Aus dem Institut für Anatomie III
Zentrum für Experimentelle Medizin
Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

Direktor: Prof. Dr. Z. Halata

Komponenten des cGMP-Systems

im

Corpus pineale des Menschen

D i s s e r t a t i o n

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
Fachbereich Medizin der Universität Hamburg
vorgelegt von

Peter Hans Hauptmann

aus Hamburg

Hamburg 2004

INHALT

1.	ARBEITSHYPOTHESE UND FRAGESTELLUNG:	S. 3
2.	EINLEITUNG UND EINFÜHRUNG	S. 4
3.	MATERIAL UND METHODEN	S. 11
3.1.	Untersuchungsmaterial	S. 11
3.2.	ELISA- Untersuchungen	S. 11
3.2.1.	Behandlung der kompletten Epiphysen für cGMP-Messung	S. 11
3.2.2.	cGMP- Messungen	S. 12
3.3.	Westernblot- Untersuchungen	S. 13
3.3.1.	Membran- und Cytosolpräparationen	S. 13
3.3.2.	Western Blot-Analysen	S. 13
3.4.	Mikroskopische Histologie und Immunhistochemie	S. 14
3.4.1.	Vorbehandlung der menschlichen Pinealorgane	S. 14
3.4.2.	Hämatoxylin-Eosin-Färbung	S. 15
3.4.3.	Immunhistochemische Methoden	S. 15
4.	ERGEBNISSE	S. 18
4.1.	Das NO-System des Corpus pineale	S. 18
4.2.	Das CO-System des Corpus pineale	S. 23
4.3.	Das CNP- System des Corpus pineale	S. 24
4.4.	cGMP-bindende Proteine im Corpus pineale	S. 25
5.	DISKUSSION	S. 28
6.	ZUSAMMENFASSUNG	S. 34
7.	LITERATUR	S. 36
8.	DANKSAGUNG	S. 41
9.	CURRICULUM VITAE	S. 42
10.	ERKLÄRUNG	S. 44

1. ARBEITSHYPOTHESE UND FRAGESTELLUNG:

Diverse Voruntersuchungen am Pinealorgan zeigen bei Ratte und Rind einen Einfluss des NO/cGMP-Weges auf die Funktion der Pinealocyten, wo noradrenerge Stimuli neben der Synthese von Melatonin auch zur Anhäufung von NO führen, sowie beim Huhn das Vorhandensein Retina-typischer cGMP-Wege. Studien über die Signalverarbeitung im Pinealorgan des Menschen liegen bisher nicht vor. Somit stellte sich die Frage nach dem Stellenwert des cGMP-Systems beim Menschen. In der vorliegenden Arbeit sollten an der menschlichen Epiphyse Komponenten des cGMP- Signalweges nachgewiesen, lokalisiert und auf ihre funktionelle Aktivität überprüft werden.

2. EINLEITUNG UND EINFÜHRUNG:

Die Bedeutung der menschlichen Epiphyse (corpus pineale) als ein neurovegetatives Zentrum ist seit vielen Jahrhunderten Gegenstand intensiver Forschung. Aufgrund der Ähnlichkeit des Organs mit einem Pinienzapfen wurde sie von Vesalius (1514-1564) als pinealis bezeichnet. Das Pinealorgan ist seit dem Altertum bekannt. Schon Galen (130-200) beschrieb die Lokalisation der Zirbeldrüse und schrieb ihr im Rahmen der Humoraltherapie regulatorische Funktion zu. Rene Descartes (1596-1650) vermutete eine direkte Verbindung zwischen den Augen und der Zirbeldrüse und sah in ihr die Hauptinstanz des Sehens. Anatomisch handelt es sich um ein flaches conusförmiges Organ (5-8mm lang, 3-5 mm dick, ca. 120mg schwer). Es liegt am hinteren Ende des 3. Ventrikels und steht mit dem Zwischenhirn durch kurze stielförmige Faserzüge, Habenulae, in Verbindung. Vom 3. Ventrikel ragt ein kurzer Recessus pinealis in das corpus pineale hinein. Der schwedische Anatom Holgren entdeckte 1918 die histologische Ähnlichkeit zwischen Retina und Zirbeldrüse bei Fröschen und Fischen. Der Hautarzt A. Lerner entdeckte 1960 das Hauptsekretionsprodukt des Corpus pineale, das Melatonin (Lerner et al. 1960). 1965 wurde durch Quay der 24- Stunden- Rhythmus der Melatoninsekretion entdeckt (Quay 1965), sowie die Möglichkeit der Retina zur Melatoninsynthese. Moore, Stephan und Zucker entdeckten 1972 den hypothalamischen nucleus suprachiasmaticus (SCN) als den Sitz der circadianen Uhr bei der Ratte (Moore 1972, Stephan und Zucker 1972). 1983 zeigte Redman, dass Melatonininjektionen bei Ratten zu einer Verschiebung ihrer endogenen circadianen Rhythmik führten und dass der Zeitpunkt der Melatoningaben kritisch ist (Redmann et al. 1983). 1986 untersuchte Arendt die Wirkung von Melatoningaben auf Personen, die unter Jet-lag leiden (Arendt et al. 1986). Im ganzen Jahr 1995 wurden in den USA etwa 50 Millionen Melatonintabletten verkauft. 1997 warnte das National Insitiute of Aging vor sorglosem Gebrauch von Melatonin, das in den USA

rezeptfrei erhältlich ist. In Deutschland ist Melatonin seit 1995 als arzneilich wirksame Substanz eingeordnet und nicht frei verkäuflich.

Melatonin wird in den Pinealocyten des Corpus pineale gebildet, welche den größten Anteil des Parenchyms der Epiphyse bilden. Melatonin wird über Serotonin aus der essentiellen Aminosäure Tryptophan gebildet und stellt eine wichtige Komponente des photoneuroendokrinen Systems dar, welches Lichtreize aus der Umgebung in hormonelle Antworten übersetzt und so den gesamten Körper über die aktuelle circadiane Phasenlage informiert („timing information“, Reiter RJ). Wie bereits erwähnt, konnte am Pinealorgan von Mammaliern ein komplexer neuronaler Schaltkreis nachgewiesen werden, der Signale aus der Retina als Lichtrezeptor und dem Nucleus suprachiasmaticus als endogenem Oszillator erhält. Die sympathische Innervation des Pinealorgans stellt das letzte Glied dieses Schaltkreises dar, aus der bei Beginn der Dunkelheit hohe Konzentrationen von Noradrenalin freigesetzt werden. Hierauf wird die Synthese und Abgabe von Melatonin stimuliert, das dem Organismus die Länge der Dunkelperiode mitteilt. Die molekularbiologischen Vorgänge in den Pinealocyten werden entscheidend durch den ß1-adrenergen Rezeptor der Pinealocytenmembran gesteuert, der an die cAMP-Signaltransduktionskaskade (cyclisches Adenosinmonophosphat) gekoppelt ist. Durch molekularbiologische und immunhistochemische Untersuchungen konnte eine zeit- und substanzspezifische Aktivierung der cAMP-Signaltransduktionskaskade und der beteiligten Transkriptionsfaktoren pCREB **(**cAMP-responsive element-binding protein) und ICER (inducible cAMP early repressor) nachgewiesen werden (Maronde et al. 1999).

Seit einiger Zeit ist bekannt, dass Noradrenalin im Pinealorgan der Ratte auch zur Stickstoffmonoxyd-Syntase (NOS)- Aktivierung mit nachfolgender Anhäufung von cGMP (cyclisches Guanosinmonophosphat) führt (Spessert et al. 1993, Lin et al. 1994, White und Klein 1995). Grundsätzlich kann cGMP von verschiedenen Guanylatcyclasen produziert werden. Bei der löslichen Guanylatcyclase (sGC) handelt es sich um ein Heterodimer aus den

Untereinheiten alpha und beta, die für sich genommen keine Aktivität aufweisen. Jede Einheit besitzt eine Guanylatcyclase-Region sowie ein Häm-Molekül. An dieses binden die von NO-Synthasen (NOS) bzw. Hämoxygenasen (HO) produzierten NO und CO mit hoher Affinität (Garthwaite und Boulton 1995, Deinum et al. 1996).

Drei Isoformen einer für die intrazelluläre Bildung von NO verantwortlichen NO-Synthase (NOS) sind unterscheidbar: eine neuronale NOS (nNOS), eine induzierbare NOS (iNOS) und eine endotheliale NOS (eNOS). In Abhängigkeit von dem Zeitpunkt ihrer ersten Isolierung sind diese auch als NOS I, NOS II und NOS III bezeichnet worden (siehe Förstermann et al. 1994). Alle NO-Synthasen benutzen L-Arginin als Substrat. Als Reaktionsprodukte entstehen NO und L-Citrullin. Die nNOS, ein lösliches Enzym von etwa 160 kDa, wird konstitutiv exprimiert und wurde zuerst aus dem Ratten- und Schweinekleinhirn gereinigt (Mayer et al. 1990, Bredt et al. 1991, Schmidt et al. 1991), was zu dem Namen neuronale NOS führte. Die ebenfalls lösliche iNOS (130 kDa) ist in der Regel nicht konstitutiv vorhanden, sondern deren Expression kann beispielsweise in Makrophagen induziert werden (Hevel et al. 1991, Stuehr et al. 1991, Yui et al. 1991). Die dritte Isoform der NO-Synthase ist primär in Endothelzellen lokalisiert (endotheliale NOS) mit einer molekularen Masse von 135 kDa.

Für jede der verschiedenen NO-Synthasen gilt mittlerweile als gesichert, dass sie auch in anderen Zellsystemen als jenen, in welchen sie zuerst isoliert wurden, vorhanden sind. So ist die neuronale NOS in epithelialen Zellen (Schmidt und Walter 1994) und die endotheliale NOS in glatten Muskelzellen (Loesch und Burnstock 1995) und insbesondere in Nervenzellen (Kantor et al. 1996, Wilson et al. 1997) beschrieben worden. Von der iNOS nimmt man an, dass sie in fast allen Zellen des Körpers induziert werden kann (Nathan und Hibbs 1991, Schmidt und Walter 1994).

CO ist wie NO ein diffusibler Botenstoff, dessen Wirkung in vielerlei Hinsicht mit denen des NO vergleichbar ist. Bekannt ist, dass CO eine relaxierende Wirkung glatter Muskelzellen von Gefäßen vermittelt (Morita et al. 1995, Zakhary et al. 1996). Im zentralen und peripheren

Nervensystem ist CO als Neurotransmitter bekannt (Maines 1993, Verma et al. 1993, Maines 1997). Für die CO-Produktion sind die so genannten Hämoxygenasen verantwortlich. Hierbei handelt es sich um ein Enzymsystem (HO-System), das aus zwei Proteinen besteht, die Produkte unterschiedlicher Gene sind (Cruse und Maines 1988). Elektronendonor für die Hämoxygenasen ist wie für die NO-Synthasen die Cytochrom P-450 Reduktase, wobei sie nur bei den NO-Synthasen Teil des Enzyms selbst ist (Bredt et al. 1991, Verma et al. 1993). Die Hämoxygenase-2 (HO-2) wird konstitutiv exprimiert, während die auch als Hitzeschockprotein 32 (HSP 32) bezeichnete Hämoxygenase-1 (HO-1) durch Temperaturerhöhung oder Stress induziert werden kann (Maines und Ewing 1996).

Unklar ist bisher, welche Komponenten des cGMP- Weges in humanen Pinealzellen vorhanden sind, welche NOS- Isoformen in der menschlichen Epiphyse vorkommen, oder welche zelluläre Lokalisation die NO- Synthasen und der NO- Rezeptor besitzen. Ob cGMP im Pinealorgan von Mammaliern auch durch andere Substanzen in seiner Produktion beeinflusst wird, ist Gegenstand aktueller Untersuchungen.

Zusätzlich zu der bereits erwähnten löslichen Guanylatcyclase existiert eine Reihe membrangebundener Guanylatcyclasen. Zu den Guanylatcyclasen mit bekannten Liganden gehören die Guanylatcyclasen A (GC-A) und B (GC-B). Die Homodimere GC-A und GC-B stellen Rezeptoren der natriuretischen Peptide dar (Müller et al 2000). Zu diesen natriuretischen Peptiden gehören das atriale natriuretische Peptid (ANP), das brain natriuretische Peptid (BNP) und das C-Type natriuretische Peptid (CNP), welches besonders hoch im Gehirn exprimiert wird. Die aufgeführten menschlichen natriuretischen Peptide bestehen aus 32 (BNP) bzw. 22 (CNP) sowie 28 (ANP) Aminosäuren. Gemeinsam haben sie eine 17 AS-Ringstruktur, die durch eine Disulfidbindung zweier Cysteinreste (Cys) stabilisiert ist. Sie besitzen Aminosäuregruppen, die bei allen natriuretischen Peptiden zu finden sind. Dem CNP fehlt ein außerhalb des Rings liegendes C-terminales Ende. (Barr et al.

