

**STUDIEN ZUR FUNKTIONELLEN BEDEUTUNG  
SYNAPTOIDER MIKROVESIKEL  
IM PINEALORGAN VON  
RATTEN (*RATTUS NORVEGICUS*) UND  
MONGOLISCHEN WÜSTENRENNMÄUSEN  
(*MERIONES UNGUICULATUS*)**

Vom Fachbereich Biologie  
der Universität Hannover  
zur Erlangung des Grades

DOKTOR DER NATURWISSENSCHAFTEN  
DR. RER. NAT.

genehmigte Dissertation  
von  
DIPL.-BIOL. HEIKE PABST  
geboren am 4. August 1967 in Bad Oeynhausen

Hannover 2001

Referent: Prof. Dr. Peter Redecker  
Institut für Anatomie 1, Medizinische Hochschule Hannover

Koreferent: Prof. Dr. Stephan Steinlechner  
Institut für Zoologie, Tierärztliche Hochschule Hannover

Tag der Promotion: 19. Januar 2001



## Zusammenfassung

Viele endokrine Zellen, so auch die hormonbildenden Zellen des Pinealorgans, enthalten kleine elektronenhelle Vesikel. Diese zeigen hinsichtlich ihrer Morphologie und ihres molekularen Aufbaus Ähnlichkeiten mit den synaptischen Vesikeln in Nervenzellen. Untersuchungen der vergangenen Jahre führten zu der Hypothese, daß diese „synaptoiden“ Mikrovesikel eine neue Klasse sekretorischer Organellen in endokrinen Zellen darstellen. Für das Pinealorgan könnte das bedeuten, daß diese Mikrovesikel möglicherweise neuroaktive Aminosäuren wie z.B. Glutamat als Botensubstanzen speichern und sezernieren und dadurch Einfluß auf die Melatoninsynthese nehmen.

Diese Hypothese konnte in der vorliegenden Arbeit dadurch untermauert werden, daß in Pinealozyten weitere, bisher in diesen Zellen nicht nachgewiesene Proteine lokalisiert wurden, die in Nervenzellen an der Zielsteuerung und Kontrolle der Exozytose synaptischer Vesikel beteiligt sind (Munc 18-1, CSP und SV2A). Außerdem bekräftigen die Befunde zur Expression und zellulären Lokalisation verschiedener Glutamatrezeptoren (mGluR2/3 und mGluR5) und –transmitter (GLT-1, GLAST und EAAC1) im Pinealorgan sowie die Ergebnisse zur Ontogenese der Mikrovesikel und ihrer regulatorischen Proteine nachdrücklich das Konzept einer sekretorischen Funktion der endokrinen Mikrovesikel und einer parakrinen Wirkung ihrer mutmaßlichen Transmitter.

Weiterhin wurden in Pinealzellkulturen Vesikelexozytosen durch depolarisierende Stimuli ausgelöst und anschließend die Art und Menge der freigesetzten Transmitter bestimmt. Daraus ergab sich, daß neben den bekannten exzitatorischen Aminosäure-Transmittern Glutamat und Aspartat offenbar auch der inhibitorisch wirksame Transmitter Glycin aus synaptoiden Mikrovesikeln freigesetzt wird.

Im Zusammenhang mit bisher ungeklärten Fragen zur Regulation der Mikrovesikelexozytose in Pinealozyten wurden weitere *in vitro*-Experimente durchgeführt. In diesen Experimenten wurde der Einfluß verschiedener, im Pinealorgan vorkommender Neurotransmitter und –peptide auf die Freisetzung neuroaktiver Aminosäuren aus den synaptoiden Vesikeln untersucht. Die aktuelle Hypothese, daß Acetylcholin im Pinealorgan als direkter Gegenspieler zu Noradrenalin wirkt, in dem es die Glutamatfreisetzung induziert, konnte durch die hier gewonnenen Ergebnisse nur bedingt bestätigt werden. Allerdings gibt es erste Hinweise, daß die Neuropeptide VIP und PACAP einen modulatorischen Einfluß auf Vesikelexozytosen ausüben.

Schließlich konnten in dieser Arbeit mit Hilfe eines speziellen Antikörper-Assays erstmals Vesikelexozytosen auf Einzelzellebene direkt mikroskopisch in Pinealozyten nachgewiesen werden.

Schlagwörter: synaptische Membranproteine, Vesikelexozytose, Glutamat



## Summary

Many endocrine cells, including the hormone producing cells of the pineal organ, contain small electron-lucent vesicles. These vesicles are similar to synaptic vesicles in neurons in terms of their morphology and molecular structure. Recent investigations suggest that these so-called synaptic-like microvesicles represent a new class of secretory vesicles in endocrine cells. They are thought to store and secrete neuroactive amino acids, such as glutamate, in the pineal organ and thereby may be involved in the regulation of the synthesis of melatonin.

This hypothesis is corroborated in this work by localization of further, so far in pinealocytes unknown proteins, which are involved in targeting and regulation of vesicle exocytosis in neurons (munc 18-1, csp, and SV 2A). In addition, the expression and cellular localization of various glutamate receptors (mGluR2/3 and mGluR5) and transporters (GLT-1, GLAST, and EAAC1) were investigated. Altogether, these findings confirm the concept of vesicular secretory function and of paracrine effects of their presumptive transmitters.

A study of the ontogeny of synaptic-like microvesicles demonstrates an early ontogenetic expression (E 20,5) of all synaptic proteins investigated in the gerbil pineal gland. In this early period of development these proteins may play a role in morphogenetic events, because vesicle exocytosis does not happen yet. Moreover, an accumulation of synaptic proteins was shown in dilated terminals in the second postnatal week. At the same time the rhythmic hormone secretion occurs in the pineal gland for the first time. This chronological coincidence suggests that the synaptic-like microvesicles influences the hormone secretion in pinealocytes from the beginning.

Furthermore, vesicular exocytosis was triggered by depolarising stimuli in cultured pineal cells, followed by determination of the type and the amount of released transmitters. In addition to the well-known excitatory amino acid transmitters glutamate and aspartate, I have now obtained strong evidence for release of the inhibitory transmitter glycine.

Further *in vitro*-experiments were performed in connection with previously unanswered questions of the regulation of the microvesicle-mediated exocytosis in pinealocytes. The involvement of different pineal neurotransmitters and neuropeptides in the secretion of neuroactive amino acids from synaptic-like microvesicles was investigated in these experiments. The current hypothesis, that in the pineal gland acetylcholine acts as a direkt counterpart of norepinephrine via release of glutamate, could only be partially confirmed in this work. On the other hand, there is evidence, that the neuropeptides VIP and PACAP may also exert a modulatory influence on vesicle exocytosis.

Finally, for the first time vesicular exocytosis was light-microscopically detected at the single cell level in pinealocytes by a special antibody assay. This assay has a special advantage over other exocytosis assays, because it allows long-term studies of vesicular processes.

Keywords: synaptic membrane proteins, vesicular exocytosis, glutamate

## Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ABC	Avidin-Biotin-Peroxidase-Complex
ACh	Acetylcholin
AMPA	Amino-3-Hydroxy-5-Methyl-4-Isoxazolpropionsäure
ATP	Adenosintriphosphat
$\alpha$	anti
BSA	Rinderserumalbumin
CAF	Cytosin- $\beta$ -D-Arabinofuranosid
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CGRP	<i>calcitonin-gene related peptide</i>
CSP	<i>cysteine string protein</i>
Cy2	Carbocyanin
Cy3	Indocarbocyanin
DAB	Diaminobenzidin
dest.	destilliert
DMEM	Dulbecco's modifiziertes Eagle-Medium
DOC2	<i>double</i> C2-Protein
DTT	Dithiothreitol
E	embryonal
EAAT	<i>excitatory amino acid transporter</i>
ECL	verstärkte Chemilumineszenz ( <i>enhanced chemiluminescence</i> )
EDTA	Ethylendiamin-N,N,N',N'-tetraacetat
EGTA	Ethylenglycoltetraacetatsäure
F12	Ham's Medium F12
FCS	fötale Rinderserum
FITC	Fluoreszein-Isothiocyanat
GABA	$\gamma$ -Aminobuttersäure
GFAP	saures Gliafibrillenprotein ( <i>glia fibrillary acidic protein</i> )
GLT-1	Glutamatransporter 1
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-Piperazinethan-Sulfonsäure
HIOMT	Hydroxyindol-O-Methyltransferase
HPLC	Hochdruckflüssigkeitschromatographie
HRP	Meerrettich-Peroxidase
Hsc70	70 kDa <i>heat shock cognate protein</i>
Hsp70	70 kDa <i>heat shock protein</i>
GluR	ionotroper Glutamatrezeptor
IP <sub>3</sub>	Inositol-3-Phosphat
K5-Ringer	Ringer mit 5 mM KCl
K80-Ringer	Ringer mit 80 mM KCl
K100-Ringer	Ringer mit 100 mM KCl
L:D	Licht-/Dunkelregime
lum	lumenal
Mint1 bzw. 2	<i>Munc 18-interacting protein</i>
mGluR	metabotroper Glutamatrezeptor
mRNA	<i>messenger</i> -Ribonukleinsäure
NA	Noradrenalin

NAS	N-Acetylserotonin
NAT	N-Acetyltransferase
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
NPY	Neuropeptid Y
P	postnatal
PACAP	<i>pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide</i>
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PB	Phosphatpuffer
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PFA	Paraformaldehyd
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
PVDF	Polyvinylidendifluorid
PVN	<i>Nucleus paraventricularis</i>
SCN	<i>Nucleus supraquiasmaticus</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
SNAP-25	<i>synaptosome-associated protein of Mr 25,000</i>
SNARE	SNAP-( <i>soluble NSF attachment protein</i> )-Rezeptor
SV2	Synaptisches Vesikelprotein 2
TRIS	2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3 propandiol
VIAAT	<i>vesicular inhibitory amino acid transporter</i>
VIP	vasoaktives intestinales Polypeptid

# Inhaltsverzeichnis

I.	Einleitung.....	1
	1. Anatomie des Pinealorgans .....	1
	2. Biosynthese von Melatonin .....	3
	3. Regulation der Melatoninsynthese .....	3
	4. Synaptoide Mikrovesikel in Pinealozyten .....	5
	5. Modellvorstellungen zur Vesikelexozytose.....	6
	6. Synapsenproteine während der Ontogenese des Pinealorgans .....	8
	7. Glutamaterge Kommunikation im Pinealorgan.....	9
	8. Weitere neuroaktive Aminosäuren im Pinealorgan.....	12
	9. Regulation der Vesikelexozytose: Neurotransmitter und Neuropeptide im Pinealorgan.....	12
	10. Wissenschaftliche Fragestellungen.....	16
II.	Material .....	20
	1. Chemikalien.....	20
	2. Puffer und Lösungen .....	20
	3. Antikörper.....	25
	4. Sonstige Materialien und Reagenzien .....	30
	5. Geräte .....	31
	6. Verwendete Computerprogramme .....	31

III.	Versuchstiere und Methoden .....	32
1.	Versuchstiere .....	32
2.	Immunhistochemie .....	32
2.1	Lichtmikroskopische Untersuchungen.....	33
2.1.1	Gewebeaufbereitung.....	33
2.1.2	Immunhistochemische Färbeprotokolle .....	35
2.2	Elektronenmikroskopische Untersuchungen.....	36
2.3	Gel-Elektrophorese und <i>Western Blot</i> .....	37
3.	<i>In vitro</i> -Versuche.....	39
3.1	Herstellung einer Primärzellkultur aus Pinealorganen.....	39
3.2	Exozytose- <i>Assay</i> .....	40
3.3	Untersuchungen zur Regulation der Vesikelexozytose.....	41
3.4	Quantitative Untersuchungen zur Aminosäurefreisetzung mittels HPLC .....	42
IV.	Ergebnisse .....	44
1.	Nachweis der synaptischen Membranproteine Munc 18-1, CSP und SV2 .....	44
1.1	Munc 18-1 .....	44
1.2	Cystein-String-Protein (CSP).....	50
1.3	Synaptisches Vesikelprotein 2A (SV2A).....	52
2.	Untersuchungen zum Verlauf der prä- und postnatalen Expression von Synapsenproteinen.....	53
3.	Nachweis von metabotropen Glutamatrezeptoren.....	61
3.1	mGluR2/3.....	61
3.2	mGluR5.....	65
4.	Nachweis von Glutamattransportern .....	67
4.1	GLT-1 und GLAST .....	67
4.2	EAAC1.....	71
5.	Exozytose- <i>Assay</i> .....	72
6.	Sekretion von neuroaktiven Aminosäuren und Regulation der Vesikelexozytosen... 74	
6.1	Induzierte Sekretion von Aminosäuren durch Depolarisation .....	74
6.2	Einfluß der Neurotransmitter Acetylcholin und Noradrenalin auf Vesikelexozytosen .....	78
6.3	Einfluß von Neuropeptiden auf Vesikelexozytosen.....	81

V.	Diskussion.....	86
1.	Synaptische Vesikelmembranproteine.....	87
2.	Synapsenproteine während der Ontogenese des Pinealorgans .....	92
3.	Metabotrope Glutamatrezeptoren .....	96
4.	Glutamattransporter .....	100
5.	Exozytose- <i>Assay</i> .....	103
6.	Freisetzung neuroaktiver Aminosäuren aus Pinealozyten nach Depolarisation.....	106
7.	Einfluß der Neurotransmitter Acetylcholin und Noradrenalin auf Vesikelexozytosen .....	108
8.	Einfluß von Neuropeptiden auf Vesikelexozytosen .....	112
9.	Ausblick.....	115
VI.	Zusammenfassung.....	118
VII.	Literaturverzeichnis .....	120







---

## I. Einleitung

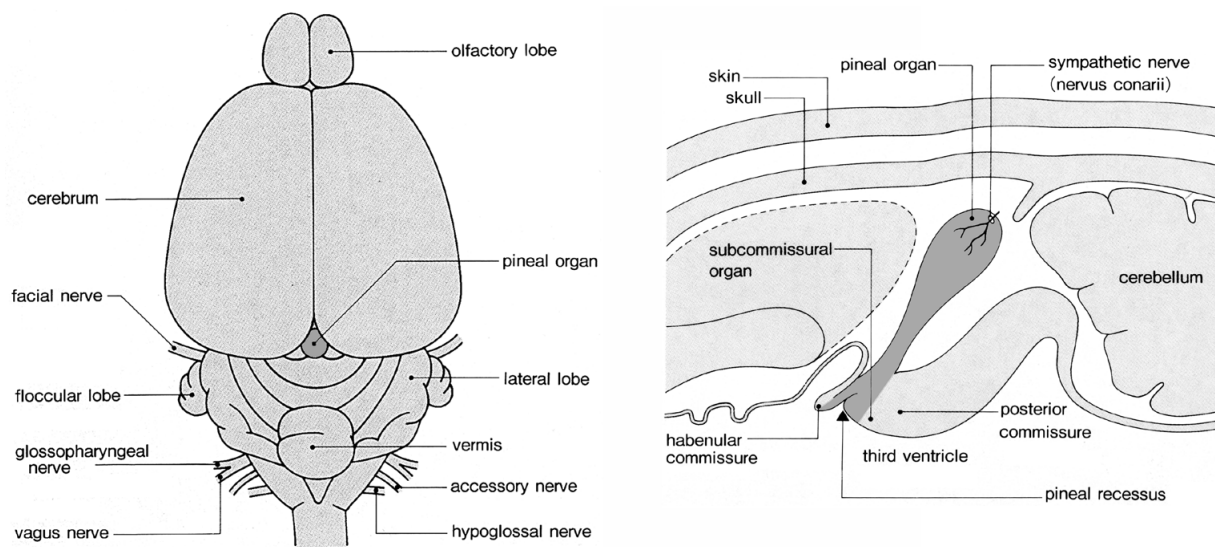
Das Pinealorgan (*Epiphysis cerebri*, Zirbeldrüse) der Säugetiere galt lange Zeit als funktionsloses Relikt des bei niederen Wirbeltieren als Lichtsinnesorgan ausgebildeten Pineal-Parietalkomplexes (STEINLECHNER 1986). Deshalb zeigten in der Vergangenheit nur wenige Wissenschaftler (STUDNICKA 1905, BARGMANN 1943) ein Interesse für dieses Organ. Das änderte sich erst, nachdem LERNER und seine Mitarbeiter 1958 ein hormonell wirksames Indolamin, das Melatonin, aus dem Pinealorgan des Rindes isoliert hatten. Seitdem wird das Pinealorgan auch bei Säugetieren eingehend untersucht. Schwerpunkte dieser Untersuchungen sind Fragestellungen zur Biosynthese von Melatonin, zu Regulations-mechanismen der Melatoninsynthese und zur Wirkung des Melatonins im Organismus.

### 1. Anatomie des Pinealorgans

Das Pinealorgan ist ein dorsales Anhangsorgan des Diencephalons und liegt bei vielen Säugetierarten zwischen den Großhirnhemisphären und dem Kleinhirn (Abb. 1). Innerhalb der Klasse der *Mammalia* sind große Unterschiede in Form und Größe des Organs zu beobachten, aber in der Regel mißt es nur wenige Millimeter (VOLLRATH 1981). Es setzt sich aus einem proximalen Stiel und einer distalen Verdickung, dem Pinealvesikel oder superfiziellen Pinealorgan, zusammen. Bei vielen Nagern, z. B. bei Hamstern und Ratten (KAPPERS 1960, SHERIDAN und REITER 1970 a, b, BOECKMANN 1980), wurde zusätzlich zum superfiziellen Pinealorgan, das den Großteil des Pinealkomplexes bei diesen Tierarten repräsentiert, ein kleines "tiefes" Pinealorgan als Verdickung des proximalen Stiels in unmittelbarer Nähe des dritten Ventrikels gefunden.

Histologisch betrachtet besteht das Pinealorgan aus Parenchym, das stark vaskularisiert ist und von Bindegewebe durchzogen sein kann. Das Parenchym setzt sich aus zwei Zellarten zusammen: Den Pinealozyten und den interstitiellen Zellen. Die sekretorisch tätigen Pinealozyten stellen den Hauptzelltyp mit einem Anteil von ca. 90%. Es sind große, helle Zellen, die durch einen dominanten Zellkern und unterschiedlich lange Fortsätze charakterisiert sind (LEONHARDT 1990). Die Fortsatzendigungen sind keulenförmig erweitert

und liegen zum Teil zwischen den Parenchymzellen, enden jedoch meistens im perivaskulären Raum (WOLFE 1965). Der zweite parenchymale Zelltyp wird durch interstitielle Zellen repräsentiert, die ca. 5 – 10% der Parenchymzellen ausmachen. Aufgrund ihrer Struktur und der molekularen Zusammensetzung werden sie auch als gliale Astrozyten bezeichnet (MILOFSKY 1957, WELSH und REITER 1978, KARASEK und REITER 1992). Sie verfügen über lange Fortsätze, die in großer Zahl im Pinealorgan vorkommen und häufig um die Kapillaren herum konzentriert sind (WARTENBERG 1968). Die Kapillaren durchziehen als dichtes Netzwerk das Pinealorgan und werden von einer doppelten Basalmembran umgeben, die den sogenannten perivaskulären Raum begrenzt (WELSH und REITER 1978). Innerhalb des perivaskulären Raumes befinden sich neben den schon erwähnten Fortsatzendigungen der Pinealozyten zahlreiche marklose sympathische Nervenfasern, die vom *Ganglion cervicale superius* aus das Pinealorgan innervieren (KAPPERS 1960, MØLLER 1992). In einigen Säugetierarten findet man im Parenchym zusätzlich auch Mastzellen, pigmenthaltige Zellen und Nervenzellen (KARASEK und REITER 1992).



