

Aus dem Universitätsklinikum Münster

Institut für Physiologie I

- Geschäftsf. Direktor: Univ.-Prof. Dr. rer. nat. H.-C.-Pape -

**Wirkung von Melatonin auf inhibitorische
und exzitatorische Rezeptoren**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur

Erlangung des doctor medicinae dentium

der Medizinischen Fakultät

der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

vorgelegt von

Houben, Fabian

aus Berlin

2009

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät

der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. W.. Schmitz

1. Berichterstatter: Prof. Dr. rer. nat. U. Mußhoff

2. Berichterstatter: Prof. Dr. N. Binding

Tag der mündlichen Prüfung: 23.04.2009

Aus dem Universitätsklinikum Münster

Institut für Physiologie I

- Geschäftsf. Direktor: Univ.-Prof. Dr. rer. nat. H.-C. Pape -

Referent: Prof. Dr. rer. nat. U. Mußhoff

Koreferent: Prof. Dr. N. Binding

ZUSAMMENFASSUNG

Wirkung von Melatonin auf inhibitorische und exzitatorische Rezeptoren

Houben, Fabian

Das Pinealhormon Melatonin ist durch seine regulatorische Wirkung auf den zirkadianen Rhythmus, seine Rolle im endokrinen System, seine Effekte auf das Immunsystem sowie seinen möglichen Nutzen bei der Behandlung von Erkrankungen wie Epilepsie und Krebs von zunehmender Bedeutung. Die pharmakologische Wirkung von Melatonin wird zur Behandlung des „jet lag“ und von Schlafstörungen genutzt. Die vorliegende Arbeit stellt die Frage inwieweit eine Interaktion von Melatonin auf exzitatorische glutamaterge und inhibitorische GABA-erge Rezeptorkanäle festgestellt werden kann.

Die Untersuchungen wurden am Expressionssystem der Oozyten von *Xenopus laevis* durchgeführt. Nach Injektion von messenger Ribonukleinsäure aus dem Nervengewebe von Ratten wurden AMPA- und GABA_A-Rezeptorkanäle exprimiert. Mit Hilfe der Zwei-Elektroden-Spannungsklemme wurden transmembranöse Ionenströme registriert.

Die Wirkung von Melatonin auf AMPA-Rezeptorkanäle wurde in den Konzentrationen 0,01, 0,1 und 1 µmol/l Melatonin untersucht. Es konnte eine signifikante Steigerung für alle Konzentrationsstufen festgestellt werden.

Die Zuführung von 0,01 µmol/l Melatonin führte zu einer nicht signifikanten Hemmung der GABA_A-Rezeptorkanäle. Für die Konzentrationsstufe 0,1 µmol/l Melatonin war die beobachtete Steigerung signifikant. In beiden Fällen liegt ein konzentrationsabhängiger Effekt vor.

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen einen Effekt von Melatonin auf exzitatorische und inhibitorische Rezeptorkanäle und weisen daraufhin, dass Melatonin, in pharmakologischen Konzentrationen appliziert, einen erregenden Effekt auf die synaptischen Prozesse an Nervenzellen auszuüben vermag.

Der Genehmigungsbescheid für die Durchführung der Versuche mit dem Aktenzeichen 50.0835.10 (G 79/2002) vom 19.12.2002 ist als letztes Blatt eingefügt.

Tag der mündlichen Prüfung: 23.04.2009

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	1
Abkürzungsverzeichnis	3
1.0 Einleitung	4
1.1 Struktur, Synthese, Freisetzung und Abbau von Melatonin	4
1.2 Wirkungen von Melatonin	9
1.3 Aufbau und Funktionsweise von Melatonin-Rezeptoren	11
1.4 Melatonin-Rezeptoren im Gehirn	13
1.5 Melatonin-Rezeptoren im Hippocampus	14
1.6 Aufbau und Funktionsweise von Glutamat- und GABA-Rezeptoren	15
1.7 Fragestellung	18
2.0 Material und Methoden	19
2.1 Das Expressionssystem der Xenopus-Oozyten	19
2.2 Oozyten von Xenopus laevis	21
2.3 Präparation und Kultivierung	23
2.4 RNA-Extraktion, Reinheitskontrolle und Konzentrationsbestimmung	25
2.5 Mikroinjektion von mRNA in Oozyten	29
2.6 Elektrophysiologische Untersuchungstechnik	29
2.7 Substanzenapplikation	31
2.8 Versuchsreihe	33
2.8.1 Substanzen: Konzentration, Lösungsmittel	33
2.8.2 Protokollschema	33
2.9 Statistische Auswertung und Bearbeitung	35

3.0	Ergebnisse	37
3.1	Charakterisierung der AMPA-Rezeptorkanal-induzierten Ionenströme	37
3.2	Repetitive Aktivierung der AMPA-Rezeptorkanäle durch den synthetischen Agonisten Kainat	41
3.3	Charakterisierung der GABA _A -Rezeptorkanal-induzierten Ionenströme	43
3.4	Repetitive Aktivierung der GABA _A -Rezeptorkanäle durch den Neurotransmitter GABA	45
3.5	Wirkung von Melatonin auf die bioelektrischen Membraneigenschaften der Xenopus-Oozyte	49
3.6	Wirkung von Melatonin auf AMPA-Rezeptorkanäle	50
3.7	Wirkung von Melatonin auf GABA _A -Rezeptorkanäle	56
4.0	Diskussion	59
4.1	Diskussion des methodischen Vorgehens	60
4.1.1	Perspektiven und Grenzen des Expressionssystems der Xenopus-Oozyten	60
4.1.2	Vor- und Nachteile des Versuchsprotokolls	62
4.2	Interpretation der Ergebnisse	63
4.2.1	Konzentrationsabhängigkeit der Effekte durch Melatonin	66
4.2.2	Bedeutung der festgestellten Ergebnisse	67
5.0	Literaturverzeichnis	69
6.0	Danksagung	90
7.0	Lebenslauf	91
8.0	Anhang	I
8.1	Genehmigungsbescheid	I

Abkürzungsverzeichnis

AMPA	α -Amino-3-Hydroxy-5-Methyl-4-Isoxazolpropionat
BIC	Bicucullin-Methiodid
CNQX	6-Cyano-7-Nitroquinoxalin-2,3-Dion
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
GABA	γ -Aminobuttersäure
GLU	Glutamat
KA	Kainat
MELI	Melatonin
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
SCN	Nucleus suprachiasmaticus
RT-PCR	Reverse-Transskriptase Polymerase-Kettenreaktion

1.0 Einleitung

1.1 Struktur, Synthese, Freisetzung und Abbau von Melatonin

Der Dermatologe Aaron B. Lerner beobachtete 1958 an Kaulquappen die Wirkung eines Extraktes der Zirbeldrüse (Pinealorgan, Epiphyse, Glandula pinealis) von Rindern. Brachte man die Kaulquappen in Kontakt mit diesem Extrakt, so erblichen sie. Diese Reaktion war auf eine Ballung der Farbstoffkörperchen (Melanin) zurückzuführen, welche vorher verteilt vorlagen. Lerner nutzte diesen Aufhellungseffekt, um das melaninkonzentrierende Hormon zu isolieren und nannte es Melatonin.

Der Name des Hormons setzt sich zusammen aus seiner Wirkung auf Melanophoren und der Tatsache, dass es ein Methoxyderivat des Serotonins ist. Die Existenz des Melatonin (N-Acetyl-5-Methoxytryptamin) konnte nicht nur bei Säugern, sondern auch bei wechselwarmen Wirbeltieren wie Reptilien und Fischen (Meissl und Ekström, 1997) und sogar bei Pflanzen und Einzellern nachgewiesen werden (Hattori et al., 1995; Reiter et al., 2007).

Bei Säugetieren existieren mehrere Syntheseorte für Melatonin. Der wichtigste und damit Hauptsyntheseort ist das Pinealorgan, von dem französischen Philosophen René Descartes (1596-1650) auch als Sitz der Seele bezeichnet. Das Pinealorgan des Menschen befindet sich im Zentrum des Gehirns, an der Rückseite des Hirnstammes, auf Höhe des 3. Hirnventrikels (Pernkopf, 1960). Die hochvaskularisierte Zirbeldrüse enthält zwei Arten von Zellen: 1. die Pinealozyten und 2. die Neuroglia. Das Hormon

Melatonin wird neben anderen Hormonen und Neurotransmittern von den Pinealozyten synthetisiert (Romijn et al., 1977). Untergeordnete Orte der Melatoninsynthese sind die Retina und das Intestinum (Gern, Ralph, 1979; Besharse und Iuvone, 1983; Lee und Pang, 1992; Coon et al., 1995; Faillace et al., 1995; Guerlotte et al., 1996). Einige Zellen der Haderschen-Drüse mancher Spezies sind ebenfalls fähig Melatonin zu synthetisieren (Menendez-Pelaez et al., 1987; Coto-Montes et al., 1996). Die Aminosäure Tryptophan ist die Ausgangssubstanz der Melatonin-Synthese (**Abb. 1.1**).

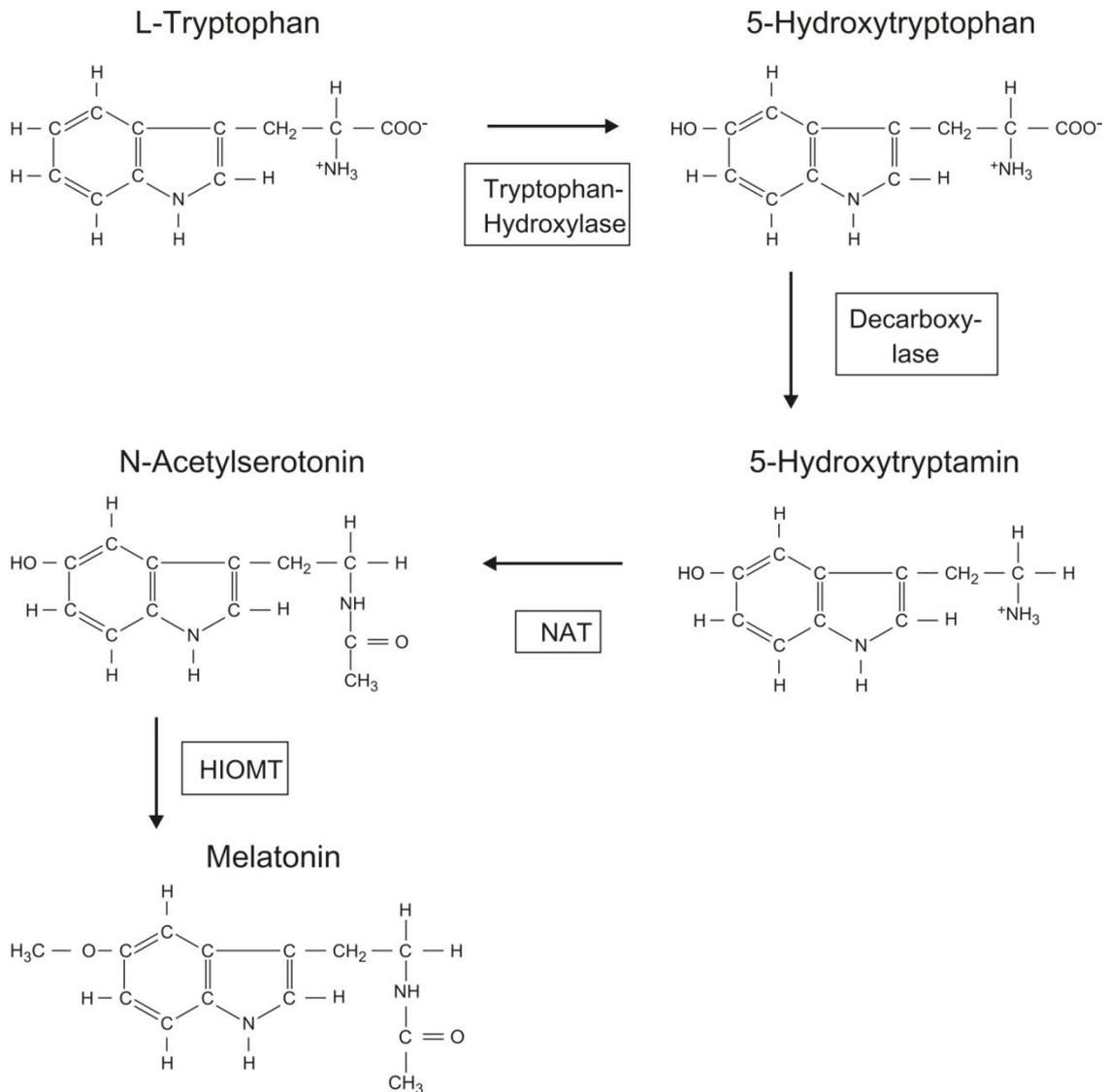


Abb. 1.1: Schematische Darstellung der Melatoninbiosynthese. Die für die Metabolisierungsschritte verantwortlichen Enzyme sind eingerahmt. NAT=N-Acetyl-Transferase, HIOMT=Hydroxyindol-O-Methyltransferase (nach Axelrod und Weissbach, 1960; Weissbach et al., 1960; modifiziert nach Cardinali, 1981).

Durch die Tryptophan-Hydrolase entsteht 5-Hydroxytryptophan. Im zweiten Schritt wird 5-Hydroxytryptamin (Serotonin; 5-HT) durch Decarboxylierung synthetisiert. Für die nächsten beiden Schritte der Melatonin-Synthese sind zwei Enzyme verantwortlich. Die N-Acetyltransferase (NAT) katalysiert die Reaktion von Serotonin zu N-Acetylserotonin. N-Acetyltransferase (NAT) wird als Schlüsselenzym der Melatonin-Synthese vom Nucleus suprachiasmaticus (SCN) gesteuert (Stehle et al., 1993; Coon et al., 1995; Stehle, 1995; Klein et al., 1996). Schließlich entsteht durch Methylierung durch Hydroxyindol-O-Methyltransferase (HIOMT) das Melatonin (Axelrod und Weissbach, 1960; Coon, et al., 1995).

Melatonin wird als das Hormon der Dunkelheit bezeichnet, da Synthese und Freisetzung in der Dunkelheit ihr Maximum erreichen. Permanente Lichtexposition kann die Synthese und Sekretion folglich völlig unterdrücken (Wurtman et al., 1963; Axelrod, 1974; Lewy et al., 1980; Laakso et al., 1994; Zawilska et al., 1995). Die Epiphyse, als Hauptproduktionsort des Melatonins, ist Bestandteil des photoneuroendokrinen Systems (**Abb. 1.2**).

Photoneuroendokrines System der Ratte

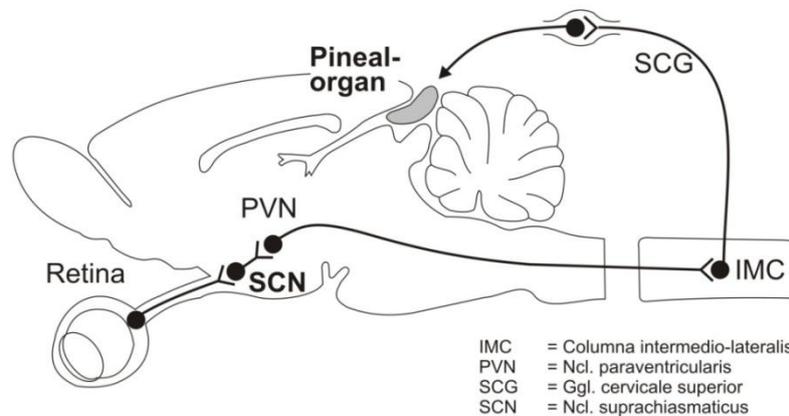


Abb. 1.2: Schematische Darstellung des photoneuroendokrines Systems der Ratte. Erklärungen und Abkürzungen sind im Text erläutert.

Durch dieses System wird Licht in neuronale Aktivität umgewandelt, die somit die Aktivität der Pinealozyten regelt. Dadurch unterliegt die Melatonin-Synthese dem circadianen Rhythmus. In den Photorezeptoren der Ganglienzellen der Retina wird das Licht, in Gestalt von Aktionspotentialen, in neuronale Aktivität umgewandelt. Die Aktionspotentiale werden über den retino-hypothalamischen Trakt zum Nucleus suprachiasmaticus (SCN) geleitet. Vom SCN gelangt die Erregung über zwei unterschiedliche Wege zur Epiphyse. Der Hauptweg führt vom SCN und Nucleus paraventricularis (PVN) über sympathische Fasern zur Formatio reticularis und Ganglion cervicale superius (IMC) bis zur Zirbeldrüse. Der Transmitter ist hierbei Noradrenalin (Kappers, 1960; Moore, 1978; Klein, 1985; Korf und Wagner, 1980). Eine

weitere Faserverbindung besteht zwischen SCN und den nucleus paraventricularis zu den Pinealocyten des Pinealorgans (Moller et al., 1991).

In der Nacht liegt die Konzentration von Melatonin im picomolaren und unteren nanomolaren Bereich (Lynch et al., 1975; Waldhauser et al., 1985). Als lipophile Substanz gelangt Melatonin per Diffusion durch die Zellmembranen der Pinealocyten in das Blut und in den Liquor (Romijn et al., 1977; Reppert et al., 1979). Im Blut und Liquor besitzt Melatonin eine Halbwertszeit von 0,5 bis 10 Minuten (Illerova et al., 1978; Iguichi et al., 1982; Yellon et al., 1996). Melatonin wird zu 92-95 % während der ersten Leberpassage eliminiert und metabolisiert. Somit besitzt es einen hohen „first pass“-Effekt (Pardridge und Mietus, 1980). In der Leber wird Melatonin zum größten Teil zu 6-Hydroxymelatonin hydrolysiert. Nach der Konjugation zu 6-Sulfatoxymelatonin ist es hydrophil und im Urin ausscheidbar (Kopin et al., 1961; Lynch et al., 1975; Pardridge und Mietus, 1980). Ein vorwiegend in der Retina lokalisierter Metabolisierungsweg besteht darin Melatonin zu 5-Methoxytryptamin zu deacetylieren, um das Produkt zu 5-Methoxyindolacethylsäure und 5-Methoxytryptophol zu desaminieren (Rogawski et al., 1979; Cahill und Besharse, 1989; Grace et al., 1991;).

1.2 Wirkungen von Melatonin

Neben den oben beschriebenen Effekten der Melanin-Konzentration in der Haut von Kaulquappen, existieren weitere Funktionen des Melatonins. Die wichtigsten bisher erforschten Funktionen des Melatonins sind zum einen die Anpassung des körper-

eigenen circadianen Rhythmus an Tages- und Jahreszeit abhängige Umstände und zum anderen die Beeinflussung von Reproduktionszyklen. Oberhalb des Chiasma opticums im SCN liegt bei Säugern die „innere biologische Uhr“. Sie wird auch durch Melatonin beeinflusst, was einen direkten Einfluss von Melatonin auf den circadianen Rhythmus unterstreicht (Lewy et al., 1992; Dawson et al., 1993). Für den Einfluss auf den SCN sind endogene wie exogene, zeitgebende Faktoren zuständig. Licht und Dunkelheit sind exogene Faktoren, die als Zeitgeber wirken. Licht inhibiert indirekt die Epiphyse, indem es über das retino-hypothalamische System den SCN erregt. Dieser bewirkt in der Folge über die beschriebenen Faserverbindungen eine Hemmung in der Melatonin-Ausschüttung. Dunkelheit führt zu den entgegengesetzten Effekten. Melatonin wiederum bewirkt im SCN eine Hemmung der Aktivität. So kann man Melatonin als endogenen, humoralen Zeitgeber verstehen, der bei Dunkelheit die neuronale Aktivität der SCN-Nervenzellen beeinflusst. (Cassone, 1990; Moore, 1997).

Der Einfluss von Melatonin auf Reproduktionszyklen basiert in der Hemmung der Sekretion von Geschlechtshormonen (Reiter, 1980). Eine zusätzliche Gabe von Melatonin bewirkt eine Veränderung der Hypothalamus-Hypophysen-Achse. Ein Melatonin-Progesteron-Präparat kann beispielsweise zu anovulatorischen Zyklen führen (Voordouw et al., 1992).

Die Lichtadaptation der Retina ist eine weitere Wirkung des Melatonins. Melatonin bewirkt eine erhöhte Netzhautempfindlichkeit (Reppert und Weaver, 1995). Eine Erhöhung der Melatonin-Konzentration hat eine erhöhte Körpertemperatur zur Folge (Cagnacci et al., 1992). Bei Ratten kann durch Melatonin-Gabe ein Blutdruckanstieg,

der durch eine Pinealektomie hervorgerufen wurde, gesenkt werden (Zanaboni et al., 1967; Krause et al., 2000).

