistisch wahrscheinlicher werden lässt. Innerhalb dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine zunehmende Menge an mutiertem CLOCK- Δ -19 innerhalb der α T3-1-Zellen zu einer Abnahme der Transkriptionsaktivität des mGnRH-Luciferase-Reportergenesis führt. Dieses Phänomen zeigt den Einfluss der beiden bHLH-Transkriptionsfaktoren CLOCK bzw. CLOCK- Δ -19 und BMAL1 auf die Regulation der Genexpression des mGnRH-Rezeptor-Genes. Bei der Formierung des Heterodimers CLOCK:BMAL1 konkurriert Clock- Δ -19 mit nativem CLOCK-Protein. Eine Aktivierung der Transkription durch CLOCK- Δ -19:BMAL1 ist nicht möglich, weshalb die Transkriptionsaktivität des Reportergenesis dosisabhängig zur Menge des vorhandenen mutierten CLOCK-Proteins abnimmt.

Das Procedere dieses Experiments weicht in seiner Methodik von der vielfach für Promotor-Studien verwendeten Coexpressionsstrategie ab. Um die Interaktion spezifischer Proteine mit ausgewählten Promotor-Bereichen von Genen zu untersuchen, wird oftmals ein Expressionssystem verwendet, welches die zu untersuchenden Gene sowie die putativ interagierenden Proteine nativ nicht exprimiert, wobei hier die Zelle lediglich ihre Transkriptionsmaschinerie zur Verfügung stellt. In der Diskussion dieses Vorgehen sollte jedoch der artifizielle Charakter dieses System hervorgehoben werden. Dieses in vitro System führt unter Umständen zu einer Coexpression bzw. Interaktion von Proteinen, die innerhalb eines natürlichen in vivo Systems nicht gemeinsam exprimiert werden. Diese Phänomen trat z.B. bei der Suche nach möglichen anderen Bindungspartnern von BMAL1 auf. Der bHLH-Transkriptionsfaktor MOP4 bildet mit BMAL1 Heterodimere, die die Transkription von Genen über CACGTG-Motive aktivieren können. Obwohl MOP4 also an den transkriptionellen Regulationsschleifen des circadianen Systems beteiligt zu sein scheint, ist MOP4 jedoch in vivo im SCN von Mäusen nicht nachweisbar (Shearman et al., 1999). Im Rahmen dieser Arbeit wurde versucht die Interaktion von endogen exprimierten Proteinen innerhalb eines zellulären Systems zu zeigen. Hierzu wurden zunächst die Expression der Transkriptionsfaktoren CLOCK und BMAL1 innerhalb von α T3-1-Zellen gezeigt. Im zweiten Arbeitsschritt erfolgte ein Nachweis der Funktionalität der mittels Reportergenesis in die Zelle eingebrachten E-Box-Motive des

mGnRH-Rezeptor-Genes. Der Nachweis einer Interaktion von E-Box-Motiv mit den Transkriptionsfaktoren CLOCK und BMAL1 erfolgte indirekt über die spezifische Inhibierung der Transkriptionsaktivität durch die Überexpression von CLOCK- Δ -19. Dieses Vorgehen weist ebenfalls methodische Schwächen auf, da es sich zum einen auch hier um ein in vitro System handelt, welches die natürlichen Bedingungen niemals vollständig widerspiegeln kann. Zum anderen kann kein direkter Nachweis einer Interaktion von CLOCK:BMAL1-Heterodimeren mit den fünf E-Box-Motiven des ausgewählten Bereiches des mGnRH-Rezeptor-Genes erbracht werden. Zur weitergehenden Klärung dieser Frage wäre der Einsatz anderer molekular-genetischer Methoden sinnvoll. Die Bandshift-Analyse (Electromobility Shift Assay [EMSA]) ist eine weitverbreitete Methode zum Nachweis von in vitro Protein-DNA-Wechselwirkungen, deren grösster Anwendungsbereich die Identifizierung und Charakterisierung von Transkriptions-faktoren und der von ihnen gebundenen DNA-Elemente (Promotoren, Enhancer, Silencer) ist (Mitchell et al, 1989).

Im Rahmen der Diskussion dieser Arbeit muss auch an eine mögliche Beteiligung anderer Faktoren gedacht werden. Bei einigen oszillierenden Genen, deren Transkriptionsaktivität innerhalb von *Clock/Clock*-Knock-out-Mäusen deutlich reduziert ist, scheint die Möglichkeit zu bestehen, dass CLOCK mit anderen Bindungspartnern dimerisiert bzw. andere bis heute nicht identifizierte DNA-Bindungsfaktoren eine Rolle bei der Kontrolle der circadianen Gen-expression spielen (Reppert et al., 2002). Innerhalb des SCN der Maus konnte die Expression anderer bHLH-PAS-Transkriptionsfaktoren wie z.B. MOP9 (Hogenesch et al., 2000) nachgewiesen werden, deren Funktion bis heute unklar geblieben ist (Shearman et al., 1999). Der bHLH-Transkriptionsfaktor MOP4, der als hirnspezifisches Homolog von CLOCK betrachtet wird, ist in der Lage mit BMAL1 heterodimerische Komplexe zu bilden, die die Expression von Genen über die Bindung an E-Box-Sequenzen beeinflussen können. MOP4 mRNA wird innerhalb der Zirbeldrüse und der Retina des Huhnes exprimiert und scheint hier, im Gegensatz zum Säugetier (siehe oben), an der molekularen Organisation der inneren Uhr beteiligt zu sein (Shearman et al., 2000). Auch innerhalb anderer Spezies wurden weitere Faktoren identifiziert, die an den circadianen Regulationsmechanismen beteiligt zu sein scheinen. So konnte beispielsweise die Existenz eines zweiten *Bmal*-Genes beim Zebrafisch gezeigt werden (Cermakian et al., 2000). Die Organisation der inneren Uhr erscheint zunehmend komplexer als ursprünglich angenommen, so dass im Verlauf der zukünftigen Forschung die Zahl der involvierten Proteine vermutlich weiter steigen wird (Shearman et al., 2000). Natürlich könnte dies auch für die Regulation des mGnRH-Rezeptor-Genes gelten, insbesondere da im Rahmen dieser Arbeit der direkte Nachweis einer Interaktion von CLOCK:BMAL1-Heterodimeren mit den E-Box-Motiven des ausgewählten Bereiches des mGnRH-Rezeptor-Genes nicht gezeigt wurde.

Die Ergebnisse der hier durchgeführten Versuche zeigen einen möglichen Regulations-mechanismus der Genexpression des mGnRH-Rezeptor-Genes. Das E-Box-Motiv ist ein

weitverbreitetes DNA-Kontrollelement, dass viele verschiedene genetische Programme wie Proliferation, Zelldifferenzierung, gewebespezifische Zellantworten und Zelltod beeinflusst (Munoz et al., 2002). Unter anderem hat die E-Box-Sequenz eine zentrale Funktion bei der Umsetzung des circadianen Programms des Organismus. Ein Gen, dessen Transkriptionsaktivität über E-Box-Motive gesteuert wird, muss also nicht zwangsläufig einem circadianen Expressionsmuster unterliegen. Ein wichtiges Charakteristikum, das von allen bekannten circadianen E-Boxen geteilt wird, ist ihre Fähigkeit zur Interaktion mit den bHLH-Transkriptionsfaktoren CLOCK und BMAL1 (Jin et al., 1999; Hogenesch et al., 1998; Darlington et al., 1998; Gekakis et al., 1998). Mit Hilfe von *in situ* Hybridisationen könnte eine Darstellung der mRNA-Level des mGnRH-Rezeptor-Genes innerhalb der Hypophyse von Wild-Typ-Mäusen gegenüber *Clock/Clock*-Knock-out-Mäusen zu verschiedenen Tageszeiten erfolgen, um so direkt einen möglichen circadianen Oszillation der Genexpression des Genes *in vivo* nachzuweisen. Die Frage, ob das mGnRH-Rezeptor-Gen zu der Gruppe der „clock-controlled-genes“ gehört, muss weiterhin kritisch diskutiert werden. Die hier dargestellten Ergebnisse stellen einen deutlichen Hinweis dar, dennoch ist eine abschließende Klärung zu diesem Zeitpunkt nicht möglich.