**Abb. 1** Das Pinealorgan der Ratte ist ein Anhangsorgan des Zwischenhirndaches und liegt in der Regel zwischen den Hemisphären des Großhirns und dem Kleinhirn. Es besteht aus einem großen superfiziellen und einem kleinen tiefen Pinealorgan, die durch einen Stiel miteinander verbunden sind. (aus: Atlas of Endocrine Organs, Springer Verlag, 1992)

---

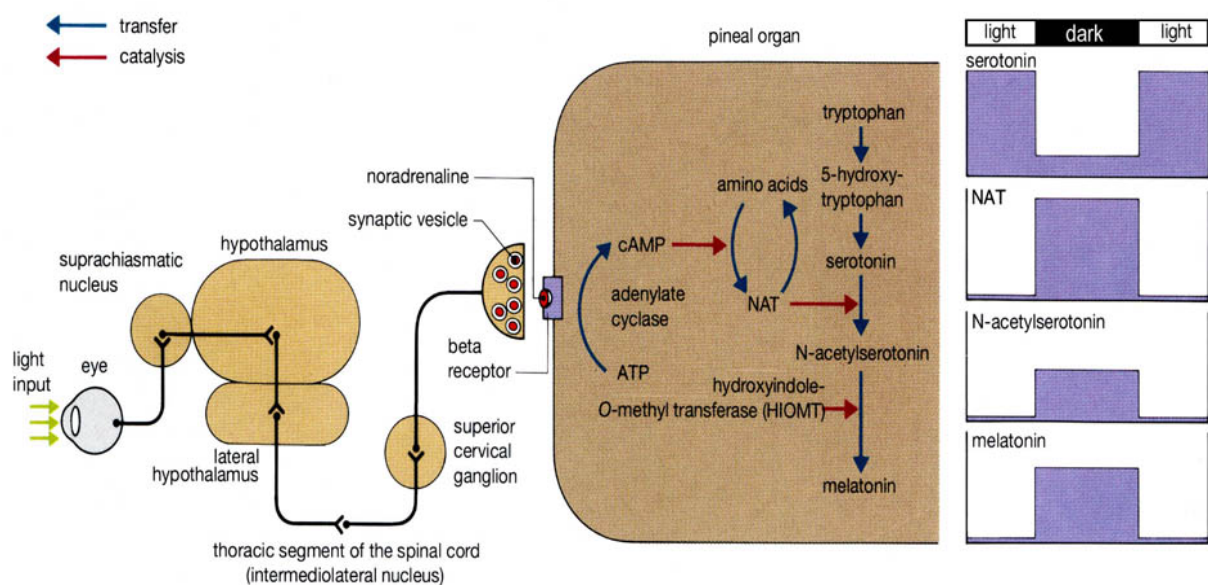
## 2. Biosynthese von Melatonin

Schon zwei Jahre nach der Isolierung des Melatonins durch LERNER *et al.* (1958) wurde von AXELROD und WEISSBACH 1960 der Syntheseweg entdeckt. Die Synthese beginnt mit der Aufnahme von Tryptophan aus dem Blutstrom in die Pinealocyten. Tryptophan wird durch das Enzym Tryptophanhydroxylase in 5-Hydroxytryptophan umgewandelt und in einem weiteren Schritt zu Serotonin decarboxyliert. Die N-Acetyltransferase (NAT), die als das Schrittmacherenzym dieses Syntheseweges gilt, bildet N-Acetylserotonin (NAS), indem es die Acetyl-Gruppe vom Acetyl-Coenzym A auf Serotonin überträgt. Die Bildung von Melatonin aus NAS katalysiert das Enzym Hydroxyindol-O-Methyltransferase (HIOMT) (Abb. 2). Das hormonelle Endprodukt Melatonin wird nicht in den Pinealocyten gespeichert, sondern kurz nach der Synthese in das Blutgefäßsystem freigesetzt.

## 3. Regulation der Melatoninsynthese

Die Melatoninsynthese steht kaum unter dem Einfluß klassischer "*feedback*"-Mechanismen, sondern wird statt dessen durch Umweltreize, insbesondere durch Licht, reguliert. Das Pinealorgan der *Mammalia* ist aber nicht selbst lichtempfindlich, sondern steht über neuronale Projektionen mit der Retina in Verbindung (Abb. 2). Nach MOORE (1978) wird die photoperiodische Information von der Retina wahrgenommen und über den retino-hypothalamischen Trakt zum paarigen *Nucleus suprachiasmaticus* (SCN) im Hypothalamus geleitet. Die weitere neuronale Verbindung führt über den *Nucleus paraventricularis* (PVN) in den *Nucleus intermediolateralis* des thorakalen Rückenmarks (SAPER *et al.* 1976). Die Axone der präganglionären sympathischen Neurone ziehen von dort zum oberen Halsganglion (*Ganglion cervicale superius*) hinauf. Die postganglionären sympathischen Nerven, die *Nervi conarii*, innervieren dann das Pinealorgan. Während der Nacht wird der Neurotransmitter Noradrenalin an den Nervenendigungen verstärkt freigesetzt. Noradrenalin vermittelt über verschiedene Rezeptoren, insbesondere über  $\beta$ -adrenerge Rezeptoren, einen Anstieg von zyklischem Adenosinmonophosphat (cAMP) in der Zelle. Der erhöhte cAMP-Gehalt induziert über eine Kaskade von Reaktionen einen Anstieg der NAT-Aktivität. Dies führt schließlich zur Synthese und Freisetzung von Melatonin. Licht hingegen hemmt die Noradrenalin-Ausschüttung und stoppt folglich die Melatoninbildung. Das Pinealorgan weist

somit einen dem Licht/Dunkel-Zyklus eines Tages entsprechenden Rhythmus in der Melatoninproduktion auf: Hohe Melatoninmengen in der Nacht stehen geringen Mengen am Tag gegenüber. Diese tagesperiodische Synthese von Melatonin stellt ein Signal dar, das zeitabhängige physiologische Prozesse im Körper (Körpertemperatur, autonome und endokrine Vorgänge, Schlaf-Wach-Rhythmus) synchronisiert (STEINLECHNER 1992).



**Abb. 2** Neuronale Regulation der Melatonsynthese im Pinealorgan der Ratte. Die photoperiodische Information (grün) wird vom Auge wahrgenommen und über einen multisynaptischen Weg unter Beteiligung des *Nucleus suprachiasmaticus* bis zum Pinealorgan geleitet. Dort setzen sympathische Nervenfasern, die vom *Ganglion cervicale superius* stammen, in Abhängigkeit vom Licht Noradrenalin frei: Hohe Konzentrationen in der Nacht und geringe Konzentrationen am Tag. Das freigesetzte Noradrenalin interagiert mit  $\beta$ -adrenergen Rezeptoren in der Pinealozystenmembran und induziert so einen intrazellulären Anstieg von cAMP. Der erhöhte cAMP-Spiegel ist verantwortlich für eine Aktivitätssteigerung des Schrittmacherenzym NAT, das den entscheidenden Schritt der Melatonsynthese katalysiert. (aus: Atlas of Endocrine Organs, Springer Verlag, 1992)

---

Licht und die dadurch induzierte Reduktion der Noradrenalin-Freisetzung aus den sympathischen Nervenendigungen scheint aber nicht der alleinige negative Regulator der Melatoninsynthese zu sein. Untersuchungen belegen, daß es zusätzlich zur lichtabhängigen Regulation der NAT-Expression auf mRNA-Ebene eine Regulation auf Proteinebene geben muß, denn die NAT-Aktivität kann beeinflußt werden, ohne daß Veränderungen auf mRNA-Ebene auftreten (ROSEBOOM *et al.* 1996, BERNARD *et al.* 1997, KLEIN *et al.* 1997). Aus diesem Grund nimmt man an, daß es weitere Regulatoren geben muß, die zusätzlich zum Noradrenalin die Melatoninsynthese beeinflussen. In der Tat hat man in den letzten Jahren zunehmend Hinweise gewonnen, die vermuten lassen, daß kleine, elektronenhelle Vesikel an der Regulation der Melatoninsynthese beteiligt sein könnten.

#### **4. Synptoide Mikrovessel in Pinealozyten**

Kleine, klare Vesikel kommen in den Pinealozyten in großen Mengen vor (DE ROBERTIS *et al.* 1961, ARSTILA 1967, WARTENBERG 1968, WELSH und REITER 1978). Sie haben einen Durchmesser von ca. 30 – 100 nm und ihr Inhalt erscheint im Elektronenmikroskop elektronenhell. Im Soma der Pinealozyten sind sie vor allem in der Nähe des Golgi-Apparates und der Plasmamembran lokalisiert. Besonders auffällig ist, daß diese Vesikel in ungewöhnlich großer Anzahl in den keulenförmig erweiterten Fortsatzendigungen der Pinealozyten akkumuliert sind (SANO und MASHIMO 1966, ARSTILA 1967, SHERIDAN und REITER 1968, PELLEGRINO DE IRALDI 1969, LUES 1971). Zahlreiche Wissenschaftler erkannten schon früh morphologische Ähnlichkeiten der beschriebenen Kompartimente mit synaptischen Vesikeln in Nervenzellen (ARSTILA 1967, WARTENBERG 1968); deshalb werden sie heutzutage als synptoide Mikrovessel (*synaptic-like microvesicle*) bezeichnet. Ähnlichkeiten zwischen den beiden Vesikeltypen wurden aber auch auf molekularer Ebene entdeckt. Studien zur molekularen Struktur der synptoiden Mikrovessel im Pinealorgan ergaben, daß zahlreiche Membranproteine der synptischen, neuronalen Vesikel auch in der Membran synptoider Mikrovessel vorhanden sind. Zu diesen synptischen Membranproteinen gehören Synptophysin (REDECKER *et al.* 1990, REDECKER und BARGSTEN 1993), Rab3a (REDECKER 1995) Synptobrevin II, Synptotagmin I, Syntaxin I (REDECKER 1996) und SNAP-25 (REDECKER *et al.* 1996). Diese Proteine sind in Neuronen an den Exo-

---

/Endozytosen der synaptischen Vesikel beteiligt und man vermutet, daß sie in der Membran der synaptoiden Mikrovesikel ähnliche Funktionen ausüben.

## 5. Modellvorstellungen zur Vesikelexozytose

In Neuronen konnten die Funktionen der Synapsenproteine und damit die molekularen Mechanismen der Exo- und Endozytose in den vergangenen Jahren teilweise geklärt werden: Zu Beginn des Exozytosevorgangs werden die transmitterhaltigen synaptischen Vesikel in der Nähe der aktiven Zonen konzentriert. In einem zweiten Schritt, dem sogenannten *docking*, heften sich einige der Vesikel an die aktive Zone an. Darauf folgt ein Reifungsprozeß (*priming*), der die synaptischen Vesikel auf eine schnelle,  $\text{Ca}^{++}$ -gesteuerte Exozytose vorbereitet. An diesem Prozeß sind das Vesikelmembranprotein Synaptobrevin und die Proteine der Plasmamembran Syntaxin und SNAP-25 beteiligt, die einen Komplex, den sogenannten SNARE- oder *core*-Komplex bilden und somit die Membranfusion einleiten. Wenn nun die Plasmamembran depolarisiert wird, öffnen sich spannungsabhängige  $\text{Ca}^{++}$ -Kanäle und es kommt zu einem räumlich begrenzten, starken Anstieg der intrazellulären  $\text{Ca}^{++}$ -Konzentration, der letztendlich die Vesikel-Exozytosen auslöst. Der relevante  $\text{Ca}^{++}$ -Rezeptor ist vermutlich Synaptotagmin, ein Membranprotein, das in allen Vesikeln vorkommt. Durch die Exozytose werden Neurotransmitter freigesetzt, die an spezifische Rezeptoren in der postsynaptischen Membran der Empfängerzelle binden und die elektrischen und/oder metabolischen Eigenschaften dieser Zelle beeinflussen. Nach der Exozytose wird die Membran der synaptischen Vesikel durch Endozytose wieder in das Nervenende aufgenommen und in den frühen Endosomen regeneriert (*recycling*). Abschließend akkumulieren die regenerierten, synaptischen Vesikel neue Transmitter und stehen dem Exo-/Endozytosezyklus wieder zur Verfügung.

Weitere, an der Vesikelexozytose beteiligte Synapsenproteine sind vermutlich Synaptophysin, Rab3a, Munc 18-1, *cysteine string protein* (CSP) und Synaptisches Vesikelprotein 2.

- Synaptophysin ist ein integrales Vesikelmembranprotein, dessen Funktion aber trotz seiner Isolierung vor über 15 Jahren bisher nur in Ansätzen verstanden wird. Man vermutet, daß es möglicherweise als molekularer Schalter dient, der die Assoziation von Synaptobrevin mit den SNARE-Proteinen der Plasmamembran reguliert (JAHN und SÜDHOF 1994).

- 
- Rab3a gehört zu den Ras-verwandten GTPasen und ist nur zeitweise an synaptische Vesikel gebunden (GEPPERT *et al.* 1994). Hier mehren sich die Hinweise, daß Rab3-Proteine ebenfalls eine Fusionskontrolle ausüben können.
  - Munc-18 ist in Neuronen im Cytosol und an der präsynaptischen Plasmamembran lokalisiert worden. Nach neueren Befunden scheint Munc-18 durch Wechselwirkung mit Syntaxin eine wichtige Rolle als negativer Regulator der Exozytose zu spielen (HATA *et al.* 1993, PEVSNER *et al.* 1994, VERHAGE *et al.* 1997).
  - *cysteine string protein* (CSP) wurde ursprünglich als synapsenspezifisches Drosophila-Protein identifiziert (ZINSMAIER *et al.* 1990), das eine charakteristische Region von 11 aufeinanderfolgenden Cysteinresten besitzt. Es ist Membranbestandteil der synaptischen Vesikel und der sekretorischen Granula in endokrinen Zellen. Mitglieder der CSP-Familie haben wahrscheinlich Chaperon-ähnliche Funktionen, indem sie Faltung oder Stabilität von Proteinkomplexen der Exozytosemaschine bewirken (CHAMBERLAIN und BURGOYNE 1997).
  - Synaptisches Vesikelprotein 2 (SV2) ist ein Glycoprotein mit 12 transmembranen Regionen, das in synaptischen und synaptoiden Vesikeln vorkommt. Es weist bemerkenswerte, molekulare Homologien zu Transporterproteinen in Hefen auf (BENNETT und SCHELLER 1994, JAHN und SÜDHOF 1994). Obwohl die Struktur und die Proteininteraktionen von SV2 viele mögliche Funktionen zulassen, bleibt seine Rolle im synaptischen Endkolben derzeit noch offen. (BUCKLEY und KELLY 1985, FEANY *et al.* 1992, CROWDER *et al.* 1999).

Der Kern dieser Modellvorstellungen von der regulierten Vesikelexozytose wird als SNARE-Hypothese bezeichnet und ist ausführlich in verschiedenen Übersichtsartikeln beschrieben worden (ROTHMAN 1994, FERRO-NOVICK und JAHN 1994, O'CONNOR *et al.* 1994, PEVSNER und SCHELLER 1994, SÜDHOF 1995, LINK und JAHN 1996, JAHN und SÜDHOF 1999).

Da einige der genannten synaptischen Membranproteine auch in Pinealozyten detektiert werden konnten (REDECKER *et al.* 1990, REDECKER und BARGSTEN 1993, REDECKER 1995, REDECKER 1996, REDECKER *et al.* 1996), ist anzunehmen, daß die synaptoiden Mikrovesikel in Pinealozyten in ähnlicher Weise wie die synaptischen Vesikel Exozytosen durchlaufen und dadurch Transmitter sezernieren, die möglicherweise an einer interzellulären Kommunikation beteiligt sind.

---

## 6. Synapsenproteine während der Ontogenese des Pinealorgans

Daten zur prä- bzw. postnatalen Expression der synaptischen Membranproteine in endokrinen Organen sind ebenfalls von großem Interesse. Sie könnten weitere Hinweise auf die Funktion der synaptoiden Mikrovesikel liefern und zudem Gemeinsamkeiten und Unterschiede in der entwicklungsabhängigen Expression dieser Proteine aufdecken.

Bisher stehen jedoch hinsichtlich dieser Fragestellung kaum Daten zur Verfügung. Es gibt lediglich eine Veröffentlichung von FUJIEDA *et al.* (1997), in der die embryonale Entwicklung des Pinealorgans der Ratte unter Berücksichtigung der Expression von Synaptophysin beschrieben wird.

Im Gegensatz dazu wurden im Nervensystem zahlreiche Untersuchungen durchgeführt, die sich mit der Ontogenese der synaptischen Vesikel und ihren Membranproteinen beschäftigt haben (LECLERC *et al.* 1989, BERGMANN *et al.* 1991, GRABS *et al.* 1994, BARK *et al.* 1995, STETTLER *et al.* 1996, CONFALONI *et al.* 1997, BERGMANN *et al.* 1999). Die Ergebnisse dieser Arbeiten lassen sich insofern zusammenfassen, daß in allen untersuchten Gehirnregionen einige der Synapsenproteine sehr frühzeitig in der embryonalen Entwicklung exprimiert werden, während andere erst viel später erscheinen. Zu den frühen Synapsenproteinen gehören die SNARE-Proteine Syntaxin, SNAP-25, Synaptobrevin sowie Synaptotagmin, Synaptophysin und SV2. Sie konnten schon vor der eigentlichen Synaptogenese in auswachsenden Axonen und ihren Wachstumskegeln lokalisiert werden (MATTEOLI *et al.* 1992, GARCIA *et al.* 1995, LITTLETON *et al.* 1995, SESACK and SNYDER 1995). OSEN-SAND *et al.* (1993) und IGARASHI *et al.* (1996) haben nachgewiesen, daß diese frühen Synapsenproteine an der axonalen Entwicklung der Neuronen beteiligt sind, in dem sie Membranzuwächse in den Neuriten und Wachstumskegeln regulieren. Während einige synaptische Membranproteine demzufolge schon vor der Synaptogenese morphogenetische Vorgänge steuern, werden andere Membranproteine erst nach der Synaptogenese hochreguliert. Zu diesen Synapsenproteinen gehören Rab3a und Dynamin (STETTLER *et al.* 1996, BERGMANN *et al.* 1999, NOAKES *et al.* 1999). Sie werden erst dann in den Nervenendigungen akkumuliert, wenn erhöhte exozytotische Aktivitäten einen schnell verfügbaren Vesikelpool in der Nähe der aktiven Zone erfordern.



---

## 7. Glutamaterge Kommunikation im Pinealorgan

Seit einiger Zeit wird vermutet, daß in den synaptoiden Mikrovesikeln neuroaktive Aminosäuren, z.B. Glutamat, gespeichert werden. Diese Vermutung stützt sich auf das bereits etablierte Wissen, daß Glutamat a) in hohen Konzentrationen im Pinealorgan vorkommt (NIR *et al.* 1973, 1974, MCNULTY *et al.* 1990) und b) im Gehirn und im Rückenmark als wichtigster erregender Transmitter fungiert. Man nimmt an, daß Glutamat auch im Pinealorgan in ähnlicher Weise an einer interzellulären Kommunikation beteiligt ist. Für eine solche parakrine, glutamaterge Kommunikation müssen allerdings folgende Voraussetzungen im Pinealorgan gegeben sein:

1. Speicherung von Glutamat in Vesikeln
2. Sekretion des Glutamats durch regulierte Vesikelexozytosen
3. Zielzellen, die mit entsprechenden Glutamatrezeptoren ausgestattet sind
4. nachweisbare Wirkung von Glutamat auf diese Zielzellen
5. Transport- oder Degradationssysteme, die die Transmitterwirkung beenden.

### Zu 1. Speicherung von Glutamat in Vesikeln

Für eine Speicherung von Glutamat in den synaptoiden Vesikeln der Pinealocyten sprechen mehrere Hinweise. REDECKER und VEH (1994) z.B. konnten in einer immunhistochemischen Arbeit zeigen, daß sowohl auf lichtmikroskopischer als auch auf elektronenmikroskopischer Ebene eine positive Korrelation von Glutamat-Immunfärbung und Vesikelhäufigkeit besteht. Außerdem wurde ein vesikulärer Glutamattransporter und eine daran gekoppelte vesikuläre ATPase nachgewiesen, die die Aufnahme von Glutamat entgegen einem Konzentrationsgradienten in die synaptoiden Mikrovesikeln bewerkstelligen könnten (MORIYAMA und YAMAMOTO 1995 a, b, YAMADA *et al.* 1996).

Auch in anderen endokrinen Organen akkumulieren synaptoiden Mikrovesikel klassische Neurotransmitter. So werden z.B. Acetylcholin in PC12-Zellen (MELEGA und HOWARD 1984, BAUERFEIND *et al.* 1993),  $\gamma$ -Aminobuttersäure (GABA) in den  $\beta$ -Zellen des endokrinen Pankreas (THOMAS-REETZ *et al.* 1993, GASKINS *et al.* 1995) und Katecholamine in den chromaffinen Zellen des Nebennierenmarks (ANNAERT *et al.* 1993) mikrovesikulär gespeichert.