Das Wachstum mancher hormonabhängiger Tumore konnte ebenfalls in einigen Tierversuchen verringert werden (Tamarkin et al., 1981). Daneben besitzt Melatonin noch mehrere andere Funktionen, z.B. Einflüsse auf die Funktion der Hypophysen-Gonaden-Achse, das Immunsystem, das Körpergewicht, den Appetit, die Schwangerschaft sowie auf Schlafgewohnheiten (Welsh, 1985; Reppert et al., 1988; Caroleo et al., 1992; Arendt, 1995; Maestroni, 2000). Die genauen Mechanismen dieser Melatonin-Effekte und Wirkungen, sowie deren Bedeutung sind zum heutigen Zeitpunkt allerdings noch weitgehend unbekannt und Gegenstand der Forschung.

1.3 Aufbau und Funktionsweise von Melatonin-Rezeptoren

Es sind mehrere Plasmamembran gebundene Melatonin-Rezeptoren bekannt, die die Wirkungen des Hormons vermitteln. Für die Melatonin-Rezeptoren sind verschiedene Nomenklaturen bekannt. Die Nomenklatur des „Committee for the International Union of Pharmacology“ ist die zurzeit gebräuchlichste. Sie unterscheidet den MT_1 -Rezeptor (auch ML_1 bzw. Mel_{1a}), den MT_2 -Rezeptor (auch ML_1 bzw. Mel_{1b}) und den MT_3 -Rezeptor (auch ML_2). Bei einigen Vertebraten, z.B. Amphibien ist ein Mel_{1c} -Rezeptor nachgewiesen worden, der bei Säugern allerdings nicht exprimiert wird. Die Bezeichnungen Mel_{1a} -, Mel_{1b} -, Mel_{1c} - und H9-Rezeptor gehen auf Reppert und Mitarbeiter (Reppert et al., 1995,1996) sowie Slaugenaupt und Mitarbeiter

(Slaugenhaupt et al., 1995) zurück. So findet man beim Menschen den Mel_{1a}-Rezeptor vor allem im SCN und der Pars Tuberalis. In der Retina und im Hippocampus ist dagegen der Mel_{1b}-Rezeptor quantitativ stärker vorliegend als der Mel_{1a}. Der H9-Rezeptor konnte in der Hypophyse und dem Hypothalamus nachgewiesen werden (Reppert et al., 1994,1995,1996). Die Arbeitsgruppe um Dubocovich teilte die Melatonin-Rezeptoren in Abhängigkeit von der Melatonin-Affinität in ML₁ und ML₂ ein (Dubocovich, 1988). Inzwischen konnten die MT₁- und MT₂-Rezeptoren kloniert und genauer charakterisiert werden (Reppert et al., 1994, 1996). Beide Rezeptoren sind an ein Pertussis-Toxin-sensitives inhibitorisches Guaninnukleotid-bindendes Protein gekoppelt (Ebisawa et al., 1994). Eine Rezeptorbindung hat eine intrazelluläre Inhibition der Adenylatcyclase zur Folge, was die Produktion von zyklischen Adenosinmonophosphat (cAMP) verringert (Morgan, 1991). Wirkungen auf cGMP und Phospholipase C sind ebenfalls beschrieben (Vanecek, 1998). Zusätzlich zu den Plasmamembran gebundenen Melatonin-Rezeptoren sind zwei weitere intrazelluläre Melatonin-Bindungsstellen bekannt (Cohen et al., 1978; Costa et al., 1995). In der Umgebung des Zellkerns wurde eine intrazelluläre Bindungsstelle für Melatonin lokalisiert: der retinoide Z-Rezeptor (RZR) oder auch der Retinolsäure-verwandte orphane Rezeptor (ROR) genannt (Carlberg und Wiesenberg, 1995; Wiesenberg et al., 1995). Über diesen Rezeptor wird eine Regulierung der Transkription spezieller Gene durch Melatonin, z.B. Glukokortikoidrezeptoren, Vitamin D-Rezeptoren, Thyreoidhormon-Rezeptoren, Östrogenrezeptoren und Retinoidrezeptoren vermutet (Enmark und Gustafsson, 1996). Die Entdeckung von nukleären Melatonin-Rezeptoren in B-

Lymphozyten der Epiphyse und Hypophyse lassen weitere Aspekte bezüglich der Regulation des circadianen Rhythmus offenbar werden, sowie neue Funktionen von Melatonin in der Immunologie vermuten (Becker-Andre et al., 1994; Carlberg und Wiesenberg, 1995; Steinhilber et al., 1995; Baler et al., 1996; Hazlerigg et al., 1996).

Die zweite intrazelluläre Melatonin-Bindungsstelle ist im Zytosol an das Protein Calmodulin gebunden. Über diesen Rezeptor kann Melatonin das Zytoskelett der Zelle verändern, indem es nach Bindung die Eigenschaften von Calcium (Ca^{2+}) imitiert (Benitez-King et al., 1993; Benitez-King et al., 1996). Calmodulin ist Ca^{2+} abhängig und aktiviert Enzyme, z.B. die Phosphodiesterase. Melatonin hemmt diese durch Calmodulin-induzierte, intrazelluläre Prozesse.

1.4 Melatonin-Rezeptoren im Gehirn

Bei Untersuchungen von Säugern ließen sich in den verschiedensten Gehirnstrukturen Bindungsstellen für [^{125}I]Jod-Melatonin nachweisen. So fand man beim Menschen ein besonders starkes Signal im Hypothalamus, speziell im SCN (Reppert et al., 1988; Weaver et al., 1989). Weitere Melatonin-Rezeptoren ließen sich direkt im Kleinhirn (Viswanathan et al., 1990), der Pons (Viswanathan et al., 1990), im Temporallappen des Cortex (Fauteck et al., 1995) und im Hirnstamm (Vanecek, 1998) nachweisen. In der Pars tuberalis der Epiphyse (Stankov und Reiter, 1990; Stankov et al., 1991; Morgan et al., 1994) sowie in der Retina (Dubocovich et al., 1983) wurden ebenfalls Melatonin-Bindungsstellen gefunden. Des Weiteren entdeckte man Melatonin-

Rezeptoren im Rückenmark von Kaninchen und Hühnern (Wan und Pang, 1993; Wan und Pang, 1996; Pang et al., 1997). In fast allen Gebieten des cerebralen Cortex und im Hippocampus konnten Transkripte für Melatonin-Rezeptoren durch Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) gefunden werden (Mußhoff et al., 2001).

1.5 Melatonin-Rezeptoren im Hippocampus

In den vergangenen Jahren wurden eine Reihe von Melatonin-Rezeptoren und Transkripte von Melatonin-Rezeptoren im Hippocampus vieler Säuger entdeckt (Laudon et al., 1988; Nonno et al., 1995; Mazzuchelli et al., 1996; Wan et al., 1999). Wie in Experimenten am menschlichen Hippocampus gezeigt, lassen sich dort MT1- und MT2-Rezeptor mRNA finden (Mazzuchelli et al., 1996, Reppert et al., 1994). Bei Ratten konnte man die mRNA des MT1 und MT2-Rezeptor im Gyrus dentatus, CA3-Region, CA1-Region sowie im Subikulum mittels RT-PCR ebenfalls nachweisen (Mußhoff et al., 2002). Die Existenz der Melatonin-Rezeptoren lässt auf eine Aufgabe des Hormons in diesen Hirnarealen schließen. Einige wenige Funktionen des Melatonins im Hippocampus hat man ermittelt. Es vermindert z.B. die Aktivität der CA3 Neurone von Schweinen (Zeise und Semm, 1985) und verkleinert die Amplitude der GABA – vermittelten Antworten in mehr als 50% der getesteten Ratten-CA1-Neuronen (Wan et al., 1999).

Melatonin besitzt in der Regel einen inhibitorischen Effekt auf das gesamte ZNS. So führt z.B. Melatonin im SCN zu einer geringeren Aktivität der Neurone (Mason et al., 1988; Shibata et al., 1989; Stehle, et al., 1989). Dieser Effekt basiert auf einer Hyperpolarisation der Neurone, vermittelt durch eine erhöhte Kaliumleitfähigkeit (Jiang et al., 1995; Nelson et al., 1996) und der Verstärkung von GABA_A-Rezeptor-induzierten Membranströmen (Wan et al., 1999). Im Gegensatz dazu fand man eine Erhöhung der Aktivität von CA1-Neuronen der Ratten durch Melatonin (Mußhoff et al., 2002). Der Mechanismus des Anstieges der neuronalen Aktivität des Hippocampus ist allerdings nicht bekannt. Es wird vermutet, dass intrazelluläre Mechanismen zu einer Inhibition von GABA_A-Rezeptoren an CA1-Neuronen führen, die einen Anstieg der Feuerrate durch Disinhibition bewirken.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass zum heutigen Zeitpunkt verschiedene Melatonin-Rezeptoren im Hippocampus bekannt sind. Die Mechanismen ihrer Effekte sowie ihre speziellen Aufgaben sind aktuell jedoch noch weitgehend unbekannt.

1.6 Aufbau und Funktionsweise von Glutamat- und GABA-Rezeptoren

Glutamat- und GABA-Rezeptoren spielen eine wesentliche Rolle in der synaptischen Übertragung zwischen den Nervenzellen. Die Neurotransmitter Glutamat und GABA (γ -Aminobuttersäure) werden, nach Freisetzung aus dem präsynaptischen Teil in den synaptischen Spalt, an ligandengesteuerte bzw. transmittergesteuerte Rezeptorkanäle gebunden. Diese ligandengesteuerten Rezeptorkanäle sind auf der postsynaptischen

Membran lokalisiert. Man unterteilt sie aufgrund ihrer funktionellen Eigenschaften in glutamaterge exzitatorische Rezeptorkanäle und GABA-erge inhibitorische Rezeptorkanäle. Glutamaterge Rezeptorkanäle führen nach Ligandenbindung zu einer Depolarisierung der Zelle durch Einstrom von Na⁺-Ionen in die Zelle (exzitatorisches postsynaptisches Potential, EPSP). Man unterscheidet verschiedene Glutamat-Rezeptorkanäle in der postsynaptischen Membran:

1. AMPA-Rezeptor (α -Amino-3-Hydroxy-5-Methyl-4-Isoxazolpropionat)
2. NMDA-Rezeptor (N-Methyl-D-Aspartat)
3. Kainat-Rezeptor
4. mGlu-Rezeptor

Die Glutamatrezeptoren können pharmakologisch und molekularbiologisch unterschieden werden. Die NMDA-, AMPA- und Kainat-Rezeptoren können als ionotrope Rezeptoren bezeichnet werden, wohingegen der mGlu-Rezeptor als metabotrop bezeichnet wird. Die ionotropen Rezeptoren besitzen transmembranöse Proteine, welche den Durchtritt bestimmter Ionen ermöglichen. Sie werden auch Rezeptorkanal genannt, da der Ionenkanal und der Rezeptor miteinander gekoppelt sind. Das Ergebnis solcher einströmenden Ionen ist eine postsynaptische Membrandepolarisation.

Der metabotrope Rezeptor führt nach Ligandenbindung und Freisetzung der second messenger Inositoltriphosphat (IP₃) und Diacylglycerol (DAG) zu einer verzögerten, langanhaltenden Zellreaktion. Die Verteilung und Funktion der einzelnen Glutamat-Rezeptoren war bisher Gegenstand vieler Untersuchungen und Forschungen

(Meldrum, 1984; Nicoll et al., 1990; Henneberry, 1992; Hollmann und Heinemann, 1994; Seeburg, 1996; Michaelis, 1998; Dingledine et al., 1999).

Die schnelle exzitatorische Signalkomponente des EPSP wird durch die AMPA-Rezeptoren vermittelt, während die späte Komponente des EPSP vornehmlich durch NMDA-Rezeptoren vermittelt wird. Voraussetzung dafür ist, dass die Zelle ausreichend depolarisiert ist. Die genaue Rolle der Kainat-Rezeptoren bei der synaptischen Erregung ist dagegen noch nicht ausreichend geklärt. Untersuchungen weisen darauf hin, dass diese Rezeptoren außerhalb des subsynaptischen Spaltes gelegen sind und erst durch hohe Glutamatkonzentrationen aktiviert werden können (Lerma et al., 1997).

Der Neurotransmitter der inhibitorischen Rezeptorkanäle ist GABA. GABA aktiviert die Ionenkanäle der postsynaptischen Membran, die selektiv für Chlorid- oder Kaliumionen permeabel sind. Daraus resultiert eine Hyperpolarisation der postsynaptischen Zellmembran, die als inhibitorisches postsynaptisches Potential (IPSP) bezeichnet wird. Es existieren drei Subtypen des GABA-Rezeptors. Der GABA_A-Rezeptor ist am häufigsten im ZNS ausgeprägt. Ihn und den GABA_B-Rezeptoren findet man im ZNS und im Rückenmark. Der GABA_C-Rezeptor dagegen ist vorwiegend in der Retina ausgebildet. Der ionotrope GABA_A-Rezeptor ist ein heterooligomeres Pentamer mit fünf Untereinheiten (Johnston, 1999; McKernan und Whiting, 1996), der für die schnelle Komponente des inhibitorischen postsynaptischen Potentials verantwortlich ist. Um einen metabotropen Rezeptor handelt es sich bei dem GABA_B-Rezeptor. Er ist ebenfalls ein heterooligomerer Rezeptor und besitzt drei Untereinheiten (Johnston, 1996 und 1999).

1.7 Fragestellung

Die vorliegende Arbeit soll die mögliche, prinzipielle Interaktion von Melatonin mit den exzitatorischen glutamatergen und inhibitorischen GABA-ergen Rezeptorkanälen untersuchen. Die elektrophysiologischen Untersuchungen wurden am heterologen Expressionssystem der *Xenopus laevis* Oozyten sowie an neuronalen Rezeptorkanälen aus dem Rattengehirn durchgeführt.

2.0 Material und Methoden

2.1 Das Expressionssystem der Xenopus-Oozyten

Als klassisches, entwicklungsbiologisches Modell gelten die Oozyten des süd-afrikanischen Krallenfrosches *Xenopus laevis*. Die Gesetzmäßigkeiten der Keimzellentwicklung bis zur Eizelle, die Befruchtung und die Embryogenese von Vertebraten wurden bei ihnen nachgewiesen und umfassend untersucht. Gurdon et al. (1971) trug mit seinen Experimenten, bei denen aus Retikulozyten von Kaninchen entnommene Globin-messenger RNA (messenger ribonucleic acid; mRNA) in die Oozyten von *Xenopus laevis* eingeschleust wurden und korrekt gebildete Translationsprodukte analysiert wurden, zur schnellen Etablierung der Oozyten des Krallenfrosches als *in vivo*-Expressionssystem unter Verwendung von mRNA aus artfremden Gewebe (heterologe mRNA) bei.

Die besonderen zellulären Eigenschaften der lebenden und isolierten Oozyte begründen eine Vielzahl von Vorteilen, die sie als Expressionssystem (*in vivo*-Ansatz) gegenüber dem Reagenzglas-Ansatz (*in vitro*-Translation) besitzt. Aufgrund ihres großen Volumens von ca. 0,5 μl (Gurdon und Wakefield, 1986; Wang et al., 1991), das ca. das 200.000-fache einer somatischen Zelle entspricht, bietet die Oozyte des Krallenfrosches ein besonders großes Reservoir an molekularen Komponenten, welche obligat für den Translationsprozess sind. Aus diesem Grund ist u.a. das Vermögen der Oozyten, heterologe mRNA zu translatieren, gegenüber einem *in vitro*-

Translationsansatzes (Kaninchen-Retikulozytenlysat) 1.000-fach erhöht und gegenüber der Herkunftszellen der mRNA nur um den Faktor 5 geringer (Gurdon et al., 1971). Dazu finden Oozyten häufige Anwendung für die Expression von mRNA aus Gewebe verschiedener Organismen, wie Pflanzen, Insekten und Vertebraten (Dascal, 1987; Madeja und Mußhoff, 1992; Sigel, 1990; Soreq, 1985), da sie nur eine geringe Artspezifität in der Translation von mRNA aufweisen. Als weitere Vorteile gegenüber anderen Expressionsmodellen sind die Widerstandsfähigkeit der Oozyten gegenüber mechanischen Manipulationen und ihre einfache Lagerung in wässriger Salzlösung (z.T. über Wochen) zu nennen. Die Gewinnung der Oozyten kann durch einen minimal invasiven operativen Eingriff erfolgen, da sie eine auf natürliche Weise synchronisierte Population von Zellen darstellen, die schnell heranwachsen und in der Prophase I der 1. meiotischen Reifeteilung arretiert sind.

Oozyten sind in der Lage, Proteine zu synthetisieren. Deren biologische Aktivität ist direkt testbar. Dies ist der große prinzipielle Vorteil des in-vivo-Expressionssystems „Oozyte“ im Vergleich zu anderen, nicht-zellulären Translationssystemen. Die synthetisierten „heterologen“ Proteine sind in der Lage die gleichen Funktionen auszuführen wie im Herkunftsgewebe der mRNA (Soreq, 1985; Sudol, 1989; Wright et al., 1990; Yu et al., 1989). Somit können Oozyten sowohl heterologe mRNA mit großer Effizienz translatieren, als auch ganze synthetisierte Aminosäuresequenzen über verschiedene posttranslationale Reaktionen prozessieren. Die vielen Vorteile der Oozyten führten schnell dazu, dass biochemische, immunologische, pharmakologische und mikrobiologische Fragestellungen häufig mit diesem Expressionsmodell bearbeitet wurden und werden (Heikkila, 1990; Wanget al., 1991).

Als neurobiologisches Expressionsmodell gewannen die Oozyten ihre Akzeptanz, nachdem die funktionelle Expression des nikotinischen Acetylcholinrezeptors aus dem elektrischen Organ von *Torpedo marmorata* gelang (Sumikawa et al., 1981; Barnard et al., 1982). Des Weiteren konnten in den Oozyten eine große Zahl von liganden- und spannungsgesteuerten Ionenkanälen exprimiert werden, an denen Reaktionen provoziert werden konnten, die in unbehandelten Oozyten nicht vorkamen (Dascal, 1987; Sigel, 1990; Snutch, 1988; Yellen, 1984). Für die Klonierungsstrategien zur Identifizierung und Vervielfältigung von Nukleinsäuresequenzen, welche Voraussetzung sind für die Bildung liganden- und spannungsgesteuerten Ionenkanäle, ist das Expressionsmodell „Oozyte“ von zentraler Bedeutung (Sigel, 1990). So nimmt das Expressionssystem „Oozyte“ für mRNA aus Nervengewebe eine wichtige verbindende Stellung zwischen Teildisziplinen der Neurobiologie ein und bietet hervorragende Möglichkeiten bei der Struktur- und Funktionsanalyse von liganden- und spannungsgesteuerten Ionenkanälen.

2.2 Oozyten von *Xenopus laevis*

Die Oozyten liegen nach der Herausnahme der Ovarteile in mehreren Entwicklungsstadien vor. Die gebräuchlichste Einteilung der Entwicklungsstufen der Oozyten des *Xenopus laevis*, ist die nach Dumont (1972). Es werden Stadien von I-VI unterschieden. Alle durchgeführten Experimente fanden an den Zellen der Stadien V und VI statt. Die Oozyten dieser Stadien zeichnet nicht nur die Größe von ca. 1 mm

aus, sondern besonders ihre polarisierte Pigmentierung. Man erkennt deutlich eine pigmentierte Hälfte (animaler Pol) und eine unpigmentierte Hälfte (vegetativer Pol; siehe Abb. 2.1). Oozyten des Stadiums VI besitzen als kennzeichnendes Merkmal ein weißes Äquatorialband zwischen beiden Polen, das einen Durchmesser von ca. 1,2 mm aufweist.