Interaktion von mPER1 und mPER2 mit dem mGnRH-Rezeptor-Promotor

Innerhalb des circadianen Uhrenmodells der Säugetiere mit seinen positiven und negativen transkriptionellen/translationalen Rückkopplungsschleifen werden spezifische Transkriptionsfaktoren über die Bindung an DNA-Verstärker-Sequenzen als der positiv regulatorische Teil dieses Systems betrachtet. Nachdem im Verlauf dieser Arbeit ein Einfluss der PAS-bHLH-Transkriptionsfaktoren CLOCK und BMAL1 via E-Box-DNA-Sequenzen auf die Regulation der Genexpression des mGnRH-Rezeptor-Genes gezeigt werden konnte, wurde der Frage nach einem möglichen Einfluss der Transkriptionsfaktoren mPER1 und mPER2 auf den Promotor des mGnRH-Rezeptor Genes gestellt. mPER1 und mPER2 gelten als Elemente der negativen Rückkopplungsschleife des Uhrenmodells der Säugetiere (Reppert et al., 2002). Zur Klärung dieser Fragestellung erfolgte eine Cotransfektion der jeweiligen Expressionsplasmide mPER1 und mPER2 mit mGnRH-Rezeptor-Luciferase-Plasmiden in α T3-1-Zellen. Sowohl die Überexpression von mPER1 als auch von mPER2 führte zu einer signifikanten Abnahme der Transkriptionsaktivität des Luciferase-Reportergens, welches unter der transkriptionellen Kontrolle, der vorgeschalteten Teilregion des Promotors des mGnRH-Rezeptor-Genes steht. Es kann so auf einen Einfluss der Transkriptionsfaktoren mPER1 bzw. mPER2 auf die Regulation der Genexpression des mGnRH-Rezeptor-Genes rückgeschlossen werden.

Der negative „Feedback loop“ des circadianen Uhrenmodells beinhaltet die dynamische Regulation der drei *Period* Gene sowie der zwei *Cryptochrome* Gene. Die rhythmische Transkription dieser Gene wird durch die bHLH-Transkriptionsfaktoren CLOCK und BMAL1 gesteuert

(Gekakis et al., 1998; Hogenesch et al., 1998; Jin et al., 1999; Kume et al., 1999), wobei innerhalb des SCN mPER1, mPER2 auf Proteinebene im gleichen Rhythmus mit mCRY1 und mCRY2 exprimiert werden (Hastings et al., 2000; Kume et al., 1999; Reppert et al., 2001). Diese synchrone Expression der *mPer*- und *mCry*-Gene scheint in ihrer gemeinsamen (auto)regulatorischen Funktion begründet zu sein. Innerhalb von *Drosophila* gilt das PERIOD-Protein als ein essentielles negativ regulatorisches Element innerhalb der transkriptionellen/translationalen Rückkopplungsschleife der Fliege. Die Strukturhomologie der mPER-Proteine mit dem *Drosophila* PERIOD-Protein führte zu der Annahme, dass auch innerhalb der Gattung der Säugetiere die drei PER-Proteine eine zentrale Rolle bei der negativen Regulation innerhalb des circadianen Uhrenmodells spielen. Vergleichbar mit dPERIOD besitzen auch alle murinen PER-Proteine eine PAS-Protein Dimerisierungsdomäne, die eine entscheidende Rolle für die Funktion der Proteine zu haben scheint. Bis heute konnten bereits zahlreiche, vermutlich PAS-vermittelte, mPER:mPER-Interaktionen nachgewiesen werden (Reppert et al., 2001). Die mPER-Proteine scheinen jedoch nicht über ein direktes DNA-Bindungsmotiv zu verfügen (Shearman et al., 1997).

Verschiedene Studien haben gezeigt, dass jedes der drei PER-Proteine in der Lage ist in vitro CLOCK:BMAL1 vermittelte Transkriptionsaktivität zu hemmen (Jin et al., 1999; Kume et al., 1999). Dennoch scheinen die murinen PER-Proteine nicht die entscheidende Rolle des negativen Regulationselementes innerhalb des Uhrenmodells der Säugetiere zu spielen. Vielmehr konnten sowohl in vitro als auch in vivo Studien die Bedeutung der mCRY-Proteine als wichtigste negative Regulatoren der transkriptionellen/translationalen Rückkopplungsschleifen des circadianen Uhrenmechanismus der Säugetiere verdeutlichen. Diese mCRY vermittelte Hemmung einer CLOCK:BMAL1 bedingten Transkriptionsaktivität erfolgt unabhängig von mPER und mTIM über direkte Protein-Protein-Interaktion, wobei der genaue Mechanismus bis heute nicht bekannt ist (Reppert et al., 2001). Die Bedeutung der mPER-Proteine als negatives Element der circadianen Regulationsschleife scheint in vivo nicht in einer direkten DNA-Interaktion zu liegen. Der Wiedereintritt der mPER- und mCRY-Proteine als Dimere bzw. im Komplex mit Caseinkinase ϵ/δ in den Zellkern scheint der entscheidende Kontrollpunkt für das Fortbestehen des transkriptionellen circadianen Zyklus zu sein. Bei der Bildung dieser Komplexe konnte die Verfügbarkeit von BMAL1-Protein als der limitierende Faktor identifiziert werden. Dementsprechend spielt die robuste Oszillation der mPER-Proteine im Cytoplasma eine entscheidende Rolle beim Fortbestehen des circadianen Kernmechanismus, in dem sie für den nukleären Wiedereintritt der negativ regulatorisch wirksamen Uhrenkomponenten zur passenden Zeit sorgen (Lee et al., 2001). Die mPER- und mCRY-Proteine stehen in einer gegenseitigen Abhängigkeit, die ihnen eine optimale nukleäre Akkumulation ermöglicht. Diese Tatsache konnte insbesondere in Studien mit Einzel-Gen-Mutationen der jeweiligen Gene *mPer1*, *mPer2*, *mCry1* und *mCry2* im Vergleich zu „Double-Knock-out“-Mäusen bestätigt werden. Der circadiane Zyklus bleibt innerhalb von Tieren mit

Einzel-Gen-Mutationen unbeeinträchtigt, während es zu einem Stopp des circadianen Uhrenmechanismus bei Mutationen beider *mPer* oder beider *mCry*-Gene kommt (Vielhaber et al., 2001; Yagita et al., 2002).

Im Rahmen dieser Arbeit konnte eine Interaktion der Proteine mPER1 und mPER2 mit dem Promotor des mGnRH-Rezeptor-Genes in vitro gezeigt werden. Wie bereits beschrieben gelten die mPER-Proteine als „Clock“-Gene, die wesentlich an der Entstehung des circadianen Kernmechanismus des SCN beteiligt sind. Dennoch scheinen sie, wie oben beschrieben, in vivo nicht zu einer direkten Hemmung der Transkription eines Genes befähigt zu sein, so dass hier eine vermutlich artifizielle Funktion der beiden mPER-Proteine gezeigt wurde.

Ist das mGnRH-Rezeptor-Gen ein „clock-controlled-gene“?

Die zentrale Fragestellung dieser Arbeit beschäftigt sich mit der möglichen Identifikation des mGnRH-Rezeptor-Genes als ein „clock-controlled-gene (ccg)“. Zu diesem Zweck wurde der Promotor des Genes auf seine Fähigkeit zur Interaktion mit spezifisch regulatorischen Elementen der inneren Uhr untersucht. Es konnte eine CLOCK:BMAL1 via E-Box-Interaktion vermittelte Aktivierung der Transkription, welche durch die PAS-Transkriptionsfaktoren mPER1 und mPER2 hemmbar ist, gezeigt werden. Diese Ergebnisse können als wichtige positive Hinweise für eine mögliche Kontrolle der Genexpression des mGnRH-Rezeptor-Genes durch die sog. „Master-Clock“ im SCN gewertet werden. Es scheint eine Verbindung zwischen GnRH-Rezeptor-Gen der Maus und der inneren Uhr zu existieren. Das mGnRH-Rezeptor-Gen wird möglicherweise als ein sog. „ccg“ erster Ordnung über eine direkte Kontrolle der Transkription über CLOCK:BMAL1-Bindung an E-Box-Sequenzen in seinem Promotor reguliert.

Die Kontrolle der eukaryontischen Genexpression ist ein komplexes System, in dem oftmals mehrere regulatorische Sequenzen mit entsprechend interagierenden Bindungsproteinen beteiligt sind, die ein Gen unter kombinatorischer Kontrolle haben (Alberts et al., 2001; Löffler et al., 1998). So stellt der Nachweis eines Einflusses der E-Box-Motive sowie der Transkriptionsfaktoren CLOCK und BMAL1 auf das Expressionsmuster des mGnRH-Rezeptor-Genes nur einen Teilaspekt wesentlich komplexerer Kontrollmechanismen dar. Zudem handelt es sich bei der hier untersuchten Region des mGnRH-Rezeptor-Genes um einen Teilbereich des Promotors, so dass der Einfluss weiterer regulatorischer Sequenzen in anderen Genabschnitten unbekannt ist. Innerhalb des mGnRH-Rezeptor-Promotors wurde beispielsweise an Position -343/-335 ein putatives Repressor Element lokalisiert, nach dessen Deletion die Transkription von Reportergenen signifikant zunahm (Maya-Núñez et al., 1999). Es konnte ebenfalls der Einfluss eines cAMP Response Elementes an Position -107/-100 (Maya-Núñez et al., 1999) sowie die Existenz eines humanen „negativ regulatory element

(NRE)“ an Position -1017/-771 (Cheng et al., 2002) gezeigt werden. Auch für andere nukleäre Transkriptionsfaktoren wie z.B. das ubiquitär exprimierte Octamer-bindung Protein Oct-1 konnte eine Bedeutung bei der Regulation der Genexpression des mGnRH-Rezeptor-Genes gezeigt werden (Cheng et al., 2002).