### Zu 2. Sekretion von Glutamat

Die Sekretion von Glutamat aus den synaptoiden Mikrovesikeln wurde im Zellkultursystem untersucht (YAMADA *et al.* 1996). Durch Depolarisation der Pinealocyten mit erhöhten KCl-Konzentrationen konnte eine Freisetzung von Glutamat hervorgerufen werden. Die Sekretion ist  $\text{Ca}^{++}$ -abhängig und kann durch  $\text{Ca}^{++}$ -Kanal-Blocker inhibiert werden. Eine Hemmung der Glutamatausschüttung kann ebenfalls erzielt werden, wenn man Botulinum-Neurotoxin E einsetzt. Dieses Neurotoxin spaltet das SNARE-Protein SNAP-25, so daß keine Vesikelexozytosen mehr stattfinden können. Die Eigenschaften der Sekretion ähneln damit der Exozytose von synaptischen Vesikeln in Nervenzellen (SÜDHOF 1995).

### Zu 3. Glutamatrezeptoren

Im Nervensystem wird die Wirkung von Glutamat durch Glutamatrezeptoren vermittelt. Es kommen eine Vielzahl verschiedener Glutamatrezeptoren im Gehirn vor, die man aufgrund ihrer Wirkungsweise in ionotrope und metabotrope Rezeptoren einteilt. Ionotrope Rezeptoren vermitteln als Ionenkanäle eine schnelle excitatorische Neurotransmission. Mindestens drei verschiedene Typen werden unterschieden, die sich in der Affinität gegenüber Glutamat-analoga unterscheiden: N-Methyl-D-Aspartat-(NMDA)-Rezeptoren,  $\alpha$ -Amino-3-Hydroxy-5-Methyl-4-Isoxazolpropionsäure-(AMPA)-Rezeptoren und Kainat-Rezeptoren. Die metabotropen Glutamatrezeptoren, die erst in den letzten Jahren charakterisiert wurden, bewirken hingegen über verschiedene *second messenger*-Systeme langfristige Modulationen der Neurotransmission. Hier unterscheidet man wiederum drei Klassen: Klasse I-Rezeptoren (mGluR1, mGluR5) bewirken durch die Hydrolyse von Phospholipiden eine  $\text{Ca}^{++}$ -Freisetzung aus intrazellulären Speichern, während die Klasse II-(mGluR2, mGluR3)- und Klasse III-(mGluR4, mGluR6, mGluR7, mGluR8)-Rezeptoren über inhibitorische G-Proteine die Adenylatzyklase hemmen und somit den cAMP-Spiegel senken.

Im Pinealorgan wurden Bindungsstellen für Glutamat erstmals 1986 von EBADI *et al.* und GOVITRAPONG *et al.* beschrieben. In der darauffolgenden Zeit gab es einige Untersuchungen mit zum Teil widersprüchlichen Ergebnissen: KUS *et al.* (1993) stellten fest, daß die Bindungsstelle keinem der zu der Zeit bekannten Glutamatrezeptortypen NMDA, AMPA und Kainat zuzurechnen war. SATO *et al.* (1993) wiesen im Pinealorgan der Ratte NMDA- und Kainat-Rezeptoren nach, konnten aber keine AMPA-Rezeptoren detektieren. MICK (1995) hingegen lokalisierte AMPA-Rezeptorsubtypen auf Gliazellen im Pinealorgan von Makaken. 1998 wurde dann erstmals ein metabotroper Glutamatrezeptor, der mGluR3, im Pinealorgan

---

der Ratte entdeckt (YAMADA *et al.* 1998). mGluR3 gehört der Klasse II der metabotropen Glutamatrezeptoren an und vermittelt aufgrund dessen seine Wirkung über ein inhibierendes G-Protein, das den cAMP-Spiegel in der Zelle senkt.

#### Zu 4. Wirkung von Glutamat

Glutamat führt in Pinealozyten bei gleichzeitiger Stimulation durch Noradrenalin zu einer Hemmung des Schlüsselenzyms der Melatonin synthese, der N-Acetyltransferase (NAT), (GOVITRAPONG UND EBADI 1988) und damit zu einer Senkung der Melatoninproduktion und –sekretion (KUS *et al.* 1994). YAMADA *et al.* (1998) konnten diese Glutamatwirkung auf Pinealozyten bestätigen. Darüber hinaus hat diese Arbeitsgruppe Hinweise auf eine Beteiligung des metabotropen Glutamatrezeptors mGluR3 an der Regulation der Hormonsynthese gefunden: Erstens zeigten Agonisten und Antagonisten für Klasse II-Rezeptoren ähnliche Effekte wie Glutamat. Zweitens ist mGluR3 funktionell über inhibitorische G-Proteine an die Adenylatzyklase gekoppelt, die in Gegenwart von Glutamat den cAMP-Spiegel senkt. Da Noradrenalin durch eine Erhöhung der cAMP-Konzentration in Pinealozyten die NAT-Aktivität stimuliert, könnte Glutamat aufgrund der beschriebenen Befunde diesem Effekt direkt entgegenwirken. Es wäre somit ein möglicher negativer Regulator der NAT-Aktivität und letztendlich der Melatonin synthese.

#### Zu 5. Glutamattransporter

Um eine schnelle und fehlerfreie Signalübertragung gewährleisten zu können, muß ein freigesetzter Neurotransmitter nach seiner Wirkung an entsprechenden postsynaptischen Rezeptoren unverzüglich inaktiviert werden. Das kann über Enzyme erfolgen, die, wie im Fall des Acetylcholins, den Neurotransmitter abbauen. Eine weitere Möglichkeit der Inaktivierung stellen Transporterproteine dar, die den Neurotransmitter aus dem synaptischen Spalt in benachbarte Zellen transportieren. Im Nervensystem kommen verschiedene Glutamattransporter vor, die zu einer Familie von natriumabhängigen Plasmamembran-Transportern gehören und eine starke Affinität für Glutamat besitzen (ROTHSTEIN *et al.* 1994, 1996, KANAI *et al.* 1995; LEHRE *et al.* 1995; SCHMITT *et al.* 1996; VELAZ-FAIRCLOTH *et al.* 1996). Der im zentralen Nervensystem am häufigsten vorkommende Glutamattransporter GLT-1 wird von Gliazellen exprimiert. GLAST, ein weiterer Glutamattransporter, wurde ebenfalls auf Gliazellen detektiert, ist aber eher im peripheren Nervensystem zu finden. Zu der gleichen Transporterfamilie gehört auch EAAC1, der im Gegensatz zu den beiden anderen

---

Transportern in Neuronen exprimiert wird. Kürzlich konnte GLT-1 auch im Pinealorgan nachgewiesen werden (YAMADA *et al.* 1997).

Zusammenfassend kann man feststellen, daß das Pinealorgan alle Voraussetzungen für ein glutamaterges Kommunikationssystem besitzt, das möglicherweise über parakrine oder autokrine Mechanismen Einfluß auf die Hormonsynthese nimmt.

### **8. Weitere neuroaktive Aminosäuren im Pinealorgan**

Zusätzlich zu Glutamat werden während der vesikelvermittelten Exozytose auch beträchtliche Mengen Aspartat im Pinealorgan freigesetzt. Diese Sekretion ist ebenfalls  $\text{Ca}^{++}$ -abhängig und kann durch Depolarisation der Pinealzellen stimuliert werden (YATSUSHIRO *et al.* 1997). Die Wirkung von Aspartat entspricht der von Glutamat, denn es hemmt die Noradrenalin-stimulierte NAT-Aktivität (GOVITRAPONG und EBADI 1988) und senkt dosisabhängig die Melatoninsynthese (YAMADA *et al.* 1997). Daraus kann man schließen, daß Aspartat *und* Glutamat an der negativen Regulation der Hormonsynthese im Pinealorgan beteiligt sein könnten.

Schließlich erfüllt auch GABA im Pinealorgan alle Kriterien einer parakrin wirksamen Substanz (EBADI *et al.* 1984, EBADI und CHAN 1980, CARDINALI *et al.* 1987, ROSENSTEIN *et al.* 1989 a, b, REDECKER 1999).

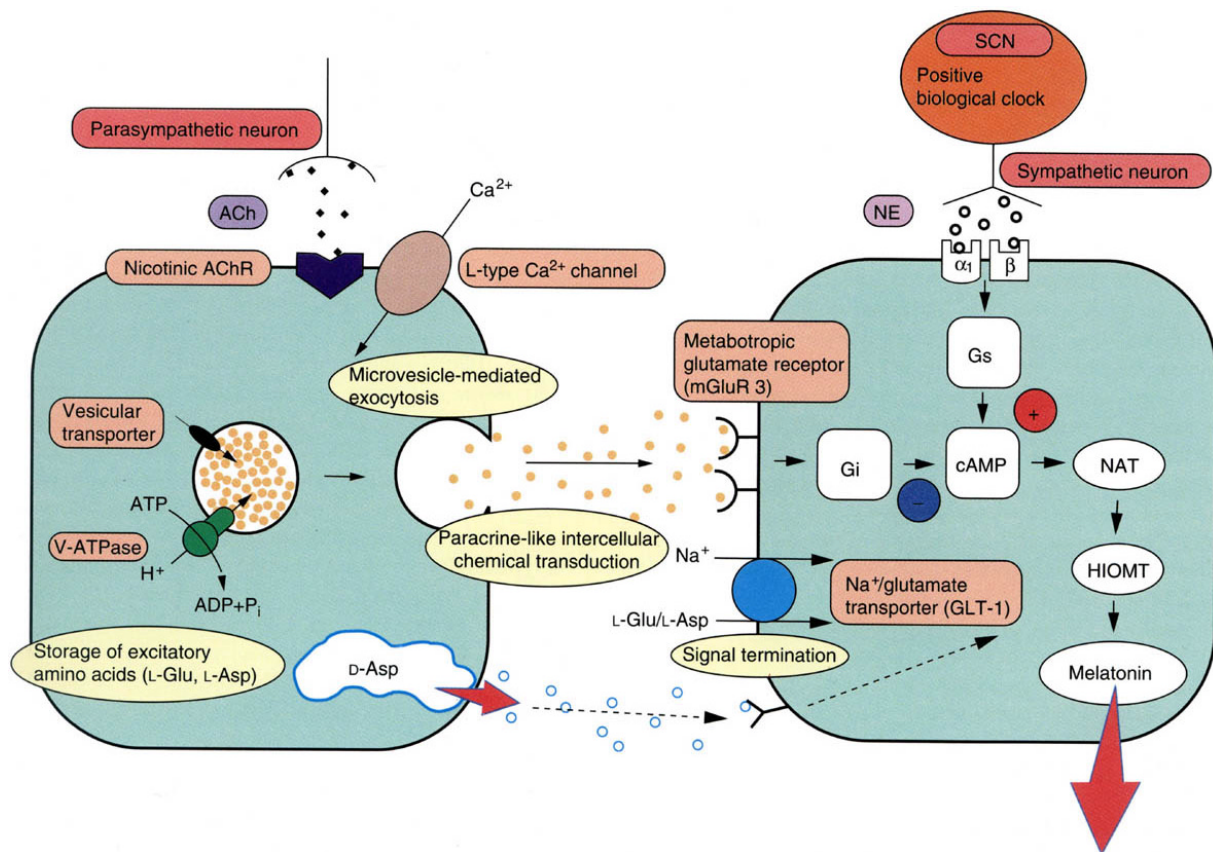
### **9. Regulation der Vesikelexozytose: Neurotransmitter und Neuropeptide im Pinealorgan**

Man weiß nun schon seit langem, daß Glutamat und andere neuroaktive Aminosäuren die Noradrenalin-stimulierte Melatoninsynthese hemmen können (s.o.). Doch die Regulationsmechanismen der Exozytose synaptoider Vesikel, die zur Freisetzung der neuroaktiven Aminosäure führen, sind bis heute nur in Ansätzen untersucht. Allerdings wird vermutet, daß eine zentrale Innervierung des Pinealorgans einen regulativen Einfluß auf die vesikelvermittelte Sekretion von intrapinealen Botenstoffen ausüben könnte. Zu dieser zentralen Innervierung gehören pinealopetale Nervenfasern aus dem Telencephalon und dem Mesencephalon, die durch das tiefe Pinealorgan und dem Pinealstiel in das superfizielle

---

Pinealorgan eindringen (MØLLER 1992). Außerdem gibt es deutliche morphologische und immunhistochemische Hinweise für eine parasympathische Innervation, die vom *Ganglion pterygopalatinum* kommend das Pinealorgan zahlreicher Säugetierarten innerviert und Acetylcholin (ACh) als Neurotransmitter verwendet (MØLLER 1992, LAITINEN *et al.* 1995). Durch die immunhistochemische Detektion der Cholin-Acetyltransferase, dem Enzym, das die Synthese von Acetylcholin katalysiert, konnte ein parasympathisches Netzwerk von Nervenfasern im perivaskulären Raum und zwischen den Pinealozyten lokalisiert werden. Diese Fasern dringen sowohl vom proximalen als auch vom distalen Pol in das Organ ein (PHANSUWAN-PUJITO *et al.* 1990, 1991).

Aufgrund dieser und weiterer Befunde wurde in den letzten Jahren eine Hypothese entwickelt (LETZ *et al.* 1997, YAMADA *et al.* 1998, SCHOMERUS und KORF 1999), die eine Beteiligung von Acetylcholin an der Regulation der Vesikelexozytosen in den Pinealozyten erwägt. Man hat muskarinerge ACh-Rezeptoren gefunden, die auf sympathischen Nervenendigungen lokalisiert sind und die Freisetzung von Noradrenalin regulieren (GOVITRAPONG *et al.* 1989, PUJITO *et al.* 1991, DRIJFHOUT *et al.* 1996). Außerdem wurden auch nicotinerge ACh-Rezeptoren im Pinealorgan detektiert (STANKOV *et al.* 1993). Der nicotinerge ACh-Rezeptor, der von Pinealozyten exprimiert wird (REUSS *et al.* 1992), ist direkt an einen unselektiven Kationenkanal gekoppelt, der hauptsächlich  $\text{Na}^+$ -Ionen transportiert. Durch die Bindung von Acetylcholin verursacht der Rezeptor auf Pinealozyten eine  $\text{Na}^+$ -abhängige Depolarisation der Zelle. Diese Depolarisation aktiviert dann  $\text{Ca}^{++}$ -Kanäle vom L-Typ, die eine intrazelluläre Erhöhung des  $\text{Ca}^{++}$ -Gehaltes bewirken (SCHOMERUS *et al.* 1995, 1999). Man vermutet, daß dieser Anstieg der  $\text{Ca}^{++}$ -Konzentration in den Pinealozyten Vesikelexozytosen auslösen kann, die letztendlich zur Freisetzung von Glutamat führen (LETZ *et al.* 1997, YAMADA *et al.* 1998, SCHOMERUS und KORF 1999). Nach dieser Hypothese wäre mit Acetylcholin erstmals ein Kandidat für die Regulation der Vesikelexozytose in den Pinealozyten gefunden.



**Abb. 3** Modell eines glutamatergen Systems in Pinealozyten. Diese Darstellung faßt die Regulation der vesikulären Exozytosen und die Beteiligung von Glutamat an der Regulation der Melatoninsynthese zusammen. Man vermutet, daß jeder Pinealozyt die molekularen Voraussetzungen für einen *Signal-Output* (Mikrovesikel und darin gespeicherte Botenstoffe) und *-Input* (Rezeptoren und Proteine der intrazellulären Signaltransduktion) besitzt. Somit könnte Glutamat entweder als parakriner oder autokriner Mediator wirken. Acetylcholin (ACh), Acetylcholin-Rezeptor (AChR), inhibitorisches G-Protein (Gi), stimulierendes G-Protein (Gs), N-Acetyltransferase (NAT), Hydroxyindol-O-Methyltransferase (HIOMT), Noradrenalin (NE), *Nucleus suprachiasmaticus* (SCN),  $\alpha$ - und  $\beta$ -adrenerge Rezeptoren ( $\alpha_1$ ,  $\beta_1$ ) (nach MORIYAMA *et al.* 2000)

Es ist anzunehmen, daß es zusätzlich zum Acetylcholin noch weitere Substanzen im Pinealorgan gibt, die einen Einfluß auf die Exozytosevorgänge in Pinealozyten haben könnten. In den letzten Jahren wurden eine Vielzahl von Neuropeptiden im Pinealorgan zahlreicher Säugtierarten entdeckt. Die Neuropeptide wurden entweder in Nervenfasern oder in parenchymalen Pinealzellen lokalisiert. Es gibt vermehrt Hinweise, daß sie an der Regulation der Pinealfunktion beteiligt sein könnten:

- 
- Neuropeptid Y (NPY), ein Neuropeptid aus 36 Aminosäuren, kommt in großen Konzentrationen im Pinealorgan vor. Es wurde vor allem in den sympathischen Nervenfasern lokalisiert, die vom *Ganglion cervicale superius* aus das Pinealorgan innervieren (SIMONNEAUX 1995, MØLLER *et al.* 1996). Eine Kolo-kalisation von Noradrenalin und NPY wurde in 80% der Nervenfasern gefunden (MØLLER *et al.* 1996). Einige wenige NPY-positive Fasern im proximalen Bereich des superfiziellen Organs, sowie im Pinealstiel und im tiefen Pinealorgan scheinen zentralen Ursprungs zu sein (ZHANG *et al.* 1991). Bindungsstellen für das Neuropeptid wurden auf der präsynaptischen Membran der noradrenergen Nervenendigungen und auf Pinealozyten lokalisiert. Die Bindung von NPY an diese Rezeptoren führt zur Hemmung des Noradrenalin-stimulierten Anstiegs von cAMP und damit zur Hemmung der Melatonin-synthese (OLCESE 1991, SIMONNEAUX *et al.* 1994).
  - Auch das vasoaktive intestinale Peptid (VIP) ist im Pinealorgan aller bisher untersuchten Tierarten detektiert worden. Allerdings wird das Pinealorgan von nur wenigen VIP-positiven Nervenfasern innerviert. Diese haben parasymphathischen Charakter und ziehen wahrscheinlich vom *Ganglion pterygopalatinum* oder vom otischen Ganglion in das Pinealorgan (SHIOTANI *et al.* 1986). VIP bewirkt, im Gegensatz zu NPY, eine Stimulation der Melatonin-synthese (MØLLER und MIKKELSEN 1992, MØLLER 1994).
  - PACAP (*pituitary adenylate cyclase-activating peptide*) liegt im Pinealorgan in zwei Formen (27 Aminosäuren und 38 Aminosäuren) vor (MIYATA *et al.* 1990). Die PACAP-haltigen Nervenfasern stammen vermutlich aus dem *Ganglion trigeminale* und dringen zusammen mit den *Nervi conarii* am distalen Pol in das Pinealorgan ein (MØLLER *et al.* 1999). Der Gehalt an PACAP im Pinealorgan ist am Tag gering und in der Nacht erhöht (FUKUHARA *et al.* 1998). Die Melatonin-synthese wird durch das Neuropeptid, in ähnlicher Weise wie durch VIP, positiv beeinflusst (SIMONNEAUX *et al.* 1993).
  - Die Konzentrationen von Somatostatin im Pinealorgan unterliegen ebenfalls tageszeitlichen und saisonalen Schwankungen (SIMONNEAUX *et al.* 1996), aber die funktionelle Rolle des Neuropeptids konnte bisher nicht geklärt werden. Somatostatin ist in Nervenfasern und auch zellulär in Pinealozyten-ähnlichen Zellen lokalisiert worden (MØLLER *et al.* 1995).
  - Eine geringe Innervation von Substanz P-haltigen Nervenfasern unbekanntem Ursprungs wurde im Pinealorgan beobachtet (RØNNEKLEIV und KELLY 1984, SHIOTANI *et al.* 1986). Effekte dieser Innervation sind gegenwärtig noch unbekannt.

- 
- Nervenfasern, die das Neuropeptid CGRP (*calcitonin-gene related peptide*) enthalten und vermutlich aus dem *Ganglion trigeminale* stammen, sind zahlreich und gleichmäßig im Parenchym des Pinealorgans verteilt (SHIOTANI *et al.* 1986).
  - Außerdem kommen opioide Neuropeptide (SCHRÖDER *et al.* 1988, MØLLER *et al.* 1991, COTO-MONTES *et al.* 1994) regelmäßig im Pinealorgan vor.