1996). Diese natriuretischen Peptide binden an eine extrazelluläre ligandbindende Region, die bei GC-B für CNP und bei GC-A für ANP und BNP spezifisch ist. Die membrangebundene Guanylatcyclasen besitzen zusätzlich eine einzelne transmembranöse Domäne sowie intrazellulär eine proteinkinaseartige und GC-Aktivität- besitzende (GC)-Region. Die Bindung der jeweiligen Liganden (CNP, ANP, BNP) an GC-B bzw. GC-A aktiviert ihren GC-Anteil, was zur Anhäufung von cGMP führt.

Der second messenger cGMP bindet an mindestens drei verschiedene Proteine: cGMP-abhängige Proteinkinasen (GK I und GK II), cGMP- abhängige Phosphodiesterasen und Nukleotid- gesteuerte Ionenkanäle. Die GK I kommt in verschiedenen Systemen vor. Als gesichert gilt ihr Vorhandensein in Thrombozyten, der glatten Muskulatur und dem Cerebellum (Francis und Corbin 1994). Bei Thrombozyten hemmt die GK I die Aggregation, in der glatten Muskulatur existiert ein relaxierender GK-Effekt. Für beide Funktionen wird eine Beeinflussung des intrazellulären Ca^{2+}-Spiegels als Hauptmechanismus angesehen (Butt et al. 1993, Lincoln und Cornwell 1993). Mehrere Studien haben mittlerweile zeigen können, dass die Ca^{2+}-Konzentration über eine GK-vermittelte Phosphorylierung des Inositol 1,4,5-Trisphosphat (IP_3)-Rezeptors gesteuert werden kann (Komalavilas und Lincoln 1996, Rooney et al. 1996). Die GK II galt bis vor kurzem als ausschließlich im Bürstensaum intestinaler Epithelthelzellen lokalisiert (DeJonge 1981). Ihre Wichtigkeit auch in anderen Organen ist mittlerweile belegt worden. So zeigten GK II-Knock-out-Mäuse neben den erwarteten Defekten bei der intestinalen Flüssigkeitssekretion auch eine wesentliche Störung der enchondralen Ossifikation (Pfeifer et al. 1996).

cGMP beeinflusst die zelluläre Ionenkonzentration auch direkt durch die intrazelluläre Bindung an membranständige CNG-Ionenkanäle, die hierbei geöffnet werden. Diese Kanäle gehören funktionell zur Klasse der ligandgesteuerten Ionenkanäle (Eismann et al. 1993). CNG-Kanäle bilden hetero-oligomere Komplexe, die aus zwei verschiedenen Untereinheiten (α und β) bestehen, wobei die α-Einheit sechs membranspannende Regionen mit einer Pore

zwischen der 4. und 5. sowie eine intrazelluläre cGMP-Bindungsstelle am C-terminalen Ende des Proteins besitzt (Böningk et al. 1993). cGMP-geöffnete Kanäle wurden zuerst in den Stäbchen-Photorezeptorzellen der Retina beschrieben (Fesenko et al. 1985), in denen sie in einem fein abgestimmten Mechanismus für die Umwandlung von Lichtreizen verantwortlich sind (Kaupp 1995). Auch in den Photorezeptoren der retinalen Zapfen und in olfaktorischen sensorischen Neuronen existieren Subtypen der CNG-Kanäle (Kaupp 1995). Weiterhin wurden Photorezeptor-CNG-Kanal-Gene in nicht-neuronalen Geweben gefunden (Biel et al. 1994, Distler et al. 1994).

Die Rolle von Phosphodiesterasen (PDEs) in cGMP-vermittelten Signalprozessen wurde zuerst in den Stäbchenaußensegmenten der Retina dargestellt (Eismann et al. 1993). Daneben sind auch andere cGMP-bindende PDEs beschrieben und genauer untersucht worden (Lincoln und Cornwell 1993, Beavo 1995). PDEs sind wichtige Komponenten in der Regulation intrazellulärer cAMP- und cGMP-Spiegel. Vermutlich sind die PDEs für den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt zur Beendigung eines Nukleotid-Signals verantwortlich und haben damit die Funktion eines Schrittmacherenzyms (Schlüsselenzyms). Zu den regulatorischen Mechanismen gehören sich verändernde cAMP- und cGMP-Konzentrationen, Aktivierung durch Ca^{2+}/Calmodulin-Bindung, Phosphorilierungsprozesse, sowie eine spezifische Lokalisation in der Zelle. Der grundsätzliche Aufbau der PDEs ist gleich, über das c-terminale Ende üben sie ihre katalytische Funktion aus. Über die Gleichartigkeit ihrer Aminosäuresequenz der katalytischen Domäne lassen sie sich in verschiedene Familien einteilen. Bis heute sind 11 PDE-Familien beschrieben. Am N-terminalen Ende befindet sich der Sitz der regulatorischen Komponente.

Diese Tatsachen sind insofern für die hier vorliegende Studie von Interesse, da dem Pinealorgan photosensible Fähigkeiten zugeschrieben werden, die bei Amphibien und Vögeln heute noch nachweisbar sind.

Die physiologische Bedeutung der pinealen cGMP- Produktion ist unklar. Unklar ist auch, ob beim Menschen der cGMP-Anstieg in den Pinealocyten einen Einfluss auf die Melatoninsekretion hat.

Da die meisten Untersuchungen am Tiermodell durchgeführt und bisher keine Untersuchungen an menschlichen Pinealorganen vorgenommen wurden, soll in dieser Studie versucht werden, Komponenten des NO- cGMP- Weges an der menschlichen Epiphyse nachzuweisen und zu lokalisiern.

3. MATERIAL UND METHODEN

3.1. Untersuchungsmaterial

Die Untersuchungen an der Epiphyse wurden ausschließlich an menschlichem Gewebe vorgenommen. Es wurden ca. 65 menschliche Pinealorgane nach sorgfältiger Sektion und fachkundiger Präparation untersucht. Das unfixierte Sektionsgut wurde noch am Tag der Sektion für die entsprechenden Untersuchungen vorbereitet. Ein Teil der Organe wurde unfixiert in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei –70° zur weiteren Verarbeitung aufgehoben, ein anderer Teil wurde für immunhistochemische Untersuchungen in Bouin`scher Lösung immersionsfixiert, in einer aufsteigenden Alkoholreihe dehydriert und in Paraffin eingebettet. Für die funktionellen Untersuchungen wurden die frisch präparierten Epiphysen in toto in eine Nährlösung überführt und direkt mit den Stimulantien inkubiert.

3.2. ELISA Untersuchungen

Die angewandte Methode basiert auf einem kompetitiven Doppelantikörper-Enzym-Immunoassay mit Solid-Phase-Technik. Die immunologische Reaktion fand an mit anti-Kaninchen-Antikörpern beschichteten Wells der Immuno-Module statt.

3.2.1. Behandlung der kompletten Epiphysen für cGMP-Messungen

Die frisch präparierten Epiphysen wurden in eine 12 Well-Platte überführt und mit Medium überschichtet. Nach Verwerfen des Mediums wurden sie in 250µl LSS (LSS; 154mM NaCl; 5.6mM KCl; 2.2mM $CaCl_2$; 1mM $MgCl_2$; 6mM $NaHCO_3$;10mM Glucose; 2mM HEPES) plus 0,25mM IBMX je Well inkubiert. Nach 1h wurden die Überstände abpipettiert und bei -70°C eingefroren. Anschließend wurden die Gewebsstücke mit dem NO-Donor SNP bzw. dem NOS-Inhibitor L-NAME in o.g. Lösung für 1h inkubiert. Die Inkubation wurde durch Abpipettieren und nachfolgendes Einfrieren des Überstandes beendet. Das im Überstand meßbare cGMP (extrazelluläres) nach Behandlung mit SNP- bzw. L-NAME wurde

verglichen mit der cGMP-Konzentration des Überstandes derselben Wells ohne SNP-Zusatz („Kontrolle“).

3.2.2. cGMP- Messungen

Bei -20°C aufbewahrte Immuno-Module (mit in Ziegen erzeugten anti-Kaninchen-IgGs beschichtete 96-Well-Mikrotiter-Platten, Nunc) wurden auf Raumtemperatur gebracht und die Wells für 2min mit 375µl E-PBS (0,1M Natriumphosphat, 0,15M NaCl, 0,005M EDTA, 0,2% BSA, 0,01% Thimerosal; pH 7,0) gefüllt. Danach wurden die Wells durch Dekantieren entleert, und die Platten wurden auf Zellstoff mehrmals kräftig „ausgeklopft“. Anschließend wurden in definierter Reihenfolge Standards und Proben (50µl/Well) sowie 50µl cGMP-Biotin (150fMol/ml E-PBS + 0,0005% Bromphenolblau) pro Well und 100µl cGMP-Antiserum („36+“, IBL, 1:100000 in E-PBS + 0,0005% Metanilgelb) pro Well pipettiert. Die folgende Inkubation fand bei Dunkelheit in einer feuchten Kammer bei 4°C für 18-24 Stunden statt. Am folgenden Tag wurden die Platten entleert (s.o.), und jedes Well wurde 30min bei 4°C mit 0,2ml Horseradish-Peroxidase (HRP)-Streptavidin (IBL, 150ng/ml) inkubiert. Nach dem Ausleeren der Wells wurden diese viermal mit kaltem Waschpuffer (0,02% Tween20 [Sigma], 0,5% NaCl in H_2O) gewaschen, bevor sie für 40min bei Raumtemperatur mit 250µl HRP-Substratlösung (25ml H_2O, 500µl Substratpuffer [4,8M Na-Acetat, 0,24M Zitronensäure], 500µl 0,2% H_2O_2, 500µl 0,5% 3,3’,5,5’-Tetramethylbenzidin in Dimethylsulfoxid) pro Well inkubiert wurden. Die Substratinkubation wurde durch zusätzliches Pipettieren von 50µl 2M H_2SO_4 je Well gestoppt. Danach wurde die optische Dichte bei 450nm mit dem ELISA-Reader MRX der Firma Dynatech Laboratories gemessen und die Meßdaten mit einem speziellen Computerprogramm (Revelation) ausgewertet.

Der Meßbereich des cGMP-ELISA lag zwischen 0,14 und 34,02pMol/ml. Die Kreuzreaktivität mit cAMP betrug 0,00004%.

3.3. Western-blot Untersuchungen

3.3.1. Membran- und Cytosolpräparationen

Gefrorene Stücke der Epiphysen und verschiedener Kontrollorgane wurden in einem Mörser pulverisiert und dann zusammen mit Homogenisierungspuffer (50 mM Tris-HCl [pH 7.5], 10^{-3} M EDTA, 10^{-3} M Dithiothreitol [DTT] und 10^{-4} M PMSF) in einem sog. Douncer (Potter-Elvehjem) mechanisch homogenisiert. Nicht homogenisierte Zelltrümmer sowie Zellkerne wurden durch Sedimentation während einer Zentrifugation (8min bei 3000g) entfernt. Für die Auftrennung in Membran- und Cytosol-Fraktion wurde der Überstand anschließend für 30min bei 100000g zentrifugiert. Der (cytosolische) Überstand wurde abpipettiert, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -70°C gelagert. Das Pellet wurde einmal in Homogenisierungspuffer plus 0,6M KCl und anschließend in Homogenisierungspuffer gewaschen und schließlich in 150µl 0,05M Tris-HCl-Puffer (pH 7.5) resuspendiert. Die Proteinkonzentration wurde mit einem Kit von Bio-Rad (München, Deutschland) unter Benutzung von BSA (Fraktion V) als Standard bestimmt. Die Membran-Suspensionen (0,6 bis 5µg Protein pro ml) wurden ebenfalls in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -70°C gelagert.

3.3.2. Western Blot-Analysen

Nach Trennung durch SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE, Laemmli 1970) in 8%- bzw. 12%-Polyacrylamidgelen wurden die Proteine auf Nitrocellulose-Membranen („Hybond-ECL Nitrocellulose“, Amersham) bei Raumtemperatur für 18 Stunden bei 12V in Transferpuffer (100 mM Tris, 193 mM Glycin) übertragen. Die transferierten Proteine wurden durch Färbung mit Ponceau S (Sigma) sichtbar gemacht. Anschließend wurden die Membranen für 2 Stunden mit einem Blockierungsreagens (Amersham) in 0,1M Maleinsäure/NaOH, 0,15M NaCl, 0.005% Thimerosal, pH7,5 inkubiert. Nach einem

fünfminütigen Waschvorgang in TBST (20mM Tris, 0,137M NaCl, 0,05% Tween 20 [Sigma]) wurden die Membranen eine Stunde mit den verschiedenen Erstantikörpern inkubiert.

Monoklonale Maus-Antikörper: anti-nNOS (Transduction, Lexington, KY, USA, 1:500), anti-eNOS (Transduction, 1:2500) anti-iNOS (Transduction, 1:2500). Polyklonale Kaninchen-Antiseren: anti-sGC (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. Koesling, Berlin, Deutschland, 1:200) anti-GKI (1:400), anti-GKII (1:400, beide freundlicherweise von Dr. Jarchau, Würzburg, Deutschland zur Verfügung gestellt), anti-HO-1 (StressGen, Victoria, Kanada, 1:500), anti-HO-2 (StressGen, 1:500). Die Membranen wurden dann erneut mit TBST gespült, bevor sie für 1 Stunde mit den Zweit-Antikörpern (anti-Maus IgG-Peroxidase [1:2000, Pierce, Rockford, IL, USA] bzw. anti-Kaninchen IgG-Peroxidase [1:5000, Pierce] behandelt wurden. Spülungen mit TBST folgte die Entwicklung der Peroxidase-Aktivität mit dem „ECL-Western Blot Detection Kit“ (Amersham) sowie die Exposition mit dem Röntgenfilm (Fuji Medical X-Ray, 18x24) für 45-90sec in einer Bleikassette bei Raumtemperatur. Die Autoradiogramme wurden mit dem Kodak LX 24-Entwickler (1:4 mit H_2O) entwickelt und mit Kodak AL4 (1:4 mit H_2O) fixiert.

