

**Dissertation: „DER EINFLUSS VON KALORISCHER RESTRIKTION UND MELATONIN AUF DIE CIRCADIANE PHYSIOLOGIE DER MAUS (MUS MUSCULUS, LINNAEUS 1758)“**

**Vorgelegt von David Resühr am Fachbereich Biologie der Universität Hamburg, Juli 2004**

**Zusammenfassung**

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

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

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

Bedingungen einen biphasischen Aktivitätsrhythmus (*rhythm splitting*) mit zwei auseinanderweichenden Aktivitätsmaxima. Die Wiederherstellung von LD eliminierte eine Aktivitätskomponente und stellte den ursprünglichen Rhythmus wieder her. Dieses Phänomen trat bei den MT-Tieren am häufigsten auf.

Die Expression des Uhr-Gens *Clock* wurde in diversen neuronalen und peripheren Geweben wie z.B. Cerebellum, olfaktorische Bulbi, Hypothalamus, Milz, Leber, Lunge Herz und Niere nachgewiesen, es gab keinen Hinweis auf seine Expression im Hoden der Maus. Es wurde festgestellt, dass eine Variante des Genes (als Spleissvariante) nur in neuronalen Geweben der untersuchten Mäuse vorkommt. Ein hypothetisches Modell wurde entworfen, indem diese Variante eine regulative Funktion an der Feinsteuerung der molekularen inneren Uhr hat.

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

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

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

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

KR- und MT-Behandlungen zeigten wenige Effekte auf die gut untersuchten Kernkomponenten der inneren Uhr. Der Vergleich der circadianen Genexpression zwischen den Versuchstiergruppen mittels *Microarray*-Technologie ergab hingegen ein komplexes Bild differentieller Regulation. Alle neu identifizierten, rhythmischen Transkripte, zeigten bei den KR- und MT-Tieren ebenfalls eine circadiane Regulation. Allerdings gab es hier

gruppenabhängige Variationen in der Phase und Amplitude des circadianen Expressionsverlaufes. Einige rhythmische Komponenten wurden bisher in anderen Geweben wie z.B. der Leber identifiziert, andere sind völlig neu. Das Vorkommen von E-Box-Elementen in den Promotorbereichen einiger der identifizierten Transkripte spricht für eine direkte Steuerung durch die positiven Elemente (Clock/Bmal1) der inneren Uhr.

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

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