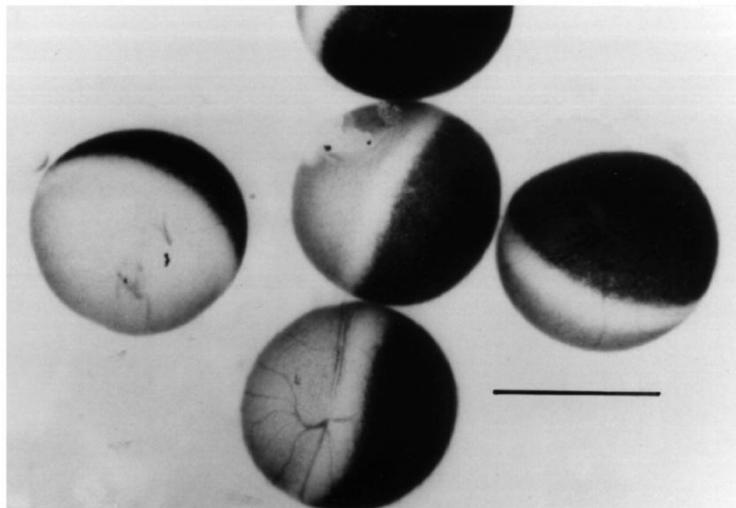


Abb. 2.1 Isolierte Oozyten des südafrikanischen Krallenfrosches *Xenopus leavis* in Reifestadium VI (Dumont, 1972). Der Balken entspricht einer Länge von 1 mm (nach Madeja et al., 1992)

Nach dem Herauspräparieren aus dem Gewebeverband, weisen die Oozyten einen in mehrere Hüllen unterteilten Schichtaufbau auf. Die azelluläre Vitellinschicht, bestehend aus Glycoproteinen, bedeckt die Oozytenmembran (Larabell und Chandler, 1988). Sie wird gefolgt von der Follikelzellschicht, die mit Hilfe von „gap junctions“ Verbindung zur Oozytenmembran hat (Dumont, 1972). Ihr liegt die bindegewebige Theka auf, die Blutgefäße, Nervenzellen und glatte Muskellzellen enthält sowie schließlich das innere

Ovarienepithel. Weil diese Hüllen der Stabilität und des Schutzes dienen, werden sie belassen (**Abb. 2.2**).

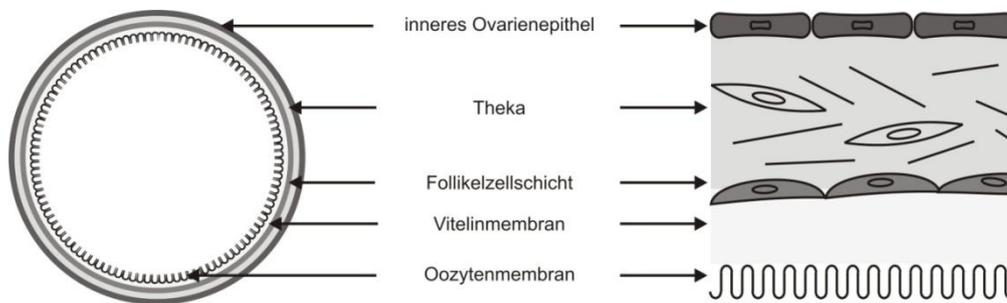


Abb. 2.2 Schematisierte Darstellung einer Oozyte im Reifestadium VI und deren Hüllschichten

Schließlich werden die Oozyten unmittelbar nach der Präparation in ein Kulturmedium überführt, indem sie bis zur mRNA-Injektion verbleiben.

2.3 Präparation und Kultivierung

Die Krallenfrösche wurden in ein Tauchbad mit 5 mmol/l 3-Aminobenzoessäureethyl-ester (MS 222) gegeben, um sie für die chirurgische Oozytenentnahme zu narkotisieren (**Abb. 2.3**). Durch eine ca. 1 cm lange Inzision der lateralen Bauchwand, erhielt man einen adäquaten Zugang zum Ovar. Es wurde ein Teil des Ovars reseziert. Anschließend vernähte man die Wunde mit selbstauflösenden Fäden. Nach einer 8-wöchigen Wartezeit können die Frösche abermals operiert werden. Diesen Vorgang kann man insgesamt ca. 4-mal wiederholen.

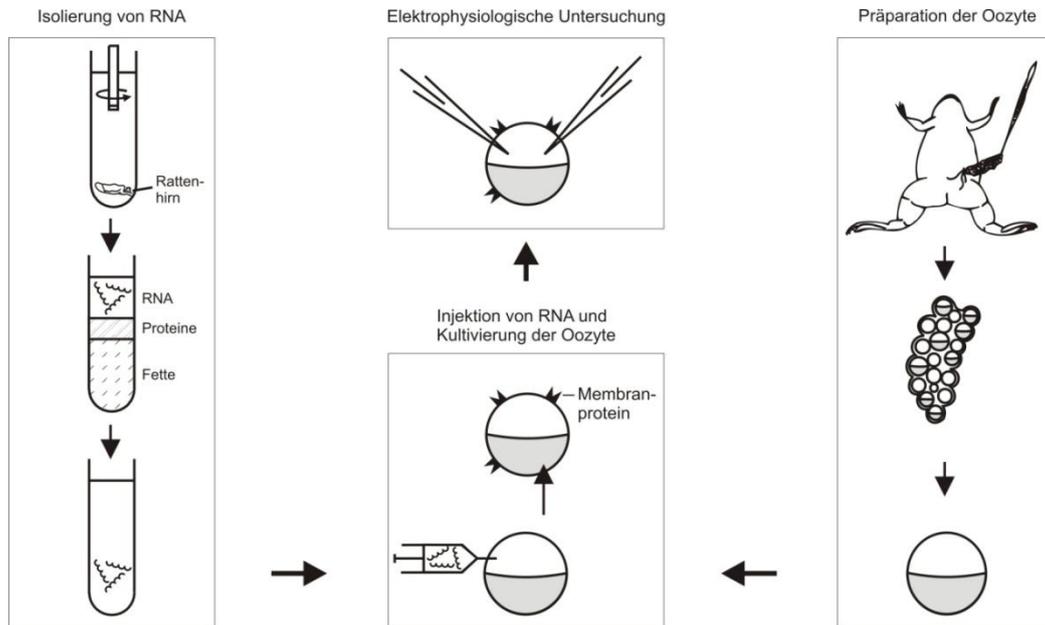


Abb. 2.3 Schematisierte Darstellung des Vorgehens zur Rezeptorkanalexpression in Oozyten des südafrikanischen Krallenfrosches *Xenopus laevis* (nach Madeja und Mußhoff, 1992) Links: Die Isolierung der RNA aus dem Rattenhirn. Rechts: Die Gewinnung der Oozyte. Mitte-unten: Injektion der RNA in die Zelle. Mitte-oben: Elektrophysiologische Untersuchung

Um die Haltbarkeit der Oozyten nach der mechanischen Isolierung zu erhöhen, wurde das Follikel epithel belassen, während die äußeren Epithelschichten und Bindegewebsanteile erhalten wurden. Nachdem die Zellen isoliert waren, wurde ihnen eine mRNA-Lösung injiziert (siehe Kapitel 2.5). Einige Zellen wurden bei 4°C gelagert, wodurch Versuche auch in der 2. Woche nach der Mikroinjektion ermöglicht wurden. Unter semi-sterilen Bedingungen wurde der andere Teil in Paare aufgeteilt und in eine mit Kulturmedium (Lösung 2 in **Tab. 2.1**) gefüllte Glaspetrischale überführt.

2.4 RNA-Extraktion, Reinheitskontrolle und Konzentrationsbestimmung

Das verwendete Nervengewebe wurde dem Hirn männlicher, adulter Albinoratten mit einem Gewicht von max. 360 g (siehe Abb. 2.3) entnommen. Den Ratten wurde zur Betäubung Luminal® (1 ml 20 %iges Natrium-5-ethyl-phenylbarbiturat pro Körpergewicht) intraperitoneal injiziert. Die Trepanation konnte nach Aussetzen des Schutzreflexes beginnen. Darauf folgte die Entnahme des Hirns in toto mit einem Gewicht von 1-1,25 g. Da eine Kontamination des Extraktes mit Ribonukleasen zu verhindern war, wurde unter semi-sterilen Bedingungen gearbeitet. Dazu gehörten die Verwendung von sterilen Gefäßen, Instrumenten, Chemikalien, Operationshandschuhen und die Sterilisation bzw. das Neuansetzen aller Lösungen. Die Gerätschaften aus Glas wurden 24 Stunden in Chromschwefelsäure gelagert, mit sterilem Aqua dest. gereinigt und schließlich genau wie Metallgeräte 8 Stunden hitzesterilisiert. Geräte und Instrumente aus Kunststoff wurden autoklaviert. Als Methode der RNA-Extraktion diente das Verfahren nach Cathala (Cathala et al., 1983). Sämtliche Arbeitsschritte wurden bei 4°C durchgeführt, bis auf die Präparation. Die folgenden Volumina beziehen sich stets auf 1 g Rattenhirn.

RNA-Extraktion, modifiziert nach Cathala

1. Homogenisierung des frisch präparierten Nervengewebes in 11 ml Homogenisierungspuffer (Lösung 3 in Tab. 2.1) im Ultrathurrax für 30 Sekunden.
2. Selektive RNA-Fällung mit einer Lithiumchlorid-Lösung (77 ml; Lösung 4 in Tab. 2.1).

3. Pelletierung des Präzipats mit 8000 g.
4. Resuspensierung des noch verunreinigten Pellets in 20 ml des Lösungspuffers SDS-TE (Lösung 5 in Tab. 2.1) durch 45-minütiges durchmischen.
5. Reinigung durch Phenol/Chloroform-Isoamylalkohol Extraktion:
 - a) Zugabe von 20 ml Phenol (Lösung 6 in Tab. 2.1)
 - b) Zugabe von 20 ml Chloroform-Isoamylalkohol (Lösung 7 in Tab. 2.1) dann jeweils 10 Minuten rühren
 - c) Phasentrennung mittels Zentrifugierung (10 Minuten; 10000 U/min)
 - d) Abpipettierung der wässrigen Oberphase, von insgesamt 3 Phasen
6. Nochmalige Reinigung der Oberphase durch Zuführung von 20 ml Chloroform-Isoamylalkohol (Lösung 7 in Tab. 2.1) sowie weiteres Rühren für 10 Minuten und Zentrifugieren mit 8000 g. Gewinnung der Oberphase, von insgesamt 2 Phasen, zur weiteren Verwendung.
7. Fällung durch Zugabe von 2 ml Natriumacetat (Lösung 8 in Tab. 2.1) und 44 ml Ethanol (Lösung 9 in Tab. 2.1), Lagerung für 12 Stunden bei -20°C und anschließende Zentrifugierung (30 Minuten; 10000 U/min; Temperatur wieder 4°C).
8. Lufttrocknung des gereinigten RNA-Pellets.
9. Lösung des Pellets in Aqua bidest. (ca. 1-2 µg/µl) unter der Reinheitskontrolle der RNA-Fraktion.
10. Portionierung in Eppendorfgefäße und Lagerung bei -70°C.

Lösungsname (Nr.)	Zusammen-setzung	Konzentration [mmol/l]	Zusätze
Narkoselösung MS 222 (1)	Aminobenzoe- säureethylester Methansulfatsalz	5,00	
Kulturlösung (2)	NaCL KCL CaCl ₂ MgSO ₄ HEPES*	88,0 1,0 1,4 0,80 5,00	Penicillin (100 IU/ml) Streptomycin (100 µ/ml)
Lysispuffer (3)	Guandininmono- thiocyanat EDTA* Tris*, pH 7,4 β-Mercaptoethanol (8% V/V)	5000 100 500	
Lithiumchloridlösung (4)		4000	
Lösungspuffer (5)	EDTA* Tris*, pH 7,4 SDS*, 0,1% (w/v)	10 100	
Phenol (6)	mit Tris* pH 7,4 gesättigt		
Chloroform-Isoamyl- Alkohollösung (7)	25:1 (v/v)		
Natriumacetatlösung (8)		3000	
Ethanol (9)	absolut		

Tab. 2.1 Lösungen zur Narkotisierung, Kultivierung und RNA-Gewinnung, *HEPES: 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure, *EDTA: Ethylendiamintetraacetat *Tris: Tris(hydroxymethyl)-aminomethan, *SDS: Natriumdodecylsulfat

Die Konzentration und der Reinheitsgrad wurden durch ein photometrisches Verfahren bestimmt (Maniatis et al., 1982).

Die Konzentration errechnet man mit Hilfe der optischen Dichte (O.D.) bei 260 nm Wellenlänge ($1 \text{ OD}_{260} = 40 \mu\text{g RNA/ml}$). Ist der Quotient aus OD_{260} und OD_{280} 1,8-2,0 spricht man von Reinheit (OD_{280} ist die optische Dichte bei einer Wellenlänge von 280 nm). Kleinere oder größere Quotienten ließen eine Verunreinigung durch Proteine oder Phenol vermuten.

Bei einigen RNA-Fractionen führte man zur Anreicherung von polyadenylierter RNA, als vorletzten Schritt, eine oligo(dT)-Affinitätschromatographie durch. Dieser angereicherten mRNA kommt bei der späteren RNA-Injektion die Aufgabe der Kanalexpression zu. Die polyadenylierte mRNA stellt nur 1-5 % der eukaryontischen Gesamt-RNA da (Maniatis et al., 1982).

Das Prinzip der Chromatographie basiert auf der vorübergehenden Basenpaarung zwischen den poly (A)⁺-Resten der mRNA und den fixierten oligo(dT)-Resten der Trägermatrix in der Säule. Ist die Salzkonzentration hoch, bindet sich die RNA-Fraktion während der Passage der Säule mit ihren poly (A)⁺ Resten reversibel. Die nicht gebundene RNA wird mit der Spülflüssigkeit gespült und verworfen. Um die reine mRNA zu gewinnen, muss mit Spülflüssigkeiten mit niedriger Salzkonzentration gespült werden, da diese die Basenpaarungen wieder auflösen. Bei diesen Versuchen wurde das Produkt „mRNA-Purifikation Kit“ der Firma Pharmacia Biotech im Standardverfahren benutzt.

2.5 Mikroinjektion von mRNA in Oozyten

Glaskapillaren (Innendurchmesser 0,5 mm) wurden durch ein Elektrodenziehgerät ausgezogen, so dass sie einen Spitzendurchmesser von 1 μm aufwiesen. Unter mikroskopischer Kontrolle wurden die Spitzen der gezogenen Glaskapillaren auf einen Durchmesser von 8-12 μm gebrochen. Um die mRNA zu injizieren, musste sie am Tage der Präparation aufgetaut und durch Zugabe von Aqua dest. auf eine Konzentration von 1-1,5 ng/nl gebracht werden. Diese mRNA-Lösung wurde in die hergestellten Glaskapillaren eingesogen, in die Oozyten geführt und intrazellulär 50 nl injiziert.

2.6 Elektrophysiologische Untersuchungstechnik

Die verwendete Zwei-Elektroden-Spannungsklemme („voltage clamp“, Hodgkin et al., 1949/1952) gestattete es, transmembranöse Ionenströme unabhängig vom Membranpotential zu registrieren. Somit konnten Beeinträchtigungen durch Aktivierung spannungsabhängiger Ionenkanäle vermieden werden. Das benutzte Messprinzip wird durch die **Abbildung 2.4** verdeutlicht.

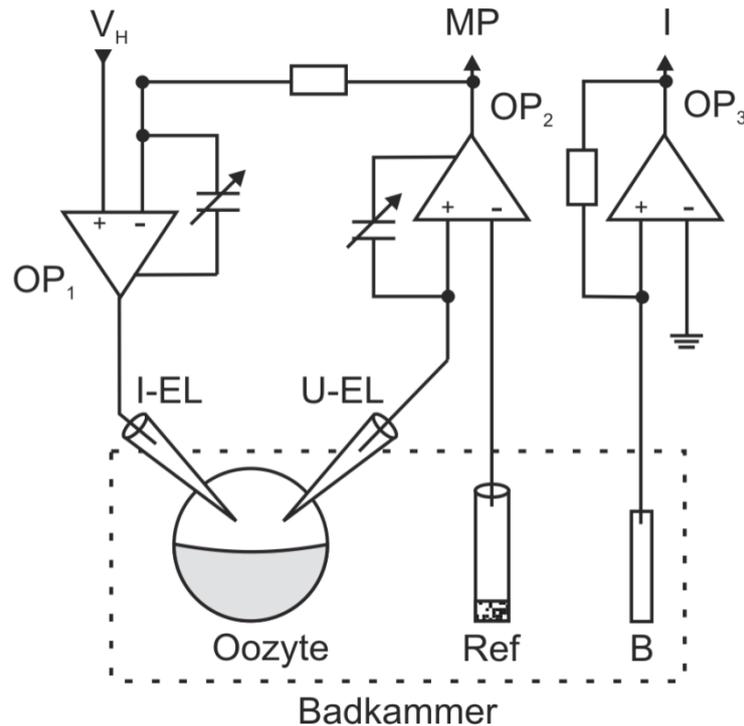


Abb. 2.4 Blockschaltbild des elektrophysiologischen Versuchsaufbaus zur Registrierung transmembranbräuser Ionenströme mit Hilfe der Zwei-Elektroden-Spannungsklemme.

I-EL = Stromelektrode; U-EL = Spannungselektrode; Ref. = extrazelluläre Referenzelektrode; B = virtuelle Baderde; OP₁ = Operationsverstärker zur Einstellung des Haltepotentials (V_H) über Injektion eines „Klemmstroms“ (I); OP₂ = Operationsverstärker zur Messung des Membranpotentials (MP); OP₃ = Operationsverstärker zur Strom-Spannungswandlung und zur Messung des „Klemmstromes“ (modifiziert nach Blooms, 1990).

Zwischen der intrazellulären Spannungselektrode (U-EL) und der extrazellulären Referenzelektrode (Ref) wurde das Membranpotential (MP) abgegriffen und durch den Operationsverstärker 1 (OP₁) verstärkt. Bei den Experimenten lag das Spontanmembranpotential zwischen -30 und -70 mV. Nach dem Anstechen der Zellen benötigen diese eine kurze Phase der Ruhe, um ein konstantes Potential zu konservieren. Mit Hilfe einer Rückkopplungsschaltung durch die zweite intrazelluläre

Elektrode, der Stromelektrode (I-EL), konnte eine ständige Angleichung des Membranpotentials an einen vorgegebenen Wert (V_h) stattfinden, indem der Operationsverstärker 2 (OP₂) Strom injizierte. Dieser Strom wurde über eine virtuelle Baderde (B) geleitet, in ein Spannungssignal umgewandelt und im Operationsverstärker 3 (OP₃) verstärkt. Hier konnte man ablesen, wie viel Strom jeweils nötig war, um das vorgegebene Membranpotential konstant zu halten. Die Versuche wurden zum größten Teil bei einem Membranpotential von -50 mV durchgeführt. Erhöhte man das Haltepotential während der Spannungsklemme um 10 mV, konnte man mit Hilfe der resultierenden Stromänderung den Membranwiderstand der Oozyten errechnen.

Die Mikroelektroden wurden jeweils aus Borosilikat-Filamentglaskapillaren (Innendurchmesser $0,86$ mm; Außendurchmesser $1,5$ mm) mit einem Elektrodenziehgerät zweistufig ausgezogen. Darauf wurden sie mit 2 mol/l KCL blasenfrei aufgefüllt. Ihr Widerstand betrug im Schnitt $1,5$ bis 2 M Ω . Ein im Institut speziell entwickeltes digitales Aufzeichnungsprogramm und ein herkömmlicher Tintenschreiber registrierten den Klemmstrom. Somit konnten die aufgezeichneten Daten des digitalen Programms elektronisch verwaltet und ausgewertet werden.

2.7 Substanzenapplikation

Mit einer sog. Konzentrationsklemme wurden die verwendeten Substanzen systemisch appliziert (Madeja et al., 1991). Im folgendem sei ihr Aufbau erklärt (siehe **Abb. 2.5**):

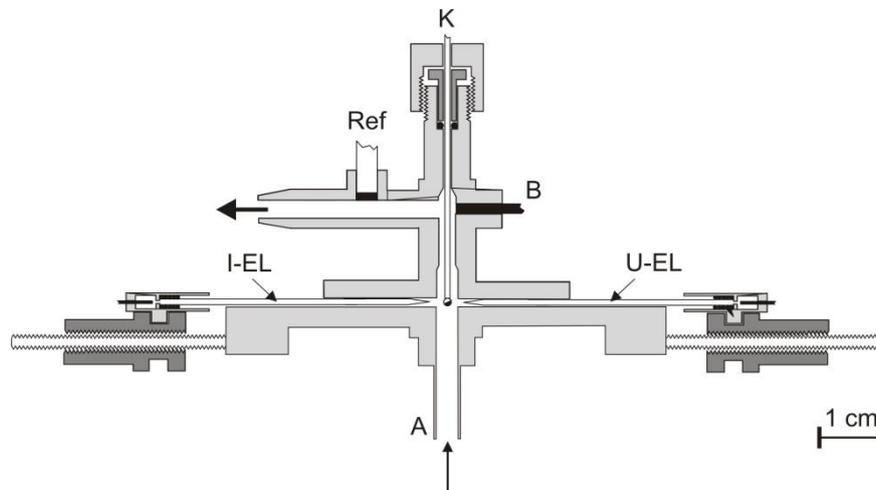


Abb. 2.5 Schematische Darstellung der Konzentrationsklemme zur Substanzapplikation. A = Ansaugstutzen; I-EL = Stromelektrode; U-EL = Spannungselektrode; Ref. = extrazelluläre Referenzelektrode; B = virtuelle Badere; K = Kapillare zur Fixierung der Oozyte; Pfeile geben die Flüssigkeitsströmung im System bei Substanzapplikation an (Madeja, 1991)

Die Oozyte wurde per Glaskapillare angesaugt und im Kreuzpunkt eines Röhrensystems aus Plexiglas durch Unterdruck positioniert. In der Horizontalen wurde die Oozyte unter dem Mikroskop von der Strom- (I-EL) und der Spannungselektrode (U-EL) angestochen. Das Röhrensystem wurde mit dem vertikalen Rohr in ein mit Flüssigkeit gefülltes Schälchen getaucht. Ein computergesteuertes Magnetventil erzeugte mit einer Unterdruckpumpe eine definierte Flüssigkeitssäule in der Kammer/ Kreuzpunkt des Röhrensystems. Das Computerprogramm (im Institut der Physiologie Münster entwickelt) steuerte auch einen elektromotorbetriebenen Probenwechsler, der mit weiteren Probenschälchen bestückt wurde. So war ein rascher Probenaustausch, nach definierten Bedingungen (Zeitpunkt, Dauer, Reihenfolge) gewährleistet.