Gerade die Existenz eines cAMP-response Elementes innerhalb des Promotors des mGnRH-Rezeptor-Genes könnte als ein zusätzlicher Hinweis auf einen Einfluss des circadianen Systems auf die Expression des Genes interpretiert werden. Das cAMP-response-Element wird neben dem E-Box-Motiv als eine weitere regulatorische DNA-Sequenz betrachtet, die eine oszillierende Genexpression vermitteln kann (siehe oben). Aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit des CRE-Elementes (TGACGTCA) mit dem kanonischen E-Box-Motiv (CACGTG) könnten diese beiden regulatorischen Sequenzen von einem gemeinsamen DNA-Enhancer-„Vorfahren“ abstammen, der in der Vergangenheit durch einen einzigen primitiven Transkriptionsfaktor stimuliert wurde. Im Laufe der Evolution wäre aufgrund von Genmutation und Genduplikation eine Divergenz in zwei verschiedene regulatorische Sequenzen mit unterschiedlichen Bindungspartnern denkbar (Kyriacou et al., 2000).

Unter der Annahme, dass die Regulation der Genexpression der Eukaryonten ein vielschichtig regulatorischer Prozess ist, kann die zelluläre Umwelt eines Genes nicht unbeachtet bleiben. Ob ein Transkript oszilliert, scheint abhängig vom jeweiligen Gewebe zu sein, in dem es exprimiert wird. Vermutlich spielen also, bis heute nicht identifizierte, gewebespezifische Faktoren ebenfalls eine Rolle innerhalb des circadianen Systems. Das mGnRH-Rezeptor-Gen wird physiologischerweise in der Hypophyse, dem Hypothalamus, sowie innerhalb der Ovarien, Placenta und Hoden exprimiert, wobei der GnRH-Rezeptor eine Schlüsselrolle innerhalb des Reproduktionssystem der Säugetiere innehat. Die hypothalisch-hypophysär-ovarielle-Achse repräsentiert das Funktionssystem mit dem allgemein bekanntesten biologischen Rhythmus. Der weibliche Zyklus mit seinem cichoralen Rhythmus wird durch eine rhythmische GnRH-Produktion innerhalb des Hypothalamus gesteuert, wobei der Schrittmacher des intrinsischen GnRH-Neuronen-Systems bis heute unbekannt ist. Klassische Experimente an Ratten haben jedoch gezeigt, dass Ovulation und die Steuerung des Oestrogenzyklus unter circadianer Kontrolle stehen (Hoffman et al., 1988; Brown-Grant et al., 1977; Weigand et al., 1980).

Dennoch kann aufgrund der Ergebnisse keine abschliessende Aussage zur bestehenden Fragestellung gemacht werden. Um die Identifizierung des mGnRH-Rezeptor-Genes als ein „clock-controlled-gene“ zu vervollständigen, sollten weitere Untersuchungen folgen. Hierzu wären Untersuchungsmethoden sinnvoll, die das zeitliche Expressionsmuster des Genes anhand von mRNA Messungen in vivo darstellen. Zudem könnte die Expression des Genes in transgenen „Knock-out“-Mäusen, in denen beispielweise homozygote *Clock/Clock*-Mutationen

vorliegen, untersucht werden. Bei diesen Mäusen wäre eine gestörte Expression des GnRH-Rezeptor-Genes zu erwarten.

Diese Arbeit beschäftigt sich mit der Bedeutung der Chronobiologie für die Fertilität der Säugetiere einschliesslich des Menschen auf der Ebene der Grundlagenforschung. Die Bedeutung der Grundlagenforschung der Medizin liegt in der Anwendung möglicher Ergebnisse auf den Menschen, um das Verständnis von Physiologie und Pathophysiologie zu vergrössern und Wege zu neuen Therapiemöglichkeiten von Erkrankungen zu ebnet. Zum Zeitpunkt des heutigen Wissensstandes existiert in der Tat eine Verbindung zwischen circadianem und reproduktivem System. Der genaue Mechanismus der Integration des circadianen „Outputs“ in die Kontrolle der Fortpflanzung ist jedoch bis heute unbekannt. Im Rahmen dieser Arbeit konnte eine Verbindung zwischen dem molekularen Kernmechanismus der circadianen Uhr mit der Kontrolle der Genexpression des Rezeptors des Gonadotropin-Releasing Hormons, dem zentralen Hormon der Reproduktion der Mammalia, aufgezeigt werden. Die Ergebnisse dieser Arbeit können so als ein weiterer winziger Baustein zum Verständnis der Bedeutung des circadianen Systems für die Kontrolle von Verhalten und Physiologie aller Lebewesen gewertet werden. Für die Zukunft könnte ein solches Verständnis die Möglichkeit insbesondere zur Behandlung von Infertilität oder auch zur Erschliessung neuer Methoden der Empfängnisverhütung bieten. Heute gilt weltweit circa jedes siebte Paar als sub-oder infertil, wobei etwa bei 10-15% der Betroffenen trotz intensiver Suche keine Ursache gefunden werden kann. Es wäre also durchaus denkbar, dass die Ursachen der ungewollten Kinderlosigkeit bei einem Teil dieser Patienten an, bis heute unbekannt, Störungen im Bereich der inneren Uhr liegen.

5 Zusammenfassung

Innerhalb dieser Arbeit wurden die transkriptionellen Regulationsmechanismen des mGnRH-Rezeptor-Genes *in vitro* untersucht. Die zentrale Fragestellung beschäftigt sich mit der möglichen Identifikation des mGnRH-Rezeptor-Genes als ein „clock-controlled-gene“. Als „clock-controlled-genes“ werden Gene bezeichnet, deren Expression durch die circadiane Uhr kontrolliert werden, die aber selbst nicht für das Fortbestehen der Uhr notwendig sind. Die Regulation ihrer Genexpression kann auf transkriptioneller, translationaler, sowie post-transkriptioneller oder post-translationaler Ebene erfolgen. Der Promotor des mGnRH-Rezeptor-Genes wurde auf seine Fähigkeit zur Interaktion mit spezifisch regulatorischen Elementen der inneren Uhr untersucht. Zunächst erfolgte die Auswahl und Charakterisierung einer geeigneten Zelllinie, die als Expressionssystem verwendet werden konnte. Mit Hilfe der Western-Blot-Technik konnte der Nachweis der beiden PAS-bHLH-Transkriptionsfaktoren CLOCK und BMAL1, die als zentrale Schlüsselkomponenten des molekularen Kernmechanismus der inneren Uhr der Säugetiere gelten, innerhalb der stabilen, hypophysären Zelllinie α T3-1 erbracht werden. Durch transiente Transfektionsexperimente wurde eine CLOCK:BMAL1 via E-Box-Interaktion vermittelte Aktivierung der Transkription des mGnRH-Rezeptor-Genes, welche durch die PAS-Transkriptionsfaktoren mPER1 und mPER2 hemmbar ist, gezeigt.

Diese Ergebnisse können als wichtige positive Hinweise für eine mögliche Kontrolle der Genexpression des mGnRH-Rezeptor-Genes durch die sog. „Master-Clock“ im SCN gewertet werden. Es scheint eine Verbindung zwischen dem GnRH-Rezeptor-Gen der Maus und der inneren Uhr zu existieren. Das mGnRH-Rezeptor-Gen wird möglicherweise als ein sog. „clock-controlled-gene erster Ordnung“ über eine direkte Kontrolle der Transkription durch Bindung von CLOCK:BMAL1-Heterodimeren an E-Box-Sequenzen in seinem Promotor reguliert. Aufgrund der Ergebnisse dieser Arbeit kann jedoch keine abschliessende Aussage zur bestehenden Fragestellung gemacht werden. Um die Identifizierung des mGnRH-Rezeptor-Genes als ein „clock-controlled-gene“ zu vervollständigen, sollten weitere Untersuchungen folgen. Insbesondere wären Untersuchungsmethoden sinnvoll, die das zeitliche Expressionsmuster des Genes anhand von mRNA Messungen *in vivo* darstellen.

Eine mögliche Verbindung der transkriptionellen/translationalen Regulationsmechanismen der inneren Uhr mit dem mGnRH-System bzw. dem mGnRH-Rezeptor könnten neue Einsichten zum Verständnis der Physiologie der Reproduktion der Säugetiere bieten. Auf dem Gebiet der Humanmedizin könnte dieses zukünftige Wissen ein besseres Verständnis der Pathogenese von Störungen der Fertilität ermöglichen, sowie insbesondere Ansätze zu neuen Therapieverfahren bieten.