3.4. Mikroskopische Histologie und Immunhistochemie

3.4.1. Vorbehandlung der menschlichen Pinealorgane

Die menschlichen Epiphysen wurden 24 Stunden bei Raumtemperatur in Bouin’scher Lösung immersionsfixiert. Anschließend wurden die in Bouin’scher Lösung fixierten Epiphysen in aufsteigender Alkoholreihe dehydriert und in Paraffin eingebettet. In der Folge wurden 5-6µm dicke Schnitte angefertigt. Die Paraffinschnitte wurden abschließend auf mit Chromalaun-Gelatine beschichtete Objektträger montiert.

3.4.2. Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Die zu untersuchenden Schnitte wurden in saurem Hämatoxylin nach Ehrlich oder in saurem Hämalaun nach Mayer gefärbt. Danach erfolgte das Bläuen der gefärbten Schnitte unter fließendem Leitungswasser oder in Natriumhydrogencarbonatlösung (0.25%) mit anschließendem Abspülen in Aqua dest. Als nächstes wurden die Schnitte für 5-10 Minuten in eine mit Aqua dest. 1+10verdünnte, Eosinlösung überführt und im Anschluss erneut mit Aqua dest. gespült. Es folgte das Entwässern in einer aufsteigenden Alkoholreihe und das Eindecken der Schnitte mittels Eukitt.

3.4.3. Immunhistochemische Methoden

Für die immunhistochemische Darstellung der korrespondierenden Antigene wurde eine Kombination der Peroxidase-Antiperoxidase-(PAP)-Technik mit der Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex (ABC)-Methode (Davidoff und Schulze 1990) angewandt. Sofern Paraffinschnitte benutzt wurden, wurden diese zuerst deparaffiniert und rehydriert. Die weitere Behandlung war mit den Kryostatschnitten identisch. Die Schnitte wurden im Falle einer anschließenden Verwendung monoklonaler Antikörper mit 2% normalem Kaninchenserum, bei Benutzung polyklonaler Antiseren mit 2% Schweineserum, jeweils 30 min in 0,1M PBS (pH 7,4), behandelt, um unspezifische Bindungen der Antikörper zu verhindern. Die für polyklonale Antiseren vorgesehenen Schnitte wurden zuvor noch 30min mit 1,2% H_2O_2 in Methanol zur Hemmung der endogenen Peroxidase behandelt.

Die so vorbereiteten Schnitte wurden dann für 24 Stunden in einer feuchten Kammer bei 4°C mit den Antiseren bzw. Antikörpern inkubiert. Die weiteren Inkubationen fanden jeweils bei Raumtemperatur statt. Nach Spülungen in PBS folgte die Behandlung mit dem Zweitantikörper, d.h. mit anti-Maus-IgG-Biotin (Dako, Hamburg, Deutschland, 60min, 1:250 in PBS) bei Benutzung von monoklonalen Mäuse-Antikörpern bzw. mit anti-Kaninchen-IgG-Biotin (Dako, 60min, 1:250 in PBS) bei Verwendung von polyklonalen Kaninchen-Antiseren. Im Anschluß an 2 weitere Spülungen in PBS folgte bei monoklonalem Erstantikörper die

Inkubation mit Maus-PAP (Dko, 30min, 1:100), bei einem polylonalen ersten Antiserum die Behandlung mit Kaninchen-PAP (Dako, 30min, 1:200). Danach wurden die Schnitte 30min mit dem ABC-Komplex (Vector, Burlingame, CA, USA, 1:250 in PBS) inkubiert. Für die Visualisierung der Peroxidase-Aktivität wurden 0,2mg/ml 3',3'-Diaminobenzidin (DAB) mit 0,0024% H_2O_2 in 50ml Tris-HCl (pH 7,6) benutzt. Alternativ wurde eine verstärkte DAB-Entwicklung, nämlich der Nickel-Glucose-Oxidase-Ansatz mit Glukose, Glukose-Oxidase, Ammoniumchlorid und Nickelsulphat in 0,1M PB (pH 7,4) gewählt (Zaborszky und Leranth 1985).

Folgende monoklonale Maus-Antikörper wurden benutzt: anti-eNOS (Transduction, 1:100), anti-iNOS (Transduction, 1:500), anti-nNOS (Transduction; 1:500).

Die nachfolgend aufgezählten in Kaninchen erzeugten polyklonalen Antiseren kamen zur Anwendung: anti-sGC (s.o., 1:200), anti-ANP (Affiniti;1:500), anti-ANP (Peninsula, 1:500), anti-BNP (Affiniti, 1:500), anti-cGMP (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. de Vente, Maastricht, Niederlande; 1:500), anti-cGMP (Biogenesis, Sandown, NH, USA; 1:300), anti-CNP (Peninsula, 1:500); anti-GKI (s.o., 1:100), anti-GKII (s.o., 1:100), anti-HO-1 (s.o, 1:500), anti-HO-2 (s.o., 1:500), anti-eNOS (Biomol, Hamburg, Deutschland; 1:500), anti-iNOS (Biomol; 1:500), anti-nNOS (Biomol; 1:500), anti-nNOS (Dr. Mayer, Graz, Österreich 1:1000), anti-HIOMT (DAKO, Kopenhagen; 1:7500). Die Primärantikörper wurden entweder in PBS mit 0.2% BSA und 0.1% NaN_3 verdünnt oder es wurde noch 0,1% Triton X (Sigma) zugesetzt. In diesem Fall wurden auch die Spülungen zwischen den Antikörper- bzw. PAP- und ABC-Inkubationen in PBS plus 0,1% Triton X durchgeführt.

Als Negativkontrollen wurden Inkubationen in Abwesenheit des mono- oder polyklonalen Primärantikörpers, des Biotin-gekoppelten Zweitantikörpers oder des PAP- und ABC-Komplexes vorgenommen. Weiterhin wurde die ausschließliche Farbentwicklung ohne vorhergehende Applikation der Antikörper vorgenommen. Im weiteren wurde bei Verwendung eines monoklonalen Maus-Antikörpers dieser durch normales Mäuseserum

(Sigma) oder gereinigtes Maus-IgG (Sigma) ersetzt, genauso wie anstelle des polyklonalen Kaninchen-Antiserums normales Kaninchenserum (Sigma) oder gereinigtes Kaninchen-IgG (Sigma) benutzt wurden.

4. ERGEBNISSE:

Um die Pinealocyten der präparierten Epiphysen darzustellen, wurde eine immunhistochemische Färbung mit einem Antikörper, der gegen das für die Melatoninsynthese essentielle Enzym HIOMT gerichtet war, durchgeführt. HIOMT methyliert N-acetylserotonin (Axelrod et al 1961). Es zeigten sich deutlich anfärbbare HIOMT- positive Zellen (Abb. 1.), sowohl in den intakten Drüsen als auch in solchen mit schon sichtbaren autolytischen Prozessen. Durch den immunhistochemischen sowie den histologischen Nachweis mittels Routinefärbung, konnten Zellen der Epiphysenschnitte als Pinealozyten charakterisiert werden (Abb. 2.). Damit war eine Grundlage für weitere Versuche an den menschlichen Präparaten gegeben, die Struktur der Humanpinealocyten schien intakt zu sein.

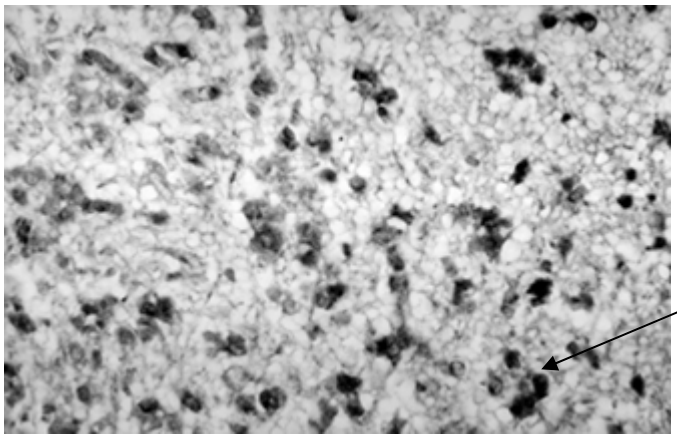

Abb. 1.
Lichtmikroskopische Darstellung von einzelnen Pinealocyten nach immunhistochemischer Markierung durch den Antikörper anti- HIOMT. Vergrößerung 400fach.

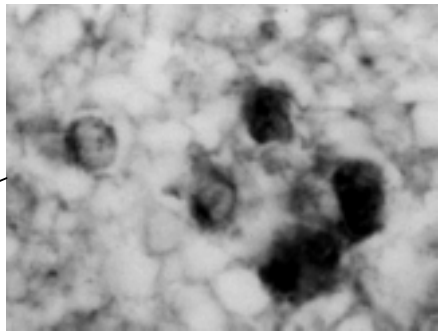

Abb. 2.
Ausschnittvergrößerung einzelner Pinealocyten mit deutlicher Anfärbung des Zytoplasmas und ungefärbtem Kern

4.1. Das NO-System des Corpus pineale

In der menschlichen Epiphyse wurde das Vorkommen der NO- Synthasen und des NO-Rezeptors (sGC) überprüft. In Paraffinschnitten des Corpus pineale zeigte ein Großteil der

Pinealgefäße, Immunreaktivität für die neuronale NOS, wobei eine klare Zuordnung zu einer bestimmten Gefäßschicht an keinem Schnitt gelang (Abb. 3.-4.).

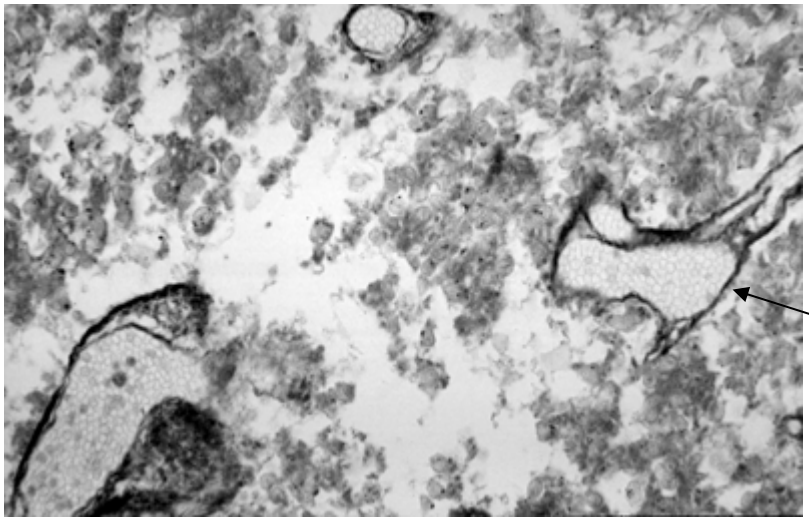

Abb. 3.
Lichtmikroskopische Darstellung von zentralen mikrovaskulären Gefäßen nach immunhistochemischer Markierung durch den Antikörper anti- nNOS. Vergrößerung 400fach.

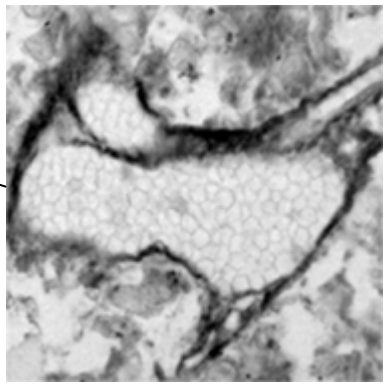

Abb. 4.
Ausschnittsvergrößerung eines zentralen pinealen Gefäßes. (ungefärbte Erythrocyten im Lumen)

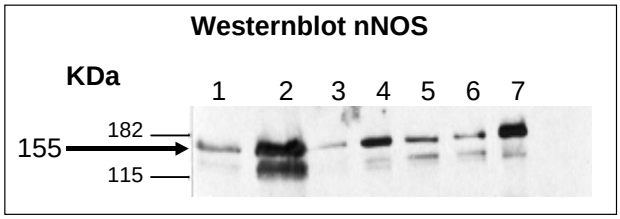

Abb. 5.
Darstellung von nNOS im Westernblot. Die Ziffern 1 bis 6 zeigen Epiphysenhomogenate verschiedener menschlicher Epiphysen. nNOS ließ sich in allen Homogenaten mit einer Größe von 155KDa in unterschiedlicher Konzentration nachweisen. Bei der Nr.7 handelt es sich um Rattenhirn als Kontrollprotein.