Die Existenz einer solchen Vielzahl von Neuropeptiden im Pinealorgan deutet auf eine komplexe Steuerung der pinealen Funktion hin. Es stellt sich die Frage, ob einige dieser Neuropeptide auch an der Regulation der Vesikelexozytosen in Pinealozyten beteiligt sind und auf diesem Wege, durch Sekretion von neuroaktiven Aminosäuren, ihre regulativen Einflüsse ausüben.

## 10. Wissenschaftliche Fragestellungen

Die hier zusammengefaßten Untersuchungen der letzten Jahre führten zu dem Konzept eines parakrinen Kommunikationssystems im Pinealorgan, das vermutlich die Funktion des Organs, nämlich die Melatoninsynthese und –sekretion, reguliert. An diesem parakrinen Mechanismus sind die synaptoiden Mikrovesikel der Pinealozyten wahrscheinlich maßgeblich beteiligt. Bis heute wird aber die Funktion der synaptoiden Vesikel im Pinealorgan nicht vollständig verstanden. Ziel dieser Arbeit ist es deshalb, einen Beitrag zur Klärung der funktionellen Bedeutung der synaptoiden Mikrovesikel für die parakrine Regulation der Pinealfunktion zu leisten. Zu diesem Zweck wurden in der vorliegenden Arbeit folgende Fragestellungen bearbeitet:

1. Um das Ausmaß der molekularen Gemeinsamkeiten wie auch der Unterschiede zwischen den synaptischen und synaptoiden Vesikeln vollständig zu erfassen, ist es sinnvoll das Pinealorgan auf das Vorkommen möglichst vieler der bisher bekannten Membranproteine, denen eine Rolle bei der Regulation der synaptischen Vesikelexozytose zugesprochen wird, zu analysieren. In dieser Arbeit wurde die Expression der Synapsenproteine Munc 18-1, CSP und SV2A und ihre zelluläre Verteilung im Pinealorgan mit immun-histochemischen Methoden untersucht.



- 
2. Außerdem fehlen gegenwärtig noch Daten zur prä- bzw. postnatalen Expression der synaptischen Membranproteine in endokrinen Organen, die ebenfalls Hinweise auf die Funktion der synaptoiden Mikrovesikel liefern und zudem Gemeinsamkeiten und Unterschiede in der entwicklungsabhängigen Expression dieser Proteine aufdecken könnten. Aus diesem Grund wurden in der vorliegenden Arbeit erstmals die Expressionsmuster von sechs Synapsenproteinen über einen längeren Entwicklungszeitraum von der embryonalen Entwicklung (E 20,5) bis zum adulten Stadium (P 38) vergleichend untersucht. Die untersuchten Proteine waren Synaptophysin, das vesikuläre SNARE-Protein Synaptobrevin, das SNARE-Protein der Plasmamembran SNAP-25 und die vesikelassoziierten Proteine Munc 18-1, Rab3a und CSP.
  3. Da es mittlerweile deutliche Anhaltspunkte dafür gibt, daß in den synaptoiden Mikrovesikeln der Pinealocyten neuroaktive Aminosäuren wie z.B. Glutamat gespeichert werden, erscheint eine parakrine Funktion der Mikrovesikel bzw. ihrer Signalmoleküle wahrscheinlich. Kenntnisse über die Expression von Rezeptor- und Transporterproteinen für Glutamat im Pinealorgan, die Hinweise auf die Zielzellen und die Art der parakrinen Regulation liefern könnten, sind deshalb von großem Interesse. Da insbesondere Studien zur eindeutigen zellulären Lokalisation dieser Proteine im Pinealorgan fehlen, wurden in dieser Arbeit sowohl die metabotropen Glutamatrezeptoren mGluR2/3 und mGluR5 als auch die neuronalen Glutamatttransporter GLT-1, GLAST und EAAC1 auf zellulärer Ebene analysiert.
  4. Ferner sind bisher keine experimentellen Untersuchungen durchgeführt worden, die einen direkten, mikroskopisch erfaßbaren Nachweis von Exo-/Endozytosezyklen synaptoider Mikrovesikel in endokrinen Zellen *in vitro* erbracht hätten. Zu diesem Zweck wurde ein für kultivierte Hippocampuszellen entwickelter Exozytose-Assay auf Pinealocytenkulturen übertragen.
  5. Vor kurzem konnte erstmals die Sekretion von Glutamat aus kultivierten Rattenepinealocyten gemessen werden (YAMADA *et al.* 1996). Da es jedoch bisher weder umfassende Untersuchungen zur Freisetzung weiterer neuroaktiver Aminosäuren noch derartige Studien an anderen Tierarten gibt, wurden sie erstmals in der vorliegenden Arbeit durchgeführt.

- 
6. In den letzten Jahren wurden mit biochemischen Methoden erste Untersuchungen zur Regulation der Vesikelexozytosen in Pinealozyten durchgeführt. Diese beschränkten sich jedoch überwiegend darauf, einen regulatorischen Einfluß von Acetylcholin nachzuweisen. Bisher gibt es keine Hinweise darauf, ob oder inwieweit andere Neurotransmitter, z.B. Noradrenalin, oder im Pinealorgan vorkommende Neuropeptide an der Regulation der Vesikelexozytosen beteiligt sind. Deshalb wurde die Wirkung der Neurotransmitter Acetylcholin und Noradrenalin sowie der Neuropeptide PACAP, VIP, Neuropeptid Y, CGRP, Substanz P und Somatostatin auf die Aminosäurefreisetzung aus kultivierten Pinealozyten untersucht.

Für alle durchgeführten Untersuchungen wurde als Tiermodell die mongolische Wüstenrennmaus (*Meriones unguiculatus*) verwendet, die in der anglo-amerikanischen und vermehrt auch in der deutschsprachigen Literatur als *gerbil* bezeichnet wird. Das Pinealorgan des Gerbils eignet sich besonders gut für das Studium synaptoider Mikrovesikel, da diese in großer Zahl in den Pinealozyten zu finden sind und zudem in den Fortsatzendigungen akkumuliert werden. Außerdem sind *dense-core*-Vesikel oder sekretorische Granula in den Pinealozyten selten, die verschiedene Untersuchungen erschweren würden. Da andere Arbeitsgruppen die Ratte als Tiermodell verwendet haben, wurden viele der beschriebenen Untersuchungen in dieser Arbeit parallel an Ratten durchgeführt, um die Ergebnisse vergleichen und mögliche Speziesunterschiede aufdecken zu können.



---

## II. Material

### 1. Chemikalien

Die Chemikalien wurden, soweit nicht anders vermerkt, von Merck, Darmstadt, Sigma, Taufkirchen oder Riedel-de Haën, Seelze bezogen.

### 2. Puffer und Lösungen

#### Lichtmikroskopische Untersuchungen

##### *blocking*-Puffer

2% Ziegen-Normalserum

in 0,01 M phosphatgepufferte Saline (PBS, pH 7,4)

##### Diaminobenzidin-(DAB-)Lösung

0,02% DAB

0,3% Ammoniumnickelsulphat

0,003% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

in 0,01 M PBS (pH 7,4)

##### Methanol/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

100% Methanol

1% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

##### Paraformaldehyd (PFA) für

- Gewebefixierung

4% PFA

in 0,1 M Phosphatpuffer (PB, pH 7,4)

- Fixierung von Gefrierschnitten

0,5% PFA

in 0,1 M PB (pH 7,4)

##### Sucroslösung

30% Saccharose

in 0,1 M PB (pH 7,4)

---

## Elektronenmikroskopische Untersuchungen

### Homogenisierungspuffer

- 0.25 M Saccharose
- 25 mM KCl
- 5 mM MgCl<sub>2</sub>
- 2 mM Ethylenglycoltetraacetatsäure (EGTA)
- in 10 mM Natrium-Phosphatpuffer (pH 7,4)

### Fixierlösungen für

- Zellhomogenate
  - 3% PFA
  - 0,25% Glutaraldehyd
  - in 5 mM Natrium-Phosphatpuffer (pH 7,4)
- Agarose-Blöcke
  - 1% Glutaraldehyd
  - in 120 ml Natrium-Phosphatpuffer (pH 7,4)

### *blocking*-Puffer

- 1% Ziegen-Normalserum
- 50 mM Glycin
- 0,1% Gelatine
- 0,1% Rinderserumalbumin (BSA)
- 0,05% Saponin
- 0.02% Natriumazid
- in 0,15 M PBS (pH 7,4)

## Gel-Elektrophorese und *Western Blot*

### Extraktionspuffer (pH 6,8)

- 20 mM Tris(hydroxymethyl)aminomethan (TRIS)
- 1% Natriumdodecylsulphat (SDS)
- 5 mM Ethylendiamintetraacetat (EDTA)
- 0,5% Triton X-100
- 20 ml Protease-Inhibitor-Cocktail (Sigma, Taufkirchen)
- in 50 ml Aqua dest.

## 2 x SDS-Probenpuffer (pH 6,8)

125 mM TRIS  
140 mM SDS  
20% Glycerol  
200 mM Dithiothreitol (DTT)  
30 mM Bromphenolblau  
in 10 ml Aqua dest.

## TRIS-Glycin-Puffer

- Kathodenpuffer  
28 mM TRIS  
190 mM Glycin  
0,1% SDS  
in 1 l Aqua dest.

- Anodenpuffer  
25 mM TRIS  
190 mM Glycin  
in 1 l Aqua dest.

## Transferpuffer (pH 8,3)

25 mM TRIS  
192 mM Glycin  
0,1% SDS  
in 20% Methanol

*blocking*-Puffer

5% Milchpulver  
in PBS (pH 7,3)

---

***In vitro*-Versuche**

## HEPES-Medium

DMEM/F12-(1:1)-Pulvermedium

100 IU/ml Penicillin

100 µg/ml Streptomycin

0,25 µg/ml Amphotericin B

20 mM HEPES

8 mM NaHCO<sub>3</sub>

in 1 l Aqua dest.

pH 7,3 durch Zusatz von 1 N NaOH bzw. 1 N HCl

## Nährmedium (pH 7,3)

HEPES-Medium

10% fötales Rinderserum

## Trypsin-Lösung

0,25% Trypsin

in PBS A (pH 7,3)

## Phosphat-gepufferte Saline A (PBS A)

8 g NaCl

200 mg KCl

200 mg KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>1,15 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

in 1 l Aqua dest.

pH 7,3 durch Zusatz von 1 N NaOH bzw. 1 N HCl

## K5-Ringer

128 mM NaCl

5 mM KCl

2,7 mM CaCl<sub>2</sub>1 mM MgCl<sub>2</sub>

10 mM Glukose

20 mM HEPES

in Aqua dest.

pH 7,3 durch Zusatz von 1 N NaOH bzw. 1 N HCl

---

**K80-Ringer**

53 mM NaCl

80 mM KCl

2,7 mM CaCl<sub>2</sub>

1 mM MgCl<sub>2</sub>

10 mM Glukose

20 mM HEPES

in Aqua dest.

pH 7,3 durch Zusatz von 1 N NaOH bzw. 1 N HCl

**K100-Ringer**

33 mM NaCl

100 mM KCl

2,7 mM CaCl<sub>2</sub>

1 mM MgCl<sub>2</sub>

10 mM Glukose

20 mM HEPES

in Aqua dest.

pH 7,3 durch Zusatz von 1 N NaOH bzw. 1 N HCl

Der osmotische Wert von DMEM/F12 beträgt 310 mOsm und gilt als isoosmotisch gegenüber dem Cytoplasma. Um osmotische Effekte zu vermeiden, die sich störend auf die Stoffwechselprozesse der Zelle, insbesondere den Exozytosevorgängen, hätten auswirken können, wurden die Ringerlösungen dem osmotischen Wert des Nährmediums angeglichen. Außerdem hatten alle Ringerlösungen eine Temperatur von 37°C, um eine Verfälschung der Ergebnisse durch Temperaturschwankungen zu vermeiden.

**Eluent A**

90% 0,1 M Natriumacetat (pH 7,2)

9,5% Methanol

0,5% Tetrahydrofuran

**Eluent B**

100% Methanol



---

### 3. Antikörper

In den folgenden Tabellen sind, nach Versuchen geordnet, die verwendeten Antikörper aufgeführt. Es wurde jeweils der Name des Primärantikörpers sowie die Art des Antikörpers, das Spendertier, die eingesetzten Verdünnungen und der verwendete Sekundärantikörper (Art der Konjugation und Verdünnung) aufgelistet. Die jeweiligen Hersteller der Antiseren wurden in Klammern aufgeführt. Eine ausführliche Liste aller Hersteller befindet sich im Anschluß an die Tabellen.

**Tabelle 1:** Nachweis von synaptischen Membranproteinen in adulten Versuchstieren sowie in prä- und postnatalen Entwicklungsstadien. Die Immunmarkierungen wurden an Semidünn- und Paraffinschnitten durchgeführt.

<b>Primärantikörper</b>	<b>monoklonal/ polyklonal</b>	<b>Verdünnung</b>	<b>Sekundärantikörper</b>	<b>Konjugat</b>	<b>Verdünnung</b>
$\alpha$ -CSP (StressGen)	polyklonal Kaninchen	1:25-1:250	Ziege- $\alpha$ -Kaninchen	biotinyliert	1:100
$\alpha$ -Dynamin (Transduction)	monoklonal Maus	1:250	Ziege- $\alpha$ -Maus	biotinyliert	1:100
$\alpha$ -Munc 18-1 (Transduction)	monoklonal Maus	1:50-1:200	Ziege- $\alpha$ -Maus	biotinyliert	1:100
$\alpha$ -Rab3a (R. Jahn)	monoklonal Maus	1:400	Ziege- $\alpha$ -Maus	biotinyliert	1:100
$\alpha$ -Rab2abc (R. Jahn)	monoklonal Maus	1:800	Ziege- $\alpha$ -Maus	biotinyliert	1:100
$\alpha$ -S-Antigen (H.-W. Korf)	polyklonal Kaninchen	1:800	Ziege- $\alpha$ -Kaninchen	biotinyliert	1:100
$\alpha$ -SNAP-25 (Sternberger)	monoklonal Maus	1:250-1:1000	Ziege- $\alpha$ -Maus	biotinyliert	1:100
$\alpha$ -SV2A (StressGen)	polyklonal Kaninchen	1:100	Ziege- $\alpha$ -Kaninchen	biotinyliert	1:100
$\alpha$ -Synapsin (Synaptic Systems)	polyklonal Kaninchen	1:300	Ziege- $\alpha$ -Kaninchen	biotinyliert	1:100
$\alpha$ -Synaptobrevin (R. Jahn)	monoklonal Maus	1:400-1:1000	Ziege- $\alpha$ -Maus	biotinyliert	1:100
$\alpha$ -Synaptophysin (R. Jahn)	polyklonal Kaninchen	1:1000-1:2000	Ziege- $\alpha$ -Kaninchen	biotinyliert	1:100
$\alpha$ -Synaptotagmin 1,2 (Synaptic Systems)	polyklonal Kaninchen	1:500	Ziege- $\alpha$ -Kaninchen	biotinyliert	1:100
$\alpha$ -Syntaxin 1 (Synaptic Systems)	polyklonal Kaninchen	1:200-1:300	Ziege- $\alpha$ -Kaninchen	biotinyliert	1:100

**Tabelle 2:** Nachweis von metabotropen Glutamatrezeptoren unter Verwendung von Gefrierschnitten

Primärantikörper	monoklonal/ polyklonal	Verdünnung	Sekundärantikörper	Konjugat	Verdünnung
$\alpha$ -GFAP (Boehringer)	monoklonal Maus	1:100	Ziege- $\alpha$ -Maus	Cy2	1:100-1:500
$\alpha$ -mGluR2/3 (Chemicon)	polyklonal Kaninchen	1:100-1:400	Ziege- $\alpha$ -Kaninchen	Cy3 biotinyliert	1:200-1:1000 1:100-1:400
$\alpha$ -mGluR5 (upstate)	polyklonal Kaninchen	1:500-1:4000	Ziege- $\alpha$ -Kaninchen	Cy3 biotinyliert	1:200-1:1000 1:1000-1:4000
$\alpha$ -Synaptophysin, Sy38 (Boehringer)	monoklonal Maus	1:20	Ziege- $\alpha$ -Maus	Cy2	1:100-1:500
$\alpha$ -Vimentin (Boehringer)	monoklonal Maus	1:500	Ziege- $\alpha$ -Maus	Cy2	1:100-1:500

**Tabelle 3:** Nachweis von Glutamattransportern in Semidünnschnitten

Primärantikörper	monoklonal/ polyklonal	Verdünnung	Sekundärantikörper	Konjugat	Verdünnung
$\alpha$ -Calbindin (SWANT)	polyklonal Kaninchen	1:400	Ziege- $\alpha$ -Kaninchen	biotinyliert	1:100
$\alpha$ -Calretinin (Chemicon)	polyklonal Kaninchen	1:1000-1:1500	Ziege- $\alpha$ -Kaninchen	biotinyliert	1:100
$\alpha$ -EAAC-1 (Chemicon)	polyklonal Ziege	1:1000-1:4000	Kaninchen- $\alpha$ -Ziege	biotinyliert	1:100
$\alpha$ -GFAP (Boehringer)	monoklonal Maus	1:100	Ziege- $\alpha$ -Maus	biotinyliert	1:100
$\alpha$ -GLAST (Chemicon)	polyklonal Meerschwein	1:800-1:1500	Ziege- $\alpha$ -Meerschwein	biotinyliert	1:100
$\alpha$ -GLT-1 (ABR)	polyklonal Kaninchen	1:500-1:2000	Ziege- $\alpha$ -Kaninchen	biotinyliert	1:100
$\alpha$ -Synaptobrevin (R. Jahn)	monoklonal Maus	1:500	Ziege- $\alpha$ -Maus	biotinyliert	1:100
$\alpha$ -Synaptophysin (R. Jahn)	polyklonal Kaninchen	1:1000	Ziege- $\alpha$ -Kaninchen	biotinyliert	1:100
$\alpha$ -Vimentin (Boehringer)	monoklonal Maus	1:100	Ziege- $\alpha$ -Maus	biotinyliert	1:100

**Tabelle 4:** Elektronenmikroskopische Untersuchung der Synapsenproteine CSP und Munc 18-1

<b>Primärantikörper</b>	<b>monoklonal/ polyklonal</b>	<b>Verdünnung</b>	<b>Sekundärantikörper</b>	<b>Konjugat</b>	<b>Ver- dünnung</b>
$\alpha$ -CSP (StressGen)	polyklonal Kaninchen	1:10-1:30	Ziege- $\alpha$ -Kaninchen	12 nm kolloidales Gold	1:30-1:50
$\alpha$ -Munc 18-1 (Transduction)	monoklonal Maus	1:10-1:30	Ziege- $\alpha$ -Maus	10 nm kolloidales Gold	1:30-1:50

**Tabelle 5:** Nachweis von Synapsenproteinen im *Western Blot*

<b>Primärantikörper</b>	<b>monoklonal/ polyklonal</b>	<b>Verdünnung</b>	<b>Sekundärantikörper</b>	<b>Konjugat</b>	<b>Ver- dünnung</b>
$\alpha$ -mGluR2/3 (Chemicon)	polyklonal Kaninchen	1:250-1:1000	Ziege- $\alpha$ -Kaninchen	Meerrettich- Peroxidase	1:2000
$\alpha$ -mGluR5 (upstate)	polyklonal Kaninchen	1:1000	Ziege- $\alpha$ -Kaninchen	Meerrettich- Peroxidase	1:2000
$\alpha$ -CSP (StressGen)	polyklonal Kaninchen	1:25	Ziege- $\alpha$ -Kaninchen	Meerrettich- Peroxidase	1:2000
$\alpha$ -Munc 18-1 (Transduction)	monoklonal Maus	1:50-1:100	Ziege- $\alpha$ -Maus	Meerrettich- Peroxidase	1:2000

**Tabelle 6:** Nachweis von Vesikelexozytosen im Zellkultursystem (Exozytose-Assay)

Primärantikörper	monoklonal/ polyklonal	Verdünnung	Sekundärantikörper	Konjugat	Verdünnung
$\alpha$ -Synaptobrevin (R. Jahn)	monoklonal Maus	1:200	Ziege- $\alpha$ -Maus	FITC	1:100
$\alpha$ -Synaptophysin (R. Jahn)	polyklonal Kaninchen	1:100-1:500	Ziege- $\alpha$ -Kaninchen	DTAF	1:100
$\alpha$ -Synaptophysin, Sy38 (Boehringer)	monoklonal Maus	1:20	Ziege- $\alpha$ -Maus	FITC	1:100
$\alpha$ -Synaptotagmin 1,2 (Synaptic Systems)	polyklonal Kaninchen	1:100	Ziege- $\alpha$ -Kaninchen	DTAF	1:100
$\alpha$ -Synaptotagmin <sub>(lum)</sub> (Eurogentec)	polyklonal Kaninchen	1:5		Cy3	
			Ziege- $\alpha$ -Kaninchen	Cy3	1:10

**Hersteller der Antiseren**

ABR, Affinity Bioreagents Inc.