2.8 Versuchsreihe

2.8.1 Substanzen: Konzentration, Lösungsmittel

Lösung	Zusammensetzung	Konzentration [$\mu\text{mol/l}$]
Oocytenringer	s. Tab. 2.1	
Kainat ($\text{C}_{10}\text{H}_{15}\text{NO}_4$)	$\text{C}_{10}\text{H}_{15}\text{NO}_4$ + Oocytenringer	100
GABA ($\text{C}_4\text{H}_9\text{NO}_2$)	$\text{C}_4\text{H}_9\text{NO}_2$ + Oocytenringer	100
Melatonin	$\text{C}_{13}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_2$	1/0,1/0,01

Tab. 2.2 Konzentration und Zusammensetzung der benutzten Lösungen und Substanzen

2.8.2 Protokollschema

Das folgende Versuchsprotokoll wurde benutzt, um die verschiedenen Lösungen und Substanzen zu applizieren. Es wurden auf dem „Karussell“ 12 Kunststoffschälchen positioniert (**siehe Abb. 2.6**). In den ersten zwei Schälchen war Ringerlösung (Lösung 3 in Tab. 2.2). Mit dieser wurde die Oozyte jeweils 30 Sekunden umspült. Im dritten Schälchen befand sich der Transmitteragonist Kainat oder GABA, welcher 60 Sekunden der Oozyte zugegeben wurde. Diese Applikation galt als Kontrollversuch. Die Schälchen 4,5 und 6 enthielten alle Ringerlösung (Lösung 3 in Tab. 2.2). Sie

dienen dem Auswaschen des Transmitters und wurden für insgesamt 620 Sekunden (10 Sekunden, 10 Sekunden, 600 Sekunden) dem System zugeführt. An 7. Stelle folgte eine 60 sekündige Exposition mit dem Hormon Melatonin. Es gab Versuchsreihen mit verschiedenen Konzentrationen (0,01 $\mu\text{mol/l}$, 0,1 $\mu\text{mol/l}$, 1 $\mu\text{mol/l}$). Das nächste Schälchen enthielt sowohl Melatonin, als auch den Transmitteragonisten des dritten Schälchens und wurden auch 60 Sekunden appliziert. Ins 8. Gefäß wurde nochmals Melatonin gegeben und wieder für 60 Sekunden dem System zugeführt. Drei weitere Schälchen, in denen Ringerlösung enthalten war, wurden für insgesamt 620 Sekunden appliziert (10 Sekunden, 10 Sekunden, 600 Sekunden). Waren die 600 Sekunden des letzten Schälchens vergangen, konnte ein neuer Versuch mit unterschiedlichen Substanzkonzentrationen gestartet werden.

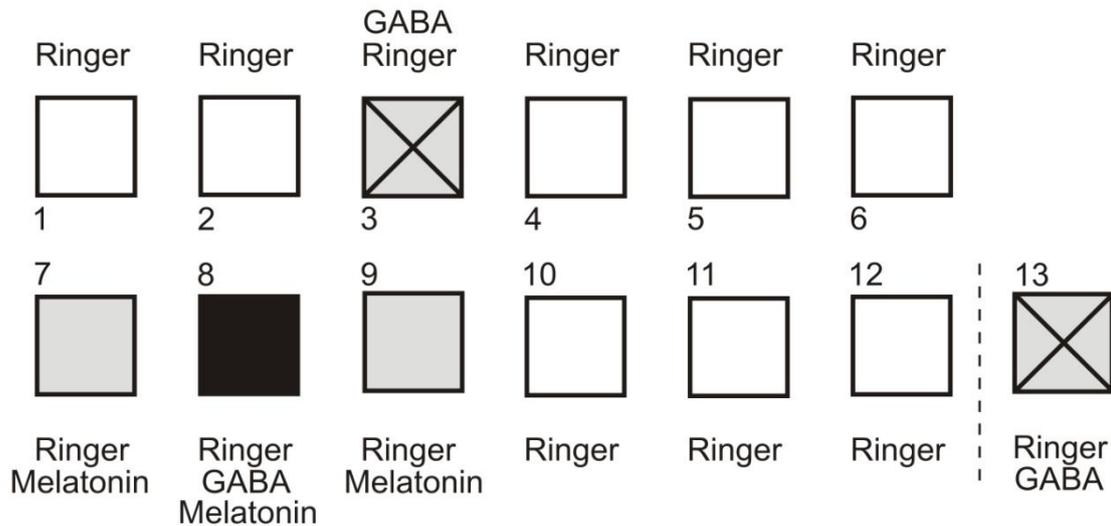


Abb. 2.6 Schematische Darstellung des Versuchsprotokolls, hier am Beispiel für GABA; Das Versuchsprotokoll für Kainat ist identisch. Wenn es die Qualität der Xenopus-Oozyten zuließ, wurde an 13. Stelle noch eine Transmitter-Kontrolle durchgeführt. Ringer = Stammlösung, Melatonin (0,01 $\mu\text{mol/l}$ oder 0,1 $\mu\text{mol/l}$ oder 1 $\mu\text{mol/l}$)

2.9 Statistische Auswertung und Bearbeitung

Die Versuche wurden anhand der aufgezeichneten Stromamplituden ausgewertet. Die Amplituden wurden jeweils 3 s vor dem Auswaschen der Flüssigkeiten gemessen. Hierzu zog man von der Grundlinie ein Lot bis zum Schnittpunkt mit der Kurve. Diese Distanz wurde auf die Eichung bezogen und zur Auswertung benutzt. Die jeweilige Kontrollantwort wurde mit 100 % gleich gesetzt. Auf diese wurde dann die Testantwort mit den entsprechenden Testsubstanzen bezogen und die prozentualen Unterschiede bestimmt. Alle Ergebnisse wurden so pro Substanz und Konzentration hinsichtlich ihrer signifikanten Unterschiede zu ihren Kontrollmessungen ausgewertet. Die statistische

Auswertung erfolgte durch den Paired-t-Test und de Mann-Whitney-Test. Die
Auswertung der Untersuchungen der AMPA-Rezeptorkanäle wurde mit dem Wilcoxon
Signed Rank Test bzw. Normality Testdurchgeführt.

3.0 Ergebnisse

Die Experimente der vorliegenden Studie wurden an 89 Oozyten vorgenommen. Dabei stammten die Oozyten von 10 Fröschen. Die elektrophysiologischen Untersuchungen wurden bei einem Membranwiderstand von 0,2 bis 3,3 M Ω durchgeführt. Es wurden RNA-Injektionslösungen aus vier verschiedenen RNA-Isolationen verwendet. Vom 3. bis zum 15. Tag post injectionem wurden elektrophysiologische Messungen durchgeführt.

3.1 Charakterisierung der AMPA-Rezeptorkanal-induzierten Ionenströme

Es dauerte drei Tage nach Injektion von mRNA in die Oozyten, bis funktionell messbare AMPA-Rezeptorkanäle elektrophysiologisch gemessen werden konnten. Durch Applikation des Liganden Kainat konnte durch Aktivierung von AMPA-Rezeptorkanälen transmembranöse Ionenströme ausgelöst werden. Kainat wurde dabei jeweils für eine Minute in Konzentrationen von 25 $\mu\text{mol/l}$, 50 $\mu\text{mol/l}$ und 100 $\mu\text{mol/l}$ appliziert.

Nach Aktivierung der AMPA-Rezeptorkanäle durch Kainat, konnte ein Ionen-einwärtsstrom beobachtet werden, der sich mit andauernder Applikation langsam verstärkte. Aus früheren Untersuchungen kann entnommen werden, dass AMPA-

Rezeptorkanäle in der Membran der Oozyte einen Einstrom von Natriumionen in die Zellen erlauben. (Watkins und Olverman 1987; siehe **Abb. 3.1**).

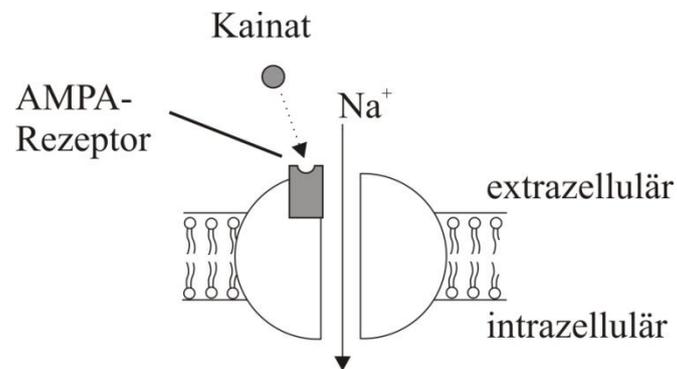


Abb. 3.1: Schematischer Aufbau des AMPA-Rezeptorkanals in der Zellmembran. nach Applikation von Kainat am mRNA- injizierten Oozyten. Es ist der Netto-Einwärtsstrom nach Rezeptorkanalaktivierung durch Kainat dargestellt.

Eine sofortige Verminderung bis auf die vorhergehende Grundlinie der Ionenströme konnte verzeichnet werden, sobald die Transmitterlösung ausgewaschen und durch eine Ringerlösung ersetzt wurde. In Abbildung 3.2 ist eine typische Originalregistrierung, der durch AMPA-Rezeptorkanäle vermittelten Ionenstrom vor, während und nach der Applikation von Kainat dargestellt.

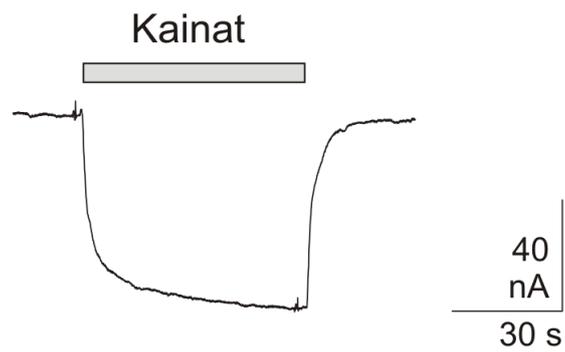


Abb. 3.2: Originalregistrierung von Ionenströmen nach Rezeptoraktivierung durch 50 $\mu\text{mol/l}$ Kainat. Ausschlag nach unten: Ioneneinwärtsstrom. Das Haltepotential betrug -70mV . Die Dauer der Applikation von Kainat wird durch den Balken dargestellt.

Werden Kainat und der spezifische AMPA-Rezeptorkanal-Antagonist CNQX zugleich appliziert, konnten dagegen keine transmembranösen Ionenströme festgestellt werden (siehe **Abb. 3.3**; vergl. Hollmann und Heinemann, 1994).

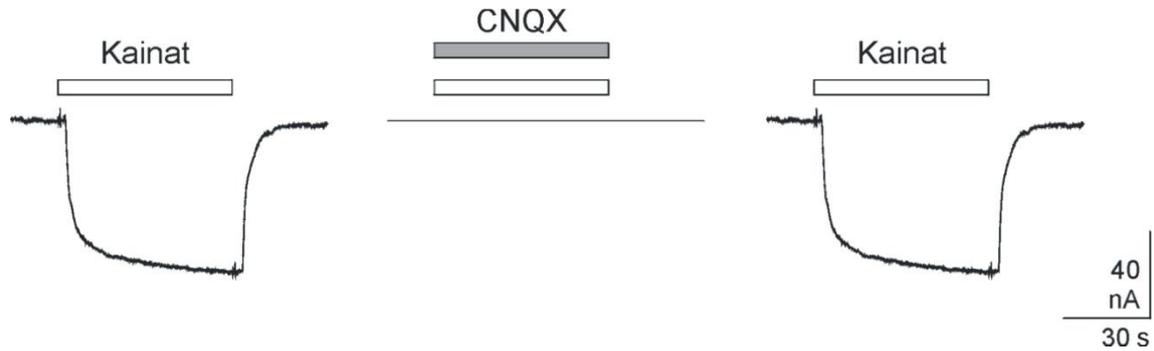


Abb. 3.3: Hemmung der Kainat-induzierten transmembranösen Ionenströme durch den AMPA-Rezeptorkanal-Antagonisten CNQX. Die Balken geben die Dauer der Substanzapplikation wieder, wobei der grau gemusterte Balken die Gabe des Antagonisten angibt. Originalmessung an einer einzelnen Oozyte mit 10 min Latenz zwischen den einzelnen Applikationen. Die Konzentrationen von Kainat und CNQX betragen jeweils 50 $\mu\text{mol/l}$. Ausschlag nach unten: Ioneneinwärtsstrom. Das Haltepotential betrug -70 mV.

Die Injektion von Gesamt-mRNA aus dem Rattenhirn kann grundsätzlich auch zur Expression von Kainat-Rezeptoren führen. Der durch Kainat-Applikation induzierte Ionenstrom kann prinzipiell auch durch Kainat-Rezeptorkanäle vermittelt werden, da der Ligand Kainat sowohl AMPA- als auch Kainat-Rezeptorkanäle aktivieren kann. Bei der beschriebenen, methodischen Vorgehensweise konnte in vorausgegangenen Versuchen allerdings gezeigt werden, dass nach Injektion von mRNA keine funktionsfähigen Kainat-Rezeptoren in der Oozyte exprimiert werden. (mündliche Mitteilung von Prof. Mußhoff). Dies lässt den Schluss zu, dass die aufgezeichneten Ionenströme allein durch die Aktivierung der AMPA-Rezeptorkanäle vermittelt werden.

3.2 Repetitive Aktivierung der AMPA-Rezeptorkanäle durch den synthetischen Agonisten Kainat

Die Kinetik der AMPA-induzierten Ionenströme wurde bei wiederholter Applikation geprüft, indem die AMPA-Rezeptorkanäle bis zu siebenmal im Abstand von jeweils 10 Minuten durch Kainat aktiviert wurden. Wie die **Abbildung 3.4** zeigt waren Amplitude und Kinetik der Ionenströme größtenteils reproduzierbar.

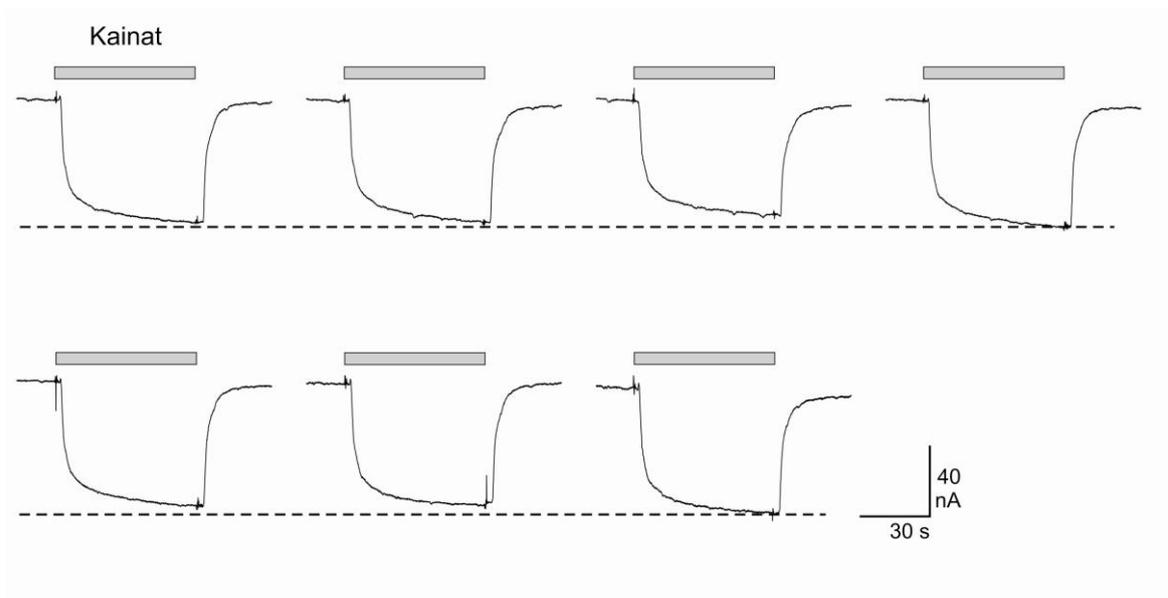


Abb. 3.4: Beispiel einer Kontrollreihe. Siebenmalige Applikation von 50 $\mu\text{mol/l}$ Kainat im Abstand von 10 min an einer mRNA injizierten *Xenopus*-Oozyte. Die Applikationsdauer betrug 1 min. Die Linie markiert die Größe der Amplitude der ersten Aktivierung durch Kainat. Diese Amplitude wurde gleich 100 % gesetzt. Ausschlag nach unten bei Einwärtsstrom. Das Haltepotential betrug -70 mV. Die Balken geben die Dauer der Aktivierung an. Im Regelfall konnten bis zu sieben Aktivierungen in Serie durchgeführt werden (**Tab. 3.1**).

Durch die Applikation von jeweils 50 $\mu\text{mol/l}$ Kainat wurde an bis zu 15 Zellen die serielle Aktivierung von AMPA-Rezeptorkanälen realisiert. Die erste durch Kainat aktivierte Amplitude einer derartigen Serie wurde als 100 % definiert. Die folgenden Amplituden der Kainat-induzierten Ionenströme wurden dann zur 1. Auslösung in Verhältnis gesetzt. Daraufhin wurde der Standardfehler berechnet, nachdem die relativen Amplituden der zweiten Aktivierungen aller Applikationsreihen gemittelt worden sind (siehe **Tab. 3.1**). Entsprechend wurden alle weiteren Applikationen in der Folge behandelt. Die Tabelle 3.1 zeigt deutlich, dass alle Mittelwerte in einem sehr schmalen Bereich um 100 % liegen. Dies lässt die Schlussfolgerung zu, dass die durch Kainat induzierten Ionenströme auch nach wiederholter Aktivierung stabil bleiben.

Nummer der Applikation	Anzahl der Zellen	Mittelwerte (%)	SEM (\pm)
1	15	100	0
2	15	99	3
3	15	99	3
4	10	100	4
5	9	97	5
6	9	104	4
7	7	98	4

Tab. 3.1: Statistische Auswertung der repetitiven Applikation von Kainat: Normierung auf die erste Applikation. Es wurden jeweils die relativen Amplituden aller 2. bis 7. Aktivierungen gemittelt und die zugehörigen Standardfehler berechnet. S.E.M. = Standard Error Of The Mean = Standardfehler.

3.3 Charakterisierung der GABA_A-Rezeptorkanal-induzierten Ionenströme

Analog zu den AMPA-Rezeptorkanälen konnte am dritten Tag nach Injektion von mRNA in die *Xenopus*-Oozyten, die funktionelle Expression des GABA_A-Rezeptorkanals erfolgen. Zu den Versuchen wurde für jeweils eine Minute GABA in einer Konzentration von 100 µmol/l appliziert, wodurch transmembranöse Ionenströme induziert werden konnten. Das Einwirken von GABA führte zu einem schnellen initialen Ionenstrom, der durch Chloridionen getragen ist. Im Verlauf der Applikation konnte ein Abnehmen der Ionenströme registriert werden (siehe **Abb. 3.6**). Mittels Ringerlösung wurde GABA ausgewaschen, was einen raschen Rückgang der Ionenströme bis zum Grundlinienniveau verursachte. Eine typische Originalregistrierung, der durch GABA-induzierten Ionenströme, ist in **Abb. 3.6** dargestellt.