Mittels Western Blotting ließ sich dieses Ergebnis in der Folge durch den Nachweis eines Proteins von 155kDa, der Molekülmasse der nNOS, in einem Kompletthomogenat bestätigen (Abb. 5.). Die unterschiedliche Intensität der Banden der verschiedenen Epiphysen-homogenate deutet auf interindividuelle Konzentrationsunterschiede von nNOS in den einzelnen Proben hin.

Der Nachweis von endothelialer NOS (eNOS) zeigte an immunhistochemisch behandelten Paraffinschnitten eine diskrete Färbung im Bereich der Endothelzellen pinealer Gefäße (Abb. 6.-7.). Die Pinealozyten zeigten keine über die Hintergrundfärbung hinausgehende Reaktion.

Mit Hilfe des Western Blotting ließ sich eNOS in allen verwendeten Homogenaten des Corpus pineale mit einer Größe von 140KDa nachweisen (Abb. 8.). Auch hier zeigten sich deutliche Unterschiede der Bandenintensität, was auf unterschiedliche Enzymkonzentrationen hinweist.

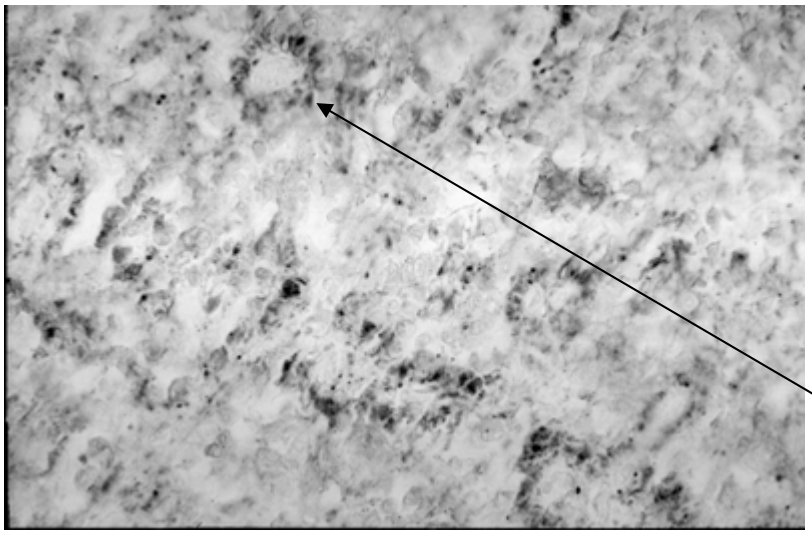

Abb. 6.
Lichtmikroskopische Darstellung von zentralen mikrovaskulären Gefäßanschnitten nach immunhistochemischer Markierung endothelialer Zellen durch den Antikörper anti- eNOS. Vergrößerung 400fach.

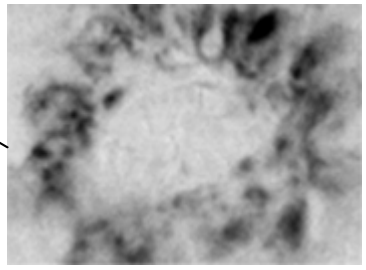

Abb. 7.
Ausschnittsvergrößerung eines zentralen pinealen Gefäßes (ungefärbte Erythrocyten im Lumen) mit Färbung der zirkulär angeordneten Endothelzellen.

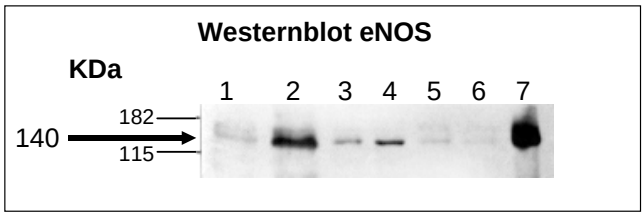

Abb. 8.
Darstellung eines mit anti- eNOS markierten Westernblots. Die Ziffern 1 bis 6 zeigen Epiphysenhomogenate verschiedener menschlicher Epiphysen. Bei der Nr.7 handelt es sich um ein eNOS-Kontrollprotein der Firma Transduction.

Immunreaktivität für die induzierbare NOS konnte demgegenüber im Pinealorgan durch keine der verwendeten Methoden dokumentiert werden.

Der NO-Rezeptor sGC, ein Heterodimer aus den Untereinheiten $ß_1$ und α_1 bzw. α_2, wurde anhand des Vorkommens seiner $ß_1$- Untereinheit untersucht. Die $ß_1$- Untereinheit konnte immun-histochemisch und im Western-blot Verfahren in Pinealorganen des Menschen nachgewiesen werden. Immunhistochemisch ließ sich eine sGC- spezifische Färbung in

einem großen Teil der Pinealocyten (Abb. 9-10. u. 10a.) und in einzelnen, kleinen pinealen Blutgefäßen (Abb. 10b.) nachweisen.

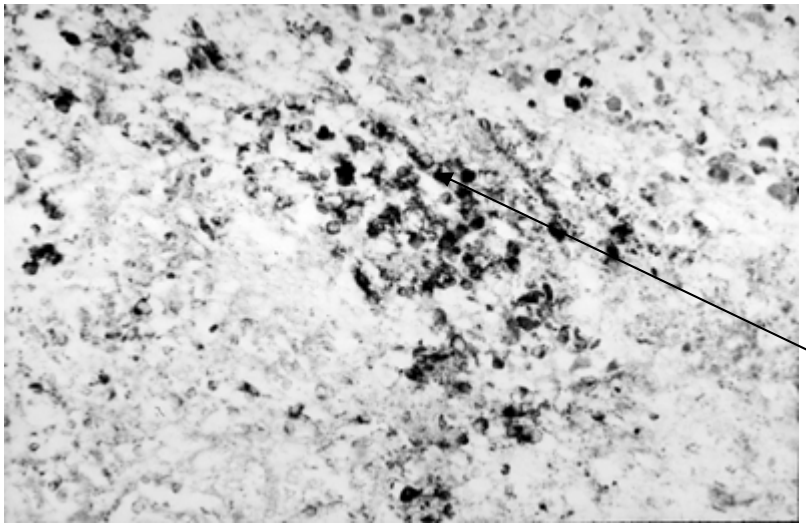

Abb. 9.
Lichtmikroskopische Darstellung von einzelnen Pinealozyten nach immunhistochemischer Markierung durch den Antikörper anti- sGC. Vergrößerung 400fach.

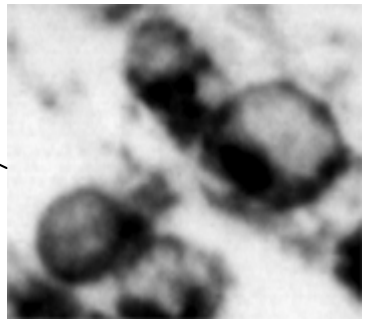

Abb. 10.
Ausschnittsvergrößerung einzelner Pinealzellen mit deutlicher Anfärbung des Zytoplasmas, bei ausgespartem Zellkern.

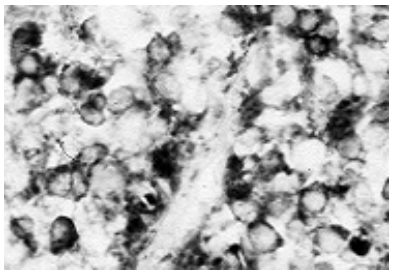

Abb. 10a:
Weitere Darstellung von sGC- markierten Pinealocyten eines anderen Präparates

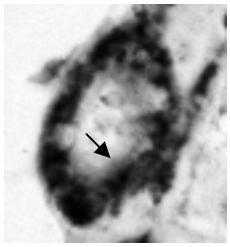

Abb. 10b:
Vergrößerung eines zentralen Pinealgefäßes mit Markierung der medialen Gefäßschicht. Der Pfeil zeigt das ungefärbte Endothel.

Mittels Western- Blotting (Abb. 11.) zeigten sich bei Verwendung eines anti- $ß_1$- GC-Antikörpers in allen untersuchten Pinealorganen eine Bande in unterschiedlicher Konzentration bei 70KDa, entsprechend der Größe der $ß_1$ Untereinheit der sGC.

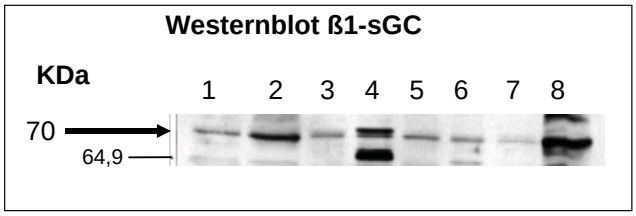

Abb. 11.
Darstellung von ß1-sGC im Westernblot. Die Ziffern 1 bis 7 zeigen Epiphysenhomogenate verschiedener menschlicher Epiphysen. ß1-sGC ließ sich in allen Homogenaten mit einer Größe von 70 KDa nachweisen. Bei der Nr.8 handelt es sich um Rattenhirn als Kontrollprotein.

Als Hinweis auf die funktionelle Aktivität der sGC erhöhte der NO- Donor SNP die cGMP-Produktion kompletter menschlicher Epiphysen regelmäßig (Abb. 12.). Durchschnittlich kam es durch SNP zu einer Erhöhung der basalen cGMP-Bildung um den Faktor 2,09.

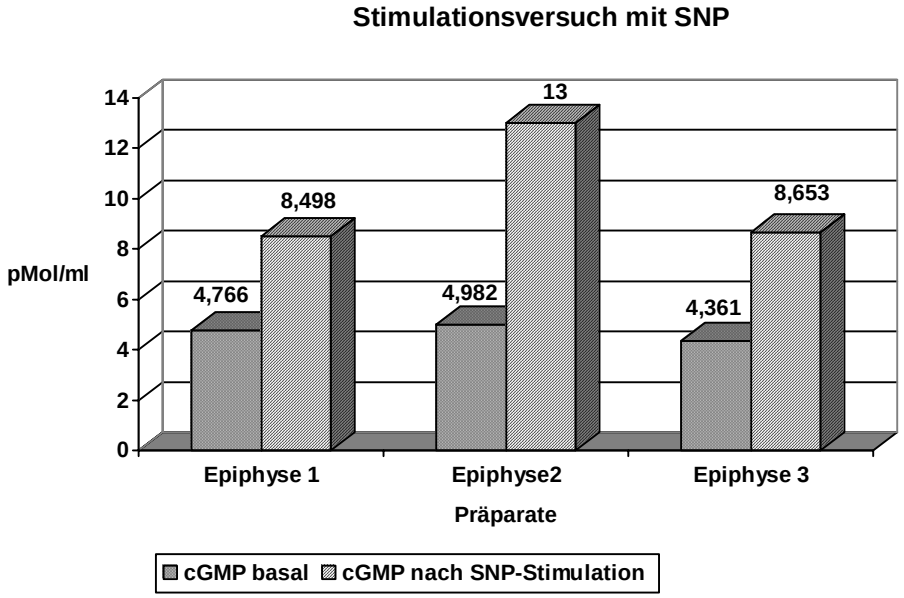

Abb.12. NO- abhängige cGMP- Produktion in menschl. Epiphysen. Pinealorgane des Menschen wurden für 60 min. in An- oder Abwesenheit von SNP (1mM) inkubiert. Anschließend wurde die cGMP- Produktion mittels ELISA gemessen.

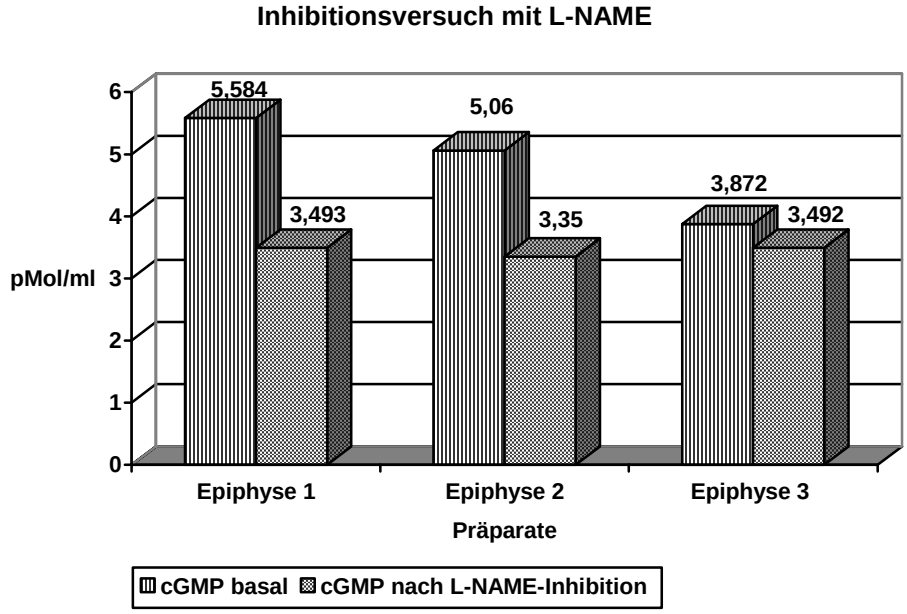

Abb.13. NO- abhängige cGMP-Produktion in menschl Epiphysen. Pinealorgane wurden für 60 min. in An- und Abwesenheit des NOS- Inhibitors L-NAME inkubiert. Anschließend wurde die cGMP-Konzentration mittels ELISA gemessen.