Boehringer, Mannheim

Chemicon, Temecula, USA

Eurogentec Bel S.A, Belgien

Reinhard Jahn, Göttingen

H.-W. Korf, Frankfurt

Sternberger Monoclonals, Baltimore, USA

StressGen Biotechnologies, Victoria, Kanada

SWANT, Bellinzona, Schweiz

Synaptic Systems GmbH, Göttingen

Transduction Laboratories, Lexington, USA

Upstate Biotechnology, Lake Placid, USA

Alle Sekundärantikörper wurden von Jackson Immuno Research, West Grove, USA bezogen.

---

#### 4. Sonstige Materialien und Reagenzien

ABC-Peroxidase-Kit:	Vectastain Elite (Camon GmbH, Wiesbaden)
Antibiotica/Antimycotica:	(Gibco BRL, Life Technologies, Eggenstein)
Blotting-Membran:	PVDF-Membran (Pall, Dreieich)
Chemilumineszenz-Kit:	ECL-Reagenz (Amersham, Braunschweig)
Cy3-Labeling-Kit:	(Amersham Life Science, USA)
Deckgläser:	Ø10 mm (Landgraf, Langenhagen)
Diaminobenzidin:	DAB-Metal Concentrate (Pierce, Rockford, USA)
DMEM/F12-Pulvermedium:	(Gibco BRL, Life Technologies, Eggenstein)
Einbettmittel:	Epoxidharz Araldit (Sigma, Taufkirchen) Epon (Fluka, Buchs)
Einschlußmittel:	Aquatex (Merck, Darmstadt)
Entellan:	(Merck, Darmstadt)
Prolong Anitfade Kit:	(Molecular Probes, Eugene)
Elektrophorese-Gele:	TRIS/Acetat-Polyacrylamidgele (Novex, Frankfurt)
Fibronectin:	humanes Fibronectin (Harbor, Norwood, USA)
Filtrationseinheit:	Centriplus-50 (Millipore GmbH, Eschborn)
Fötales Rinderserum:	(Gibco BRL, Life Technologies, Eggenstein)
Mitose-Inhibitor:	Cytosin- $\beta$ -D-Arabinofuranosid (Sigma, Taufkirchen)
Molekulargewichtsmarker:	Full Range Rainbow (Amersham Life Science, USA)
Multischale:	48-Well-Multischale (Nunc Intermed, GB)
Neuropeptide:	(Bachem, Heidelberg)

---

## 5. Geräte

Brutschrank:	CO <sub>2</sub> Auto-Zero (Hereaus, Hanau)
Elektrophorese-Apparatur:	Hoefer Mighty small II (Pharmacia, San Francisco)
Elektrotransfer-Apparatur:	(Biometra, Göttingen)
Fluoreszenz-Detektor:	Monochromator Kratos FS 970 (BAI, Bensheim)
Gefriertrocknung:	Christ alpha 2-4 (Christ, Osterode)
HPLC-Anlage:	(Shimadzu, Kyoto, Japan)
Mikroskope:	Photomikroskop II (Zeiss, Oberkochen) Zeiss Axiophot (Zeiss, Oberkochen) Elektronenmikroskop EM 9 2S (Zeiss, Oberkochen)
Mikrotome:	Ultramikrotom Ultracut (Leica, Nußloch) Rotationsmikrotom 1512 (Leitz, ) Kryostat Frigocut 2700 (Reichert Jung, )
Photometer:	DU-600 (Beckman, München)
Säulen:	Ultrasphere XL3 ODS C18 (Beckman, München)
Sterilbank:	Nuaire Class II, Typ A/B3 (Nuaire, USA)
Zählkammer:	nach Neubauer (Brand, Wertheim)
Zentrifugen:	Biofuge 1.3 R (Hereaus, Hanau) Megafuge 1.0 R (Hereaus, Hanau)

## 6. Verwendete Computerprogramme

Die Bilder wurde digitalisiert und mit den Programmen Axiophot Metamorph 5.0 (Zeiss, Oberkochem) bzw. Adobe Photoshop 4.0 bearbeitet.

Die chromatographisch ermittelten Daten wurden mit Microcal Origin 4.1 statistisch und graphisch bearbeitet.

---

## III. Versuchstiere und Methoden

### 1. Versuchstiere

Für die Versuche wurden Mongolische Wüstenrennmäuse (*Meriones unguiculatus* = Gerbil) sowie Ratten (*Rattus norvegicus*) der Stämme Wistar und Lewis verwendet. Zuchtpaare wurden von Charles River Wiga GmbH, Sulzfeld bezogen und im zentralen Tierlabor der Medizinischen Hochschule Hannover bzw. in der Tierärztlichen Hochschule Hannover weitergezüchtet. Bis zur Organentnahme wurden die Tiere unter normalen Laborbedingungen mit einem Licht-/Dunkelregime von L:D 14:10 (6.00 Uhr Licht an, 20 Uhr Licht aus) gehalten. Pelletiertes Standardfutter (Altromin GmbH, Lage) und Wasser standen den Tieren *ad libitum* zur Verfügung.

Für die immunhistochemischen Untersuchungen wurden in der Regel adulte Tiere benötigt. Die Tiere für die *in vitro*-Versuche waren in der Regel zwei bis vier Wochen alt. In der Ontogenesestudie wurden Tiere in pränatalen (embryonale Tage: E20,5 und E24.5) und postnatalen Stadien (Tage nach der Geburt: P0, P7, P14, P38) verwendet.

### 2. Immunhistochemie

Mit verschiedenen immunhistochemischen Techniken wurden Proteine, die an der parakrinen Kommunikation im Pinalorgan beteiligt sind, *in situ* nachgewiesen und zellulär lokalisiert. Die verwendeten Techniken umfaßten immunhistochemische Markierungen von Proteinen in Semidünn-, Paraffin- und Gefrierschnitten sowie elektronenmikroskopische Untersuchungen und Nachweise von Proteinen im *Western Blot*.



---

## 2.1 Lichtmikroskopische Untersuchungen

### 2.1.1 Gewebeaufbereitung

#### Organentnahme

Die Organentnahme erfolgte jeweils zur gleichen Tageszeit (9.00 – 12.00 Uhr). Die Versuchstiere wurden durch eine CO<sub>2</sub>-Narkose betäubt und anschließend dekapitiert. Der Schädel wurde vom Hinterhauptsloch aus eröffnet und die Schädeldecke abgehoben. Das Pinealorgan der Ratten liegt nach der Eröffnung gut sichtbar im Scheitelpunkt zwischen den Großhirnhemisphären und dem Kleinhirn. Das Pinealorgan der Gerbils reißt hingegen häufig vom Zwischenhirn ab und ist an den Hirnhäuten der Schädeldecke angeheftet. Die Pinealorgane sowie die Kontrollorgane (Großhirn, Kleinhirn, Hippocampus) wurden entnommen und für die jeweiligen Untersuchungen aufgearbeitet.

#### Semidünnschnitte

Sowohl der Nachweis von synaptischen Membranproteinen und Glutamattransportern im Pinealorgan als auch die Untersuchungen der postnatalen Stadien in der Ontogenesestudie wurden an Semidünnschnitten durchgeführt. Diese Schnitte sind aufgrund ihrer geringen Dicke (0,5 µm) für solche Analysen besonders geeignet, da sie deutliche Färbemuster auf zellulärer Ebene zeigen. Außerdem ermöglicht die geringe Schnittdicke die Anfertigung von Serienschnitten durch eine einzelne Zelle, die verwendet werden können, um Kollokalisierungen verschiedener Proteine in einer Zelle darzustellen.

Zur Herstellung von Semidünnschnitten wurden die Organe in mit flüssigem Stickstoff gekühltes Isopentan getaucht und anschließend in flüssigem Stickstoff tiefgefroren. Danach wurden die Organe gefriergetrocknet (-35°C, 72 h) und mit Paraformaldehyd (PFA, 60°C, 1 Std.) dampffixiert. Die Einbettung der Gewebeproben erfolgte in Epoxidharz. Von den Gewebelöcken wurden semidünne (0,5 µm) Serienschnitte angefertigt, die bei 80°C (ca. 20 min) auf einer Heizplatte ohne Klebemittel auf Glasobjektträger aufgebrannt wurden. Bevor die Semidünnschnitte mit immunhistochemischen Techniken gefärbt werden konnten, mußten sie in einem Natriummethylatbad (2 min bei Raumtemperatur) entharzt werden.

### **Paraffinschnitte**

Da die Pinealorgane in den Pränatalstadien noch nicht vollständig ausgebildet sind, war es nicht möglich, sie vom Gehirn abzuräparieren. Stattdessen wurde das gesamte Gehirn für diese Untersuchung präpariert und eingebettet. Hierfür eignet sich insbesondere die Paraffineinbettung, weil mit dieser Technik relativ große Gewebestücke dünn (5 µm) geschnitten werden können.

Um Paraffinschnitte anfertigen zu können, wurden die Organe zuerst in 4%iger PFA-Lösung über Nacht immersionsfixiert. Anschließend erfolgte die Entwässerung durch eine aufsteigende Alkoholreihe (70%, 80%, 2 x 96%, 2 x 100%; jeweils 2 – 3 h). Nach Entfernung des Alkohols aus dem Gewebe wurde das Gewebe in Paraffin eingebettet und geschnitten. Die 5 µm dicken Schnitte wurden auf Objektträger aufgezoogen. Vor Beginn der immunhistochemischen Färbung erfolgte die Entparaffinierung in einer absteigenden Alkoholreihe.

### **Gefrierschnitte**

Im Laufe der Untersuchungen stellte sich heraus, daß die deutlichsten Immunmarkierungen der metabotropen Glutamatrezeptoren des Pinealorgans in den Gefrierschnitten zu finden waren, die zuvor in einer Mikrowelle mit geringen Konzentrationen PFA fixiert wurden. Deshalb ist der Nachweis von metabotropen Glutamatrezeptoren im Pinealorgan überwiegend an diesen speziell behandelten Gefrierschnitten geführt worden.

Zur Herstellung von Gefrierschnitten wurden die Organe nach der Entnahme über Nacht in eine 30%ige Sucroselösung eingelegt. Am nächsten Tag wurden sie in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend auf den Schneidblock des Kryostaten aufgefroren. Es wurden 5 - 8 µm dicke Schnitte angefertigt, auf Objektträger aufgezoogen und getrocknet. Um Gefrierartefakte zu vermeiden, wurden die auf Objektträger gebrachten Schnitte vor der Lagerung im Gefrierschrank (-30°C) paarweise in Alufolie eingewickelt.

Zur weiteren Behandlung der Gefrierschnitte wurden eine Mikrowellenbehandlung durchgeführt, wie sie von FRITSCHY *et al.* (1998) beschrieben wurde. Dazu wurden die Schnitte aufgetaut und für ca. 30 min bei Raumtemperatur equilibriert. Anschließend wurden sie in eine Lösung aus 0,5% PFA in 0,1 M Phosphatpuffer (pH 7,3) transferiert und in einer handelsüblichen Mikrowelle für 3 min mit 900 Watt bestrahlt. Nach einer Abkühlphase von 15 min sind die Schnitte kurz mit destilliertem Wasser und dann 2 x 5 min mit PBS

---

gewaschen worden. Schließlich wurde die endogene Peroxidase mit Methanol/ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (20 min, Raumtemperatur) geblockt und die Schnitte nochmals gründlich mit PBS gewaschen.

### **2.1.2 Immunhistochemische Färbeprotokolle**

Der Nachweis der Proteine erfolgte entweder mittels Avidin-Biotin-Peroxidase-Complex-(ABC)-Technik oder mittels Immunfluoreszenzfärbung.

#### **ABC-Technik (nach Hsu *et al.* 1981)**

Nach der Inkubation (30 min, Raumtemperatur) mit 2% Ziegen-Normalserum bzw. Rinderserumalbumin in PBS (pH 7,4), zur Blockierung von unspezifischen Bindungsstellen, wurden die Schnitte mit dem Primärantikörper für 24 h bei 4°C markiert. Dann wurden die Schnitte zunächst mit dem biotinylierten Sekundärantikörper und anschließend mit dem Streptavidin-Peroxidase-Komplex jeweils für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Inkubationen erfolgten generell in einer feuchten Kammer. Die verwendeten Antikörper und Reagenzien wurden in PBS verdünnt, der 2% Ziegen-Normalserum und 0,1% Triton X-100 zugesetzt wurden. Die Peroxidaseaktivität ist durch 0,02% DAB (Diaminobenzidin-Hydrochlorid) mit 0,3% Nickelsulfat in 0,01 M PBS (10 min, Raumtemperatur) sichtbar gemacht worden. In einigen Fällen konnten mit DAB Metal Concentrate bessere Färbeergebnisse erzielt werden. Die Paraffin- und Semidünnschnitte wurden schließlich zum Entwässern durch eine aufsteigende Alkoholreihe geführt und nach einem Xylol-Bad mit Entellan eingedeckt. Die Gefrierschnitte hingegen wurden luftgetrocknet und mit Aquatex verschlossen. Zwischen allen Arbeitsschritten wurden sowohl die Gefrier- als auch die Paraffin- und Semidünnschnitte 3 x 5 min mit PBS gewaschen.

#### **Immunfluoreszenzfärbung**

Die Immunfluoreszenzfärbung wurde nach dem Protokoll in der Veröffentlichung von REDECKER *et al.* 1997 durchgeführt. Dazu wurden zuerst die unspezifischen Bindungsstellen mit 2% Ziegen-Normalserum geblockt, dann folgte die Inkubation mit dem Primärantikörper (24 h, 4°C). Anschließend wurde 3 x 5 min mit PBS gewaschen und dem Primärantikörper entsprechend mit Fluorochrom-konjugierten Ziegen-anti-Kaninchen oder Ziegen-anti-Maus-Antikörpern für 1 h bei 37°C inkubiert. Nach 2 Waschgängen à 5 min mit PBS folgte ein

---

weiterer mit destilliertem Wasser, um die Salze des Puffers zu entfernen. Dann wurden die Schnitte luftgetrocknet und mit Prolong Antifade Kit eingedeckt. Sowohl die Inkubation mit den Fluorochrom-konjugierten Sekundärantikörpern als auch die Lagerung bis zur Auswertung erfolgten im Dunkeln, um ein Ausbleichen der Fluoreszenzfarbstoffe zu verhindern. Für Doppelmarkierungen wurden die Schnitte zuerst einer Mischung aus Maus- und Kaninchen-Primärantikörpern und nachfolgend einer zweiten Mischung aus sekundären Antikörpern ausgesetzt. Um sicherzustellen, daß keine Kreuzreaktionen der sekundären Antikörper auftraten, wurde zur Kontrolle jeweils einer der beiden Primärantikörper weggelassen oder präadsorbierte Sekundärantikörper verwendet.

### **Spezifitätskontrollen**

Alle Immunfärbungen sind erfolgreich auf methodisch bedingte, unspezifische Reaktionen hin überprüft worden (GRUBE und KUSOMOTO 1986; STERNBERGER 1986). In den Kontrollen wurden Primär- und Sekundärantiseren durch Puffer (PBS) oder unspezifische Antiseren ersetzt. Außerdem wurden Verdünnungsreihen des Primärantikörpers ausgetestet und hochmolare PBS (0,5 M) als Waschlösung zwischen den Schritten des immunhistochemischen Protokolls verwendet.

## **2.2 Elektronenmikroskopische Untersuchungen**

Mit Hilfe der Elektronenmikroskopie wurde die ultrastrukturelle Verteilung von synaptischen Membranproteinen in Pinealozyten untersucht. Hierbei kam das sogenannte *Pre-embedding*-Verfahren zum Einsatz, das von DE CAMILLI *et al.* (1983) und NAVONE *et al.* (1984, 1986) für die Lokalisation von Membranantigenen in Hirnhomogenaten beschrieben wurde. In diesem Verfahren werden Gewebefragmente zuerst in Agarose eingebettet, dann immunmarkiert und erst hinterher in Kunstharz eingebettet. Dieses Verfahren ist insofern von Vorteil, da Kunstharze die Immunmarkierungen negativ beeinflussen können.

### **Gewebeaufbereitung**

Nach der Organentnahme wurden die Pinealorgane und cerebralen Cortices (als Kontrollorgane) mit einem Glas-Teflon-Homogenisierer in eiskaltem Homogenisierungspuffer vorsichtig fragmentiert. Anschließend wurde das Homogenat mit eiskalter Fixierlösung

---

auf dem Schüttler für 45 min gemischt. Die fixierten Zellfragmente wurden durch Zentrifugation (12500 x g für 20 min bei 4°C) pelletiert, in 0,12 M Natrium-Phosphatpuffer (pH 7,4) resuspendiert und mit warmer, flüssiger Agarose gemischt. Daraus wurden kleine Blöcke mit einer Kantenlänge von ca. 8 mm x 8 mm x 1 mm gegossen, die anschließend für die Immungold-Markierungen benutzt wurden.

### **Immungold-Markierung**

Für diese Markierung wurden die genannten Agaroseblöcke zuerst frei flottierend mit einem *blocking*-Puffer für 30 min inkubiert. Die Blöcke wurden dann mit den primären Antikörpern (Verdünnungen in PBS mit 5% BSA und 0,02 % Natriumazid) für 24 h inkubiert. Nach mehreren Waschgängen mit PBS folgten entsprechend der verwendeten Primärantikörper Inkubationen mit Ziege-anti-Maus-Immunglobulinen oder Ziege-anti-Kaninchen-Immunglobulinen, die mit kolloidalem Gold konjugiert waren. Alle Inkubationen erfolgten auf dem Schüttler für 24 h bei Raumtemperatur. Schließlich wurden die Agarose-Blöcke nach mehreren Waschgängen mit 1% Glutaraldehyd in 120 mM Natriumphosphatpuffer fixiert, mit 1% OsO<sub>4</sub> osmiert, dehydriert und in Epon eingebettet. Danach wurden sie geschnitten, auf Grids aufgebracht und mit dem Elektronenmikroskop ausgewertet.

### **2.3 Gel-Elektrophorese und *Western Blot***

Der *Western Blot* ist eine weitere, gängige Methode, um Proteine in Geweben nachzuweisen. Dieses Verfahren wird häufig als Ergänzung zu immunhistochemischen Färbemethoden angewendet, um die Spezifität des verwendeten Antikörpers zu überprüfen.

#### **Gewebeaufbereitung**

Die Pinealorgane und Kontrollorgane von Ratten und Gerbils wurden nach der Präparation in Extraktionspuffer überführt und mit einem Glas-Teflon-Homogenisierer zerkleinert. Der Extraktionspuffer hatte die Aufgabe, die Proteine aus dem Gewebe herauszulösen. Durch eine nachfolgende Zentrifugation (12.000 x g, 4°C, 15 min) wurden die gelösten Proteine dann von den festen Bestandteilen getrennt. Der Überstand wurde gewonnen und bis zur weiteren Verwendung eingefroren.

---

### **Gel-Elektrophorese (SDS-PAGE)**

Das Trennverfahren nach LAEMMLI (1970) erlaubt die Auftrennung von Proteingemischen nach ihrem Molekulargewicht. Denaturierte Proteine bilden mit SDS (Natriumdodecylsulphat) einen negativen Ladungskomplex, der im elektrischen Feld zur Anode wandert, so daß der Vernetzungsgrad des Gels die Trennleistung bestimmt. In dieser Arbeit wurden 7,5%, 10% und 12,5% Tris/Glycin- oder Tris/Acetat-Polyacrylamidgele verwendet.