6 Literaturverzeichnis

- Albarracin, C.T., Kaiser, U.B., Chin, W.W.** (1994) Isolation and characterization of the 5'-flanking region of the mouse gonadotropin releasing hormone receptor gene. *Endocrinology*, 135 (6): 2297-2299
- Alberts, B., Bray, D., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P.** (2001) Kapitel 8: Chromosomen und Genregulation. In: *Lehrbuch der molekularen Zellbiologie (2. Auflage)*, WILEY-VCH Verlag GmbH, Weinheim (D); pp 261-295
- Albrecht, U.** (2002) Invited Review: Regulation of mammalian circadian clock genes. *J. Appl. Physiol.*, 92: 1348-1355
- Allen, E.W., England, G.C.W.** (1996) Kapitel 7: Endokrinologie der Fortpflanzung bei der Hündin. In: *Kompendium der Endokrinologie-Hund und Katze* (M. Hutchison, ed), Schlütersche Verlagsanstalt, Hannover (D); pp 124-137
- Allen, E.W., England, G.C.W.** (1996) Kapitel 6: Endokrinologie der Fortpflanzung beim Rüden In: *Kompendium der Endokrinologie-Hund und Katze* (M. Hutchison, ed), Schlütersche Verlagsanstalt, Hannover (D); pp 119-123
- Akhtar, R.A., et al.** (2001) Circadian cycling of the mouse liver transcriptome, as revealed by cDNA microarray, is driven by the suprachiasmatic nucleus. *Curr. Biol.*, 12: 540-550
- Arora, K.K., Atsushi, S., Catt, K.J.** (1995) Effects of second intracellular loop mutations on signal transduction and internalization of gonadotropin-releasing hormone receptor. *Journal of Biol. Chemistry*, 270 (39): 22820-22826
- Baler, R., Covington, S., Klein, D.C.** (2000) Rat arylalkylamine N-actyltransferase gene: Upstream and intronic components of bipartite promotor. *Biol. Cell.*, 91: 699-705
- Balsalobre, A., Damiola, F., Schibler, U.** (1998) A serum shock induces circadian expression in mammalian tissue culture cells. *Cell*, 93: 929-937
- Balsalobre, A., Marcacci, L., Schibler, U.** (2000) Multiple signaling pathways elicit circadian gene expression in cultured Rat-1 fibroblasts. *Curr. Biol.*, 10: 1291-1294
- Baldwin, J.M.** (1993) The probable arrangements of the helices in G protein coupled receptors. *EMBO J.*, 12: 1693-1703
- Bartness, T.J., Song, C.K., Demas, G.E.** (2001) SCN efferents to peripheral tissues: implications for biological rhythms. *J. Biol. Rhythms*, 16: 196-204
- Bell-Pedersen, D., Dunlap, J.C., Loros, J.J.** (1996) Distinct cis-acting elements mediate clock, light, and developmental regulation of *Neurospora crassa eas (ccg-2)* gene. *Mol. Cell. Biol.*, 16: 513-521
- Belvin, M.P., Covington, S., Klein, D.C.** (1999) The *Drosophila* dCREB2 gene affects the circadian clock. *Biol. Cell*, 91: 699-705
- Bendall, A., Molloy, P.** (1994) Base preferences for DNA binding by the bHLH-Zip protein USF: effects of MgCl₂ on specificity and comparison with binding of Myc family members. *Nucleic Acids Res.*, 22: 2801-2810
- Biben, C., Kirschbaum, B., Garner, I., Buckingham, M.** (1994) Novel muscle-specific enhancer sequences upstream of the cardiac actin gene. *Mol. Cell. Biol.*, 14: 3504-3513

- Blackwell, K., Weintraub, H.** (1990) Differences and similarities in DNA-binding preferences of MyoD and E2A protein complexes revealed by binding site selection. *Science*, 250: 1104-1110
- Bodner, M., Castrillo, J.L., Theill, L.E., Deerinck, T., Ellismein, M., Karin, M.** (1988) The pituitary-specific transcription factor GHF-1 is a homeobox-containing protein. *Cell*, 55: 505-518
- Brooks, J., Taylor, P.L., Saunders, P.T., Eidne, K.A., Struthers, W.J., McNeilly, A.S.** (1993) Cloning and sequencing of the sheep pituitary gonadotropin-releasing hormone receptor and changes in expression of its mRNA during estrous cycle. *Mol. Cell. Endocrinol.*, 94: R23-R27
- Brown-Grant, K., Raisman, G.** (1977) Abnormalities in reproductive function associated with the destruction of the suprachiasmatic nuclei in female rats. *Proc. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.*, 198: 279:296
- Bunger, M.K. et al.** (2000) *Mop3* is an essential component of the master pacemaker in mammals. *Cell*, 103: 1009-1017
- Burgess, H.J., Fogg, L.F., Yound, M.A., Eastman, Cl.** (2004) Bright light therapy for winter depression--is phase advancing beneficial? *Chronobiol. Int.*, 21(4-5): 759-775
- Burke, Z., Wells, T., Carter, D., Klein, D., Baler, R.** (1999) Genetic targeting: the serotonin N-acetyltransferase promoter imparts circadian expression selectively in the pineal gland and retina of transgenic rats. *J. Neurochem.*, 73: 1343-1349
- Campion, C.E., Turzillo, A.M., Clay, C.M.** (1996) The gene encoding the ovine gonadotropin-releasing hormone (GnRH) receptor: cloning and initial characterization. *Gene*, 170: 277-280
- Cavallo, A.** (1993) The pineal gland in human beings: relevance to pediatrics. *J. Pediatr.*, 123: 843-851.
- Cermakian, N., Whitmore, D., Foulkes, N.S., Sassone-Corsi, P.** (2000) Asynchronous oscillations of two zebrafish CLOCK partners reveal different clock control and function. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97: 4339-4344
- Cho, R.J., Fromont-Racine, M., Wodicka, L., Feierbach, B., Stearns, T., Legrain, P., Lockhart, D.J., Davis, R.W.** (1998) Parallel analysis of genetic selections using whole genome oligonucleotide arrays. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95: 3752-3757
- Claridge-Chang, A., Wijnen, H., Naef, F., Boothroyd, C., Rajewsky, N., Young, M.W.** (2001) Circadian regulation of gene expression systems in *Drosophila* head. *Neuron*, 32: 657-671
- Cheng, C.K., Yeung, C.M., Hoo, R.L.C., Chow, B.K.C., Leung, P.C.K.** (2002) Oct-1 is involved in the transcriptional repression of the gonadotropin-releasing hormone receptor gene. *Endocrinology*, 143(12): 4693-4701
- Cheng, K.W., Ngan, E.S.W., Kang, S.K., Chow, B.K.C., Leung, P.C.K.** (2000) Transcriptional downregulation of human gonadotropin-releasing hormone (GnRH) receptor gene by GnRH: role of protein kinase C and activating protein 1. *Endocrinology*, 141: 3611-3622
- Cheng, M.Y., Bullock, C.M., Li, C., Lee, A.G., Bermak, J.C., Belluzzi, J., Weaver, D.R., Leslie, F.M., Zhou, Q.Y.** (2001) Prokineticin 2 transmits the behavioural circadian rhythm of the suprachiasmatic nucleus. *Nature*, 417: 405-410
- Chi, L., Zhou, W., Prikhozhan, A., Flanagan, C.A., Davidson, J.S., Golembo, M., Illing, N., Millar, R.P., Sealfon, S.C.** (1993) Cloning and characterization of a human GnRH receptor. *Mol. Cell. Endocrinol.*, 90: R1-R6