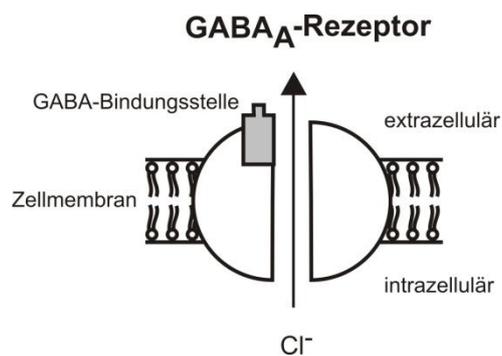


Abb. 3.5: Schematischer Aufbau des GABA_A-Rezeptorkanals in der Zellmembran, nach Applikation von GABA. Dargestellt ist der Ionenstrom von Cl⁻.

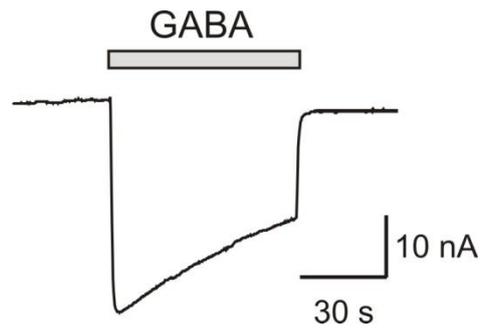


Abb. 3.6: Originalregistrierung eines Ionenstroms nach Rezeptoraktivierung durch 100 $\mu\text{mol/l}$ GABA. Ausschlag nach unten: Ioneneinwärtsstrom. Das Haltepotential betrug -70 mV. Die Dauer der Applikation wird durch den Balken dargestellt.

Applizierte man GABA zusammen mit Bicuculline-Methiodide, einen spezifischen GABA_A -Rezeptorkanal-Antagonist, konnten keine transmembranösen Ionenströme festgestellt werden (**Abb. 3.7**).



Abb. 3.7: Hemmung der GABA-induzierten transmembranösen Ionenströme durch den GABA_A-Rezeptorkanal-Antagonisten Bicucullin-Methiodid (BM). Die Balken geben die Dauer der Substanzapplikation an, wobei der schwarze Balken die Gabe des Antagonisten angibt. Die gestrichelte Linie markiert die Größe der Amplitude der vorherigen Aktivierung durch GABA. Diese Amplitude wurde gleich 100 % gesetzt. Originalmessung an einer einzelnen Oozyte mit 10 min Latenz zwischen den einzelnen Applikationen. Ausschlag nach unten: Ioneneinwärtsstrom. Das Haltepotential betrug -70 mV.

3.4 Repetitive Aktivierung der GABA_A-Rezeptorkanäle durch den Neurotransmitter

GABA

Vor der Untersuchung der Wirkung von Melatonin auf die GABA_A-Rezeptorkanäle, wurde in Kontrollversuchen überprüft, ob bei wiederholter Aktivierung der GABA_A-Rezeptorkanäle eine Veränderung der Stromkinetik oder der Stromamplitude auftritt. Dabei wurden die Rezeptorkanäle durch GABA bis zu neunmal hintereinander aktiviert. Eine Originalregistrierung dieses Versuchsablaufes ist in **Abbildung. 3.9** illustriert, wobei der zeitliche Abstand zwischen den einzelnen Applikationen jeweils 10 Minuten betrug.

Die dargelegte Originalregistrierung ist repräsentativ für die durch GABA-induzierten Ionenströme, respektive der Reproduzierbarkeit der Amplitude und der Kinetik. Diese Versuchsanordnung ist an 23 Oozyten wiederholt worden. Der Neurotransmitter GABA lag dabei jeweils in einer Konzentration von 100 $\mu\text{mol/l}$ vor. Im Verlauf der Versuchsreihen zeigte sich, dass bei repetitiver Applikation die hintere Amplitude (gemessen vor dem Auswaschen des Liganden) konstanter ausgebildet war als die vordere Amplitude (gemessen nach dem Einwaschen des Liganden), welche den initialen schnellen Einwärtsstrom dokumentierte (siehe **Abb. 3.8**).

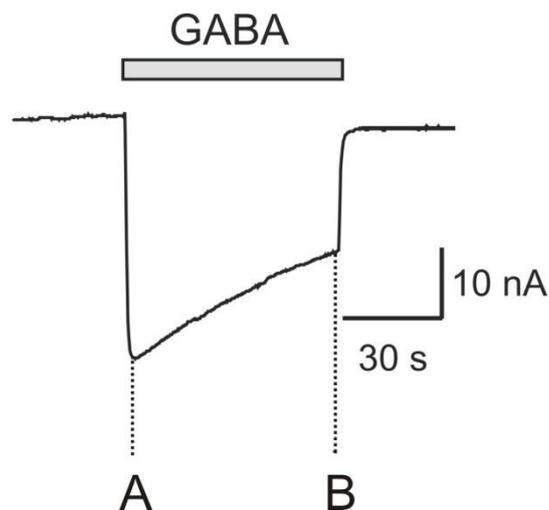


Abb. 3.8: Originalregistrierung eines Ionenstroms nach Rezeptoraktivierung durch GABA. A = vordere Amplitude, B = hintere Amplitude, welche zur Auswertung der Versuche genutzt wurde.

Aus diesem Grund wurde die GABA-induzierte Ionenstromamplitude kurz vor dem Auswaschen mit Ringerlösung für die weiteren Auswertungen herangezogen. Die Auswertung der Amplituden bei repetitiver Aktivierung der GABA_A -Rezeptoren zeigen,

dass erst mit der 2. Aktivierung und den darauf folgenden Aktivierungen durch GABA eine relative Konstanz der Amplituden auslösbar war. Die Normierung der Amplituden auf die erste Messung ergab dagegen größere Schwankungen. Aus diesem Grunde wurden die Amplituden der nachfolgenden, durch GABA-induzierten, Ionenströme auf die zweite Messung bezogen. Die erste Messung wurde nicht weiter berücksichtigt.

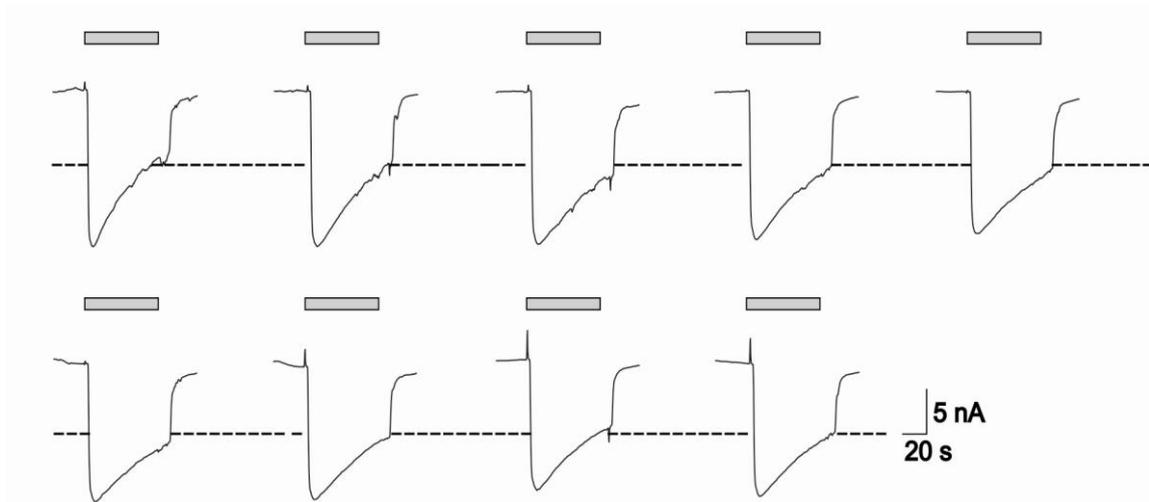


Abb. 3.9: Beispiel einer Kontrollserie. Neunmalige Applikation von GABA im Abstand von 10 min an einer mRNA injizierten Xenopus-Oozyte. Die erste Messung ist hier nicht gezeigt. Die Applikationsdauer betrug 60 s. Die gestrichelte Linie markiert die Größe der Amplitude der zweiten Aktivierung durch GABA. Diese Amplitude wurde gleich 100 % gesetzt. Ausschlag nach unten bei Einwärtsstrom. Das Haltepotential betrug -70 mV. Die Balken geben die Dauer der Aktivierung an.

Um den Standardfehler zu berechnen wurden die relativen Amplituden der zweiten Aktivierung aller Applikationsserien gemittelt. In der **Tabelle 3.2** ist die statistische Auswertung dieser repetitiven GABA-Applikationen erfasst. So geht aus der Tabelle

hervor, dass die Mittelwerte aus allen repetitiven Aktivierungen bezogen auf den zweiten durch GABA-induzierten Ionenstrom um den Wert 98% schwanken. Somit kann angenommen werden, dass auch nach wiederholter Aktivierung sich weder die, durch GABA-induzierten, Ionenströme gravierend verändern, noch ein signifikanter Unterschied zwischen ihnen besteht.

Nummer der Applikation	Anzahl der Zellen	Mittelwerte (%)	SEM (\pm)
1	8	Verworfen	
2	8	100	
3	8	103	3
4	8	98	5
5	8	94	7
6	6	95	7
7	3	94	4
8	2	92	2
9	3	97	2

Tab. 3.2: Statistische Auswertung der repetitiven Applikationen von GABA: Normierung auf die zweite Applikation. Es wurden jeweils die relativen Amplituden aller 2.-9. Aktivierungen gemittelt und die zugehörigen Standardfehler berechnet. SEM = Standard Error Of The Mean = Standardfehler.

3.5 Wirkung von Melatonin auf die bioelektrischen Membraneigenschaften der Xenopus-Oozyte

Es wurde zunächst überprüft, ob das Hormon Melatonin bei alleiniger Zuführung zur mRNA-injizierten Oozyte signifikante elektrophysiologische Effekte evozieren kann. Dazu wurde Melatonin den Konzentrationen 0,01 $\mu\text{mol/l}$, 0,1 $\mu\text{mol/l}$ und 1 $\mu\text{mol/l}$ jeweils für eine Dauer von 180 Sekunden an insgesamt 6 Oozyten appliziert. Es konnte bei

keiner der alleinigen Applikationen von Melatonin eine Änderung in den elektrophysiologischen Eigenschaften der Oozyten registriert werden (**Abb.3.10**).

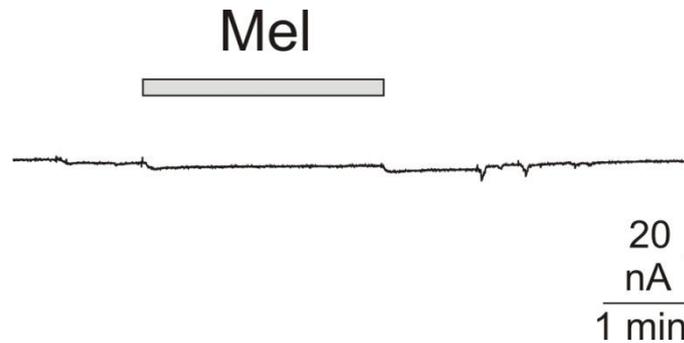


Abb. 3.10: Beispiel einer Originalregistrierung an einer mRNA-injizierten Oozyte nach Applikation des Hormons Melatonin in einer Konzentration von 0,1 $\mu\text{mol/l}$.

3.6 Wirkung von Melatonin auf AMPA-Rezeptorkanäle

Der Einfluss von Melatonin auf die AMPA-Rezeptorkanäle wurde anhand des in Kapitel 2.8.2 vorgestellten Versuchsprotokolls untersucht. Der Oozyte wurde vorab für die Dauer von 60 Sekunden Kainat zugeführt. Dies diente als Kontrolle. Im Abstand von 620 Sekunden erfolgte die Koapplikation von Melatonin für 60 Sekunden. Je nach Versuch wurde Melatonin in den Konzentrationen von 0,01 $\mu\text{mol/l}$, 0,1 $\mu\text{mol/l}$ sowie 1 $\mu\text{mol/l}$ appliziert. War das Membranpotential der Oozyte weiterhin stabil, so konnte im Anschluss eine weitere Kontrolle mit Kainat sowie die Applikation der nächst höheren Melatonin-Konzentration vorgenommen werden. Die **Abbildungen 3.11, 3.12 und 3.13**

zeigen exemplarische Originalregistrierungen mit den jeweiligen unterschiedlichen Melatonin-Konzentrationen. Die Aufzeichnungen resultierten von drei unterschiedlichen Oozyten. Es sind jeweils die Kainat-Kontrollen vor der Melatonin-Applikation sowie die Koapplikation von Melatonin in den unterschiedlichen Konzentrationen und Kainat dargestellt.

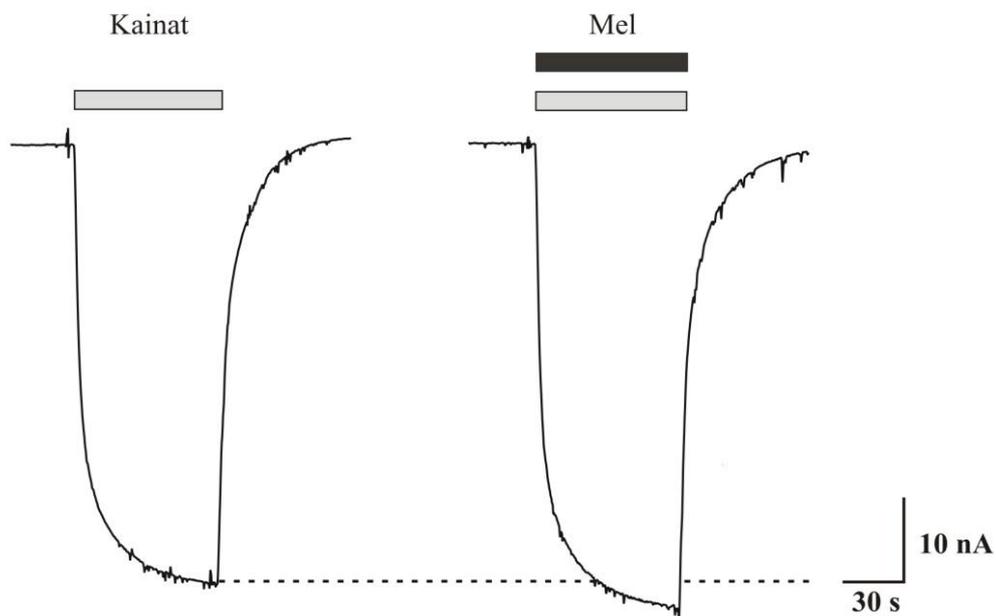


Abb. 3.11: Originalregistrierung einer Oozyte als Beispiel für die Versuchsreihe zur Analyse der Wirkung von Melatonin $0,01 \mu\text{mol/l}$ auf AMPA-Rezeptorkanäle. Die Dauer der Applikation wird durch die Balken wiedergegeben. Die gestrichelte Linie markiert die Größe der Amplitude der vorausgegangenen Aktivierung durch die alleinige Applikation des Neurotransmitters Kainat. Diese Amplitude wurde als 100 % definiert. Daran schloss sich die Koapplikation mit Melatonin an.

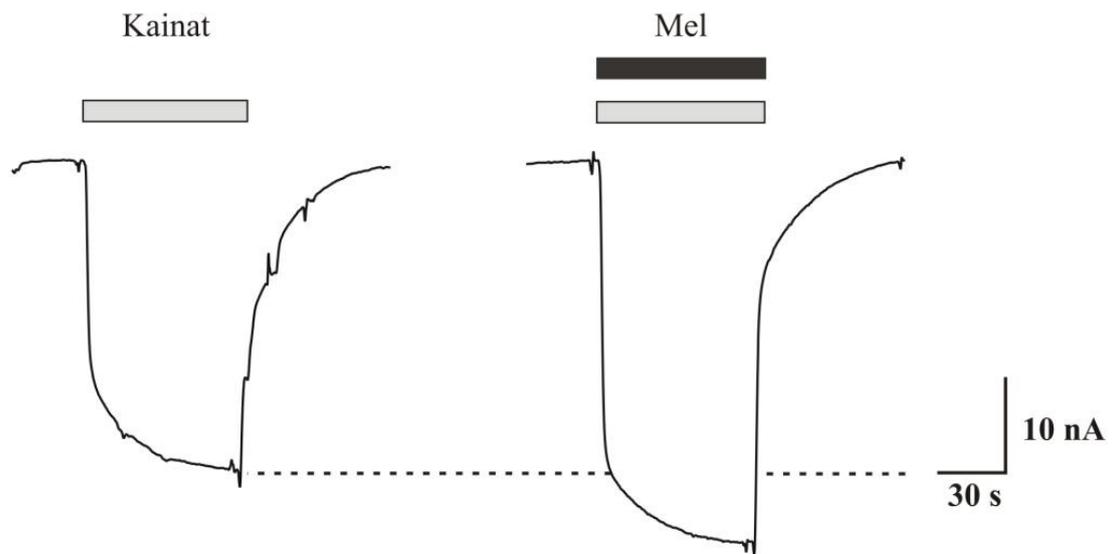


Abb. 3.12: Originalregistrierung einer Oozyte als Beispiel für die Versuchsreihe zur Analyse der Wirkung von Melatonin $0,1 \mu\text{mol/l}$ auf AMPA-Rezeptorkanäle. Die Dauer der Applikation wird durch die Balken wiedergegeben. Die gestrichelte Linie markiert die Größe der Amplitude der vorausgegangenen Aktivierung durch die alleinige Applikation des Neurotransmitters Kainat. Diese Amplitude wurde als 100 % definiert. Daran schloss sich die Koapplikation mit Melatonin an.

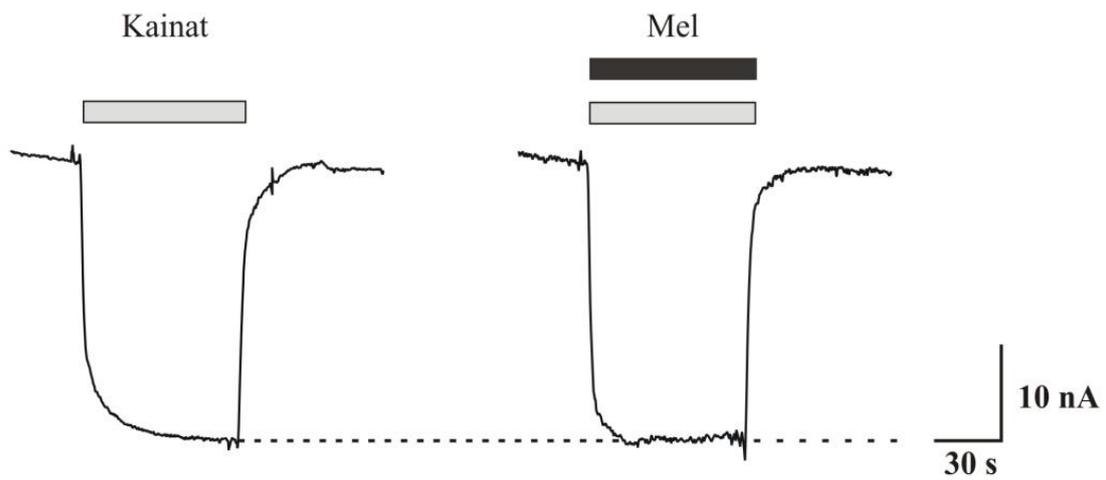


Abb. 3.13: Originalregistrierung einer Oozyte als Beispiel für die Versuchsreihe zur Analyse der Wirkung von Melatonin 1 $\mu\text{mol/l}$ auf AMPA-Rezeptorkanäle. Die Dauer der Applikation wird durch die Balken wiedergegeben. Die gestrichelte Linie markiert die Größe der Amplitude der vorausgegangenen Aktivierung durch die alleinige Applikation des Neurotransmitters Kainat. Diese Amplitude wurde als 100 % definiert. Daran schloss sich die Koapplikation mit Melatonin an.

Die Konzentration des Neurotransmitters Kainat zur Aktivierung der AMPA-Rezeptorkanäle betrug bei allen Versuchen 100 $\mu\text{mol/l}$. Für die Versuche der Koapplikation von Melatonin und Kainat wurden insgesamt 42 Oozyten verwendet. Das Membranpotential einiger Oozyten blieb im Verlauf der Versuche nicht stabil genug, so dass einige Versuche vorzeitig gestoppt werden mussten.