Der kompetetive NOS-Inhibitor L-NAME bewirkte in ELISA- Versuchen ein deutliches Absinken der basalen cGMP- Konzenration (Abb.13.), was die funktionelle Aktivität der pinealen NO-Synthasen dokumentiert und darauf hindeutet, dass nach NOS-Hemmung

weniger NO zur Aktivierung der löslichen Guanylatcyclase zur Verfügung stand (Faktor: 1,40fach = 27,0%). Diese Ergebnisse zeigen, dass NO- abhängige, cGMP- erhöhende Enzymsysteme in den Präparaten lokalisiert sind und auch in vitro effektiv arbeiten.

4.2. Das CO-System des Corpus pineale

Die Frage, ob die im Pinealorgan gefundene Aktivität der sGC in vivo auch durch ein weiteres Molekül nämlich CO verursacht sein könnte, wurde durch den Nachweis der CO-produzierenden Enzyme untersucht. Immunhistochemische Untersuchungen zeigten eine Gefäßlokalisation der Hämoxygenasen HO-1 und HO-2 (Abb. 14,15,16 und 17.). Auch einzelne Pinealocyten konnten durch anti- HO-2 markiert werden (Abb.14.). Die mit anti-HO-1 behandelten Epiphysen- Schnitte zeigten demgegenüber keine Pinealocytenfärbung.

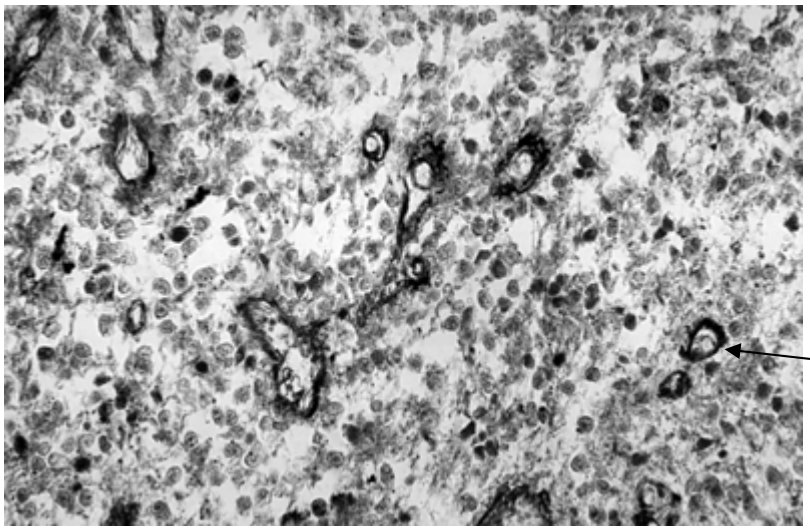

Abb. 14.
Lichtmikroskopische Darstellung von Gefäßanschnitten nach immun-histochemischer Markierung von vermutlich medialen Gefäßanteilen durch den Antikörper anti- HO-2. Vergrößerung 400fach.

Abb. 15.
Ausschnittsvergrößerung zweier Gefäße mit deutlicher Färbung der Media bei ungefärbter Endothelzellschicht (siehe Pfeil) und ausgespartem Lumen.

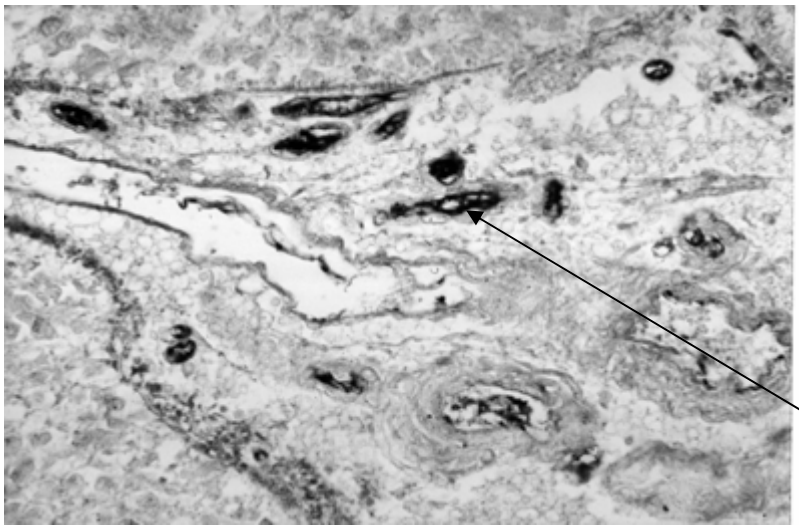

Abb. 16.
Lichtmikroskopische Darstellung von zentralen venösen Gefäßen nach immunhistochemischer Markierung des Endothels durch den Antikörper anti- HO-1. Vergrößerung 400fach.

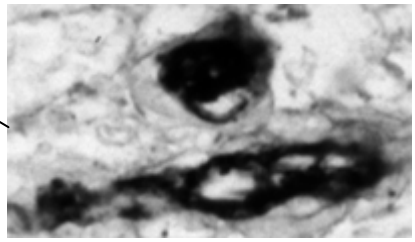

Abb. 17.
Ausschnittsvergrößerung eines zentralen venösen Gefäßes mit deutlicher Färbung der Endothelzellen und ausgespartem Lumen.

Durch Western Blotting ließ sich die Hämoxygenase-2 in einem Teil der Kompletthomogenate der menschlichen Epiphyse mit einer Größe von 36 KDa darstellen.

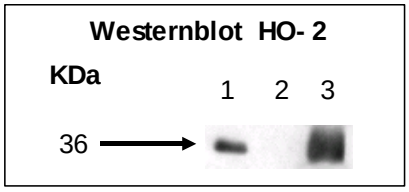

Abb. 18.
Darstellung von anti- HO-2 mittels Westernblot. Die Ziffern 1 und 2 zeigen Epiphysenhomogenate verschiedener menschlicher Epiphysen. Homogenat Nr. 2 zeigt keine Immunreaktion im Bereich von 36 KDa. Bei der Nr. 3 handelt es sich um Rattenhirn als Kontrollprotein.

4.3. Das CNP- System des Corpus pineale

Im Zusammenhang mit der Frage, ob im menschlichen Pinealorgan neben der löslichen Guanylatcyclase noch weitere Guanylatcyclasen eine Rolle spielen könnten, wurde untersucht, ob natriuretische Peptide als Liganden der membranständigen Guanylatcyclasen GC-A und GC-B exprimiert werden. Hierbei konnte CNP mittels Immunhistochemie in Schnitten der Epiphyse nur unzulänglich dargestellt werden.

Auch ANP war in Humanpinealozyten immunhistochemisch an Schnitten nicht nachweisbar. Demgegenüber konnte BNP bei den hier durchgeführten immunhistochemischen

Untersuchungen in Teilen der Humanpinealocyten und in der Media der Pinealisgefäße nachgewiesen werden (Abb. 19-20.).

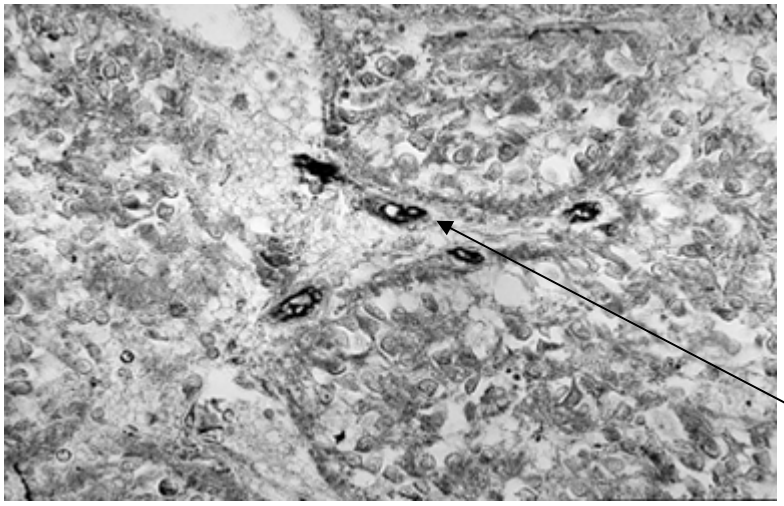

Abb. 19.
Lichtmikroskopische Darstellung von zentralen mikrovaskulären Gefäßen nach immunhistochemischer Markierung der Media durch den Antikörper anti- BNP-22. Vergrößerung 400fach.

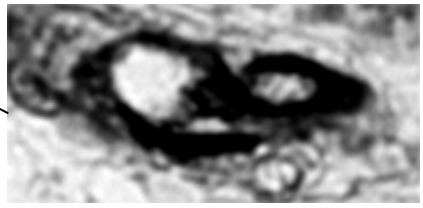

Abb. 20.
Ausschnittsvergrößerung eines zentralen pinealen Gefäßes mit deutlicher Färbung der Media.

4.4. cGMP-bindende Proteine im Corpus pineale

Vor dem Hintergrund, dass die Funktion von cGMP in Pinealocyten noch unklar ist, wurde dass Vorhandensein spezifischer cGMP- Bindungsproteine untersucht. Das Signalmolekül cGMP selbst, dessen Anhäufung in der Epiphyse durch natriuretische Peptide und NO bereits im ELISA-Versuch gezeigt werden konnte, ließ sich in diesem Organ immunhistochemisch, mit Antikörpern gegen formalinfixiertes cGMP, nur unzureichend darstellen.

Nachgewiesen werden konnten die cGMP- abhängige Proteinkinase (GK I) und der cyclisch Nukleotid-gesteuerte (CNG)-Ionenkanal in den Pinealocyten.

Die G-Kinase I konnte durch Western- Blotting und immunhistochemische Färbung auf Proteinebene dargestellt werden (Abb. 21-23.).

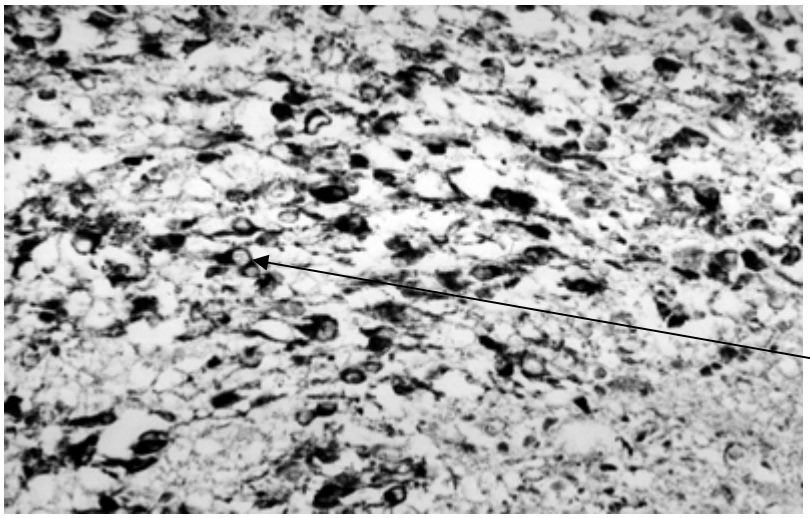

Abb. 21.
Lichtmikroskopische Darstellung von Pinealocyten nach immunhistochemischer Markierung durch den Antikörper anti- GK I. Vergrößerung 400fach.

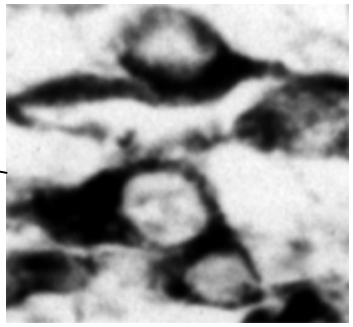

Abb. 22.
Ausschnittsvergrößerung einzelner Pinealzellen mit deutlicher Anfärbung des Zytoplasmas, bei ausgespartem Zellkern.

In allen untersuchten Pinealhomogenaten ließ sich die GK I nachweisen. Dabei zeigte sich, dass sich durch den verwendeten Antikörper beide Varianten der GK I (α und ß) mit einer Größe von 76 bzw. 78 KDa in unterschiedlicher Konzentration darstellen ließen.

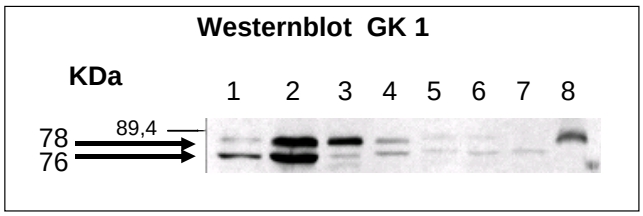

Abb. 23.
Darstellung eines mit anti- GK I markierten Westernblots. Die Ziffern 1 bis 7 zeigen Epiphysenhomogenate verschiedener menschlicher Epiphysen. Bei der Nr.8 handelt es sich um Rattenhirn als Kontrollprotein.

Die α Untereinheit des cyclisch Nukleotid- gesteuerten (CNG)-Ionenkanals ließ sich mittels des Antikörpers PPc15 immunhistochemisch in Pinealocyten nachweisen (Abb. 24.).