Für dieses Verfahren wurden die gewebespezifischen Proteinproben mit dem 2 x SDS-Probenpuffer im Verhältnis 1:1 gemischt und anschließend für 2 min auf 85°C erhitzt. Nach einer Abkühlphase wurden die Proben mit einer Proteinmenge von jeweils 30 – 40 µg in die Probenaschen des Gels gefüllt. Die Elektrophorese erfolgte in einer vertikalen Gel-Elektrophorese-Apparatur für 1 h - 2 h bei einer konstanten Stromstärke von 40 mA. Als Laufpuffer wurden Tris/Glycin-Puffer verwendet.

### **Transfer von Proteinen auf PVDF-Membran (*Western Blot*)**

Nach der Elektrophorese wurden die Proteine auf eine Polyvinylidendifluorid (PVDF)-basierte Membran im *Semi-Dry*-Verfahren übertragen. Hierzu wurden das Gel und die PVDF-Membran aufeinander gelegt und zwischen mehrere, mit Transferpuffer getränkte Filterpapierlagen geschichtet. Die PVDF-Membran ist zuvor mit 100% Methanol aktiviert, in Aqua bidest. gewaschen und mit Transferpuffer durchtränkt worden. Der Transfer erfolgte in einer Elektrotransfer-Apparatur für 2 h – 10 h bei einer Stromstärke von 0,75 mA/cm<sup>2</sup>.

### **Immundetektion transferierter Proteine**

Zum Nachweis der auf der PVDF-Membran befindlichen Proteine wurde, nach der Absättigung unspezifischer Bindungsstellen (5% Milchpulver in PBS (pH 7,3), 1h bei Raumtemperatur), mit dem gewünschten Primärantikörper über Nacht bei 4°C inkubiert. Die Verdünnungen des Antikörpers wurden in PBS angesetzt und richteten sich nach den jeweiligen Herstellerangaben oder sind in Verdünnungsreihen ermittelt worden. Nach der Inkubation mit dem Primärantikörper wurde mehrmals mit PBS gewaschen und anschließend mit dem entsprechenden Sekundärantikörper für 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Es wurde wiederum mehrmals mit PBS gewaschen und anschließend erfolgte die Detektion. Da alle verwendeten Sekundärantikörper mit Meerrettich-Peroxidase konjugiert waren, konnten die Proteinbanden als Chemilumineszenzsignale mittels eines Chemilumineszenz-Reagenz (ECL-Reagenz) auf Autoradiographiefilmen sichtbar gemacht werden.

---

Anhand eines Protein-Molekulargewichtsmarkers, der zusätzlich zu den Proteinproben die Gelelektrophorese durchlaufen hatte, konnten die Molekulargewichte der Proteine, die als Banden sichtbar wurden, geschätzt werden.

### **3. *In vitro*-Versuche**

Im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit wurden mit zellbiologischen Methoden direkt und indirekt Exozytosen synaptoider Mikrovesikel in Pinealocyten nachgewiesen und deren Regulationsmechanismen untersucht.

#### **3.1 Herstellung einer Primärzellkultur aus Pinealorganen**

Alle hier genannten Arbeitsschritte, mit Ausnahme der Präparation, erfolgten unter sterilen Bedingungen in einer Sterilbank. Zur Gewinnung von Pinealzellen wurden Pinealorgane von 2 – 4 Wochen alten Ratten und Gerbils verwendet. Die Tiere wurden nach vorheriger CO<sub>2</sub>-Narkose dekapitiert. Die Pinealorgane sind präpariert und in sterilem, eisgekühltem HEPES-Medium gesammelt worden. Das Gewebe wurde im Anschluß, zur Lockerung des Zellverbandes, enzymatisch dissoziiert. Dabei wurden die Organe von Ratten und Gerbils unterschiedlich behandelt. Die Inkubation der Pinealorgane der Ratten erfolgte für 30 min bei 37°C mit 0,25% Trypsinlösung. Die Pinealorgane der Gerbils hingegen wurden einer sogenannten Kalttrypsinierung unterzogen, die vorzugsweise bei empfindlichen Geweben angewendet wird. Die Organe wurden hierbei zuerst für mehrere Stunden (3 – 5 h) bei 4°C mit der Trypsinlösung durchtränkt und anschließend für kurze Zeit (ca. 15 min) bei 37°C inkubiert. Die enzymatische Zerkleinerung der Pinealorgane beider Tierarten konnte anschließend durch dreimaliges Waschen mit serumhaltigem DMEM/F12-Medium gestoppt werden. Danach erfolgte eine mechanische Vereinzelung der Zellen, indem die Gewebe mehrmals durch eine 20 G-Kanüle geschert wurden. Die erhaltene Zellsuspension wurde auf die gewünschte Zellzahl von 1 – 2 x 10<sup>5</sup> Zellen pro Milliliter durch Verdünnen mit Nährmedium eingestellt (Zellzahlbestimmung mittels Zählkammer nach Neubauer). Ein Milliliter der Zellsuspension wurde jeweils auf ein Well einer 48-Well-Multischale verteilt.

---

Die Wells waren zuvor mit 2,5  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  humanem Fibronectin beschichtet worden, um eine erfolgreiche Anheftung der Zellen an das Substrat zu gewährleisten.

Für die mikroskopischen Untersuchungen des Exozytose-*Assays* sind die Zellen auf Deckgläsern von 10 mm Durchmesser ausgesät worden. Diese wurden zuvor mit 100% unvergälltem Ethanol abgeflämmt, autoklaviert, ebenfalls mit humanem Fibronectin beschichtet und in die Wells der 48-Well Multischale eingelegt. Die Kultivierung der Zellen erfolgte in einem Brutschrank bei 98% feuchter Luft, 2%  $\text{CO}_2$  und einer Temperatur von 37°C. Ein Teil des Nährmediums, bestehend aus DMEM/F12 und 10% fötalem Rinderserum, wurde jeden zweiten Tag durch frisches Medium ersetzt. Bei erhöhtem Fibroblastenwachstum wurde der Zellkultur am zweiten Tag *in vitro* der Mitose-Inhibitor Cytosin-Arabinosid in einer Konzentration von 200  $\mu\text{M}$  in PBS A für 24 h zugesetzt. Nach 3 – 5 Tagen *in vitro* konnten die Zellkulturen für die Untersuchungen verwendet werden.

### 3.2 Exozytose-*Assay*

Anfang der 90er Jahre wurde ein *Assay* entwickelt, mit dem es möglich ist, Vesikel-Exo-/Endozytosen direkt mikroskopisch nachzuweisen. Dieser *Assay* beruht auf dem Einsatz eines Antikörpers gegen die lumenale, d. h. im Vesikelinneren gelegene Domäne des Vesikelproteins Synaptotagmin.

#### **Konjugation des Antikörpers Synaptotagmin<sub>(lum)</sub> mit dem Fluorochrom Cy3**

Damit der Antikörper im Lichtmikroskop sichtbar gemacht werden konnte, mußte er vor seinem Einsatz mit einem Fluorochrom konjugiert werden. Dazu wurde der Cy3-Labeling-Kit von Amersham Life Science, Inc., USA verwendet. Zur erfolgreichen Konjugation des Antikörpers mit dem Farbstoff Cy3 benötigte man eine Proteinlösung mit einer Konzentration von mindestens 1mg/ml. Deshalb wurde der Proteingehalt der Antikörperlösung photometrisch bei  $\lambda = 280 \text{ nm}$  bestimmt. Da der Proteingehalt nur 0,85 mg/ml betrug, wurde die Lösung mit Hilfe der Filtrationseinheit Centriplus-50 in einer Zentrifuge bei 3000 x g für 60 min auf 1,245 mg/ml aufkonzentriert.

Für die Konjugation wurden 1 ml dieser Proteinlösung eingesetzt, die zuerst dem Kopplungspuffer zugefügt wurde. Anschließend wurde diese Mischung zum Farbreagenz gegeben und für 30 min inkubiert. Die Separation des markierten Antikörpers vom nicht



---

konjugierten Farbstoff erfolgte über eine Gelfiltrationssäule mit 50 mM PBS (pH 7,3) als Elutionspuffer. Der fluorochromkonjugierte Antikörper wurde mit 2,5 ml Elutionspuffer von der Säule gewaschen, aufgefangen und bei 4°C im Dunkeln gelagert.

### **Nachweis von Vesikelexozytosen mit dem Cy3-konjugierten Antikörper Synaptotagmin<sub>(lum)</sub>**

Für den Exozytose-*Assay* wurden ausschließlich Gerbil-Primärkulturen verwendet, die 3 – 4 Tage kultiviert worden waren. Die Zellen wurden zunächst 2 x 10 min mit K5-Ringer gewaschen. Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem Cy3-konjugierten Antikörper (1:5 verdünnt in Ringerlösung) für 20 min bei 37°C. Für den Nachweis der basalen Exozytosevorgänge wurde der Antikörper in K5-Ringer angesetzt. Zur Depolarisation der Zellen wurde der Antikörper hingegen in K100-Ringer verdünnt. Nach der Inkubation wurde der überschüssige Antikörper 2 x 10 min mit K5-Ringer ausgewaschen. Anschließend wurde die Zellkultur mit 4%igem PFA in 0,1 M Phosphatpuffer (pH 7,3) für 20 min fixiert, 2 x 10 min mit PBS und einmal mit destilliertem Wasser gewaschen und schließlich mit Prolong Antifade eingedeckt. Häufig wurde eine Doppelmarkierung zur Identifizierung der Zellen bzw. der Zellorganellen, die den Cy3-konjugierten Antikörper internalisiert hatten, durchgeführt. Dazu wurden die Zellen nach der Fixierung mit 0,1% Triton X-100-Lösung für 10 min permeabilisiert, mit 5% BSA-Lösung zur Blockierung unspezifischer Bindungsstellen behandelt (20 min) und anschließend mit Primärantikörpern gegen die Proteine Synaptophysin, Synaptotagmin oder Synaptobrevin über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag erfolgte nach 3 Waschgängen die Inkubation mit den entsprechenden Sekundärantikörpern. Nach mehrmaligem Waschen und anschließendem Eindecken konnten die Kulturen lichtmikroskopisch untersucht werden.

### **3.3 Untersuchungen zur Regulation der Vesikelexozytose**

Um die Freisetzung neuroaktiver Aminosäuren aus den synaptoiden Mikrovesikeln der Pinealozyten und deren Regulationsmechanismen zu untersuchen, wurden Ratten- und Gerbilpinealkulturen verwendet, die 3 – 4 Tage kultiviert worden waren.

Zunächst wurden die Zellkulturen 2 x 10 min mit K5-Ringer gewaschen. Um eine Freisetzung von neuroaktiven Aminosäuren hervorzurufen, wurden die Zellen anschließend mit K80-

---

Ringer für 20 min bei 37°C depolarisiert. Die Zellüberstände wurden gesammelt und bis zur Untersuchung mittels HPLC bei – 80°C eingefroren. Als Kontrollen dienten die Überstände unstimulierter Zellen.

Eine mögliche regulative Wirkung von Neurotransmittern/Neuropeptiden auf die Exozytosevorgänge in Pinealozyten wird in der Literatur diskutiert. Um diese Hypothese zu untersuchen, wurden die Zellen anstelle der Depolarisation mit erhöhten KCl-Gaben mit 100 µM Acetylcholin in K5-Ringer und 1 µM Noradrenalin in K5-Ringer für 20 min bei 37°C stimuliert. Außerdem wurde in einer Vorstudie depolarisierten (K80-Ringer) und nicht-depolarisierten Zellen (K5-Ringer) die Neuropeptide CGRP, NPY, PACAP-38, VIP, Substanz P und Somatostatin in Konzentrationen von 100 pM, 1 nM, 10 nM und 100 nM zugesetzt, um einen ersten Hinweis auf mögliche dosisabhängige, modulatorische Eigenschaften der Neuropeptide auf die Vesikelexozytose zu erhalten.

### 3.4 Quantitative Untersuchungen zur Aminosäurefreisetzung mittels HPLC

Die Bestimmung der Aminosäurekonzentrationen im Zellüberstand erfolgte entsprechend der Protokolle aus den Publikationen von LÖSCHER *et al.* (1991,1993 a, b).

Zuerst wurden die Proben mit einem Spritzenfilter (0,2 µm Porengröße) von Feststoffen gereinigt, die zu einer Verstopfung der Säulen hätten führen können. Dann erfolgte die Derivatisierung bei Raumtemperatur mit dem kommerziell erhältlichen Reagenz o-Phthaldialdehyd. Dazu wurden 50 µl der Probe mit 50 µl des Reagenz versetzt und gemischt. Die Reaktion wurde nach 1 min durch Zugabe von 10 µl 6%iger Essigsäure gestoppt. Die derivatisierte Probe wurde dann in das Einspritzventil der HPLC-Anlage injiziert. Die Trennung der einzelnen Aminosäuren erfolgte bei 35°C über Vorsäule (4,6 x 5 mm) und Hauptsäule (4,6 x 70 mm). Um eine ausreichende Trennung zu erzielen, war es erforderlich, die Zusammensetzung des Eluenten im Verlauf des Chromatogramms zu ändern. Man spricht dabei von einer Gradientenelution. Eluent A bestand aus 90% 0,1 M Natriumazetat (pH 7,2), 9,5% Methanol und 0,5% Tetrahydrofuran. Eluent B bestand zu 100% aus Methanol. Nachdem die einzelnen Aminosäurederivate mit diesem Gradient isoliert worden waren, wurden sie im Fluoreszenz-Detektor angezeigt. Dazu wurden sie mit einer Anregungswellenlänge von 330 nm zum Fluoreszieren gebracht. Die Menge des emittierten Lichts verhält sich dabei proportional zur Konzentration der detektierten Aminosäure. Das

---

Fluoreszenzsignal wurde durch einen Photomultiplier verstärkt und in elektrische Signale umgewandelt. Die Ausgangssignale des Detektors wurden anschließend als Peaks auf dem Bildschirm dargestellt. Die quantitative Auswertung der Peaks erfolgte schließlich durch den Vergleich der Peakflächen der Probe mit denen einer Standard-Eichlösung. Die verwendete Eichlösung setzte sich aus verschiedenen Aminosäurederivaten zusammen, die jeweils in einer Konzentration von 20 ng/50 µl eingesetzt wurden. Die Zuordnung der Peaks zu den verschiedenen Aminosäurederivaten erfolgte durch sukzessive Zugabe der einzelnen Aminosäuren zu der Standard-Eichlösung, so daß die Reihenfolge und die Retentionszeiten für die einzelnen Substanzen bestimmt werden konnten.

---

## IV. Ergebnisse

### 1. Nachweis der synaptischen Membranproteine Munc 18-1, CSP und SV2

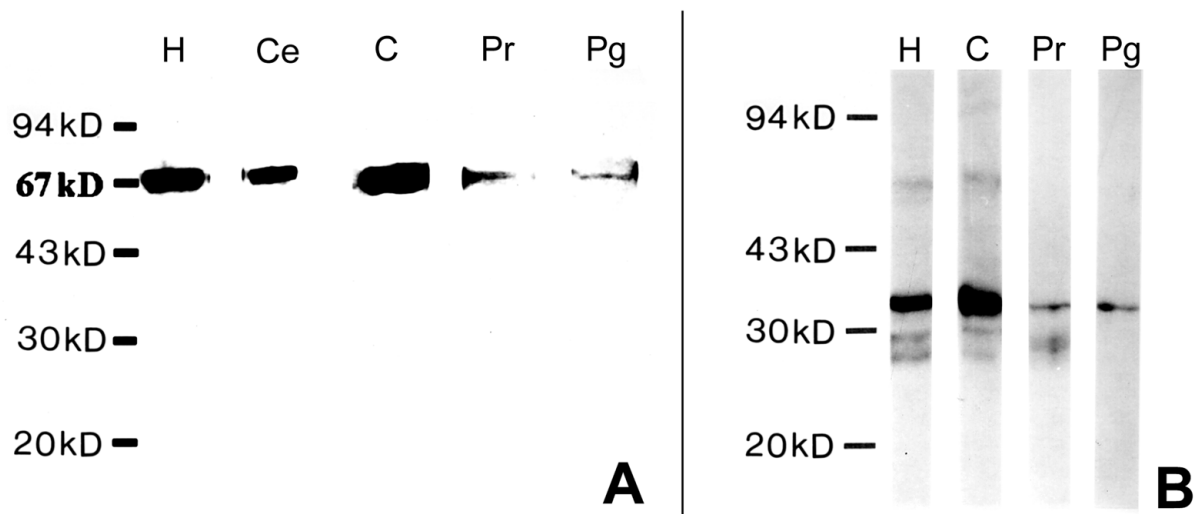
In den letzten Jahren wurden in den Synapsen von Nervenzellen zahlreiche Proteine entdeckt, die regulatorisch die Exozytose synaptischer Vesikel und damit die Freisetzung der Neurotransmitter an den Synapsen beeinflussen. Es stellte sich die Frage, ob diese Synapsenproteine auch in den Pinealozyten vorkommen und dort an der Exozytose der synaptoiden Mikrovesikel beteiligt sind.

In dieser Arbeit wurden die Proteine Munc 18-1, *cysteine string protein* (CSP) und Synaptisches Vesikelprotein 2 (SV2) immunhistochemisch im *Western Blot* und an seriellen Semidünnschnitten von Pinealorganen untersucht.

#### 1.1 Munc 18-1

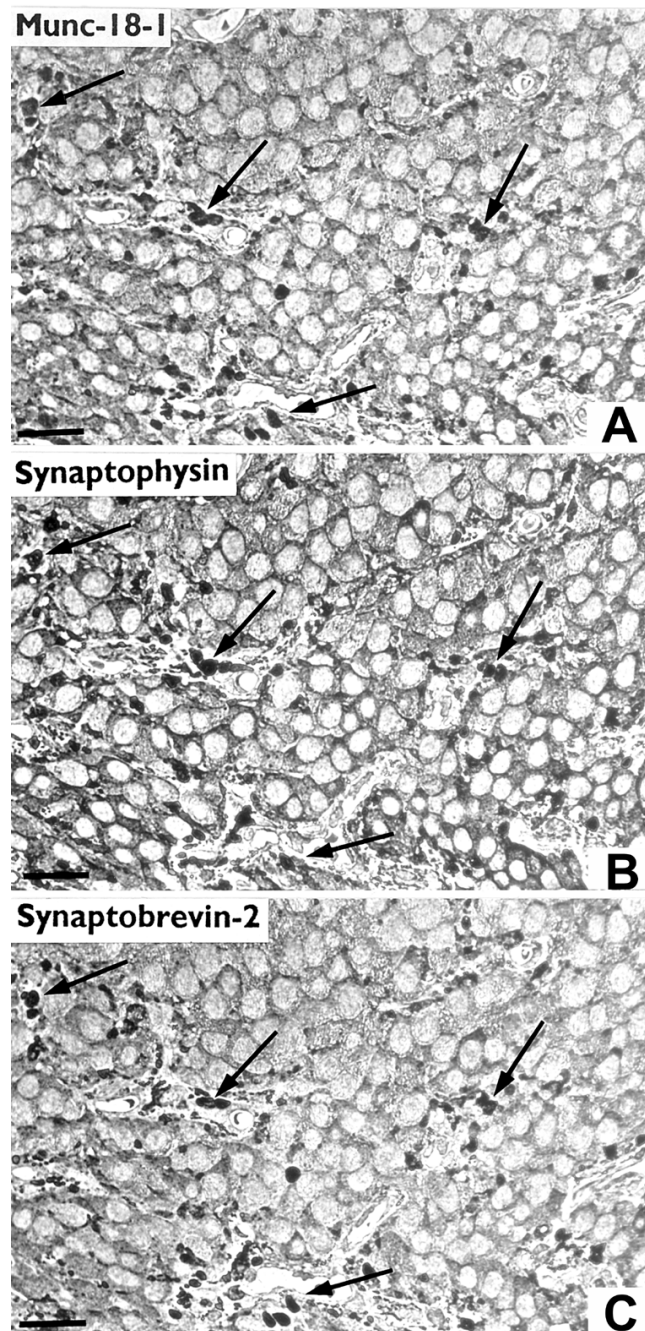
Munc 18-1 ist ein 67 kDa großes Protein, das überwiegend in Neuronen vorkommt und dort im Cytosol und an der präsynaptischen Plasmamembran lokalisiert wurde (GARCIA *et al.* 1995; PEVSNER *et al.* 1994). In dieser Arbeit sollte Munc 18-1 erstmals auch im Pinealorgan von Ratten und Gerbils nachgewiesen werden.