Die **Tabelle 3.3** veranschaulicht die relativen Effekte von Melatonin auf die AMPA-Rezeptorkanäle. Die Tabelle zeigt, dass von 33 Versuchen die Amplitude in 6 Fällen abnahm. Bei den übrigen 27 Fällen konnte eine vergrößerte Amplitude registriert werden. Deren Amplituden mehrheitlich zwischen 104-300 % lagen. Es ist festzuhalten, dass die Amplituden bei der Melatonin-Konzentration 1 $\mu\text{mol/l}$ deutlich größere Schwankungen besaßen, sowohl hinsichtlich einer Hemmung, als auch einer Steigerung. Zusammengefasst ergibt die statistische Auswertung der Versuche, dass durch Melatonin in den Konzentrationen 0,01 $\mu\text{mol/l}$ ($p=0,049$), 0,1 $\mu\text{mol/l}$ ($p=0,004$) und 1 $\mu\text{mol/l}$ ($p=0,004$) signifikante Abweichungen der Kainat induzierten Ionenströme hervorgerufen werden konnte. Es kam zu einer mittleren Vergrößerung der Amplitude bei 0,01 $\mu\text{mol/l}$ auf $120,5 \% \pm 9,825 \%$ bei 0,1 $\mu\text{mol/l}$ auf $121,92 \% \pm 6,872 \%$ und bei 1 $\mu\text{mol/l}$ auf $166,6 \% \pm 23,82 \%$ (siehe **Tab. 3.3**).

Versuchs-Nr.	Relative Effekte (%) von Melatonin [μmol] auf AMPA-Rezeptorkanal vermittelte Ionenströme		
	0,01	0,1	1
1	93	89	100
2	100	150	88
3	104	115	191
4	100	104	200
5	136	125	129
6	111	136	169
7	200	95	300
8	127	114	93
9	88	112	229
10	106	118	
11	173	130	
12	108	175	
MW\pmSEM	120,5 \pm 9,825	121,92 \pm 6,872	166,6 \pm 23,82
p	0,049	0,004	0,004

Tab. 3.3 Relative Effekte von Melatonin auf AMPA-Rezeptorkanäle. n = Anzahl der untersuchten Oozyten. MW \pm SEM = Mittelwert \pm Standardfehler. P = Wahrscheinlichkeit, dass die Differenz aufgrund zufälliger Schwankungen auftrat (bestimmt durch Paired-t-test bzw. Mann-Whitney-Test). Ist $p \leq 0,05$, so ist die Wahrscheinlichkeit hoch, dass die ermittelte Differenz signifikant ist. Die Testantworten wurden immer auf die jeweils vorangegangene Kontrollantwort bezogen.

3.7 Wirkung von Melatonin auf GABA_A-Rezeptorkanäle

Wie bei der Untersuchung der Wirkung von Melatonin auf AMPA-Rezeptorkanäle, wurde bei der Analyse des Einflusses von Melatonin auf die GABA_A-Rezeptorkanäle, nach dem in Kapitel 2.8 vorgestellten Versuchsprotokoll verfahren. Es wurde nach einer Kontrollaktivierung durch GABA im Abstand von 620 Sekunden die Koapplikation von GABA und Melatonin durchgeführt. Melatonin wurde in den Konzentrationen von 0,01 µmol/l und 0,1 µmol/l hinzugegeben. Die Konzentration von GABA betrug jeweils 100 µmol/l. Versuche mit weiteren Melatoninkonzentrationen wurden aufgrund der zunehmend instabilen Oozyten nicht durchgeführt. Die **Abbildungen 3.14** und **3.15** zeigen für die jeweilige Melatonin-Konzentration beispielhafte Originalregistrierungen dieser Versuchsreihe. Insgesamt wurden für diese Reihe 31 Oozyten verwendet. Die **Tabelle 3.4** demonstriert die relativen Effekte von Melatonin auf GABA_A-Rezeptorkanäle. Es zeigt sich, dass bei 8 von 10 ausgewerteten Versuchen die Amplitude anstieg. Für die beiden Konzentrationsstufen von Melatonin 0,01 µmol/l und 0,1 µmol/l konnte jeweils einmal eine Verringerung aufgezeichnet werden. Bei der Versuchsreihe mit 0,01 µmol/l lag diese bei 40 %. In derselben Konzentrationsstufe erreichte die Amplitude zweimal exakt 100 % sowie 116 % und 104 %. Die Amplituden in der Konzentrationsstufe von 0,1 µmol/l lagen, außer einmal bei 96 %, alle oberhalb der Kontrolle von 100 %. Die statistische Zusammenfassung aller Versuche ergab, dass die Substanzkonzentrationen von Melatonin von 0,01 µmol/l keine signifikante Abweichung aufweist. Im Durchschnitt kam es zu einer Verkleinerung der Amplitude

auf $92 \% \pm 13,3 \%$ (p -Wert = 0,299). Bei der Melatonin-Konzentration $0,1 \mu\text{mol/l}$ gab es eine geringe Signifikanz (p -Wert = 0,045). Gemittelt konnte eine Erhöhung von $138,0\% \pm 17,8 \%$ festgestellt werden.

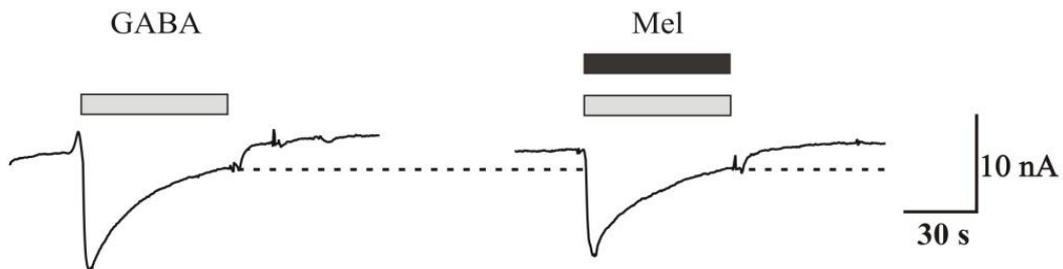


Abb. 3.14: Originalregistrierung als Beispiel für die Versuchsreihe zur Analyse der Wirkung von $0,01 \mu\text{mol/l}$ Melatonin auf GABA_A -Rezeptorkanäle. Die gestrichelte Linie markiert die Größe der Amplitude der vorausgegangenen Aktivierung durch die alleinige Applikation des Neurotransmitters Kainat. Diese Amplitude wurde als 100 % definiert. Daran schloss sich die Koapplikation mit Melatonin an.

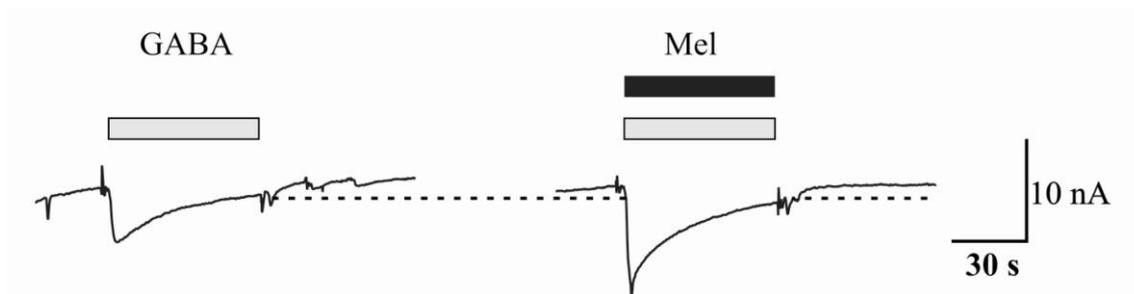


Abb. 3.15: Originalregistrierung als Beispiel für die Versuchsreihe zur Analyse der Wirkung von $0,1 \mu\text{mol/l}$ Melatonin auf GABA_A -Rezeptorkanäle. Die gestrichelte Linie markiert die Größe der Amplitude der vorausgegangenen Aktivierung durch die alleinige Applikation des Neurotransmitters Kainat. Diese Amplitude wurde als 100 % definiert. Daran schloss sich die Koapplikation mit Melatonin an.

Versuchs-Nr.	Relative Effekte (%) von Melatonin [μmol] auf GABA _A -Rezeptorkanal vermittelte Ionenströme	
	0,01	0,1
1	100	96
2	116	128
3	40	116
4	100	200
5	104	150
MW\pmSEM	92,0 \pm 13,3	138,0 \pm 17,8
p	0,299	0,045

Tab. 3.4 Relative Effekte von Melatonin auf GABA_A-Rezeptorkanäle. n = Anzahl der untersuchten Oozyten. MW \pm SEM = Mittelwert \pm Standardfehler. P = Wahrscheinlichkeit, dass die Differenz aufgrund zufälliger Schwankungen auftrat (bestimmt durch Wilcoxon Signed Rank Test bzw. Normality Test). Ist $p \leq 0,05$, so ist die Wahrscheinlichkeit gering, dass die ermittelte Differenz signifikant ist. Die Testantworten wurden immer auf die jeweils vorangegangene Kontrollantwort bezogen.

4.0 Diskussion

Das Hormon Melatonin hat in den letzten Jahren stark an Bedeutung und Beachtung gewonnen. Dies zeigt sich auch an den stetig zunehmenden Publikationen, die sich direkt oder indirekt mit Melatonin beschäftigen. Seine regulatorische Wirkung auf den zirkadianen Rhythmus, seine Rolle im endokrinen System, seine Effekte auf das Immunsystem, als auch eine mögliche Rolle bei der Behandlung von Krankheiten wie Krebs sowie Epilepsie, machen das Hormon zu einem ernsthaften und interessanten Forschungsobjekt. Es gibt aktuell keine valide, wissenschaftliche Bestätigung für die Wirkungen von Melatonin enthaltenden, freikäuflichen Produkten, welche z.B. „anti-aging“ Effekte für sich proklamieren. Die exakten physiologischen Wirkungen sowie der genaue therapeutische Nutzen des Hormons bleiben allerdings weiterhin nicht vollständig geklärt und sind Gegenstand der Forschung.

Die Ergebnisse dieser Experimente zeigen, dass Melatonin die Funktion von exzitatorischen AMPA- und inhibitorischen GABA_A-Rezeptoren beeinflussen kann.

4.1 Diskussion des methodischen Vorgehens

4.1.1 Perspektiven und Grenzen des Expressionssystems der Xenopus-Oozyten

Es konnte in zahlreichen Studien gezeigt werden, dass die Rezeptorkanäle der mRNA-injizierten Oozyten in Aufbau und Funktion mit den Rezeptorkanälen in Nervenzellen weitgehend übereinstimmen. Desweiteren konnte bestätigt werden, dass die elektrophysiologisch registrierte Zellaktivität nach Injektion neuronaler mRNA aus Rattenhirn und Applikation von Neurotransmittern durch de novo synthetisierte rattenspezifische Ionenkanäle erzeugt wird (Sigel 1987; Randle et al. 1988; Mußhoff et al. 1992). Durch die spezifischen Translationsprozesse der Oozyte werden funktionstüchtige Rezeptorkanäle in die Oozytenmembran eingebaut. Dies wurde für die AMPA- und GABA_A-Rezeptoren nachgewiesen (vergl. Mußhoff et al. 1992). Die pharmakologischen Eigenschaften der exprimierten Rezeptorkanäle sind mit denen nativer Rezeptorkanäle weitgehend identisch (Nicoll et al. 1990). Es konnte ebenfalls gezeigt werden, dass die spezielle Kinetik der transmembranösen Ionenströme nach Aktivierung des Rezeptors mit den bereits in vorherigen Untersuchungen beschriebenen übereinstimmen (Randle 1988; Kelso und Leonard 1991). Dieses Modell ist trotz der weitgehenden Übereinstimmungen der heterologen und nativen Rezeptorkanäle nicht hundert prozentig mit der nativen Nervenzelle identisch. So gibt es Rezeptoren in unterschiedlichen Neuronen, welche an unterschiedliche Reaktionkaskaden gebunden sind. Wahrscheinlich sind nicht alle Reaktionskaskaden in den nativen Rezeptorkombinationen in der Oozyte exprimiert (Schoepp und Conn

1993). Weiterhin zeigten molekularbiologische Untersuchungen, dass Glutamat- und GABA_A-Rezeptoren aus zahlreichen Untereinheiten aufgebaut sind (Luo et al. 1997).

Die Kombination der Untereinheiten ist dabei jeweils zell- und gewebespezifisch. Gerade Kinetik und Desensitivierungsverhalten sind von diesen Untereinheiten abhängig. Die Kombinatorik der Untereinheiten ist im Expressionssystem der Xenopus-Oozyte nicht in dem Maße ausgebildet, wie sie im nativen Gewebe vorkommt. Hier ist möglicherweise ein Nachteil bei der Beurteilung der Wirkungen von Melatonin auf die heterolog exprimierten Ionenkanäle zu berücksichtigen. Eine besondere Eigenschaft der Oozyten muss bei Experimenten berücksichtigt werden. Hüllschichten der Oozyte stellen für bestimmte Substanzen ein Diffusionshindernis dar, was zu einer möglichen Unterbestimmung der Rezeptorantworten auf Melatonin-Applikation führen könnte (Madeja et al., 1997). Lösungsversuche mit defollikulierten Oozyten verursachten relativ schnell eine Veränderung des transmembranösen Haltestroms, wodurch die für die Versuche notwendige Stabilität nicht erreicht werden konnte. Das Expressionssystem der Xenopus-Oozyte ist für die Beurteilung der Funktionsweise der Rezeptorkanäle und die Beeinflussung der Funktion durch unterschiedliche Substanzen insgesamt aber dennoch sehr geeignet. Aufgrund ihrer relativen Unempfindlichkeit gegenüber Nervenzellen sind die Oozyten in ihrer Handhabung auch über mehrere Stunden sehr zweckdienlich. Die zu untersuchenden Substanzen können ohne Einwirkung anderer Ionenkanäle gezielt an den Rezeptorkanälen wirken. Eine Verfälschung der erhobenen Ergebnisse durch Substanzaufnahme in benachbarte Zellen oder Transmitterfreisetzung aus umliegenden Zellen sowie durch eine

Veränderung der Extrazellulärflüssigkeit durch Zelltod kann aufgrund der Tatsache, dass es sich um Einzelversuche handelt, ausgeschlossen werden.

4.1.2 Vor- und Nachteile des Versuchsprotokolls

Das Hormon Melatonin wurde, wie in Kapitel 2.8.2 erklärt, appliziert. Nach einer Kontrollantwort, induziert durch die Neurotransmitter GABA bzw. durch den Glutamat-Liganden Kainat, erfolgte anschließend die Koapplikation von Neurotransmitter und Melatonin als Testantwort. Melatonin wurde in den jeweiligen Konzentrationen (0,01 $\mu\text{mol/l}$, 0,1 $\mu\text{mol/l}$, 1 $\mu\text{mol/l}$) zugeführt. Es konnte somit an einer einzelnen Oozyte bis zu drei Melatoninkonzentrationen getestet werden. Zwischen den Testläufen wurde für mindestens 15 Minuten pausiert. Die der Testantwort vorausgehende Kontrollantwort, stellte den reglementierenden Faktor für die weitere Nutzbarkeit der Oozyte dar. Eine Schädigung der Oozyte und damit verfälschte Effekte während der Testantwort konnten somit ausgeschlossen werden. Die Oozyte wurde verworfen, sobald die Amplitude der Kontrollantwort um mehr als 15 % von der Amplitude der initialen Kontrollantwort abwich. Dadurch konnte verhindert werden, dass es zu Additionseffekten durch wiederholte Testläufe kam, welche das Ergebnis verfälschen könnten. Während der Testreihen konnte beobachtet werden, wie sich die bioelektrischen Membraneigenschaften oft nach 2-3 Testzyklen so stark veränderten, dass das Haltepotential der Oozyten inkonstant wurde. Dies musste zum Abbruch des Versuches und zur Verwerfung der Zelle führen. Diese Instabilität resultiert eher aus

dem schlechten Zustand der Oozyten, denn aus dem wiederholten Kontakt zu Melatonin. Durch den geringen zeitlichen Abstand zwischen Kontrollantwort und Testantwort kann die Einflussnahme durch den Faktor Zeit auf das Testergebnis verhindert werden.

Auch die Frage, ob eine alleinige Applikation von Melatonin schon die Membraneigenschaften der Oozyten verändern kann, wurde untersucht. Wie im Kapitel 3.5 ausgeführt, konnten nach der alleinigen Applikation von Melatonin keine Veränderungen der bioelektrischen Membraneigenschaften festgestellt werden.

Die Versuchsreihen mit GABA zeigten, dass die zeitlich erste Amplitude, während des Einwaschens des Transmitters, einer großen Variation unterliegt und somit nicht für die Auswertung der Originalregistrierungen herangezogen werden konnte. Deshalb wurde zur Auswertung der Aufzeichnungen die deutlich konstante Amplitude kurz vor dem Auswaschen des Liganden verwendet.

4.2 Interpretation der Ergebnisse

Die vorliegende Arbeit untersucht einen möglichen Effekt des Hormons Melatonin auf die Funktion der inhibitorischen GABA- und exzitatorischen glutamatergen AMPA-Rezeptoren. Die **Abbildungen 4.1** und **4.2** fassen die Ergebnisse zusammen.

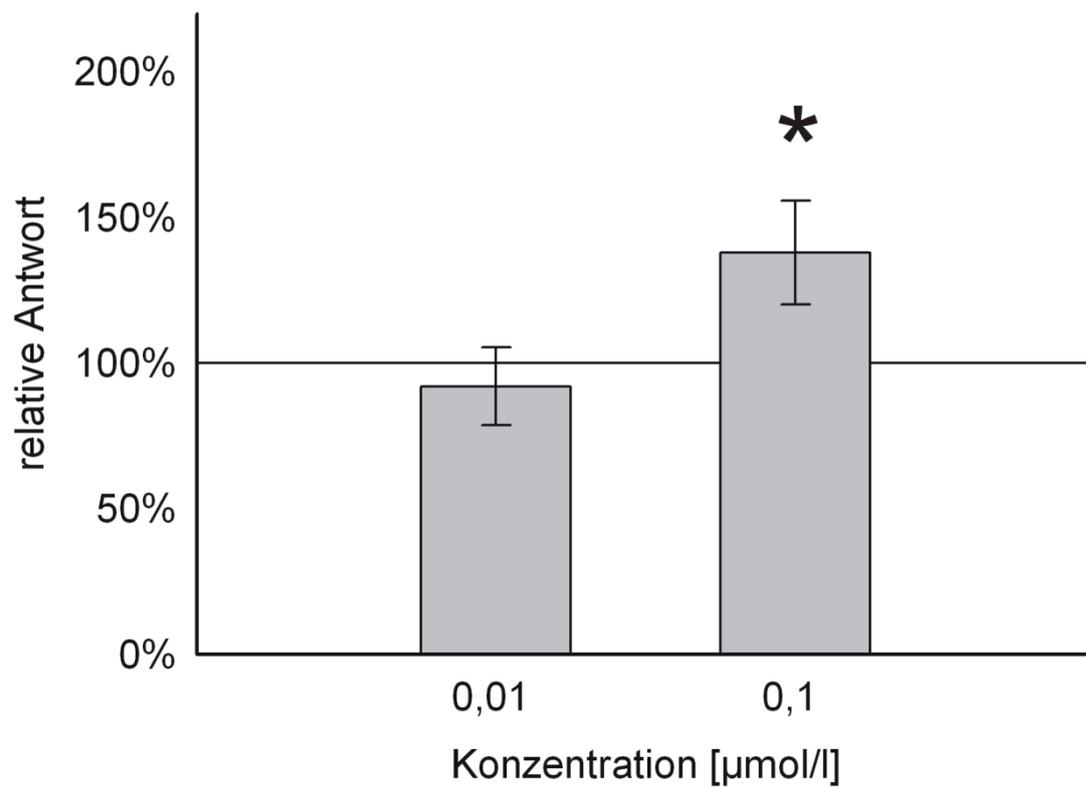


Abb. 4.1: Graphische Darstellung der Wirkung von Melatonin in den Konzentrationen 0,01 $\mu\text{mol/l}$ und 0,1 $\mu\text{mol/l}$ auf GABA_A -Rezeptorkanäle. Die Y-Achse gibt die GABA-Antwort, die X-Achse die getesteten Melatoninkonzentrationen wieder. Die prozentualen Angaben beziehen sich jeweils auf die vorangegangene GABA-Kontrolle, die mit 100 % gleichgesetzt wurde (Linie). * = Signifikanz der gemessenen Werte ($p \leq 0,05$).