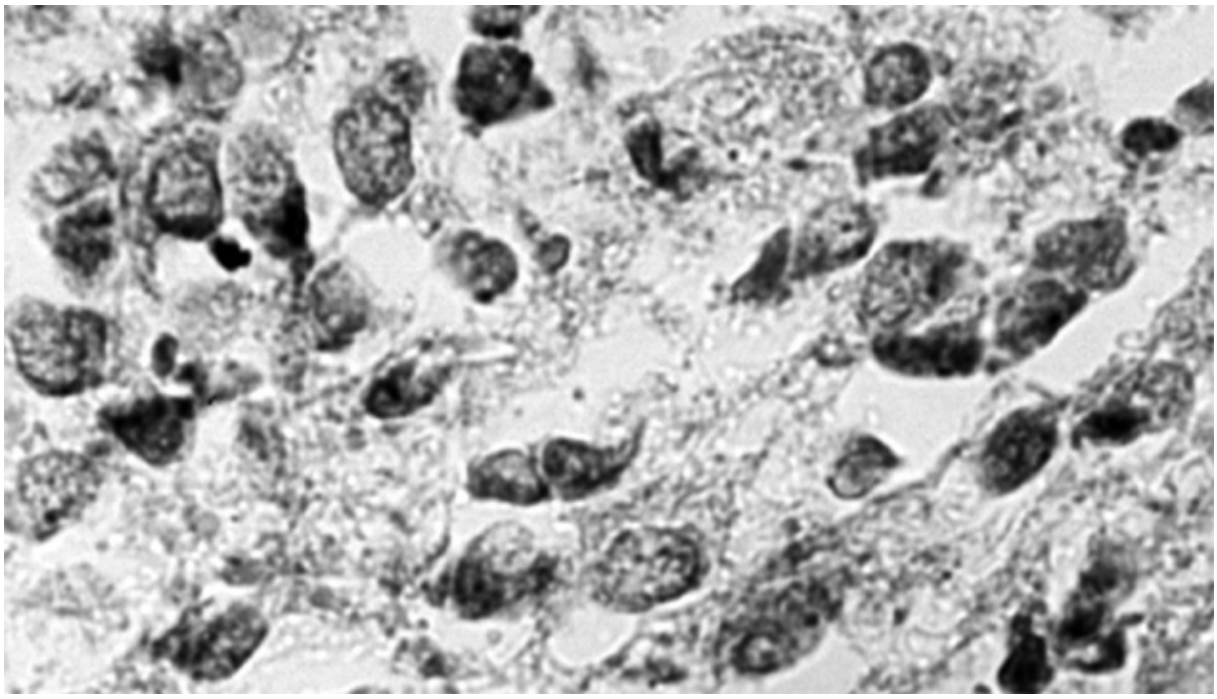

Abb. 24.
Lichtmikroskopische Darstellung von einzelnen Pinealocyten nach immunhistochemischer Markierung durch den Antikörper anti- PPc-15. Vergrößerung 400fach.

5. DISKUSSION:

In dieser Arbeit wurde erstmalig dargestellt, dass NO-Synthasen, CO-produzierende Hämoxygenasen, die lösliche Guanylatcyclase als Rezeptor für NO und CO und andere zur cGMP-Anhäufung beitragende Faktoren wie natriuretische Peptide in der menschlichen Epiphyse vorhanden sind und dass sowohl lösliche Gunaylatcyclase als auch NO-Synthasen funktionell aktiv sind.

Der an menschlichen Pinealorganen erbrachte Nachweis von nNOS sowie eNOS sowohl immunhistochemisch als auch im Westernblot-Verfahren deckt sich mit Befunden am Rind- und Rattenpinealorgan, bei welchem NOS-Expression und -Aktivität nachgewiesen wurden (Lin et al 1994, Maronde et al. 1995).

Neben einer deutlichen Gefäßlokalisation für eNOS, zeigte auch nNOS eine Anfärbung von Gefäßen, was bereits zuvor in Untersuchungen an Rinderpinealorganen beschrieben wurde (Middendorff 1998). In den Pinealgefäßen wurde eNOS imunhistochemisch im Endothel nachgewiesen. Dieses deckt sich mit Studien an Ratte und Rind, wo für eNOS ebenfalls eine endotheliale Lokalisation beschrieben wird. Erstmalig wurde das Vorkommen von eNOS in der Aorta von Ratten durch Pollock et al. 1991 aufgezeigt. Im Western-blot Verfahren konnten beide Enzyme mittels Antikörpernachweis in Kompletthomogenaten der Epiphysen nachgewiesen werden. Die Expression beider Enzyme war bei den Homogenaten verschiedener Personen unterschiedlich. Ein Zusammenhang mit zuvor abgelaufenen autolytischen Prozessen bei unterschiedlicher postmortaler Dauer bis zur Entnahme ist nicht auszuschließen, ließ sich aber mit dem Erhaltungszustand der histologischen Präparate in keinen direkten Zusammenhang bringen, sodass auch interindividuelle Unterschiede oder circardiane Expressionsunterschiede vor dem Hintergrund unterschiedlicher Todeszeitpunkte infrage kommen könnten, was jedoch nicht weitergehend untersucht werden konnte. Interessanterweise ließ sich die induzierbare NOS (iNOS) weder an Paraffinschnitten noch im

Western-blot Verfahren nachweisen. Dieses steht im Widerspruch zu Untersuchungen von Nathan und Hibbs (1991) die ein ubiquitäres Vorkommen von iNOS postulierten. Erklärbar wäre dies durch eine fehlende endogene Induktion der iNOS (siehe Schmidt und Walter 1994), da möglicherweise vor der Entnahme Induktoren der iNOS-Transkription wie Lipopolysaccharide, Cytokine, Interferon oder auch der TNF α nicht aktiv waren.

Durch den Nachweis der $ß_1$-Untereinheit der löslichen Guanylatcyclase wurde in vorliegender Untersuchung erstmalig demonstriert, dass auch der NO-Rezeptor, die lösliche Guanylatcyclase, ein Heterodimer aus $ß_1$ und α_1 bzw. α_2, in menschlichen Pinealocyten lokalisiert ist. Dieses deckt sich mit Untersuchungen an Rinderpinealocyten, wo der NO-Rezeptor (sGC) immunhistochemisch im Cytoplasma eines Teils der Rinderpinealozyten und durch Western Blot-Analysen in Epiphysenextrakten darstellbar war (Middendorf 1998). In der vorliegenden Arbeit ließ sich die sGC ebenfalls in einem Teil der Pinealgefäße immunhistochemisch nachweisen, sodass davon auszugehen ist, dass sGC sowohl in Pinealgefäßen als auch in den Pinealoyten zu einer cGMP- Akkumulation beiträgt.

Als Nachweis der sGC-Aktivität konnte gezeigt werden, dass durch Stimulation von vollständigen menschlichen Epiphysen mittels des NO- Donor SNP ein cGMP- Anstieg zu verzeichnen war. Diese erstmalig beim Menschen nachgewiesene cGMP- Produktion zeigt, dass NO-abhängige, enzymatische Prozesse, die zu einer Erhöhung der cGMP- Konzentration führen, auch in vitro noch existent sind. Dies mag ein Beispiel dafür sein, dass Organkulturen bzw. Untersuchungen an kompletten Organen ein gutes Modell für die Imitation von in vivo-Situationen darstellen können.

Der kompetetive NOS-Inhibitor L-NAME bewirkte in ELISA-Versuchen ein deutliches Absinken der cGMP Konzenration, was darauf hindeutet, dass nach NOS- Hemmung weniger NO zur Aktivierung der löslichen Guanylatcyclase zur Verfügung stand und entsprechend die gemessene cGMP- Konzentration sank. Somit konnte in einem funktionellen Assay belegt

werden, dass nicht nur exogen zugeführtes NO, sondern auch endogen synthetisiertes NO im Pinealorgan des Menschen aktiv ist.

Um abzuklären, ob ein weiterer inter- bzw. intrazellulärer Botenstoff, das Kohlenmonoxyd (CO), ebenfalls in der menschlichen Epiphyse synthetisiert und somit zu einem zusätzlichen intrazellulären cGMP-Anstieg führt, wurde im Rahmen dieser Untersuchung versucht mittels Western blotting und Immunhistochemie die Isoformen der CO- produzierenden Enzyme (Hämoxygenasen) darzustellen. Die Hämoxygenase 1 (HO-1) und die Hämoxygenase 2 (HO-2) zeigten immunhistochemisch eine deutliche Gefäßlokalisation an menschlichen Pinealgefäßen. Bezüglich der Pinealocyten ließ sich HO-2 in einem Teil der Präparate in einzelnen Zellen darstellen, wohingegen sich HO-1 an keinem Epiphysen-Schnitt eindeutig nachweisen ließ. Im Westernblot-Verfahren konnte nur die HO-2 nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis steht im Gegensatz zu Untersuchungen, die in niedriger Konzentration ein ubiquitäres Vorkommen der HO-1 beschreiben (Verma et al 1993, Mains 1997). Möglicherweise ist diese Diskrepanz auf die unterschiedliche Sensitivität der verwendeten Methoden zurückzuführen.

Die Gefäßlokalisation von eNOS und nNOS könnte vermuten lassen, dass über die NO-Synthese und dem damit verbundenen Effekt an glatten Muskelzellen der Gefäßwand, ein weiterer Regelmechanismus existiert, der über die pineale Durchblutung die Melatonin-Sekretion mit beeinflusst. Der zusätzliche Nachweis einer funktionell aktiven Guanylatcyclase macht in Verbindung mit dem Vorhandensein der cGMP-abhängigen Kinase vom Typ I eine aus den Gefäßen anderer Organe bekannte NO-, cGMP-, GK I-induzierte Relaxation (Inagami et al. 1995) äußerst wahrscheinlich. Von Interesse ist in diesem Zusammenhang, daß bei der Ratte ein circadianer Rhythmus des Blutflusses zum Pinealorgan analog zu der sich ändernden Melatoninsekretion (Quay 1972) und beim Schaf ein verminderter pinealer Blutfluß (Rollag et al. 1978) beim Übergang von Dunkelheit zu Licht beobachtet wurde. Da gleichzeitig Berichte über circadiane Veränderungen der NOS-Aktivität

im Rattengehirn (Ayers et al. 1996) und insbesondere in der Rattenepiphyse (Schaad et al. 1995, Spessert et al. 1995) vorliegen, ist denkbar, dass eine wesentliche Funktion von pinealem NO darin liegen könnte, die physiologischen Schwankungen des Melatonin-Plasmaspiegels über eine veränderte pineale Gefäßweite mitzuregulieren.

Das diffusible Kohlenmonoxid ist in vielen seiner bisher bekannten Wirkungen dem NO vergleichbar. So vermittelt CO die Relaxation glatter Muskelzellen von Gefäßen (Morita et al. 1995, Zakhary et al. 1996). Im zentralen und peripheren Nervensystem ist CO als Neurotransmitter bekannt (Maines 1993, Verma et al. 1993, Maines 1997, Boehning et al. 2003).

Bekannt ist weiterhin, dass von beiden Hämoxygenasen freigesetztes CO, die lösliche Guanylatcyclase (sGC) aktivieren kann (Christodoulides et al. 1995, Morita et al. 1995, Zakhary et al. 1996). Das gleichzeitige Vorhandensein von HO-2 (bzw. HO-1), sGC und cGMP in Pinealozyten kann somit Ausdruck eines zusätzlichen CO-Systems in diesen Zellen sein, bei welchem endogen produziertes CO zur intrazellulären cGMP- Akkumulation führt. Diese Kolokalisation lässt einen weiteren CO- gesteuerten Regelmechanismus vermuten, der somit ebenfalls cGMP-abhängige Prozessse über eine Konzentrationsänderung mitbeeinflusst. Eine hohe HO-2 Konzentration im gesamten Gehirn wurde zuvor bereits beschrieben (Trakshel u. Maines 1989), ebenfalls wurde die Kombination von HO-2 mit Guanylatcyclase in Bezug auf die cGMP- Regulation beschrieben (Schmidt et al 1992). Von Interesse sind jüngste Befunde, die eine Verbindung zwischen circadianen Rhythmen und Neurotransmission durch CO zeigen (Boehning und Snyder 2002, Dioum et al. 2002).

In glatten Muskelzellen und Myofibroblasten ist davon auszugehen, dass die cGMP-gesteuerten Prozesse zu einer Relaxation dieser kontraktilen Zellen führen, was wiederum vermuten lässt, dass somit auch die CO-produzierenden Hämoxygenasen direkt oder indirekt an der Blutflusskontrolle und auf diese Weise auch an der Melatonin- Ausschüttung beteiligt sind.