- Clay, C.M., Nelson, S.E., DiGreorio, G.B., Campion, C.E., Wiedemann, A.L., Nett, R.J.** (1995) Cell-specific expression of the mouse gonadotropin-releasing hormone (GnRH) gene is conferred by elements residing within 500 bp of proximal 5'-flanking region. *Endocrinology*, 3: 615-622
- Clayton, R.N., Harwood, J.P., Catt, K.J.** (1979) Gonadotropin-releasing hormone analogue binds to luteal cells and inhibits progesterone production. *Nature*, 282: 90-92
- Currie, A.J., Fraser, H.M., Sharpe, R.M.** (1981) Human placental receptors for luteinizing hormone releasing hormone. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 99: 332-338
- Clayton, R.N., Catt, K.J.** (1981) Gonadotropin releasing hormone receptors: characterisation, physiological regulation and relationship to reproductive function. *Endocr.Rev.*, 2: 186-209
- Clayton, R.N., Catt, K.J.** (1981) Regulation of pituitary gonadotropin-releasing hormone receptors by gonadal hormones. *Endocrinology*, 108: 887-885
- Damiola, F., Le Minh, N., Preitner, N., Kornmann, B., Fleury-Olela, F., Schibler, U.** (2000) Restricted feeding uncouples circadian oscillators in peripheral tissues from central pacemaker in the suprachiasmatic nucleus. *Genes Dev.*, 14: 2950-2961
- Darlington, T., Wager-Smith, K., Ceriani, K., Staknis, D., Gekakis, N., Steeves, T., Weitz, C., Takahashi, J., Kay, S.** (1998) Closing the circadian loop: CLOCK-induced transcription of its own inhibitors *per* and *tim*. *Science*, 280: 1599-1603
- Darlington, T.K., Lyons, L.C., Hardin, P.E., Kay, S.A.** (2000) The *period* E-box is sufficient to drive circadian oscillation of transcription in vivo. *J. Biol. Rhythms*, 15 (5): 462-470
- Delaunay, F., Laudet, V.** (2002) Circadian clock and microarrays: mammalian genome gets rhythm. *TRENDS in Genetics*, 18: 595-597
- Desbarats, L., Gaubatz, S., Eilers, M.** (1996) Discrimination between different E-box-binding proteins at an endogenous target gene of c-myc. *Genes Dev.*, 10: 447-460
- Duffield, G.E., Best, J.D., Meurers, B.H., Bittner, A., Lorros, J.J., Dunlap, J.C.** (2002) Circadian programs of transcriptional activation, signaling, and protein turnover revealed by microarray analysis of mammalian cells. *Curr Biol.*, 12(7): 551-7
- Duval, D.L., Ellsworth, B.S., Clay, C.M.** (1997a) The tripartite basal enhancer of the gonadotropin-releasing hormone (GnRH) receptor gene promoter regulates cell-specific expression through a novel GnRH receptor activating sequence. *Mol. Endocrinology*, 11: 1814-1821
- Duval, D.L., Nelson, S.E., Clay, C.M.** (1997b) A binding site for steroidogenic factor-1 is part of a complex enhancer that mediates expression of the murine gonadotropin-releasing hormone receptor gene. *Biol. Reprod.*, 56: 160-168
- Eide, E.J., Vielhaber, E.L., Hinz, W.A., Virshup, D.M.** (2002) The circadian regulatory protein BMAL1 and cryptochromes are substrates of casein kinase 1 ϵ (CK1 ϵ). *J. Biol. Chem.*, 277: 17248-17254
- Emanuele, N.V., Emanuele, M.A., Tentler, J., Kirsteins, L., Azad, N., Lawrence, A.M.** (1990) Rat splen lymphocytes contains an immunoreactive and bioactive luteinizing hormone releasing-hormone. *Endocrinology*, 126: 2482-2486

- Fan, N.C., Peng, C., Krinsinger, J., Leung, P.C.K.** (1995) The human gonadotropin-releasing hormone receptor gene: complete structure including multiple promoters, transcriptions initiation sites and polyadenylation signals. *Mol. Cell. Endocrinol.*, 107: R1-R8
- Ferris, C.F., Albers, H.E., Wesolowski, S.M., Goldman, B.D., Leman, S.E.** (1984) Vasopressin injected into the hypothalamus triggers a stereotypic behavior in golden hamsters. *Science*, 224: 521-523
- Fisher, F., Crouch, D., Jayaraman, P., Clark, W., Gillespie, D., Goding, C.** (1993) Transcription activation by Myc and Max: flanking sequences target activation to a subset of CACGTG motifs in vivo. *EMBO J.*, 12: 5075-5082
- Forger, D.B., Peskin, C.S.** (2003) A detailed predictive model of the mammalian circadian clock. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 100(25): 14806-11
- French, B., Chow, K., Olson, E., Schwartz, R.** (1991) Heterodimers of myogenic helix-loop-helix regulatory factors and E12 bind a complex element governing myogenic induction of the avian cardiac alpha-actin promoter. *Mol. Cell. Biol.*, 11: 2439-2450
- Gassen, H.-G., Schrimpf, G. (Hrsg.)** (1999) Protein-Blotting: Western-Blot und andere Overlay-Techniken In: Gentechnische Methoden 2. Auflage-Heidelberg; Berlin: Spektrum, Akad. Verlag
- Gekakis, N., Staknis, D., Nguyen, H., Davis, F., Wilsbacher, L., King, D., Takahashi, J., Weitz, C.** (1998) Role of the CLOCK protein in the mammalian circadian mechanism. *Science*, 280: 1564-1569
- Gershengorn, M.C., Osman, R.** (2001) Insight into G protein coupled receptor function using molecular models. *Endocrinology*, 142: 2-10
- Gether, U., Kolbilka, B.K.** (1998) G protein couples receptors.II. Mechanism of agonist activation. *J. Biochem. Chem.*, 273: 17979-17982
- Hamerik, D.L., Crowder, M.E., Nilson, J.H., et al.** (1986) Measurement of messenger ribonucleic acid for luteinizing hormone beta-subunit, alpha-subunit, growth hormone and prolactin after hypothalamic pituitary disconnection in ovariectomized ewes. *Endocrinology*, 119: 2704-2710
- Hao, H., Allen, D.L., Hardin, P.E.** (1997) A circadian enhancer mediates PER-dependent mRNA cycling in *Drosophila melanogaster*. *Mol. Cell. Biol.*, 17: 3687-3693
- Hastings, M., Maywood, E.S.** (2000) Circadian clocks in the mammalian brain. *BioEssays*, 22: 23-31
- Heding, A., Vrecl, M., Bogard, J., McGregor, A., Sellar, R., Taylor, P.L., Eidne, A.E.** (1998) Gonadotropin-releasing hormone receptor with intracellular carboxyl-terminal tail undergo acute desensitization of total inositol phosphat production and exhibit accelareted internalization kinetics. *J. Biol. Chem.*, 273: 11472-114
- Hida, A., Koike, N., Hirose, M., Hattori, M., Sakaki, Y., Tei, H.** (2000) The human and mouse *Period1* genes: Five well-conserved E-boxes additively contribute to the enhancement of mPer1 transcription. *Genomics*, 65: 224-233
- Ho, S.N., Hunt, H.D., Horton, R.M., Pullen, J.K., Pease, L.R.** (1989) Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction. *Gene*, 77: 51-59

- Hoffman, J.C.** (1988) The influence of photoperiod on reproductive function in female mammals. In: *Physiology of Reproduction* (Knobil, E., Neill, J., eds.) New York: Raven Press, pp: 57-77
- Hogenesch, J.B., Gu, Y.-Z., Jain, S., Bradfield, C.A.** (1998) The basic helix-loop-helix-PAS-orphan MOP3 forms transcriptionally active complexes with circadian and hypoxia factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95: 5474-5479
- Hogenesch, J.B. Gu, Y.Z., Moran, S.M., Shimomura, K., Radcliffe, L.A., et al.** (2000) The basic helix-loop-helix-PAS protein MOP9 is a brain-specific heterodimeric partner of circadian and hypoxia factors. *J. Neurosci.*, 20: RC 83
- Honma, S., Katsuno, Y., Tanahashi, Y., Abe, H., Honma, K.** (1998) Circadian rhythms of arginine-vasopressin and vasoactive intestinal polypeptide do not depend on cytoarchitecture of dispersed cell culture rat suprachiasmatic nucleus. *Neuroscience*, 86: 967-976
- Hotchkiss, J., Knobil, E.** (1996) Kapitel 7: The Hypothalamic Pulse Generator: The Reproductive Core. In: *Reproductive Endocrinology, Surgery, and Technology Vol.1* (Adashi, E.Y., Rock, J.A., Rosenwaks, Z.) Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia USA; 146 pp
- Horn, F., Bilezikjian, L.M., Perrin, M.H., Bosma, M.M., Windle, J.J., Huber, K.S., Bount, A.L., Hile, B., Vale, W., Mellon, P.L.** (1991) Intracellular responses to gonadotropin-releasing hormone in a clonal cell line of gonadotrope lineage. *Mol. Endocrinol.*, 5: 347-355
- Hwang, A., Maity, A., McKenna, W., Muschel, R.** (1995) Cell cycle-dependent regulation of the Cyclin B1 promoter. *J. Biol. Chem.*, 270: 28419-28424
- Imagwa, M., Chiu, R., Karin, M.** (1987) Transcription factor AP-2 mediates induction by two different signal-transduction pathways; protein kinase C and cAMP. *Cell*, 51: 251-260
- Ingraham, H.A., Flynn, S.E., Voss, J.W., Albert, V.R., Kapiloff, M.S., Wilson, L., Rosenfeld, M.G.** (1990) The POU-specific domain of Pit-1 is essential for sequence specific, high affinity binding and DNA-dependent Pit1-Pit1 interactions. *Cell*, 61: 1021-1033
- Inouye, S.T., Kawamura, H.** (1979) Persistence of circadian rhythmicity in a mammalian hypothalamic „island“ containing the suprachiasmatic nucleus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76: 5962-5966
- Irvine, C.H.G., Alexander, S.L.** (1993) GnRH. In: *Equine Reproduction* (A.O. McKinnon & J.L. Voss, eds), Lea & Febiger, Philadelphia (USA); pp 37-44,
- Iwasaki, Y., Oiso, Y., Saito, H., Majzoub, J.A.** (1997) Positive and negative regulation of the rat vasopressin gene promoter. *Endocrinology*, 138: 5266-5274
- Jin, X., Shearman, L.P., Weaver, D., Zylka, M.J., De Vries, G.J., Reppert, S.** (1999) A molecular mechanism regulating rhythmic output from the suprachiasmatic circadian clock. *Cell*, 96: 57-68
- Kaiser, U.B., Jakubowiak, A., Steinberger, A., Chin, W.W.** (1993) Regulation of rat pituitary gonadotropin-releasing hormone mRNA levels in vivo and vitro. *Endocrinology*, 133: 931-934
- Kakar, S.S., Malik, M.T., Winters, S.J.** (2002) Gonadotropin-releasing hormone receptor: cloning, expression and transcriptional regulation. *Progress in Brain Research*, Vol.141
- Kakar, S.S.** (1997) Molecular structure of the human gonadotropin-releasing hormone receptor gene. *Eur. J. Endocrinol.*, 137: 183-192