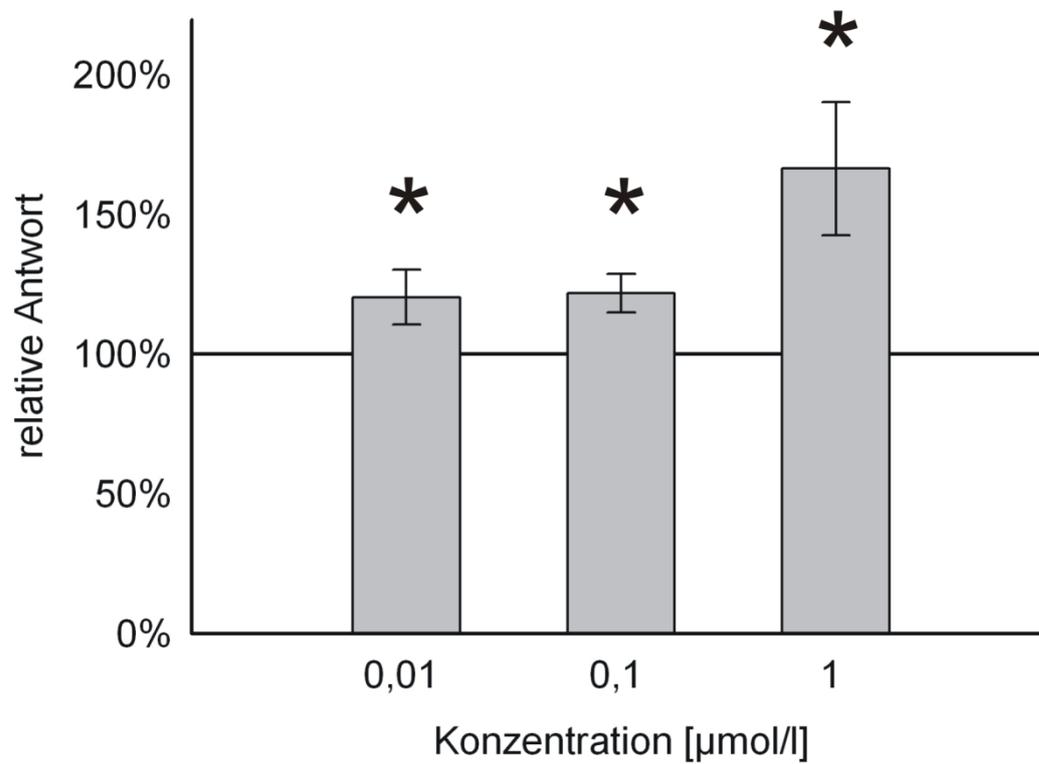


Abb. 4.2: Graphische Darstellung der Wirkung von Melatonin in den Konzentrationen 0,01 µmol/l, 0,1 µmol/l und 1 µmol/l auf AMPA-Rezeptorkanäle. Die Y-Achse gibt die Kainatantwort, die X-Achse die getesteten Melatoninkonzentrationen wieder. Die prozentualen Angaben beziehen sich jeweils auf die vorangegangene Kainat-Kontrolle, die mit 100 % gleichgesetzt wurde (Linie). * = Signifikanz der gemessenen Werte ($p \leq 0,05$).

4.2.1 Konzentrationsabhängigkeit der Effekte durch Melatonin

Melatonin zeigte im getesteten Konzentrationsbereich von 0,01 bis 1 $\mu\text{mol/l}$ jeweils eine Beeinflussung der AMPA-Rezeptorkanäle. Der t-Test zeigte im Vergleich der einzelnen Konzentrationstufen mit den jeweils vorangegangenen Kontrollantworten für 0,01 $\mu\text{mol/l}$ Melatonin einen gerade noch signifikanten Effekt ($p = 0,049$), $120,5\% \pm 9,8\%$ im Sinne einer Amplitudenverstärkung. So konnte der t-Test für die Konzentrationen 0,1 $\mu\text{mol/l}$ und 1 $\mu\text{mol/l}$ ebenfalls signifikante Verstärkungen (jeweils $p = 0,004$) der Testantwort feststellen: $121,9\% \pm 6,9\%$ und $166,6\% \pm 23,8\%$. Bei den Versuchen mit GABA_A -Rezeptoren zeigten sich im t-Test für die Melatonin Konzentration 0,01 $\mu\text{mol/l}$ eine nicht signifikante Hemmung ($p = 0,299$): $92\% \pm 13,3\%$. Während dagegen signifikant verstärkte Effekte ($p = 0,045$) bei der Melatonin-Konzentration von 0,1 $\mu\text{mol/l}$ auftraten: $138\% \pm 17,8\%$.

Zusammenfassend konnte für die Versuche mit Melatonin auf die Funktion der AMPA-Rezeptoren ein signifikant verstärkter Effekt festgestellt werden. Mit steigender Melatonin-Konzentration erhöht sich hier der Effekt auf die AMPA-Rezeptorkanäle. Während für GABA gezeigt wurde, dass erst im deutlich pharmakologischen Bereich der Konzentrationen signifikante Effekte auf die Funktion der Rezeptoren festgestellt werden konnten.

4.2.2 Bedeutung der festgestellten Ergebnisse

Im zirkadianen System und in der Regulierung saisonabhängiger Zyklen spielt Melatonin eine zentrale Rolle (Moore, 1997). Das von der Zirbeldrüse produzierte Hormon hat seine höchste Konzentration während der Nacht, während sie tagsüber am niedrigsten ist. Der Nucleus suprachiasmaticus (SCN) kontrolliert diesen täglichen Rhythmus. Gleichzeitig ist der SCN auch Ziel für Effekte durch Melatonin. Durch spezifische Rezeptoren vermittelt (Reppert et al., 1996), kann Melatonin den zirkadianen neuronalen „firing“ Rhythmus unterdrücken und verschieben (Morgan et al., 1994; Vanecek, 1998).

Melatonin beeinflusst auch im Zentralen Nervensystem (Stankov et al., 1991) eine Reihe von physiologischen Effekten, wie z.B. Schlafintensität, -effektivität, -dauer (Haimov et al., 1995) und Stärkung der Immunfunktion (Maestroni et al., 1993; Lissoni et al., 1993; Reiter et al., 1995). Melatonin beeinflusst Ionenkanäle sowohl in physiologischer als auch pharmakologischer Konzentration. Pharmakologische Auswirkungen werden z.B. bei der Therapie des „jet lag“ (Arendt et al., 1997) und bei Schlafstörung (Oldani et al., 1994) von Schichtarbeitern (Haimov et al., 1995) ausgenutzt. Man erhofft sich zukünftig durch die therapeutische Gabe von Melatonin Fortschritte z.B. in der Behandlung von Brustkrebs (Blask et al., 1997; Panzer et al., 1997) und Epilepsie (Munoz-Hoyos et al., 1998).

Prinzipiell unterscheidet man im Körper zwischen physiologischer und pharmakologischer Wirkung einer Substanz. Die physiologische Wirkung wird durch Kon-

zentrationen herbeigeführt, die durch den Körper selbst erreicht werden können. Im Fall des Hormons Melatonin entspricht dies im höchsten Fall ca. 10 nmol/l, häufig deutlich weniger. Die physiologische Konzentration liegt eher im picomolaren Bereich. Effekte durch die pharmakologische Wirkung werden entsprechend ab einer Konzentration von >10 nmol/l beobachtet. Solche Konzentrationen können durch exogen zugeführtes Melatonin durchaus erreicht werden.

Allein die Melatoninkonzentration von 0,01 µmol/l, wie in den vorliegenden Versuchen eingesetzt, entspricht in etwa einer physiologischen Konzentration. Es läßt sich bei dieser Konzentration für die AMPA-Rezeptorkanäle nur ein sehr gering signifikanter Effekt (siehe Kapitel 3.6) im Sinne einer Amplitudenverstärkung und für GABA kein signifikanter Effekt (siehe Kapitel 3.7) zeigen. Melatonin scheint jedoch auch in dieser Konzentration in der Lage zu sein, die Funktion von Ionenkanälen zu verändern.

Die Beeinflussung der Rezeptorkanäle ist konzentrationsabhängig. Somit war für Melatonin im pharmakologischen Bereich eine deutliche Veränderung der Rezeptoraktivität denkbar. Dies konnte durch die vorliegenden Versuche festgestellt werden. Der Effekt sowohl für AMPA- als auch für GABA-Rezeptoren ist bei Melatonin in einer Konzentration >10 nmol/l deutlich signifikant und nimmt ebenfalls konzentrationsabhängig zu. Dadurch ist ein erhöhter Einfluß durch Melatonin auf weite Teile des ZNS zu erwarten.

5.0 Literaturverzeichnis

Arendt J, Skene DJ, Middleton B, Lockley SW, Deacon S
Efficacy of melatonin treatment in jet lag, shift work, and blindness
J Biol Rhythms 12: 604-17 (1997)

Arendt J, Deacon S, English J, Hampton S, Morgan L
Melatonin and adjustment to phase shift
J Sleep Res 4: 74-79 (1995)

Axelrod J, Weissbach
Enzymatic O-methylation of N-acetylserotonin to melatonin
Science 131: 1312 (1960)

Axelrod J
The pineal gland: a neurochemical transducer
Science 184: 1341-1348 (1974)

Baler R, Coon S, Klein DC
Orphan nuclear receptor RZR β : cyclic AMP regulates expression in the pineal gland
Biophys Res Commun 220: 975-978 (1996)

Barnard EA, Miledi R, Sumikawa K
Translation of exogenous messenger RNA coding for nicotinic acetylcholine receptors produces functional receptors in *Xenopus* oocytes
Proc R Soc Lond B Biol Sci 215: 241-246 (1982)

Becker-Andre M, Wiesenberg I, Schaeren-Wiemers N, Andre E, Missbach M, Saurat JH, Carlberg C

Pineal gland hormone melatonin binds and activates an orphan of the nuclear receptor superfamily

J Biol Chem 269: 28531-28534 (1994)

Benitez-King G, Huerto-Delgadillo L, Anton-Tay F

Binding of H-Melatonin to calmodulin

Life Sci 53: 201-207 (1993)

Benitez-King Ríos A, Martínez A, Antón-Tay F

In vitro inhibition of Ca²⁺/calmodulin-dependent kinase II activity by melatonin.

Biochim Biophys Acta 1290:191-196 (1996)

Besharse JC, Iuvone PM

Circadian clock in *Xenopus* eye controlling retinal serotonin N-acetyltransferase

Nature 305: 133-135 (1983)

Blask DE, Wilson ST, Zalatan F

Physiological melatonin inhibition of human breast cancer cell growth in vitro: evidence for a glutathione-mediated pathway

Cancer Res 57: 1909-1914 (1997)

Cagnacci A, Elliott JA, Yen SS

Melatonin: a major regulator of the circadian rhythm of core temperature in humans

J Clin Endocrinol Metab 75: 447-452 (1992)

Cahill GM, Besharse JC

Retinal melatonin is metabolized within the eye of *Xenopus laevis*

Proc Natl Acad Sci 86: 1098-1102 (1989)

Cardinali DP

Melatonin. A mammalian pineal hormone.

Endocr Rev 2: 327-346 (1981)

Carlberg C, Wiesenberg I

The orphan receptor family RZR/ROR, melatonin and 5-lipoxygenase: An unexpected relationship

J Pineal Res 18: 171-178 (1995)

Caroleo MC, Nistico G, Doria G

Effect of melatonin on the immune system

Pharmacol Res Suppl 2: 34-37 (1992)

Cassone VM

Effects of melatonin on vertebrate circadian systems

Trends Neurosci 13: 457-464 (1990)

Cathala G, Savouret JF, Mendez B, West BL, Karin M, Martial JA, Baxter JD

A method for isolation of intact translationally active ribonucleic acid

DNA 2: 329-335 (1983)

Cohen M, Roselle D, Chabner B, Schmidt TJ, Lippman M

Evidence for a cytoplasmatic melatonin receptor

Nature 274: 894-895 (1978)

Coon SL, Roseboom PH, Baler R, Weller JL, Namboodiri MAA, Koonin EV, Klein DC,

Pineal serotonin N-acetyltransferase: expression cloning and molecular analysis

Science 270: 1681-1683 (1995)

Costa EJX, Lopes RH, Lamy-Freund MT

Permeability of pure lipid bilayers to melatonin

J Pineal Res 19: 123-126 (1995)

Coto-Montes AM, Rodriguez-Colunga MJ, Tolivia D, Menedez-Pelaez A

Immunocytochemical localization of melatonin in the harderian gland of Syrian hamster

Anat Rec 245: 13-16 (1996)

Dascal N

The use of *Xenopus* oocytes for the study of ion channels

CRC Critical Rev Biochem 22: 317-387 (1987)

Dawson D, Encel N

Melatonin and sleep in humans

J Pineal Res 15: 1-12 (1993)

Dingledine R, Borges K, Bowie D, Traynelis SF

The glutamate receptor ion channels

Pharmacol Rev 51: 7-61 (1999)

Dubocovich ML

Melatonin is a potent modulator of dopamine release in the retina

Nature 306: 782-4 (1983)

Dubocovich ML

Pharmacology and function of melatonin receptors

FASEB J. 2: 2765-2773 (1988)

Dumont JN

Oogenesis in *Xenopus laevis* (Daudin) I. Stages of oocytes development in laboratory maintained animals

J Morph 136: 153-180 (1972)

Ebisawa T, Karne S, Lerner MR, Reppert SM

Expression cloning of a high-affinity melatonin receptor from *Xenopus* dermal melanophores

Proc Natl Acad Sci 91 6133-6137 (1994)

Enmark E, Gustafsson JA

Orphan nuclear receptors-the first eight years

Mol Endocrinol 10: 1293-1307 (1996)

Faillace MP, Cutrera R, Keller Sarmiento MI, Rosenstein RE

Evidence for local synthesis of melatonin in golden hamster retina

Neuroreport 6: 2093-2095 (1995)

Fauteck JD, Bockmann J, Böckers TM, Wittkowski W, Köhling R, Lücke A, Straub H, Speckmann EJ, Tuxhorn I, Wolf P, Pannek H, Opiel F

Melatonin reduces low-Mg²⁺ epileptiform activity in human temporal slices

Exp Brain Res 107: 321-325 (1995)

Gern WA, Ralph CL

Melatonin synthesis by the retina

Science 204: 183-184 (1979)

Grace MS, Cahill GM, Besharse JC

Melatonin deacetylation: retinal vertebrate class distribution and *Xenopus laevis* tissue distribution

Brain Res 559: 56-63 (1991)

Guerlotte J, Greve P, Bernard M, Grechez-Cassiau A, Morin F, Collin JP, Voisin P
Hydroxyindole-O-methyltransferase in the chicken retina: Immunocytochemical
localization and daily rhythm of mRNA
Eur J Neurosci 8: 710-715 (1996)

Gurdon JB, Lane CD, Woodland HR, Marbaix G
Use of frog eggs and oocytes for the study of messenger RNA and its translation in
living cells
Nature 233: 177-182 (1971)

Gurdon JB, Wakefield L
Microinjection of amphibian oocytes and eggs for analysis of transcription
Methods Cell Biol 269-299 (1986)

Haimov I, Lavie P, Laudon M, Herer P, Vigder C, Zisapel N
Melatonin replacement therapy of elderly insomniacs
Sleep 18: 598-603 (1995)

Hattori A, Migitaka H, Iigo M, Itoh M, Yamamoto K, Ohtani-Kaneko R, Hara M, Suzuki
T, Reiter RJ
Identification of melatonin in plants and its effects on plasma melatonin levels and
binding to melatonin receptors in vertebrates
Biochem Mol Biol Int 35: 627-34 (1995)

Hazlerigg DG, Barrett P, Hastings MH, Morgan PJ,
Are nuclear receptors involved in pituitary responsiveness to melatonin?
Mol Cell Endocrinol 123: 53-59 (1996)

Henneberry RC
Cloning of the genes for excitatory amino acid receptors
Bioassays 14: 465-471 (1992)

Hodgkin A, Huxley A

A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve

J Physiol 117: 500-544 (1949)

Hollmann M, Heinemann S

Cloned glutamate receptors

Annu Rev Neurosci 17: 31-108 (1994)

Iguichi H, Kato KI, Ibayashi H

Age-dependent reduction in serum melatonin concentrations in healthy human subjects

J Clin Endocrinol Metab 55: 27-29 (1982)

Illernova H, Vaneccek J, Krecek J, Wetterberg L, Säaf J

Effect of one minute exposure to light at night on rat pineal serotonin N-acetyltransferase and melatonin

J Neurochem 32: 673-675 (1978)

Jiang ZG, Nelson CS, Allen CN

Melatonin activates an outward current and inhibits I_h in rat suprachiasmatic nucleus neurons

Brain Res 687: 125-132 (1995)

Johnston GA, Chebib M

The 'ABC' of the receptors: a brief review

Clin Exp Pharmacol Physiol 26: 937-40 (1999)

Johnston GA

GABA receptors: relatively simple transmitter-gated ion channels

Trends Pharmacol Sci 17: 319-323 (1999)

Kappers JA

The development, topographic relations and innervation of the epiphysis cerebri in the albino rat

Z Zellforsch 52: 163-215 (1960)

Kelso SR, Nelson TE, Leonard JP

Protein kinase C-mediated enhancement of NMDA currents by metabotropic glutamate receptors in *Xenopus* oocytes

J Physiol 449: 705-718 (1992)

Klein DC, Roseboom PH, Coon SL

New light is shining on the melatonin rhythm enzyme

Trends Endocrinol Metab 7: 106-112 (1996)

Klein DC

Photoneural regulation of the mammalian pineal gland. In: Revered D and Clark S (eds.) Photoperiodism, melatonin and the pineal

Pittmann, London, 38-51 (1985)

Kopin IJ, Pare CMB, Axelrod J, Weissbach H

The fate of melatonin in animals

J Biol Chem 236: 3072-3075 (1961)

Korf HW, Wagner U

Evidence for a nervous connection between the brain and the pineal organ in the guinea pig

Cell Tissue Res 209: 505-510 (1980)

Kraus DN, Geary GG, Doolen S, Duckles SP

Melatonin and cardiovascular function

Adv Exp Med Biol 460: 299-310 (1999)

Laakso ML, Hättönen T, Alila A

Uncoupling of the pineal melatonin synthesis of rats from the circadian regulation

Neurosci Lett 179: 5-8 (1994)

Larabell CA, Chandler DE

The extracellular matrix of *Xenopus laevis* eggs: a quick-freeze, deep-etch analysis of the modification at fertilization

J Cell Biol 107: 731-741 (1988)

Laudon M, Isaac N, Zisapel N

Melatonin receptors in discrete brain areas of the male rat

Neuroendocrinology 48: 577-583 (1988)

Lee PNN, Pang SN

Identification and characterization of melatonin binding sites in the gastrointestinal tract of ducks

Life Sci 50:117-125 (1992)

Lerma J

Kainat reveals its targets

Neuron 19: 1155-1158 (1997)

Lewy AJ, Wehr TA, Goodwin FK, Newsome DA, Markey SP

Light suppresses melatonin secretion in humans

Science 210: 1267-1269 (1980)

Lewy AJ, Ahmed S, Jackson JM, Sack RL

Melatonin shifts human circadian rhythms according to a phase-response curve

Chronobiol Int 9: 380-392 (1992)

Lissoni P, Barni S, Tancini G, Rovelli F, Ardizzoia A, Conti A, Maestroni GJM

A study of mechanisms involved in the immunostimulatory action of the pineal hormone in cancer patients

Oncology 50: 399-402 (1993)

Luo J, Wang Y, Yasuda RP, Dunah AW, Wolfe BB

The majority of N-methyl-D-aspartate receptor complexes in adult rat cerebral cortex contain at least three different subunits (NR1/NR2A/NR2B)

Mol Pharmacol 51: 79-86 1997

Lynch HJ, Ozaki Y, Shakal D, Wurtmann RJ

Melatonin excretion of man and rats: effect of time of day, sleep, pinealectomy and food consumption

Int J Biometeorol 19: 267-79 (1975)

Madeja M, Mußhoff U, Speckmann EJ

A concentration-clamp system allowing two-electrode voltage-clamp investigations in oocytes of *Xenopus laevis*

J Neurosci Methods 38: 267-269 (1991)

Madeja M, Mußhoff U

Die Eizellen des Krallenfrosches als Modell in der Neurophysiologie

EEG-Labor 15: 25-37 (1992)

Madeja M, Musshoff U, Speckmann EJ

Follicular tissues reduce drug effects on ion channels in oocytes of *Xenopus laevis*

Eur J Neurosci 9: 599-604 (1997)

Maestroni GJ

The immunoneuroendocrine role of melatonin

J Pineal Res 14: 1-10 (1993)

Maestroni GJ

Therapeutic potential of melatonin in immunodeficiency states, viral diseases, and cancer

Adv Exp Med Biol 460: 395-405 (1999)

Maniatis T, Fritsch EF, Sambrook J

Molecular cloning. A laboratory manual

Cold Spring Harbor Laboratory (1982)

Mason R, Brooks A

The electrophysiological effects of melatonin and a putative melatonin antagonist (N-acetyltryptamine) on rat suprachiasmatic neurones in vitro

Neurosci Lett 95: 296-301 (1988)

Mazzuchelli C, Capsoni S, Angeloni D, Franschini F, Stankov B

Expression of the melatonin receptor in *Xenopus laevis*: A comparative study between protein and mRNA distribution

J Pineal Res 20: 54-64 (1996)

McKernan RM, Whiting PJ

Which GABAA-receptor subtypes really occur in the brain?