Eine Gruppe von Peptiden, die über die Bindung an eine membranständige Guanylatcyclase für eine intrazelluläre cGMP- Erhöhung sorgen, sind die natriuretischen Peptide. Das C-natriuretische Peptid (CNP), dessen Präsenz in Pinealorganen von Rind (Middendorff et al. 1996) und Ratte (Müller et al. 1999) nachgewiesen wurde und welchem eine hohe Konzentration im Gehirn zugeschrieben wird, ließ sich immunhistologisch nur unzureichend an menschlichen Epiphysenschnitten darstellen. Die Pinealocyten zeigten keine über die Hintergrundfärbung hinausgehende Reaktion. Aufgrund des Molekulargewichts von CNP war ein Nachweis durch das Westernblot-Verfahren nicht möglich. Auch der Versuch, das atriale natriuretische Peptid (ANP) immunhistochemisch in der menschlichen Epiphyse nachzuweisen, gelang nur unzureichend. Dieses deckt sich mit Untersuchungen an Rattenpinealorganen, wo sich neben dem Peptid auch der Rezeptor für ANP nicht nachweisen ließ, während er in anderen Hirnarealen zur Darstellung kam (Müller et al. 2000) und dort für die intrazelluläre cGMP- Erhöhung mitverantwortlich zu sein scheint. Von den natriuretischen Peptiden konnte nur das Brain natriuretische Peptid (BNP) im Gegensatz zum Rind (Middendorff et al. 1996), wo es im Pinealorgan nicht exprimiert wird, in Teilen der Humanpinealocyten und in der Media zentraler Pinealisgefäßen immunhistochemisch nachgewiesen werden. Somit scheint es bei der pinealen Expression der natriuretischen Peptide wesentliche Speziesunterschiede zu geben. Zu klären bleibt, ob CNP im Pinealorgan des Menschen auch in vivo im Unterschied zu anderen Spezies fehlt, oder ob aufgrund des Zustandes des entnommenen Materials oder speziesabhängiger Antikörperunterschiede der CNP-Nachweis beim Menschen nicht möglich war. Welche besondere Rolle CNP neben der cGMP- Erhöhung im Pinealorgan spielt, ist nicht geklärt, ein direkter Einfluß auf die Melatoninproduktion konnte weitgehend ausgeschlossen werden.

In dieser Untersuchung wurde außerdem versucht, Effektorproteine, an die cGMP direkt zu binden vermag, darzustellen. Aufgrund der Tatsache, dass in vielen anderen Geweben bzw. Organen die cGMP-abhängige Proteinkinase (PKG) ein wichtiger Effektor der cGMP-

Produktion ist, wurde unter anderem untersucht, ob auch in der menschlichen Epiphyse die PKG1 vorhanden sind. Es gelang in einem großen Teil der Pinealocyten PKG1 immunhistochemisch nachzuweisen. Auch mittels Western-blot Verfahren war die PKG auf Proteinebene darstellbar. Es zeigte sich, dass beide bekannten Isoformen des Typ 1 der PKG als Doppelbande mit einer Größe von 76 bzw. 78 kDa in den verschiedenen untersuchten Pinealorganen des Menschen vorhanden sind. Neben der PKG kommt es in Rattenpinealocyten über cGMP aber auch zu einer Aktivierung der ribosomalen S6-Kinase (Ho et al. 2003) und der P38 MAP-Kinase (Ho et al. 2001).

Es ist also wahrscheinlich, dass cGMP-abhängige Phosphorilierungsprozesse in menschlichen Pinealocyten vorkommen. Dieses deckt sich mit Untersuchungen von Li et al. (1996) an Rinder-Hypophysen, wo ebenfalls eine cGMP-abhängige PKG-Aktivität nachgewiesen werden konnte.

Des Weiteren gelang in dieser Arbeit der immunhistochemische Nachweis eines aus den Stäbchen der Retina bekannten CNG- Kanals mittels des Antikörpers PPC 15, der die ionenleitfähige α- Untereinheit in den menschlichen Pinealocyten markierte. Dieses deckt sich mit Untersuchungen an den noch lichtempfindlichen Pinealorganen des Huhns (Böningk et al. 1996) sowie mit Untersuchungen an Rattenpinealorganen, wo neben einem CNG-Kanal auch andere Komponenten des retinalen cGMP-Weges nachgewiesen werden konnten (Blackshaw und Snyder 1997). Diese Ähnlichkeit mit retinalen Strukturen ist zumindest ein Hinweis auf die Entwicklungsgeschichte des Organs, wobei zurzeit noch unklar ist, ob die Komponenten Retina-spezifischer Signalwege lediglich funktionslose Relikte des Ursprunggewebes darstellen oder ob es sich auch beim Menschen um biologisch aktive Proteine mit bisher noch unbekannter Funktion handelt. Unabhängig davon konnte aber mit dem CNG-Kanal neben der PKG1 ein weiteres cGMP-Zielprotein in den menschlichen Pinealocyten identifiziert werden.

6. ZUSAMMENFASSUNG:

Im Pinealorgan der Ratte ist die noradrenalin-abhängige cAMP-vermittelte Melatoninsekretion, die verantwortlich ist für die Steuerung einer circadianen Rhythmik und damit dem Organismus die Phasenlage vermittelt, ausführlich untersucht worden. Daneben ist bei der Ratte seit einiger Zeit bekannt, dass Noradrenalin in Pinealocyten auch zur Stickstoffmonoxyd-Synthase (NOS)-Aktivierung mit nachfolgender Anhäufung des Signalmoleküls cyclisches Guanosinmonophosphat (cGMP) führt. In der menschlichen Epiphyse sind vergleichbare Signalwege aber noch weitgehend unbekannt. Insbesondere ist eine mögliche Rolle von cGMP noch gar nicht untersucht. Mit Hilfe immunhistochemischer Methoden, Westernblot-Untersuchungen und dem ELISA-Verfahren wurden hier menschliche Epiphysen in Hinblick auf Vorkommen, Lokalisation und Aktivität verschiedener Komponenten cGMP- abhängiger Signalwege untersucht. Hierbei zeigte sich, dass NO-Synthasen, CO-produzierende Hämoxygenasen, die cGMP- produzierende lösliche Guanylatcyclase als Rezeptor für NO und CO sowie Liganden weiterer Guanylatcyclasen, wie die natriuretischen Peptide, in der menschlichen Epiphyse vorhanden sind und dass sowohl lösliche Guanylatcyclase als auch NO-Synthasen funktionell aktiv sind. Die NO-Synthasen eNOS und nNOS konnten in der Muscularis sowie im Endothel von zentralen Pinealisgefäßen lokalisiert werden. Auch die CO- produzierenden Hämoxygenasen HO-1 und HO-2 zeigten eine deutliche Gefäßlokalisation, die HO-2 fand sich auch in Pinealocyten. Der NO-und CO-Rezeptor, die lösliche Guanylatcyclase ließ sich in menschlichen Pinealocyten und in einem Teil zentraler Pinealgefäße lokalisieren. Als Ligand der membrangebundenen Guanylatcyclase A fand sich das brain- natriuretische- Peptid (BNP) in Teilen der Humanpinealocyten und in der Media zentraler Pinealisgefäße, während die verwandten Moleküle ANP und CNP in der menschlichen Epiphyse nicht exprimiert werden. Ebenfalls gelang es in dieser Untersuchung cGMP- Effektorproteine der menschlichen Epiphyse zu identifizieren. So ließ sich die cGMP- abhängige Proteinkinase I in einem großen Teil der

Pinealocyten sowohl immunhistochemisch als auch mittels Westernblot-Verfahren nachweisen. Weiterhin konnte ein durch cGMP-geöffneter (CNG) Ionenkanal in menschlichen Pinealocyten lokalisiert werden.

Der Nachweis dieser verschiedenen Komponenten des cGMP-Systems spricht für eine wichtige Rolle dieses second messenger im menschlichen Pinealorgan. Offen bleibt aber, welche genaue Funktion cGMP- Wege in den Pinealocyten ausüben. In den Pinealgefäßen ist eine cGMP-vermittelte Relaxation und damit die indirekte Regulation der Melatoninfreisetzung aus dem Organ in den allgemeinen Körperkreislauf anzunehmen.

7. LITERATURVERZEICHNIS

Arendt J, Aldhous M, Marks V (1986) Alleviation of jet lag by melatonin: preliminary results of controlled double blind trial. Br Med J, 292: 1170

Axelrod, j. Weissbach (1961). Purification and properties of HIOMT.
J. biol. Chem. 236: 211-213

Ayers NA, Kapas L, Krueger JM (1996). Circardian variation of nitric oxide synthase activity and cytosolic protein levels in rat brain. Brain Res 707: 127-130

Barr CS, Rhodes P, Struthers D (1996). C-type natriuretic peptide. Peptides. 17: 1243-1251

Beavo JA (1995). Cyclic nucleotide phosphodiesterases: functional implications of multiple isoforms. Physiol Rev 75: 725-748

Biel M, Zong X, Distler M, Bosse E, Klugbauer N, Murakami M, Flockerzi V, Hofmann F (1994). Another member of the cyclic nucleotide-gated channel family, expressed in testis, kidney, and heart. Proc. Natl. Acad. Sci. 91: 3505-3509

Blackshaw S, Snyder SH (1997). Developmental expression pattern of phototransduction components in mammalian pineal implies a light-sensing function. J. Neurosci. 17: 8074-8082

Böningk W, Altenhofen W, Müller F, Dose A, Illing M, Molday RS, Kaupp UB (1993). Rod and cone photoreceptor cells express distinct genes for cGMP-gated channels. Neuron 10: 865-877

Boehning D, Moon C, Sharma S, et al. (2003). Carbon monoxide neurotransmission activated by CK2 phosphorylation of heme oxygenase-2. Neuron 40: 129-37

Boehning D, Snyder SH (2002). Circadian rhythms. Carbon monoxide and clocks.
Science 298: 2339-2340

Bredt DS, Hwang PH, Glatt C, Lowenstein C, Reed RR, Snyder SH (1991). Cloned and expressed nitric oxide synthase structurally resembles cytochrome P-450 reductase. Nature 352: 714-718

Butt E, Geiger J, Jarchau T, Lohmann SM, Walter U (1993). The cGMP-dependent protein kinase - gene, protein, and function. Neurcochem. Res. 18: 27-42

Christodoulides N, Durante W, Kroll MH, Schafer AI (1995). Vascular smooth muscle cell heme oxygenases generate guanylyl cyclase-stimulatory carbon monoxide. Circulation 91: 2306-2309

Cruse I, Maines MD (1988). Evidence suggesting that the two forms of heme oxygenase are products of different genes. J. Biol. Chem. 263: 3348-3353

Deinum G, Stone JR, Babcock GT, et al (1996). Binding of nitric oxide and carbon monoxide to soluble guanylate cyclase as observed with Resonance raman spectroscopy.
Biochemistry 35: 1540-1547

DeJonge HR (1981). Cyclic GMP-dependent protein kinase in intestinal brushborders. In: Advances in Cyclic nucleotide research, Vol. 14 (Dumont JE, Greengard P, Robinson GA, eds.), Raven Press, New York p.315-333

Dioum EM, Rutter J, Tuckerman JR, et al. (2002). NPAS2: a gas-responsive transcription factor. Science 298: 2385-2387

Distler M, Biel M, Flockerzi V, Hofman F (1994). Expression of cyclic nucleotide-gated cation channels in non-sensory tissues and cells. Neuropharmacology 33: 1275-1282

Eismann E, Bönigk W, Kaupp UB (1993). Structural features of cyclic nucleotide-gated channels. Cell Physiol. Biochem. 3: 332-351

Fesenko EE, Kolesnikov SS, Lyubarsky AL (1985). Induction by cyclic GMP of cationic conductance in plasma membrane of retinal rod outer segment. Nature 313: 310-313

Förstermann U, Closs EI, Pollock JS, Nakane M, Schwarz P, Gath I, Kleinert H (1994). Nitric oxide synthase isozymes. Characterization, purification, molecular cloning, and functions. Hypertension 23: 1121-1131

Francis SH, Corbin JD (1994). Structure and function of cyclic nucleotide-dependent protein kinases. Annu. Rev. Physiol. 56: 237-272

Garthwaite J, Boulton CL (1995). Nitric oxide signaling in the central nervous system. Annu. Rev. Physiol. 57: 683-706

Gordon SE (2000)."Light" reading: targeting tryptophans in cyclic nucleotide-gated channels. J. Gen. Physiol. 116: 223-225

Hevel JM, White KA, Marletta MA (1991). Purification of the inducible murine macrophage nitric oxide synthase. Identification as a flavoprotein. J. Biol. Chem. 266: 22789-22791

Ho AK, Price L, Mackova M, et al. (2001). Potentiation of cyclic AMP and cyclic GMP accumulation by p38 mitogen-activated protein kinase (p38MAPK) inhibitors in rat pinealocytes. Biochem. Pharmacol. 62: 1605-1611

Ho AK, Mackova M, Cho C, et al. (2003). Regulation of 90-kilodalton ribosomal S6 kinase phosphorylation in the rat pineal gland. Endocrinology 144: 3344-3350

Inagami T, Naruse M, Hoover R (1995). Endothelium as an endocrine organ. Annu. Rev. Physiol. 57: 171-189

Kantor DB, Lanzrein M, Stary SJ, Sandoval GM, Smith WB, Sullivan BM, Davidson N, Schuman EM (1996). A role for endothelial NO synthase in LTP revealed by adenovirus-mediated inhibition and rescue. Science 274: 1744-1748

Kaupp UB (1995). Family of cylic nucleotide gated ion channels. Curr. Opin. Neurol. 5: 434-442