- Kakar, S.S., Neill, J.D.** (1994) The human gonadotropin-releasing hormone gene (GnRHR) maps to chromosome 4q13.1. *Cytogenet. Cell Genet.*, 70: 211-214
- Kakar, S.S., Musgrove, L.C., Devor, D.C., Sellers, J.C., Neill, J.D.** (1992) Cloning, sequencing, and expression of human gonadotropin-releasing hormone (GnRH) receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 189: 289-295
- Kakar, S.S., Rahe, C.H., Neill, J.D.** (1993) Molecular cloning, sequencing, and characterization of the bovine receptor for gonadotropin-releasing hormone (GnRH). *Domest. Anim. Endocrinol.*, 10: 335-342
- Kakar, S.S., Grantham, K., Musgrove, L.C., Devor, D.C., Sellers, J.C., Neill, J.D.** (1994a) Rat gonadotropin-releasing hormone (GnRH) receptor; tissue expression and hormonal regulation of its mRNA. *Mol. Cell. Endocrinol.*, 1010: 151-157
- Kalsbeek, A., Van Der Vliet, J., Buijs, R.M.** (1996a) Decrease of endogenous vasopressin release necessary for expression of the circadian rise in plasma corticosterone: a reverse microdialysis study. *J. Neuroendocrinol.*, 8: 299-307
- Kalsbeek, A., van Heerikhuizen, J.J., Wortel, J., Buijs, R.M.** (1996b) A diurnal rhythm of stimulatory input to the hypothalamo-pituitary-adrenal system as revealed by timed intrahypothalamic administration of the vasopressin V_1 antagonist. *J. Neurosci.*, 16: 5555-5565
- Kalsbeek, A., Buijs, R.M.** (2002) Output pathways of the mammalian suprachiasmatic nucleus: coding circadian time by transmitter selection and specific targeting. *Cell Tissue Res.*, 309: 109-118
- Kang, S.K., Cheng, K.W., Ngan, E.S.W., Chow, B.K.C., Choi, K., Leung, P.C.K.** (2000) Differential expression of human gonadotropin-releasing hormone receptor gene in pituitary and ovarian cells. *Mol. Cell. Endocrinol.*, 162: 157-166
- Kesner, J.S., Kaufman, J.-M., Wilson, R.C., Kuroda, G., Knobil, E.** (1986) The effect of morphine on the electrophysiological activity of the hypothalamic luteinizing hormone releasing hormone pulse generator in the rhesus monkey. *Neuroendocrinology*, 43: 686-688
- King, D.P. et al.** (1997) Positional cloning of the mouse circadian *Clock* gene. *Cell*, 89: 641-653
- Kita, Y. et al.** (2002) Implication of circadian gene expression in kidney, liver and the effects of fasting on pharmacogenomic studies. *Pharmacogenetics*, 12: 55-65
- Knobil, E.** (1989) The electrophysiology of the GnRH Pulse Generator. *J. Steroid. Biochem.*, 33: 669
- Kraner, S., Rich, M., Kallen, R., Barchi, R.** (1998) Two E-Boxes are the focal point of muscle-specific skeletal muscle type 1 Na^+ channel gene expression. *J. Biol. Chem.*, 273(18): 11327-11334
- Krsmanovic, L.Z., Stojilkovic, S.S., Mertz, L.M., Tomic, M., Catt, K.J.** (1993) Expressing of gonadotropin-releasing hormone receptors and autocrine regulation of neuropeptide release in immortalized hypothalamic neurons. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 90: 3908-3912
- Kuhlmann, S.J., Quintero, J.E., McMahon, D.G.** (2000) GFP fluorescence reports *Period1* circadian gene regulation in the mammalian biological clock. *NeuroReport*, 11: 1479-1482
- Kume, K., Zylka, M.J., Sriram, C., Shearman, C.D., Weaver, D.R., Jin, X., Maywood, C.S., Hastings, M.H., Reppert, S.M.** (1999) mCRY1 and mCRY2 are essential components of the negative limb in circadian clock feedback loop. *Cell*, 98: 193-205

- Kyriacou, C.P., Rosato, E.** (2000) Squaring up the E-box. *J.Biol.Rhyth.*,15 (6): 483-490
- Lauder, V., Gronemeyer, H.** (2002) *The nuclear receptor Factsbook*, Academic Press
- Lavery, D.J., Lopez-Molina, L., Margueron, R., Fleury-Olela, F., Conquet, F., Schibler, U., Bonfils, C.** (1999) Circadian expression of steroid 15 α -hydroxylase (Cyp2a4) and coumarin 7-hydroxylase (Cyp2a5) genes in mouse liver is regulated by PAR leucine zipper transcription factor DBP. *Mol. Cell. Biol.*, 19: 5316-5325
- Lee, C., Etchegaray, J.P., Cagampang, F.R., London, A.S., Reppert, S.M.** (2001) Posttranslational mechanisms regulate the mammalian circadian clock. *Cell*, 107: 855-867
- Liu, C., Reppert, S.M.** (2000) GABA synchronizes clock cells within suprachiasmatic circadian clock. *Neuron*, 25: 123-128
- Löffler, G., Petrides, P.** (1998) Kapitel10: Transkription und posttranskriptionelle Prozessierung. In: *Biochemie und Pathobiochemie (6. Auflage)*, Springer Verlag Berlin Heidelberg New York, pp239-265
- Lowrey, P.L.** (2000) Positional syntenic cloning and functional characterisation of a mammalian circadian mutation tau. *Science*, 288: 483-491
- Lyons, L.C., Darlington, T.K., Hao, H., Houl, J., Kay, S. A., Hardin, P.E.** (2000) Specific sequences outside the E-box are required for proper *per* expression and behavioral rescue. *J. Biol. Rhythms*, 15 (6): 472-482
- Martinez de la Escalera, G., Choi, A.L.H., Weiner, R.I.** (1992) Generation and synchronization of GnRH pulses: intrinsic properties of the Gt1-1 GnRH neuronal cell line. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89: 1852-1855
- Massari, M.E., Murre, C.** (2000) Helix-Loop-Helix Proteins: Regulator of transcription in eukaryotic organisms. *Mol. Cell. Biol.*, 20: 429-440
- Maya-Núñez, G., Conn, P.M.** (1999) Transcriptional regulation of the gonadotropin-releasing hormone receptor gene is mediated in part by a putative repressor element and by the cyclic adenosin 3', 5'-monophosphate response element. *Endocrinology*, 140 (8): 3452-3458
- McDonald, M.J., Robash, M.** (2001) Microarray analysis and organization of circadian gene expression in *Drosophila*. *Cell*, 107: 567-578
- McNamara, P., Seo, S., Rudic, R.D., Sehgal, A., Chakravarti, D., FitzGerald, G.** (2001) Regulation of CLOCK and MOP4 by nuclear hormone receptor in the vasculature: a humoral mechanism to reset a peripheral clock. *Cell*, 105: 877-889
- Mellon, P.L., Windle, J.J., Goldsmith, P.C., Padula, C.A., Roberts, J.L., Weiner, R.I.** (1990) Immortalization of hypothalamic GnRH neurons by genetic tumorigenesis. *Neuron*, 5: 1-10
- Meyer-Bernstein, E.L., Jetton, A.E., Matsumoto, S.I., Markuns, J.F., Lehman, M.N., Biiman, E.L.** (1999) Effects of suprachiasmatic transplants on circadian rhythms of neuroendocrine functions in golden hamsters. *Endocrinology*, 140: 207-218
- Mercer, J.E., Clements, J.A., Funder, J.W., et al.** (1984) Luteinizing hormone-beta-mRNA levels are regulated primarily by gonadotropin-releasing hormone and not by negative estrogen feedback on pituitary. *Neuroendocrinology*, 39: 214-221
- Mihai, R., Juss, T.S., Ingram, C.D.** (1994a) Suppression of suprachiasmatic nucleus neuron activity with a vasopressin receptor antagonist: possible role for endogenous vasopressin in circadian activity cycles in vitro. *Neurosci. Lett.*, 179: 95-99