In einem ersten Schritt wurde das Vorkommen von Munc 18-1 in Gewebekomogenaten von Ratten- sowie Gerbilpinealorganen im *Western Blot* untersucht. Ein spezifischer, monoklonaler Antikörper gegen Munc 18-1 markierte in den Kontrollgeweben Cortex, Cerebellum und Hippocampus eine starke Bande, die einem Molekulargewicht von ca. 67 kDa entsprach (Abb. 4 A). Die *Western Blots* der Homogenate von Ratten- und Gerbilpinealorganen zeigten ebenfalls eine deutliche, wenngleich schwächere Bande mit dem gleichen Molekulargewicht.

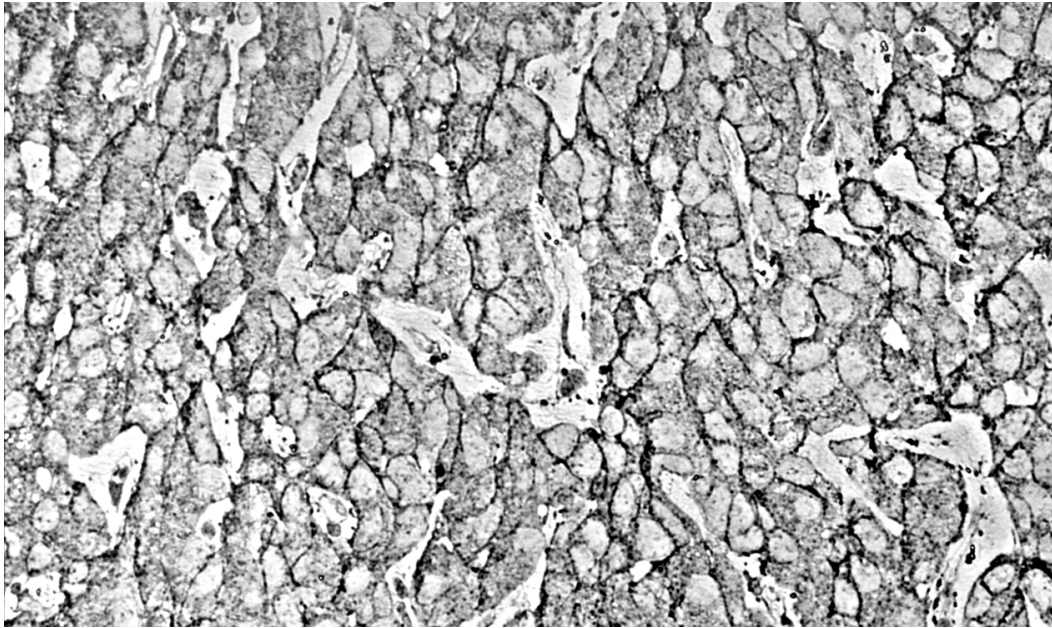


**Abb. 4** Immunmarkierung der *Western Blots* mit Antikörpern gegen Munc 18-1 (A) und CSP (B). Untersucht wurden Gewebekomponenten vom Hippocampus (H), Cerebellum (Ce), cerebralen Cortex (C), Pinealorgan der Ratte (Pr) und des Gerbils (Pg).

In einem zweiten Schritt wurde mit immunhistochemischen Methoden die Verteilung des Proteins auf zellulärer Ebene untersucht. Dies ist insofern von Bedeutung, als Pinealorgane, wie eingangs schon erwähnt, aus verschiedenen Zelltypen bestehen: Pinealocyten, interstitiellen Zellen und Fibroblasten (REITER 1981, VOLLRATH 1981, SCHACHNER *et al.* 1984). Munc 18-1 konnte in zahlreichen Zellen der Ratten- und auch Gerbilpinealorgane nachgewiesen werden. In benachbarten Semidünnschnitten waren diese markierten Zellen ebenfalls für die Vesikelmembranproteine Synaptophysin und Synaptobrevin immunpositiv (Abb. 5). Da Synaptophysin ein Markerprotein für Pinealocyten darstellt, konnten die immunreaktiven Zellen somit eindeutig als solche identifiziert werden. Im Pinealorgan der Ratten wurde vor allem die Plasmamembran der Pinealocyten markiert (Abb. 6). Im Gerbilpinealorgan traten neben schwachen Immunreaktivitäten im Cytoplasma vor allem starke Markierungen der Fortsatzendigungen auf (Abb. 5, Pfeile). Die Endigungen sind in der Abbildung mit Pfeilen markiert und imponieren als stark immunpositive, rundliche Strukturen.

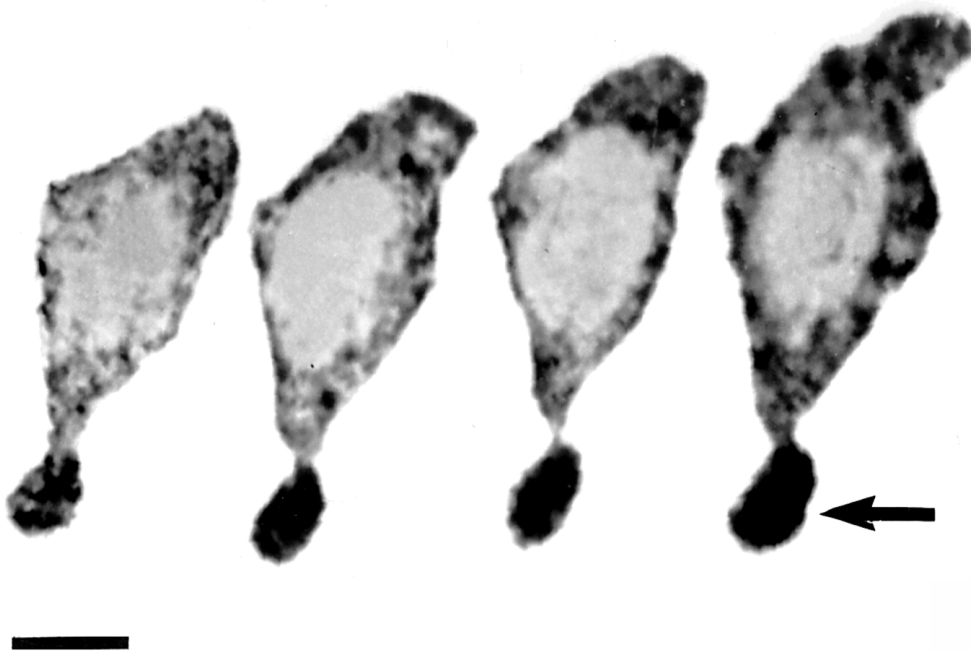


**Abb. 5** Drei Folgeschnitte wurden mit Antikörpern gegen Munc 18-1 (A), Synaptophysin (B) und Synaptobrevin II (C) immungefärbt. Die Pinealozyten, die für Synaptophysin und Synaptobrevin immunreaktiv waren, koexprimierten auch Munc 18-1. Auffällig war die Anreicherung von Munc-18-Immunreaktivität in den punktförmigen Fortsatzendigungen (A, Pfeile). In denselben Fortsatzendigungen konnten in Nachbarschnitten auch die Akkumulation der Vesikelmembranproteine Synaptophysin und Synaptobrevin (B, C, Pfeile) nachgewiesen werden. Phasenkontrast. Balken 20  $\mu\text{m}$ .



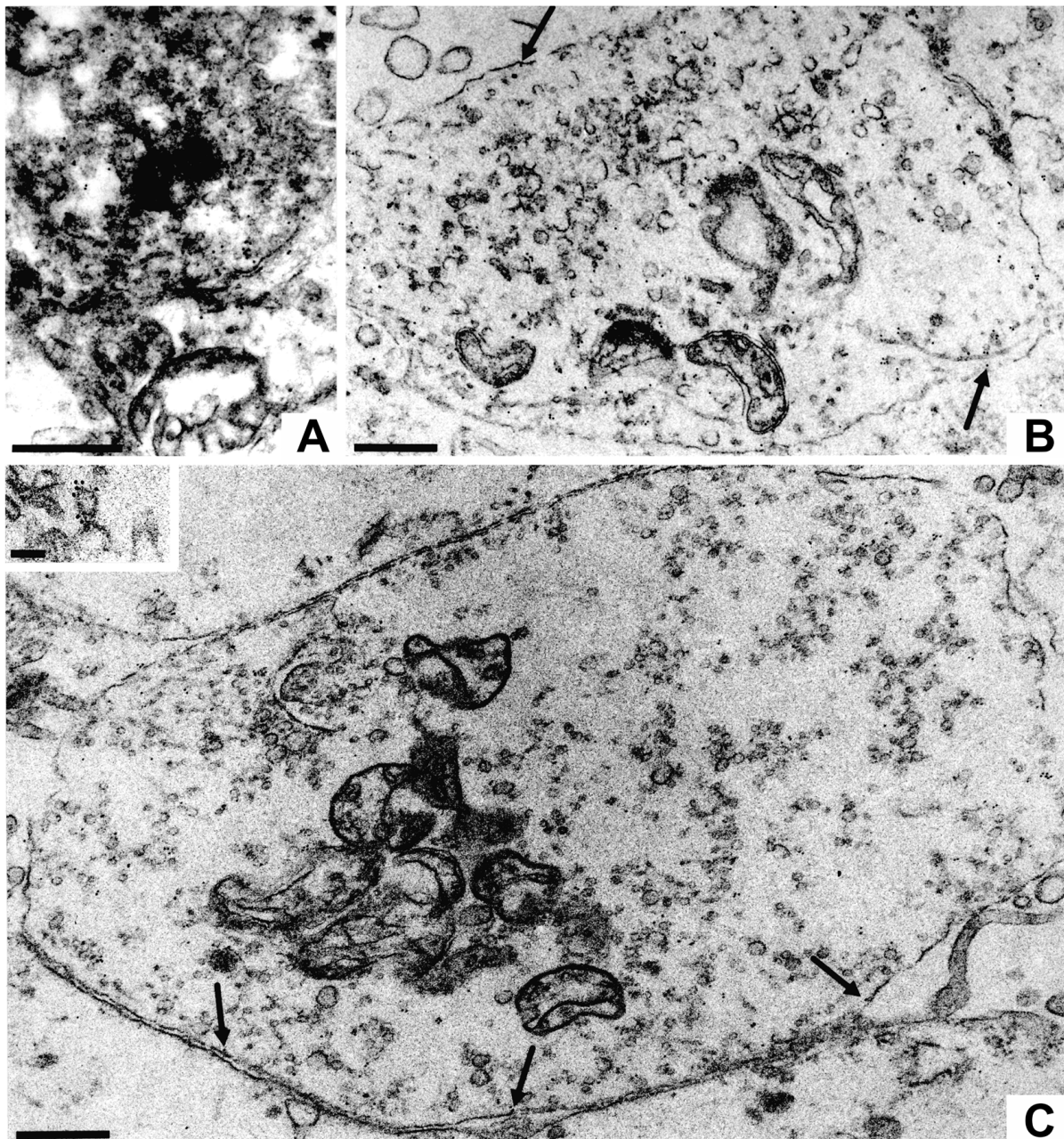
**Abb. 6** Im Rattenpinealorgan wurden vor allem die Plasmamembranen der Pinealozyten mit dem Antikörper gegen Munc 18-1 markiert. Phasenkontrast. Vergrößerung x 400.

Um die Akkumulation von Munc 18-1 in den Fortsatzendigungen besonders deutlich darstellen zu können, wird in Abbildung 7 ein einzelner Pinealozyt in verschiedenen Schnittebenen gezeigt. Auffällig ist in allen Schnittebenen die kurze, stark immunreaktive Fortsatzterminale im Vergleich zum schwächer markierten Soma. Das offenkundige Akkumulationsmuster von Munc 18-1, das dem der Vesikelmembranproteine Synaptophysin und Synaptobrevin gleicht, legt den Verdacht nahe, daß Munc 18-1 nicht nur in der Plasmamembran und im Cytosol lokalisiert ist, sondern in nennenswertem Umfang auch an die Vesikelmembran gebunden sein könnte. Die elektronenmikroskopischen Untersuchungen mit Immungoldmarkierungen zeigen in der Tat, daß Munc 18-1 (neben Markierungen des Cytosols und der Plasmamembran) in größerem Umfang vesikelassoziiert vorliegt (Abb. 8 B, C). In ergänzenden Untersuchungen am Großhirn konnte nachgewiesen werden, daß offenbar auch im Nervengewebe mehr Munc 18-1 vesikelassoziiert vorkommt, als bisher bekannt ist (ohne Abbildung).



**Abb. 7** Die Abbildung zeigt einen einzelnen Pinealozyten in vier repräsentativen Semidünnschnitten, die aus einer Serie von 13 Nachbarschnitten ausgewählt wurden. In allen Schnittebenen erkennt man die starke Immunmarkierung der verdickten Fortsatzendigung (Pfeil) im Vergleich zum schwächer markierten Soma. Phasenkontrast. Balken 5  $\mu$ m.





**Abb. 8** Subzelluläre Lokalisation von CSP (A) und Munc 18-1 (B, C) mittels Immungold-Elektronenmikroskopie an Agarose-eingebetteten Fragmenten des Pinealorgans (Gerbil). (A) Der Gold-konjugierte Antikörper gegen CSP markierte deutlich die synaptoiden Mikrovesikel, die in großer Zahl im Fortsatzende eines Pinealozyten vorhanden waren. In Abbildung B und C sind Fortsatzterminalen zweier unterschiedlicher Pinealozyten dargestellt. Die Immunreaktivitäten für Munc 18-1 sind im geringen Umfang mit der Plasmamembran assoziiert (Pfeile). Balken 500 nm. Das kleine Bild in C zeigt einen stark immunmarkierten synaptoiden Mikrovesikel in einer höheren Vergrößerung. Balken 100 nm.

---

## 1.2 Cystein-String-Protein (CSP)

CSP kommt ebenso wie Munc 18-1 in präsynaptischen Nervenendigungen vor und ist durch zahlreiche palmitoylierte Cysteinreste gekennzeichnet.

CSP konnte in den durchgeführten Untersuchungen auch im Pinealorgan von Gerbils und Ratten lokalisiert werden. Im *Western Blot* (Abb. 4 B) markierte der Antikörper gegen CSP in Gewebekomogenaten von Ratten- und Gerbilpinealorganen Banden mit einem Molekulargewicht von ca. 37 kDa. Banden mit dem gleichen Molekulargewicht wurden auch in den Kontrollorganen Hippocampus und Cortex detektiert.

Außerdem wurde die zelluläre Verteilung des Proteins mittels Immunhistochemie an Semidünnschnitten bestimmt. CSP kommt in einer Vielzahl von Zellen im Pinealorgan beider untersuchten Tierarten vor. Schon anhand der Morphologie konnten diese Zellen als Pinealocyten identifiziert werden. Ähnlich wie in immunhistologischen Abbildungen anderer vesikelassoziierter Proteine wurde eine schwache Immunreaktivität des Somas und eine starke Immunreaktivität in den Fortsatzterminalen beobachtet. Abbildung 9 zeigt eine Kolo-kalisation der Proteine CSP und Munc 18-1 in denselben Pinealocyten. Besonders auffällig ist die Überlappung der Immunmarkierungen in den Fortsatzendigungen (Pfeile).

Auf elektronenmikroskopischer Ebene konnte die Assoziation von CSP mit der Membran der synaptoiden Mikrovesikel eindeutig nachgewiesen werden. Abbildung 8 A zeigt eine starke Markierung der kleinen, elektronenhellen Vesikel durch immungoldkonjugierte Antikörper gegen CSP.

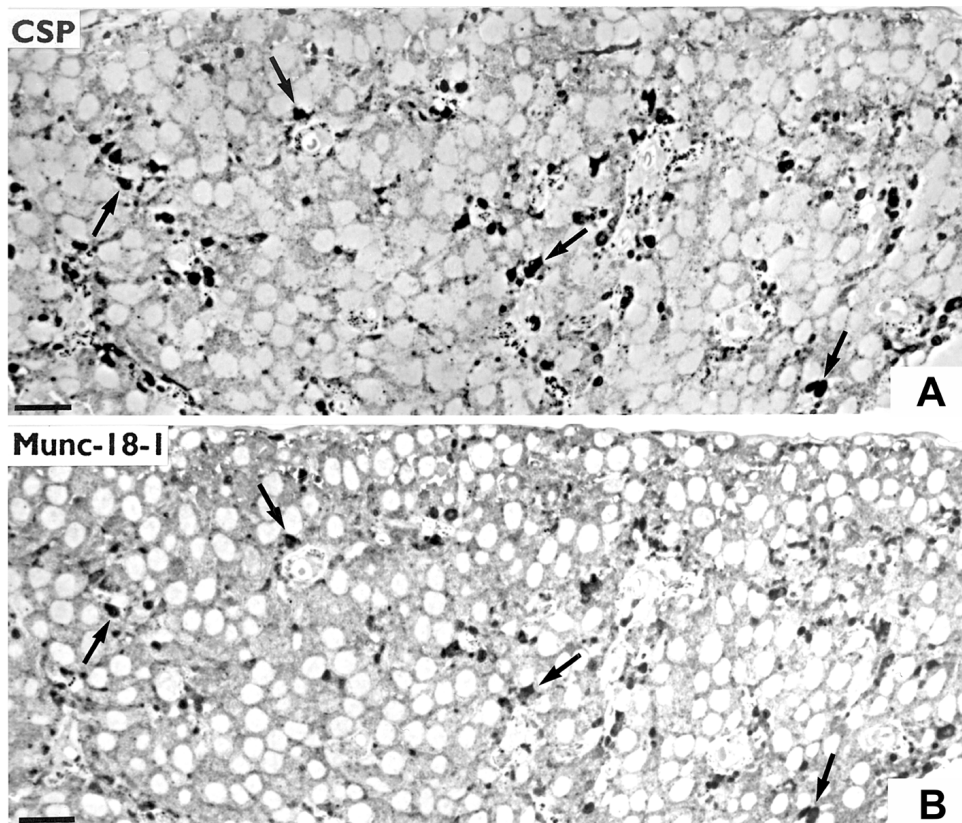


Abb. 9 Koexpression der Synapsenproteine CSP (A) und Munc 18-1 (B) in denselben Pinealozyten. In benachbarten Semidünnschnitten wird die Anreicherung der beiden Synapsenproteine in denselben Fortsatzterminalen deutlich (Pfeile). Phasenkontrast. Balken 20  $\mu\text{m}$ .

### 1.3 Synaptisches Vesikelprotein 2A (SV2A)

SV2 ist ein Vesikelmembranprotein mit 12 transmembranen Domänen, das in drei Isoformen vorliegt: Zwei neuronenspezifische Formen (SV2B und SV2C) und der hier untersuchten ubiquitären Form SV2A, die in Neuronen und endokrinen Zellen zu finden ist.

Die immunhistochemische Analyse zur zellulären Verteilung von SV2A im Pinealorgan von Gerbils führte zu ähnlichen Färbemustern wie die Untersuchungen von Munc 18-1 und CSP. Allerdings sind die Unterschiede in der Immunreaktivität zwischen Soma und Fortsatzende nicht ganz so stark ausgeprägt. Abbildung 10 zeigt einen Semidünnschnitt, der mit dem spezifischen, polyklonalen Antikörper gegen SV2A inkubiert wurde.