Komolavilas P, Lincoln TM (1996). Phosphorylation of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor by cyclic GMP-dependent protein kinase. J. Biol. Chem. 269: 21933-21938

Lerner AB, Case JD, Takahashi Y (1960). Isolation of melatonin and 5-methoxyindole-3-acetic acid from bovine pineal glands. J. Biol. Chem. 235:1992-1997

Li H, Liu JP, Smith R, Robinson PJ (1996). Identification of cGMP-dependent protein kinase and its specific substrates in the anterior pituitary. Mol. Cell. Endocrinol. 122: 159-171

Lin AMY, Schaad NC, Schulz PE, Coon SL, Klein DC (1994). Pineal nitric oxide synthase: characteristics, adrenergic regulation and function. Brain. Res. 651: 160-168

Lincoln TM, Cornwell TL (1993). Intracellular cyclic GMP receptors. FASEB J. 7: 328-338

Loesch A, Burnstock G (1995). Ultrastructural localization of nitric oxide synthase and endothelin in coronary and pulmonary arteries of newborn rats. Cell. Tissue. Res. 279: 475-483

Maines MD (1993). Carbon monoxide: an emerging regulator of cGMP in the brain. Mol. Cell. Neurosci. 4: 397

Maines MD, Ewing JF (1996). Stress response of the rat testis: in situ hybridization and immunohistochemical analysis of heme oxygenase-1 (HSP32) induction by hyperthermia. Biol. Reprod. 54: 1070-1079

Maines MD (1997). The heme oxygenase system: a regulator of second messenger gases. Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 37: 517-554

Maronde E, Middendorff R, Mayer B, Olcese J, (1995). The effekt of No-donors in bovine- and rat- pinealcells: Stimmulation of cGMP and cGMP- independent inhibition of melatonin synthesis, J. of Neuroendocrinology 7: 207-214

Maronde E, Pfeffer M, Olcese J, et al (1999). Transcription factors in neuroendocrine regulation: rhythmic changes in pCREB and ICER levels frame melatonin synthesis. J. Neurosci. 19: 3326-3336

Mayer B, John M, Böhme E (1990). Purification of Ca / calmodulin-dependent nitric oxide synthase from porcine cerebellum; Cofactor-role of tetrahydrobiopterin. FEBS Lett. 277: 215-219

Middendorff R, Maronde E, Paust H.-J., Müller D, Davidoff M, Olcese J, (1996). Expression of c-type natriuretic peptide in the bovine pineal gland. J. Neurochem. 67: 517-524

Middendorff R (1998). Habilitationschrift, Universität Hamburg

Morita T, Perrella MA, Lee ME, Kourembanas S (1995). Smooth muscle cell-derived carbon monoxide is aregulator of vascular cGMP. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92: 1475-1479

Moore RY, Eichler VB (1972). Loss of a circadian adrenal corticosterone rhythm following suprachiasmatic lesions in the rat. Brain Res. 42: 201-206

Müller D, Olcese J, Mukhopadhyay A, Middendorff R (2000). Guanylyl cyclase B represents the predominant natriuretic peptide receptor expressed at exceptionally high levels in the pineal gland. Mol. Brain Res. 75: 321-329

Nathan C, Hibbs JB (1991). Role of nitric oxide synthesis in macrophage antimicrobial activity. Curr. Opin. Immunol. 3: 65-70

Olcese J (1995). The mammalian pineal gland and reproduction. Controversies and strategies for future research. In: Tissue Renin-Angiotensin systems (Mukhopadhyay AK, Raizada MK, eds.) Plenum Press 1-13

Pfeifer A, Aszodi A, Seidler U, Ruth P, Hofmann F, Fässler R (1996). Intestinal secretory defects and dwarfism in mice lacking cGMP-dependent protein kinase II. Science 274: 2082-2084

Pollock JS, Förstermann U, Mitchell JA, Warner TD, Schmidt HHHW, Nakane M, Murad F (1991). Purification and characterization of particulate endothelium-derived relaxing factor synthase from cultured and native bovine aortic endothelial cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 10480-10484

Quay WB (1965). Photic relations and experimental dissociation of circadian rhythms in pineal composition and running activity in rats. Photochem. Photobiol. 3: 425-432

Quay WB (1972). Twenty-four-hour rhythmicity in carbonic anhydrase activities of choroid plexuses and pineal gland. Anat. Rec. 174: 279-287

Redman J, Armstrong S, Ng KT (1983). Free-running activity rhythms in the rat: entrainment by melatonin. Science 219: 1089-1091

Reiter RJ (1991). Pineal melatonin: cell biology of its synthesis and of its physiological interactions. Endocrine Rev. 12: 151-180

Rollag MD, O'Callaghan PL, Niswender GD (1978). Dynamics of photo-induced alterations in pineal blood flow. J. Endocrinol 76: 547-548

Rooney TA, Joseph SK, Queen C, Thomas P (1996). Cyclic GMP induces oscillatory calcium signals in rat hepatocytes. J Biol Chem 271: 19817-19822

Schaad NC, Vanecek J, Kosar E, et al. (1995). Adrenergic control of rat pineal NO synthase. J. Neurochem. 65: 935-938

Schmidt HHHW, Pollock JS, Nakane M, Gorsky LD, Förstermann U, Murad F (1991). Purification of a soluble isoform of guanylyl cyclase-activating-factor synthase. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 365-369

Schmidt HHW, Walter U (1994). NO at work. Cell 78: 919-925

Schmidt HHW, Gagne GD, Nakane M, Pollock JS, Miller MF, Murad F (1992). Mapping of neural nitric oxide synthase in the rat suggests frequent colocalization with NADPH diaphorase but not with soluble guanylate cyclase, and novel paraneural functions for nitrinergic signal transduction. J. Histochem. Cytochem. 40: 1439-1456

Shammat IM, Gordon SE (1999). Stoichiometry and arrangement of subunits in rod cyclic nucleotide-gated channels. Neuron 23: 809-819

Spessert R, Gupta BBP, Seidel A, Maitra SK, Vollrath L (1992). Involvement of cyclic guanosine monophosphate (cGMP) and cytosolic guanylate cyclase in the regulation of synaptic ribbon numbers in rat pineal gland. Brain Res. 570: 231-236

Spessert R, Layes E, Vollrath L (1993). Adrenergic stimulation of cyclic GMP formation requires NO-dependent activation of cytosolic guanylate cyclase in rat pinealocytes. J. Neurochem. 61: 138-144

Spessert R, Layes E, Schollmayer A, Reuss S, Vollrath L (1995). In the rat pineal gland, but not in the suprachiasmatic nucleus, the amount of constitutive neuronal nitric oxide synthase is regulated by environnemental lighting conditions. Biochem. Biophys. Res. Commun. 212: 70-76

Stephan FK, Zucker I (1972). Circadian rhythms in drinking behavior and locomotor activity of rats are eliminated by hypothalamic lesions.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 69: 1583-1586

Stuehr DJ, Cho HJ, Kwon NS, et al. (1991). Purification and characterization of the cytokine-induced macrophage nitric oxide synthase: an FAD- and FMN-containing flavoprotein. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 7773-7777

TrakshelG. M., Maines M.D., (1989). Multiplicity of the hemeoxygenase isozymes HO-I and HO-II are different molecular species in rat and rabbit, J. Biol. Chem. 264: 1323-1328

Verma A, Hirsch DJ, Glatt CE, Ronnett GV, Snyder SH (1993). Carbon monoxide: a putative neural messenger. Science 259: 381-384

White BH, Klein DC (1995). Stimulation of cyclic GMP accumulation by sodium nitroprusside is potentiated via a Gs mechanism in intact pinealocytes.
J. Neurochem. 64: 711-717

Wilson RI, Yanovsky J, Gödecke A, Stevens DR, Schrader J, Haas HL (1997). Endothelial NOS and LTP. Nature 386: 338

Yui Y, Hattori R, Kosuga K, et al. (1991). Purification of nitric oxide synthase from rat macrophages. J. Biol. Chem. 266: 12544-12547

Zakhary R, Gaine SP, Dinerman JL, Ruat M, Flavahan NA, Snyder SH (1996). Heme oxygenase 2: endothelial and neuronal localization and role in endothelium-dependent relaxation. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 795-798

Stephan FK, Zucker I (1972). Circadian rhythms in drinking behavior and locomotor activity of rats are eliminated by hypothalamic lesions. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 69: 1583-1586

8. DANKSAGUNG

Vielfältige Unterstützung begleitete diese Arbeit und hat die Umsetzung grundlegender Ideen ermöglicht, deshalb gilt mein besonderer Dank vor allem Herrn Prof. Dr. R. Middendorff, der das Thema dieser Arbeit zur Verfügung stellte und durch seine kontinuierliche Betreuung und fachliche Anleitung, sowie durch die Bereitstellung optimaler Rahmenbedingungen die nötigen Voraussetzungen für die Erstellung dieser Arbeit schaffte.

Herrn Prof. Dr. M. Davidoff möchte ich für seine beispiellose Unterstützung in der Beantwortung konzeptioneller und interdisziplinärer Fragestellungen sowie für die praktische Unterstützung bei der Präparation des zu untersuchenden Materials großen Dank aussprechen.

Für die Überlassung des Untersuchungsmaterials möchte ich meinen herzlichen Dank gegenüber Herrn Prof. Dr. K. Püschel, Direktor des Instituts für Rechtsmedizin des Universitätskrankenhauses Eppendorf, zum Ausdruck bringen.

Für ihre tatkräftige Unterstützung bei der Durchführung der Westernblot und immunhistochemischen Versuche bedanke ich mich bei der medizinisch- technischen-Assistentin, Frau M. Köhler.

Meine Eltern und meine Frau standen mir maßgeblich unterstützend und ermutigend zur Seite. Von Ihrem außerordentlichen Engagement konnte ich in großem Umfang profitieren. Ganz besonderen Dank empfinde ich meinem Vater gegenüber, dem diese Arbeit gewidmet sein soll.

9. CURRICULUM VITAE

Persönliche Daten:

Peter-Hans Hauptmann geboren am 06.06.1970 in Hamburg

Schulausbildung:

08/1977: Einschulung in die Rudolf-Steiner-Schule in Hamburg Wandsbek

06/1990: Schulabschluß mit Abitur an obiger Schule

Dienstpflicht:

10/1990: Beginn der Wehrdienstzeit und Ausbildung zum Sanitäter

01/1991: Dienst im Sanitätszentrum der Bundeswehr als Rettungssanitäter und Truppenarztschreiber in Hamburg

10/1991: Ende der Wehrdienstzeit

Weitere Tätigkeiten:

02/1992: Freiwilliges soziales Jahr beim Deutschen Roten Kreuz e.V.. Eingesetzt in der Schwerstbehinderten-Rehabilitation im Senator Neumann Heim in Hamburg

02/1993: Ende des freiwilligen sozialen Jahres. Weiterbeschäftigung in der Einrichtung im Pflege- und Betreuungsdienst bis Oktober 1993

Aus- und Weiterbildung:

10/1993: Studium für Humanmedizin an der Universität Hamburg

01/1995: Studentische Tätigkeit in der Abteilung für molekulare Zellbiologie am Anatomischen Institut der Universität Hamburg

03/1997: Ärztliche Vorprüfung

04/1997: Tätigkeit als Doktorrand am Anatomischen Institut, mit dem Forschungsschwerpunkt molekulare Neurobiologie

09/1998: Erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung

03/1999: Fortsetzung der Forschungstätigkeit als studentische Hilfskraft am Anatomischen Institut der Universität Hamburg

09/2000: Zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung

10/2000: Beginn des praktischen Jahres im Allgemeinen Krankenhaus Barmbek in der IV medizinischen Abteilung

02/2001: Chirurgisches Tertial des praktischen Jahres im Amalie Sieveking Krankenhaus

06/2001: Drittes Tertial in der neurologischen Abteilung des Allgemeinen Krankenhauses Barmbek

11/2001: Dritter Abschnitt der ärztlichen Prüfung

01/2002: Beginn des AiP im Bereich Anästhesie der Park- klinik Manhagen

10/2002: Weitere AiP- Tätigkeit im Bereich Psychiatrie des Heinrich-Sengelmann- Krankenhaus.

07/2003: Anstellung als Assistenzarzt in der Facharztweiterbildung Psychotherapie/Psychiatrie an oben genannter Klinik.

Studium begleitende Tätigkeiten:

09/1998: Achtmonatige Tätigkeit im ambulanten Pflegedienst in Ahrensburg

01/1999: Zusätzliche Tätigkeit in der Drogenambulanzen Hamburg GmbH im Bereich Betreuung und Versorgung

Die Arbeit wurde am 14. Oktober 2004 durch den zuständigen Promotionsausschuss, unter dem Vorsitz von **Frau Prof. Dr. U. Beisiegel**, zur Promotion zugelassen.

Der Prüfungsausschuss unter dem Vorsitz von
Herrn Prof. Dr. R. Middendorff
den beiden Gutachtern
Herrn Prof. Dr. M. Davidoff und
Herrn Prof. Dr. G. W. Mayr
erklärte am 18. Februar 2005 die mündliche Prüfung als bestanden.