- Mihai, R., Coculescu, M., Wakerley, J.B., Ingram, C.D.** (1994b) The effects of (Arg8) vasopressin and (Arg8) vasotocin on the firing rate of suprachiasmatic neurons in vitro. *Neuroscience*, 62: 783-792
- Miller, B.H., Olson, S.L., Turek, F.W., Levine, J.E., Horton, T.H., Takakashi, J.S.** (2004) Circadian *clock* mutation disrupts estrous cyclicity and maintenance of pregnancy. *Current Biology*, 14: 1367-1373
- Miller-Craig, M.W., Bishop, C.N., Raftery, E.B.** (1978) Circadian variation of blood-pressure. *Lancet*, 8068: 795-797
- Mitchell, P.R., Tijan, R.** (1989) Transcriptional regulation in mammalian cells by sequence-specific DNA binding proteins. *Science*, 245: 371
- Mol, J.A., Forsberg, M.** (1997) Pituitary Function. In: *Clinical Biochemistry of Domestic Animals* (Kaneko, J.J., Harvey, J.W., Bruss, M.L., eds), Academic Press, San Diego (USA); pp 517-551
- Muller, J.E., Tofler, G.H., Stone, P.H.** (1989) Circadian variation and triggers of onset of acute cardiovascular disease. *Circulation*, 79: 733-743
- Munoz, E., Brewer, M., Baler, R.** (2002) Circadian transcription. *J. Biol. Chem.*, 277 (39): 36009-36017
- Naor, Z., Childs, G.V.** (1984) Binding and activation of gonadotropin-releasing hormone receptor in pituitary and gonadal cells. *Int. Rev. Cytol.*, 103: 147-156
- Naor, Z., Atlas, D., Clayton, R.N., Forman, D.S., Amsterdam, A., Catt, K.J.** (1981) Interaction of Fluorescent gonadotropin-releasing hormone with receptors in cultured pituitary cells. *J. Biol. Chem.*, 256 (6): 3049-3052
- Neumann, F., Schenck, B., Schleusener, H., Schweikert, H.U.** (1992) Endokrinopharmakologie In: *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie* (W. Forth, D. Henscheler & W. Rummel, eds), BI Wissenschaftsverlag, Mannheim (D); pp 528-579
- Ngan, E.S.W., Cheng, P.K.W., Leung, P.C.k., Chow, B.K.C.** (1999) Steroidgenic factor-1 interact with the first exon of human gonadotropin-releasing hormone gene to mediate gonadotrope-specific expression. *Endocrinology*, 140: 2452-2462
- Ngan, E.S.W., Leung, P.C.K., Chow, B.K.C.** (2000) Identification of an upstream promotor in human gonadotropin-releasing hormone receptor gene. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 270: 766-772
- Norwitz, E.R., Cardona, G.R., Jeong, K.H., Chin, W.W.** (1999) Identification and characterization of the gonadotropin-releasing hormone response element in the mouse gonadotropin-releasing hormone receptor gene. *J. Biol. Chem.*, 274: 2389-2392
- Obrietan, K., Impey, S., Smith, D., Athos, J., Storm, D.R.** (1999) Circadian regulation of cAMP response element-mediated gene expression in the suprachiasmatic nuclei. *J. Biol. Chem.*, 274: 17748-17756
- Oishi, K., Fukui, H., Ishida, N.** (2000) Rhythmic expression of BMAL1 mRNA is altered in *Clock* mutant mice: differential regulation in the suprachiasmatic nucleus and peripheral tissues. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 268: 164-171

- Pagesy, P., Li, J.Y., Berthet, M., Peillon, F.** (1992) Evidence of gonadotropin-releasing hormone mRNA in the rat anterior pituitary. *Mol Endocrinol.*, 6: 523-528
- Panda, S. et al.** (2002) Coordinated transcription of key pathways in the mouse by the circadian clock. *Cell*, 109: 307-320
- Pau, K.-Y., Hess, D.L., Kaynard, A.H., Ji, W.-Z., Gleissman, M., Spies, H.G.** (1989) Suppression of mediobasal hypothalamic gonadotropin-releasing hormone and plasma luteinizing hormone pulsatile patterns by phentolamine in ovariectomized rhesus monkey. *Endocrinology*, 124: 891-898
- Pirke, K.M., Wuttke, W., Schweiger, U., eds.** (1989) *The menstrual cycle and its disorders*. New York, NY: Springer Verlag
- Preitner, N. et al.** (2002) The orphan nuclear receptor REV-ERB α controls circadian transcription within the positive limb of the mammalian circadian oscillator. *Cell*, 110: 251-260
- Ralph, M.R., Foster, R.G., Davis, F.C., Menaker, M.** (1990) Transplanted suprachiasmatic nucleus determines circadian period. *Science*, 247: 975-978
- Reppert, S.M., Schwartz, W.J., Uhl, G.R.** (1987) Arginine vasopressin: a novel peptide rhythm in cerebrospinal fluid. *TINS*, 10: 76-80
- Reppert, S.M., Weaver, D.R.** (2001) Molecular analysis of mammalian circadian rhythms. *Ann. Rev. Physiol.*, 63: 647-676
- Reppert, S.M., Weaver, D.** (2002) Coordination of circadian timing in mammals. *Nature*, 418: 935-941
- Ripperger, J.A., Shearman, L., Reppert, S., Schibler, U.** (2000) CLOCK, an essential pacemaker component, controls expression of the circadian transcription factor DBP. *Genes Dev.*, 14: 679-689
- Ripperger, J.A., Schibler, U.** (2001) Circadian regulation of gene expression in animals. *Cell Biology*, 13: 357-362
- Roche Lexikon Medizin**, 4.Auflage (1999); Urban & Fischer Verlag, München 1984/1987/1993/1999
- Robertson, L.M., Kerpolla, T.K., Vendrell, M., Luk, D., Smeyne, R.J., Bocchiaro, C., Morgan, J.I., Curran, T.** (1995) Regulation of c-fos expression in transgenic mice requires multiple interdependent transcriptional control elements. *Neuron*, 14: 241-252
- Sakamoto, K. et al.** (1998) Multitissue circadian expression of rat period homolog (rPer2) mRNA is governed by the circadian clock, the suprachiasmatic nucleus in the brain. *J. Biol. Chem.*, 273: 27039-27042
- Schally, A.V., Arimura, A., Kastin, A.J.** (1971) Isolation, structural determination and synthesis of hypothalamic LH and FSH releasing hormone. *Res. Reprod.*, 3, 1
- Schertler, G.F.X., Villa, C., Henderson, R.** (1993) Projection structure of rhodopsin. *Nature*, 362: 770-772

- Scholtz, B., Kingsley- Kalleisen, M., Rizzino, A.** (1996) Transcription of the transforming Growth Factor- α 2 Gene is dependent on an E-box located between an essential cAMP Response Element/Activating transcription factor motif and the TATA Box of the gene. *J. Biol. Chem.*, 271, 32375-32380
- Shearman, L.P., Zylka, M.J., Weaver, D.R., Kolakowski, L.F. Jr, Reppert, S.M.** (1997) Two *period* homologs: circadian expression and photic regulation in the suprachiasmatic nuclei. *Neuron*, 19: 1261-1269
- Shearman, L.P., Zylka, M.J., Reppert, S.M., Weaver, D.R.** (1999) Expression of basic helix-loop-helix/PAS genes in the mouse suprachiasmatic nucleus. *Neuro Science*, 89: 387-397
- Shearman, L.P., Sriram, S., Weaver, D.R., Maywood, E.S., Chaves, I., Zheng, B., Kume, K., Lee, C.C., van der Horst, G.T.J., Hastings, M.H., Reppert, S.M.** (2000) Interacting molecular loops in the mammalian circadian clock. *Science*, 288: 1013-1019
- Shupnik, M.A.** (1990) Effects of gonadotropin-releasing hormone on rat gonadotropin gene transcription in vitro: requirement for pulsatile administration of luteinizing hormone beta gene stimulation. *Mol. Endocrinol.*, 4: 1444-1445
- Seppala, M., Wahlstrom, T.** (1980) Identification of luteinizing hormone-releasing factor and alpha subunit of glycoprotein hormones in ductal carcinoma of the mammary gland. *Int. J. Cancer*, 26: 267-268
- Steiner, R.A.** (1987) Nutritional and metabolic factors in the regulation of the reproductive hormone secretion in the primate. *Proc. Nutr. Soc.*, 46: 159-17
- Stephan, F. et al.** (1972) Circadian rhythms in drinking behavior and locomotor activity of rats are eliminated by hypothalamic lesions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 69: 1583-1586.
- Storch, K.F. et al.** (2002) Extensive and divergent circadian gene expression in liver and heart. *Nature*, 417: 78-83
- Swanson, H., Chan, W., Bradfield, C.** (1995) DNA binding specificities and pairing rules of the Ah Receptor, ARNT, and SIM Proteins. *J. Biol. Chem.*, 270 (44): 26292-26302
- Szende, B., Srkalovic, G., Timar, J., Mulchahey, J.J., Neill, J.D., Lapis, K., Csikos, A., Szepashazi, K., Schally, A.V.** (1991) Localization of luteinizing-hormone-releasing hormone in pancreatic and mammary cancer cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88: 4153-4156
- Tan, L., Rousseau, P.** (1982) The chemical identity of the immunoreactive LHRH-like peptide in the human placenta. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 109: 1061-1071
- Tosini, G., Menaker, M.** (1996) Circadian rhythms in cultured mammalian retina. *Science*, 272: 419-421
- Tosini, G., Menaker, M.** (1998) The clock in the mouse retina: melatonin synthesis and photoreceptor degeneration. *Brain Res.*, 789: 221-228
- Travnickova-Bendova, Z., Cermakian, N., Reppert, S.M., Sassone-Corsi, P.** (2002) Bimodal regulation of *mPeriod* promoters by CREB-dependent signalling and CLOCK:BMAL1 activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 99: 7728-7733
- Tsutsumi, M., Zhou, W., Millar, R.P., Mellon, P.L., Roberts, J.L., Flanagan, C.A., Dong, K.W., Gillo, K., Sealfon, S.C.** (1992) Cloning and functional expression of a mouse gonadotropin-releasing hormone receptor. *Mol. Endocrinol.*, 6: 1163-1169