Trends Neurosci 19: 139-43 (1996)

Meissl H, Ekström P

The pineal organ of teleost fishes.

Rev in Fish Biol Fish 7: 199-184 (1997)

Meldrum B

Amino acid neurotransmitters and new approaches to anticonvulsant drug action

Epilepsia Suppl 2: 140-9 (1984)

Menendez-Pelaez A, Howes KA, Gonzalez-Brito A, Reiter RJ

N-acetyltransferase activity, hydroxyindole-O-methyltransferase activity and melatonin levels in the harderian glands of the female Syrian hamster: Changes during the light: dark cycle and the effect of 6-parachlorophenylalanine administration

Biochem Biophys Res Com 145: 1231-1238 (1987)

Michaelis EK

Molecular biology of glutamate receptors in the central nervous system and their role in excitotoxicity, oxidative stress and aging

Prog Neurobiol Sci 54: 369-415 (1998)

Moller M, Ravault JP, Cozzi B, Zhang ET, Phansuwan-Pujito P, Larsen PJ, Mikkelsen JD

The multineuronal input to the mammalian pineal gland. In: Folders A, Reiter RJ (eds.) Advances in Pineal Research

John Libbey & Co. Ltd. London Vol 6: 3-12 (1991)

Moore RY

Neural control of pineal function in mammals and birds

J Neural Transm Suppl 13: 47-58 (1978)

Moore RY

Neural control of the pineal gland

Behav Brain Res 73: 125-30 (1996)

Moore RY

Circadian rhythms: basic neurobiology and clinical applications

Annu Rev Med 48: 253-266 (1997)

Morgan PJ, Barrett P, Howell HE, Helliwell R

Melatonin receptors: Localization, molecular pharmacology and physiological significance

Neurochem Int 24: 101-146 (1994)

Morgan PJ, Lawson W, Davidson G, Howell HE

Melatonin inhibits cyclic AMP production in cultured ovine pars tuberalis cells

J Mol Endocrinol 3: R5-R8 (1989)

Munoz-Hoyos A, Sanchez-Forte M, Molina-Carballo A, Escames G, Martin-Medina E, Reiter RJ, Molina-Font JA, Acuna-Castroviejo D

Melatonin's role as an anticonvulsant and neuronal protector: experimental and clinical evidence

J Child Neurol 13: 501-9 (1998)

Mußhoff U, Madeja M, Bloms P, Speckmann EJ

Time course of glutamate receptor expression in individual oocytes of *Xenopus laevis* after injection of rat brain RNA

Comp Biochem Physiol 103C: 189-193 (1992)

Mußhoff U, Riewenherm D, Berger E, Fauteck JD, Speckmann EJ

Melatonin Receptors in rat hippocampus: molecular and functional investigations

Hippocampus 12: 165-173 (2002)

Mußhoff U, Madeja M, Bloms P, Speckmann EJ

Time course of glutamate receptor expression in individual oocytes of *Xenopus laevis* after injection of rat brain RNA

Comp Biochem Physiol 103: 189-193 (2002)

Nelson CS, Marino JL, Allen CN

Melatonin receptors activate heteromeric G-protein coupled Kir3 channels

Neuroreport 7: 717-720 (1996)

Nicoll RA, Isaacson JS

Aniracetam reduces glutamate receptor desensitization and slows the decay of fast excitatory synaptic currents in the hippocampus

Proc Natl Acad Sci 88: 10936-40 (1990)

Nonno R, Lucini V, Stankov B, Fraschini F

2-[¹²⁵I]iodomelatonin binding sites in the bovine hippocampus are not sensitive to guanine nucleotides

Neurosci Lett 194: 113-116 (1995)

Oldani A, Ferini-Strambi L, Zucconi M, Stankov B, Fraschini F, Smirne S

Melatonin and delayed sleep phase syndrome: ambulatory polygraphic evaluation

Neuroreport 6: 132-4 (1994)

Pang CS, Tang PL, Song Y, Pang SF, NG KW, Guardiola-Lemaitre B, Delagrangé P, Brown GM

Differential inhibitory effects of melatonin analogs and three naphthalenic ligands on 2-[¹²⁵I]iodomelatonin binding to chicken tissues

J Pineal Res 23: 148-55 (1997)

Panzer A, Viljoen M

The validity of melatonin as an oncostatic agent

J Pineal Res 22: 184-202 (1997)

Pardrige WM, Mietus LJ

Transport of albumin-bound melatonin through the blood-brain barrier

J Neurochem 34: 1761-1763 (1980)

Pernkopf E

Topographische Anatomie des Menschen

Pichler A (Hrsg.) Urban & Schwarzenberg, München-Wien-Baltimore, Bd IV/2 1960

Randle JCR, Vernier P, Garrigues AM, Brault E

Properties of kainite channels in rat brain mRNA injected *Xenopus* oocytes: Ionic selectivity and blockade

Mol Cell Biochem 80: 121-132 (1988)

Reiter RJ, Melchiorri D, Sewerynek E, Poeggeler B, Barlow-Walden L, Chuang JI, Ortiz GG, Acuna-Castroviejo D

A review of the evidence supporting melatonin's role as an antioxidant

J Pineal Res 18: 1-11 (1995)

Reiter RJ

The pineal and its hormones in the control of reproduction in mammals

Endocr RV 1: 109-31 (1980)

Reiter RJ, Tan DX, Manchester LC, Simopoulos AP, Maldonado MD, Flores LJ, Terron MP

Melatonin in edible plants (phytomelatonin): Identification, concentrations, bioavailability and proposed functions

World Rev Nutr Diet 97: 211-36 (2007)

Reppert SM, Perlow MJ, Tamarkin L, Klein DC

A diurnal melatonin rhythm in primate cerebrospinal fluid

Endocrinology 104: 295-301 (1979)

Reppert SM, Weaver DR, Rivkees SA, Stopa EG

Putative melatonin receptors in a human biological clock

Science 242: 78-81 (1988)

Reppert SM, Weaver DR, Ebisawa T

Cloning and characterization of a mammalian melatonin receptor that mediates reproductive and circadian responses

Neuron 13: 1177-1185 (1994)

Reppert SM, Weaver DR, Ebisawa T, Mahle CD, Kolakowski LF

Melatonin receptors are for the birds: molecular analysis of two receptor subtypes differentially expressed in chick brain

FEBS Lett 386: 219-224 (1996)

Reppert SM, Weaver DR, Cassone VM, Godson C, Kolakowski LF

Cloning of a melatonin-related receptor from human pituitary

Neuron 15: 1003-1015 (1995)

Rogawski MA, Roth RH, Aghajanian GK

Melatonin: deacetylation to 5-methoxytryptamine by liver but not brain aryl acylamidase

J Neurochem 32: 1219-26 (1979)

Romijn HJ, Mud MT, Wolters PS

A pharmacological and autoradiographic study on the ultrastructural localization of indoleamine synthesis in the rabbit pineal gland

Cell Tiss Res 185: 199-214 (1977)

Schoepp DD, Conn PJ

Metabotropic glutamate receptors in brain function and pathology

Trends Pharmacol Sci 14: 13-20 (1993)

Seeburg PH

The role of RNA editing in controlling glutamate receptor channel properties

J Neurochem 66: 1-5 (1996)

Shibata S, Cassone VM, Moore RY

Effects of melatonin on neuronal activity in the rat suprachiasmatic nucleus in vitro

Neurosci Lett 97: 140-144 (1989)

Sigel E

Properties of single sodium channels translated by *Xenopus* oocytes after injection with messenger ribonucleic acid

J Physiol 386: 73-90 (1987)

Sigel E

Use of *Xenopus* oocytes for the functional expression of plasma membrane proteins

J Membrane Biol 117: 201-221 (1990)

Slaugenhaupt SA, Roca AL, Liebert CB, Altherr MR, Gusella JF, Reppert SM

Mapping of the gene for the Mel 1a-melatonin receptor to human chromosome 4 (MTNR 1A) and mouse chromosome 8 (Mtnr 1a)

Genomics 27: 355-357 (1995)

Snutch TP

The use of *Xenopus* oocytes to probe synaptic communication

Trends Neurosci 11: 250-256 (1988)

Soreq H

The biosynthesis of biologically active proteins in mRNA-microinjected *Xenopus* oocytes

CTC Crit Rev Biochem 18: 199-238 (1985)

Stankov B, Cozzi B, Lucini V, Fumagalli P, Scaglione F, Fraschini F

Characterization and mapping of melatonin receptors in the brain of three mammalian species: rabbit, horse and sheep: A comparative in vitro binding study

Endocrinology 53: 214-221 (1991)

Stankov B, Reiter RJ

Melatonin receptors: Current status, facts and hypotheses

Life Sci 46: (1990)

Stehle JH, Foulkes NS, Molina CA, Simonneaux V, Pevet P, Sassone-Corsi P

Adrenergic signals direct rhythmic expression of transcriptional repressor CREM in the pineal gland

Nature 365: 314-320 (1993)

Stehle JH

Pineal gene expression: Dawn in a dark matter

J Pineal Res 18: 179-190 (1995)

Stehle J, Vanecek J, Vollrath L

Effects of melatonin on spontaneous electrical activity of neurons in rat suprachiasmatic nuclei: an in vitro iontophoretic study

J Neural Transm 78: 173-177 (1989)

Steinhilber D, Brungs M, Werz O, Wiesenberg I, Danielsson C, Kahlen JP, Nayeri S, Schröder M, Carlberg C

The nuclear receptor for melatonin represses 5-lipoxygenase gene expression in human B lymphocytes

Biol Chem 270: 7037-7040 (1995)

Sudol M

Functional expression of the yes proto-oncogene protein in *Xenopus* oocytes injected with chicken cerebellar mRNA

J Neurosci 24: 1-8 (1989)

Sumikawa K, Houghton M, Emtage JS, Richards BM, Barnard EA

Active multi-subunit ACh receptor assembled by translation of heterologous mRNA in *Xenopus* oocytes

Nature 292: 862-864 (1981)

Tamarkin L, Cohen M, Roselle D, Reichert C, Lippman M, Chabner B

Melatonin inhibition and pinealectomy enhancement of 7,12-dimethylbenz(a)anthracene-induced mammary tumors in the rat

Cancer Res 41: 4432-6 (1981)

Vanecek J

Melatonin binding sites

J. Neurochem 51:1436-1440 (1988)

Viswanathan M, Laitinen JT, Saavedra JM

Expression of melatonin receptors in arteries involved in thermoregulation

Proc Natl Acad Sci 87: 6200-6203 (1990)

Voordouw BCG, Euser R, Verdonk RER, Alberda BT, De Jong FH, Drogendijk AC, Fauser BCJM, Cohen M

Melatonin and melatonin-progestin combinations alter pituitary-ovarian function in women and can inhibit ovulation

J Clin Endocrinol Metab 74: 108-117 (1992)

Waldhauser F, Dietzel M

Daily and annual rhythms in human melatonin secretion: role in puberty control

Ann N Y Acad Sci 453: 242-52 (1985)

Wan Q, Man HY, Liu F, Braunton J, Niznik HB, Pang SF, Brown GM, Wang YT

Differential modulation of GABAA receptor function by Mel1a and Mel1b receptors

Nat Neurosci 2: 401-403 (1999)

Wan Q, Pang SF

[125I]iodomelatonin binding sites in the chicken spinal cord: binding characteristics and diurnal variation

Neurosci Lett 163: 101-4 (1993)

Wan Q, Liao M, Brown GM, Pang SF

Localization and characterization of melatonin receptors in the rabbit spinal cord

Neurosci Lett 204: 77-80 (1996)

Wang HC, Beer B, Sassano D, Blume AJ, Ziai MR

Gene expression in *Xenopus* oocytes

Int J Biochem 23: 271-6 (1991)

Watkins JC, Olverman HJ, Honore T, Drejer J, Nielsen M

Molecular target size of NMDA antagonist binding sites

Eur J Pharmacol 136: 137-8 (1987)

Weaver DR, Rivkees SA, Reppert SM

Localization and characterization of melatonin receptors in rodent brain by in vitro autoradiography

J Neurosci 9: 2581-2590 (1989)

Weissbach H, Redfield BG, Axelrod J

Biosynthesis of melatonin: enzymic conversion of serotonin to N-acetylserotonin

Biochim Biophys Acta 43: 352-353 (1960)

Welsh MG,

Pineal Calcification: structural and functional aspects

Pineal Research Reviews 3: 41-68 (1985)

Wiesenberg I, Missbach M, Kahlen JP, Schröder M, Carlberg C

Transcriptional activation of the nuclear receptor RZR alpha by the pineal gland hormone melatonin and identification of CGP 52608 as a synthetic ligand

Nucleic Acids Res 23: 327-22 (1995)

Wright MS, Karlson HE, Paulssen EJ, Meyerhof W, Högset A, Gautvik KM

Different-sized mRNAs from GH4C1 cells induce a TRH-dependent electrical response in *Xenopus laevis* oocytes

Acta Physiol Scand 140: 129-34 (1990)

Wurtman RJ, Axelrod J, Phillips LS

Melatonin synthesis in the pineal gland: Control by light

Science 142: 1071-1073 (1963)

Yellen G, Tomaselli GF, Marban E

Sodium channels from human brain RNA expressed in *Xenopus* oocytes. Basic electrophysiologic characteristics and their modification by diphenylhydantoin

J Clin Invest 83: 1724-1732 (1984)

Yellon SM

Daily melatonin treatments regulate the circadian melatonin rhythm in the adult Djungarian hamster

J Biol Rhythm 11: 4-13 (1996)

Yu L, Blumer KJ, Davidson N, Lester HA, Thomer J

Functional expression of the yeast alpha-factor receptor in *Xenopus* oocytes

J Biol Chem 264: 20847-50 (1989)

Zanaboni A, Zanaboni-Muciaccia W, Forni A, Zanussi C

Effect of pinealectomy on arterial blood pressure and food and water intake in the rat

J Endocrinol Invest 1: 125-130 (1978)

Zawilska JB, Jarmak A, Woldan-Tambor A, Nowak JZ

Light-induced suppression of nocturnal serotonin N-acetyltransferase activity in chick pineal gland and retina: A wavelength comparison

J Pineal Res 19: 87-92 (1995)

Zeise ML, Semm P

Melatonin lowers excitability of guinea pig hippocampal neurons in vitro

J Comp Physiol A 157: 23-29 (1985)

6.0 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt:

Herrn Prof. U. Mußhoff, nicht nur für die Überlassung des Themas und seiner immerwährenden Hilfestellung, sondern vor allem für die freundlichen und produktiven Gespräche, die mir halfen den Blick für das Wesentliche nie zu verlieren.

allen Mitarbeitern und Doktoranden des Institutes der Physiologie, stellvertretend Fr. Dr. K. Krüger, Frau A. Markovic und Fr. Dr. C. Wackerbeck für die stetige Hilfsbereitschaft und hervorragende Arbeitsatmosphäre.

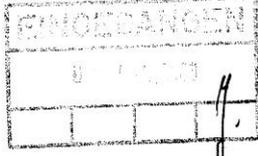
meiner Frau Julia für ihre Liebe und Unterstützung.

meinen Eltern, ohne die ein Studium und eine Promotion nicht möglich gewesen wäre.

7.0 Lebenslauf

8.0 Anhang

8.1 Genehmigungsbescheid

Bezirksregierung Münster

Bezirksregierung Münster • 48128 Münster

Gegen Empfangsbekanntnis
Herrn
Prof. Dr. med. Erwin-Josef Speckmann
Institut für Physiologie
-Institut für Experimentelle Epilepsie-
forschung-
des Universitätsklinikums Münster
Robert-Koch-Str. 27 a
48149 Münster

Dienstgebäude:
Domplatz 1-3
Telefon: (0251) 411-0
Durchwahl: 2110
Telefax: 2115
Raum: 431
Auskunft erteilt:
Frau Möllers
E-Mail:
irmgard.moellers@bezreg-muenster.nrw.de
Aktenzeichen:
50.0835.1.0 (G 79/2002)

19. Dez. 2002

**Tierschutz;
Durchführung von Versuchen an Wirbeltieren**

Ihr Antrag vom 10.10.2002, hier eingegangen am 06.11.2002

Genehmigungsbescheid:

Sehr geehrter Herr Professor Speckmann,

gemäß § 8 Tierschutzgesetz (TierSchG) vom 25. Mai 1998 (BGBl. I S. 1105) in der zur Zeit geltenden Fassung wird Ihnen die Genehmigung zur Durchführung nachstehenden Versuchsvorhabens erteilt:

„Experimentelle Epilepsieforschung“. (10 Teilprojekte gem. Antrag)

Leiter des Versuchsvorhabens und seine Stellvertreter sind:

Herr Prof. Dr. med. E.-J. Speckmann Institut für Physiologie -Institut für Experimentelle Epilepsieforschung- des Universitätsklinikums Münster Robert-Koch-Str. 27 a 48149 Münster	Frau Prof. Dr. rer. nat. Heidrun Straub Institut für Physiologie des Universitätsklinikums Münster Robert-Koch-Str. 27 a 48149 Münster
--	---

Grünes Umweltschutztelefon: (0251) 411-3300
E-Mail: poststelle@bezreg-muenster.nrw.de • Internet: www.bezreg-muenster.nrw.de
zentrale Telefaxnummer: (0251) 411-2525
Konten der Landeskasse Münster:
Deutsche Bundesbank - Filiale Münster - BLZ: 400 000 00 Konto: 40001 520
Westdeutsche Landesbank Girozentrale Münster BLZ: 400 500 00 Konto: 61820
OPNV ab Hbf. Linien 14 • 20 bis Haltestelle Domplatz, Linien 2 • 10 • 11 • 12 bis

1/3

**2000 BEZIRKS
REGIERUNG
JAHR MÜNSTER**

Herr
Prof. Dr. med. Ulrich Altrup
Institut für Experimentelle
Epilepsieforschung
des Universitätsklinikums Münster
Robert-Koch-Str. 27 a
48149 Münster

Herr
Prof. Dr. rer. nat. Ulrich Mußhoff
Institut für Physiologie
des Universitätsklinikums Münster
Robert-Koch-Str. 27 a
48149 Münster

Diese Genehmigung gilt bis zum **31. 12. 2005**.

Zur Durchführung des Versuchsvorhabens dürfen folgende Tiere verwendet werden:

**100 Mäuse,
500 Ratten,
30 Frösche,
500 Landschnecken.**

Mit dem Versuchsvorhaben darf erst nach Vorliegen dieser Genehmigung begonnen werden.

Sofern der Leiter des Versuchsvorhabens oder seine Stellvertreter wechseln, ist mir dieser Wechsel unverzüglich anzuzeigen.

Diese Genehmigung wird zurückgenommen, wenn bei der Erteilung die Voraussetzungen nach § 8 Abs. 3 TierSchG nicht gegeben waren.

Sie wird widerrufen, wenn die Voraussetzungen nach § 8 Abs. 3 TierSchG nicht mehr gegeben sind und dem Mangel nicht innerhalb einer von mir zu bestimmenden Frist abgeholfen wird; sie kann widerrufen werden, wenn ihre Bedingungen und Auflagen nicht erfüllt werden oder den Vorschriften des § 9 Abs. 2 TierSchG wiederholt oder grob zuwidergehandelt worden ist.

Ein Antrag auf Verlängerung der Genehmigung ist rechtzeitig vor Ablauf der Frist bei mir zu stellen.

Da das Versuchsvorhaben überwiegend im öffentlichen Interesse erfolgt, wird von der Erhebung einer Verwaltungsgebühr Abstand genommen.

Rechtsbehelfsbelehrung:

Gegen diesen Bescheid kann innerhalb eines Monats nach Bekanntgabe Widerspruch erhoben werden. Der Widerspruch ist bei mir unter der oben genannten Anschrift schriftlich oder zur Niederschrift einzureichen.

Sollte die Frist durch das Verschulden eines von Ihnen Bevollmächtigten versäumt werden, so würde dessen Verschulden Ihnen zugerechnet werden.

Ich bitte um umgehende Rückgabe des beiliegenden Empfangsbekanntnisses.

Mit freundlichen Grüßen
Im Auftrag



Dr. Piontkowski