- Ueda, H.R. et al.** (2002) A transcription factor response element for gene expression during circadian night. *Nature*, 418: 534-539
- Vielhaber, E.L., Duricka, D., Ullman, K.S., Virshup, D.M.** (2001) Nuclear export of mammalian PERIOD proteins. *J. Biol. Chem.*, 276:45921-45927
- Vitaterna, M.H.; King, D.P.; Chang, A.-M.; Kornhauser, J.M.; Lowrey, P.L.; McDonald, J.D.; Dove, W.F.; Pinto, L.H.; Turek, F.W.; Takahashi, J.S.** (1994): Mutagenesis and mapping of a mouse gene, *clock*, essential for circadian behavior. *Science*, 264: 719-725
- Voranova, A., Baltimore, D.** (1990) Mutations that disrupt DNA binding and dimer formation in the E47 Helix-Loop-Helix Protein map to distinct domains. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87 (12), 4722-4726
- Walhout, A.J., Gubbels, J., Bernardis, P.C., van der Vliet, P., Timmers, H.** (1997) c-Myc/Max heterodimers bind cooperatively to the E-box sequences located in the first intron of the rat ornithine decarboxylase (ODC) gene. *Nucleic Acids Res.*, 25 (8): 1493-1501
- Weesner, G.D., Matteri, R.L.** (1994) Nucleotide sequence of luteinizing hormone releasing hormone (LHRH) receptor cDNA in the pig pituitary. *J. Anim.Sci.*, 72: 1911
- Weigand, S.J., Terasawa, E., Bridson, W.E., Goy, R.W.** (1980) Effects of discrete lesions of preoptic and suprachiasmatic structures in the female rat. Alterations in the feedback regulation of gonadotropin secretion. *Neuroendocrinology*, 31: 147-157
- Welsh, D.H., Logothetis, D.E., Meister, M., Reppert, S.M.** (1995) Individual neurons dissociated from rat suprachiasmatic nucleus determines circadian period. *Science*, 247: 975-978
- White, B.R., Duval, D.L., Mulvaney, J.M., Roberson, M.S., Clay, C.M.** (1999) Homologous regulation of gonadotropin-releasing hormone receptor gene is partially mediated by protein kinase C activation of an activator protein-1 element. *Mol. Endocrinol.*, 13: 566-577
- Wierman, M.E.** (1996) Gonadotropin-Releasing Hormone. In: *Reproductive Endocrinology, Surgery, and Technology Vol.1* (Adashi, E.Y., Rock, J.A., Rosenwaks, Z.) Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia USA; 675 pp
- Wierman, M.E., Beardsworth, D.E., Crawford, J.D., et al.** (1986) Adrenarche and skeletal maturation during luteinizing hormone releasing hormone analogues suppression gonadarche. *J. Clin. Invest.*, 77: 121-126
- Willars, G.B., Heding, A., Vrecl, M., Sellar, R., Blumenrohr, M., Nahorski, S.R., Eidne, K.A.** (1999) Lack of a C-terminal tail in the mammalian gonadotropin-releasing hormone receptor confers resistance to agonist-dependent phosphorylation and rapid desensitization. *J.Biol. Chem.*, 274 (42): 30146-30153
- Windle, J.J., Weiner, R.I., Mellon, P.L.** (1990) Cell lines of pituitary lineage derived by targeted oncogenesis in transgenic mice. *Mol. Endocrinol.*, 4: 597-603
- Wonerow, P., Schöneberg, T., Schultz, G., Gudermann, T., Paschke, R.** (1998) Deletion in the third intracellular loop of thyrotropin receptor. *J.Biol.Chem.*, 273: 7900-7905
- Yagita, K., Okamura, H.** (2000) Forskolin induces circadian gene expression of rPer1, rPer2 and dbp in mammalian rat-1 fibroblasts. *FEBS Lett.*, 465: 79-82
- Yagita, K. et al.** (2002) Nucleocytoplasmic shuttling and mCRY-dependent inhibition of ubiquitylation of the mPER2 protein. *EMBO J.*, 21: 1301-1314

Yamazaki, S., Numano, R., Abe, M., Hida, A., Takahashi, R., Ueda, M., Block, G.D., Menaker, M., Tei, H. (2000) Resetting central and peripheral circadian oscillators in transgenic rats. *Science*, 288: 682-685

Yu, W., Nomura, M., Ikeya, M. (2002) Interacting feedback loops within the mammalian clock: BMAL1 is negatively autoregulated and upregulated by CRY1, CRY2, and PER2. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 290: 933-942

7 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich all denen meinen Dank ausdrücken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Zunächst möchte ich meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. Christoph Bamberger, für die Betreuung meiner Promotion danken.

Mein Dank gilt weiterhin Herrn Prof. Dr. Freimut A. Leidenberger für die Aufnahme in das Institut für Hormon- und Fortpflanzungsforschung und die Möglichkeit dort den experimentellen Abschnitt meiner Doktorarbeit durchzuführen.

Weiterhin möchte ich mich bei P.D. Dr. James Olcese für die Bereitstellung des interessanten Themas, sowie für die kontinuierliche, engagierte Betreuung und freundliche Unterstützung während aller Abschnitte meiner Arbeit bedanken. Ebenso möchte ich allen anderen Mitgliedern der Arbeitsgruppe um J.Olcese meinen Dank aussprechen für die Unterstützung und Hilfestellung während des praktischen Abschnittes meiner Dissertation.

Meinen ganz besonderen Dank gilt Herrn Roger Domagalski. Ohne seine kompetente Betreuung und Unterstützung in vielen praktischen Fragen meiner Arbeit, wäre meine Doktorarbeit in dieser Form nicht möglich gewesen.

Meinen Eltern, Alice und Ekkehard Grell, sowie meiner Schwester, Susanne Grell, bin ich sehr dankbar für die zuverlässige moralische und praktische Unterstützung nicht nur während meiner Dissertation, sondern in allen Abschnitten meiner Ausbildung.

Meinen besonders herzlichen Dank möchte ich meinem Mann, Michael Wildemann, für seine verlässliche und motivierende Unterstützung insbesondere während des praktischen Abschnittes meiner Arbeit aussprechen. Schließlich gilt mein besonderer Dank meinem Sohn, Maximilian, für den wunderbaren Schlafrhythmus innerhalb seiner ersten Lebensmonate, der mir die Fertigstellung dieser Arbeit ermöglichte.

8 Lebenslauf

Name: Uta Wildemann
Geburtsname: Grell
Geburtsort: Uelzen
Geburtsdatum: 01.03.1972
Familienstand: verheiratet, 1 Kind

Schulbildung: 1978-1982 Grundschule Westerweyhe
1982-1984 Orientierungsstufe Sternschule Uelzen
1984-1991 Lessing-Gymnasium Uelzen mit Abschluss der
Allgemeinen Hochschulreife

Berufsausbildung: 1991-1994 Berufsfachschule für Ergotherapie Bad Bevensen mit
Abschluss als staatlich anerkannte Ergotherapeutin

Berufstätigkeit: 1994-1998 Wilhelmsburger Krankenhaus „Groß-Sand“
Abteilung für geriatrische Frührehabilitation mit
Tagesklinik

Hochschulstudium: ab 1998 Universität Hamburg

9 Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt habe oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.