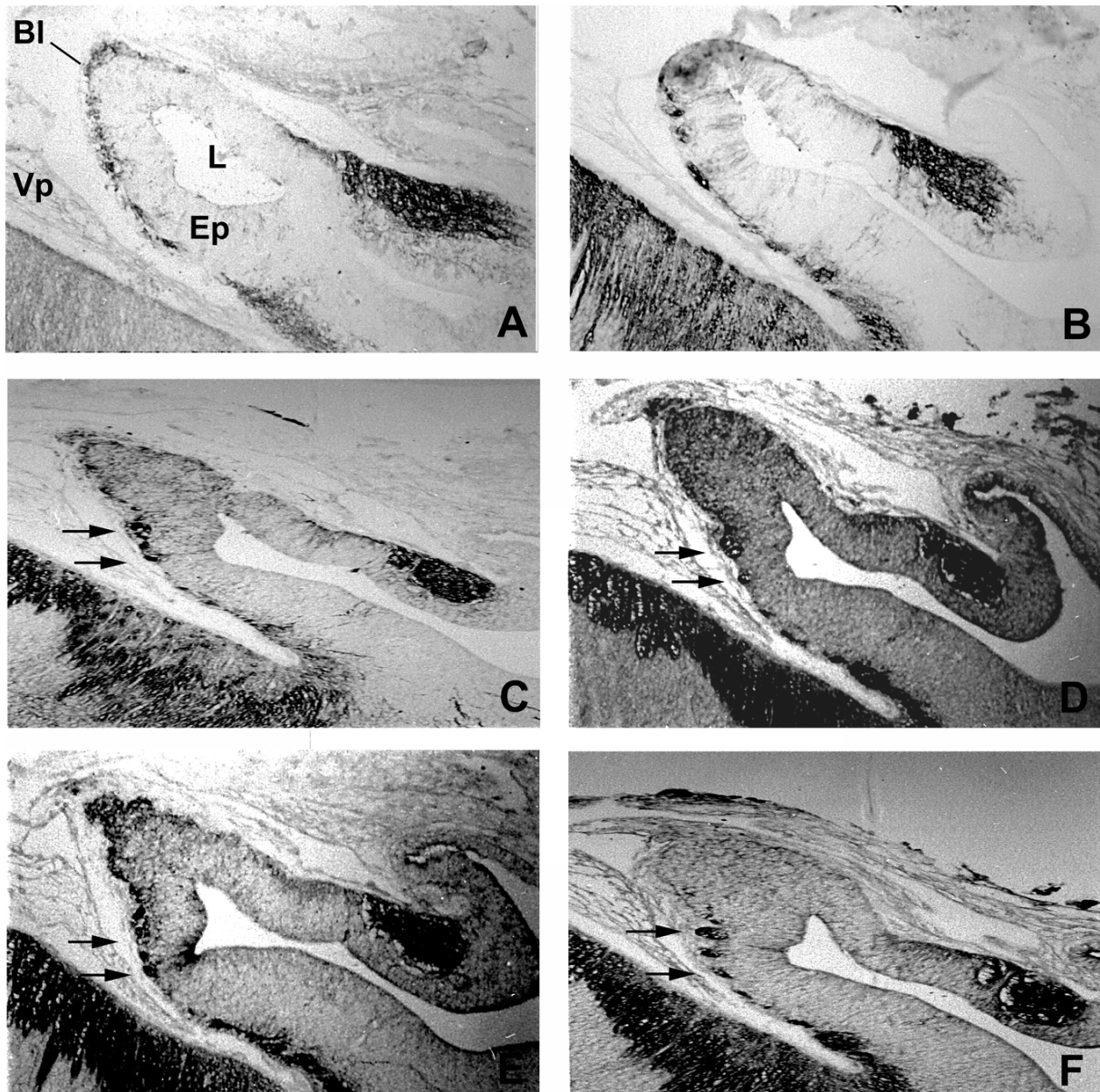
**Abb. 10** Immunhistochemischer Nachweis von SV2A im Semidünnschnitt eines Gerbils pinealorgans. Die immunpositiven Zellen sind Pinealocyten, deren markierte Fortsatzendigungen durch Pfeile gekennzeichnet sind. Phasenkontrast. Vergrößerung x 400.

---

## 2. Untersuchungen zum Verlauf der prä- und postnatalen Expression von Synapsenproteinen

Untersuchungen zur prä- und postnatalen Expression von Synapsenproteinen wurden bisher überwiegend an Neuronen (BERGMANN *et al.* 1991, STETTLER *et al.* 1996) und nur für das Synapsenprotein Synaptophysin an endokrinen Zellen durchgeführt (FUJIEDA *et al.* 1996). Dies ist die erste immunhistochemische Studie, in der die Expressionsmuster von sechs Synapsenproteinen über einen Zeitraum vom embryonalen Tag E 20,5 bis zum postnatalen Tag P 38 vergleichend untersucht wurden. Die untersuchten Proteine waren Synaptophysin, die SNARE-Proteine Synaptobrevin und SNAP-25 und die vesikelassoziierten Proteine Rab3a, Munc 18-1 und CSP. Als Tiermodell wurden hier nur mongolische Wüstenrennmäuse verwendet, da bei dieser Tierart – im Gegensatz zu anderen Tierarten – die Fortsatzendigungen der Pinealozyten eindeutig immunhistochemisch nachweisbar sind und somit auch deren Entwicklung gut charakterisiert werden kann. Die Untersuchung der Pränatalstadien wurde an Paraffinschnitten durchgeführt, die der Postnatalstadien an Semidünnschnitten.

Das Pinealorgan ist eine Ausstülpung des Zwischenhirndaches und besteht am Tag 20,5 der embryonalen Entwicklung (E 20,5) aus einem mehrschichtigen Epithel, das von einer Basallamina bedeckt ist. Im ventralen Bereich grenzt das Pinealorgan an einen in der Nähe liegenden Venenplexus. Das Lumen steht zu diesem frühen Zeitpunkt noch mit dem dritten Ventrikel in Verbindung. Bereits im ersten untersuchten Entwicklungsstadium (Tag E 20,5) konnten alle sechs Synapsenproteine nachgewiesen werden (Abb. 11 A – F). Immunpositive Zellen waren vorwiegend im distalen Teil des Pinealorgans zu beobachten. Viele dieser stark immunreaktiven Zellen waren an der Grenze zur Basallamina angeordnet. Abgesehen von diesen Gemeinsamkeiten unterschieden sich die Expressionsmuster der einzelnen Proteine voneinander. Synaptophysin-positive Zellen (Abb. 11 A) wurden fast ausschließlich in der Nähe der Basallamina lokalisiert. Antikörper gegen die Proteine SNAP-25 und Synaptobrevin markierten ebenfalls überwiegend Zellen in der Peripherie (Abb. 11 B und C), jedoch wurde auch ein beträchtlicher Anteil der zum Lumen gerichteten Zellen markiert. Schwache Immunreaktivitäten für Rab3a, Munc 18-1 und CSP (Abb. 11 D, E, F) wurden im gesamten distalen Epithel gefunden. Zusätzlich wurden in lokalen Ausstülpungen des Epithels, die zum Venenplexus hin ausgerichtet waren, außergewöhnlich stark immunmarkierte Zellhaufen detektiert (Pfeile).

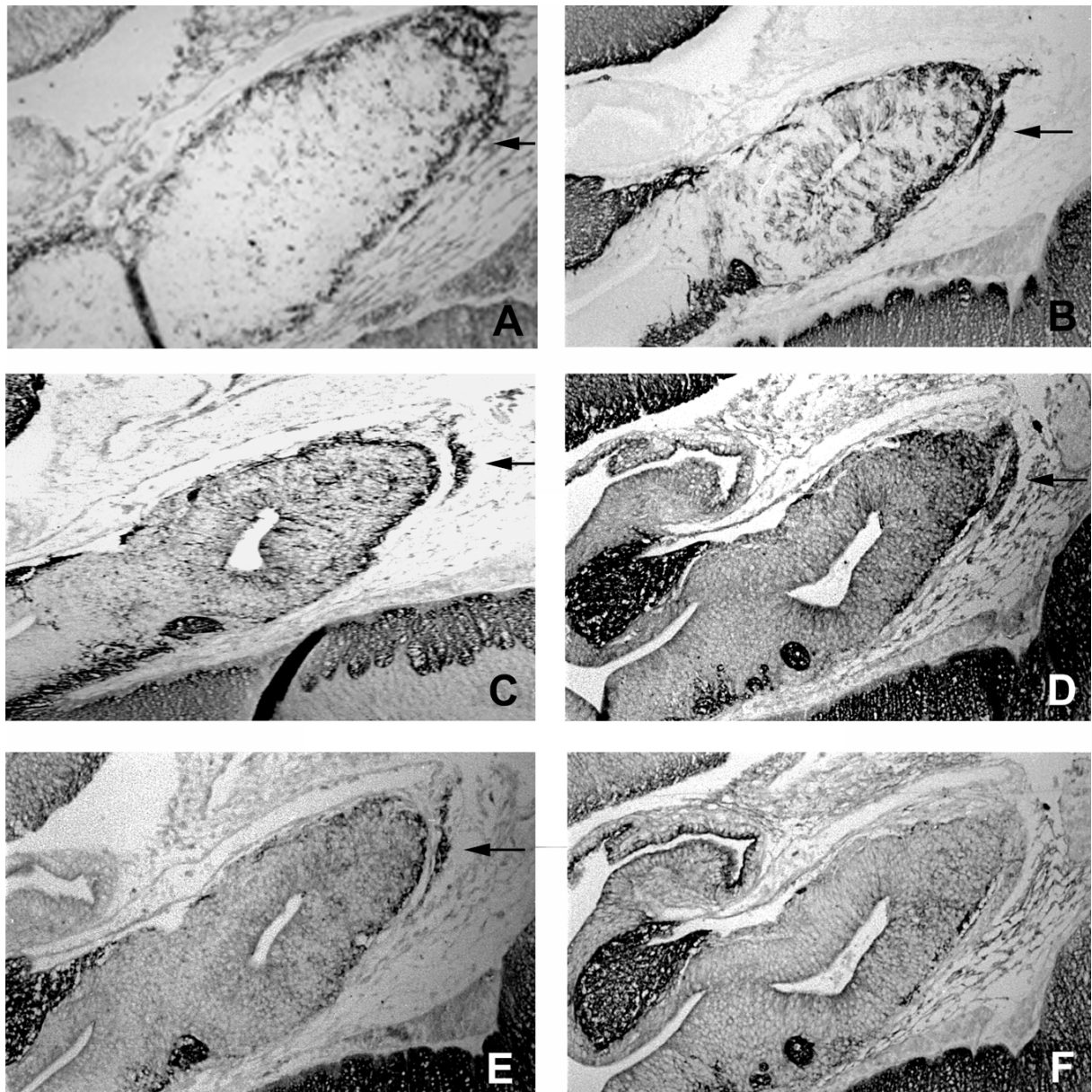


**Abb. 11** Paraffinschnitte eines Gerbilpinealorgans am embryonalen Tag E 20,5. Schon zu diesem frühen Zeitpunkt der Ontogenese konnten die Synapsenproteine Synaptophysin (A), SNAP-25 (B), Synaptobrevin (C), Rab3a (D), Munc 18-1 (E) und CSP (F) nachgewiesen werden. Stark immunreaktive Zellen sind in Epithelausstülpungen zu finden (Pfeile). Basallamina (Bl), Epithel (Ep), Lumen (L), Venenplexus (Vp). Durchlicht. Vergrößerung x 200.

---

Am 24. Tag der embryonalen Entwicklung erscheint das Epithel verdickt. Das Lumen ist deutlich kleiner und eine Verbindung mit dem dritten Ventrikel konnte nicht mehr nachgewiesen werden. Immunhistochemisch wurden mehr Zellen im Pinealorgan markiert als zum Zeitpunkt E 20,5 (Abb. 12). Neben den Zellen im distalen Teil konnten nun auch im proximalen Teil immunreaktive Zellen lokalisiert werden und die Intensität der Immunreaktivitäten nahm ebenfalls zu. Wie am Tag E20,5 zeigten die Färbemuster einiger Proteine Ähnlichkeiten. So ließen sich zum Beispiel die Immunreaktivitäten für die SNARE-Proteine SNAP-25 und Synaptobrevin in gleichen Bereichen des Epithels detektieren (Abb. 12 B, C). Aufgrund der Schnittdicke der Paraffinschnitte konnten jedoch keine eindeutigen Kollokalisierungen der Proteine auf Einzelzellebene nachgewiesen werden. Auch die vesikelassoziierten Proteine Rab3a, Munc 18-1 und CSP (Abb. 12 D, E, F) zeigten ein ähnliches Markierungsmuster, das aber nicht auf Einzelzellebene untersucht werden konnte. Synaptophysin wurde, wie schon am Tag E 20,5, überwiegend in peripheren Zellen nachgewiesen (Abb. 12 A). Zusätzlich konnten zu diesem Zeitpunkt auch einzelne zentral gelegene Zellen markiert werden. Besonders auffällig erscheint in Abbildung 12 ein Zellaggregat, das außerhalb der Basalmembran des Pinealorgans in der umgebenden Matrix liegt und sehr starke Immunreaktivitäten für fast alle Proteine aufweist (Pfeil).





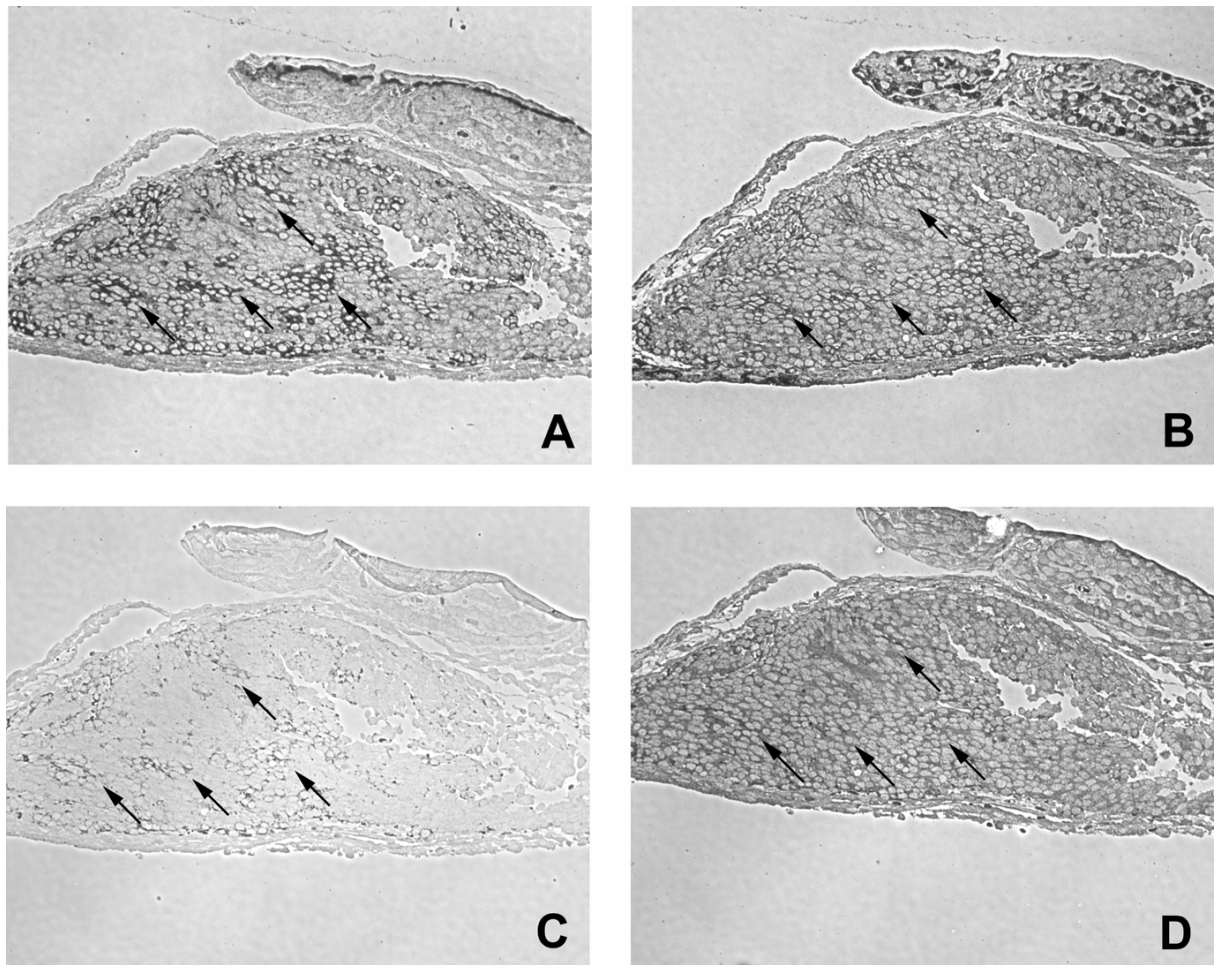
**Abb. 12** Paraffinschnitte eines Gerbilpinealorgans am embryonalen Tag E 24,5. Es ist eine Zunahme der immunmarkierten Zellen für alle Synapsenproteine im Vergleich zu Tag E 20,5 zu verzeichnen. Die Pfeile markieren ein stark immunreaktives Zellaggregat, das sich außerhalb der Basallamina befindet. Dargestellt sind Immunfärbungen von Synaptophysin (A), SNAP-25 (B), Synaptobrevin (C), Rab3a (D), Munc 18-1 (E) und CSP (F). Durchlicht. Vergrößerung x 200.



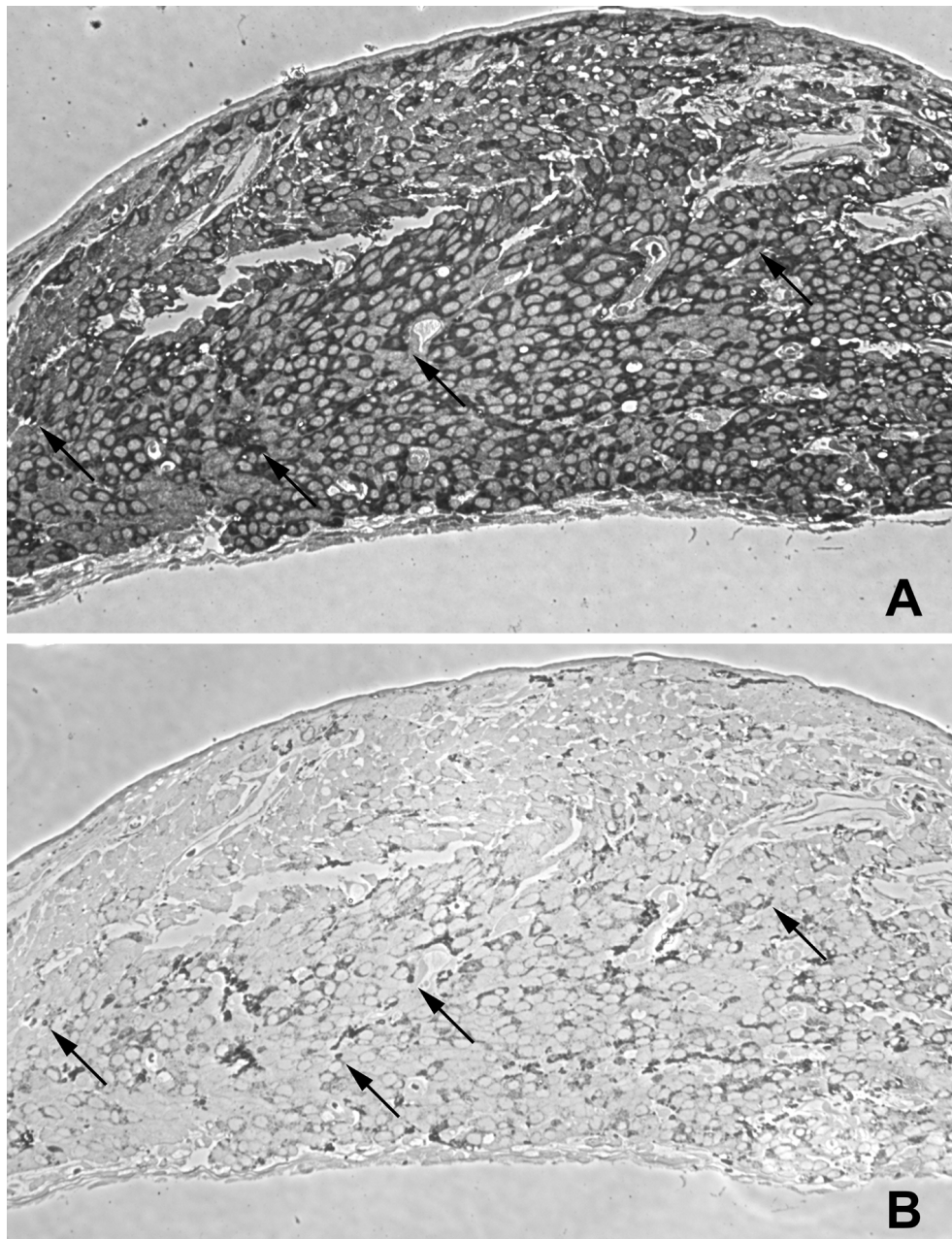
---

Bis zur Geburt (Tag P 0) entwickelt sich das Pinealorgan zu einem kompakten Organ; das Lumen ist dann gänzlich verschwunden. Diese Entwicklung geht mit einer Größenzunahme des Organs einher.

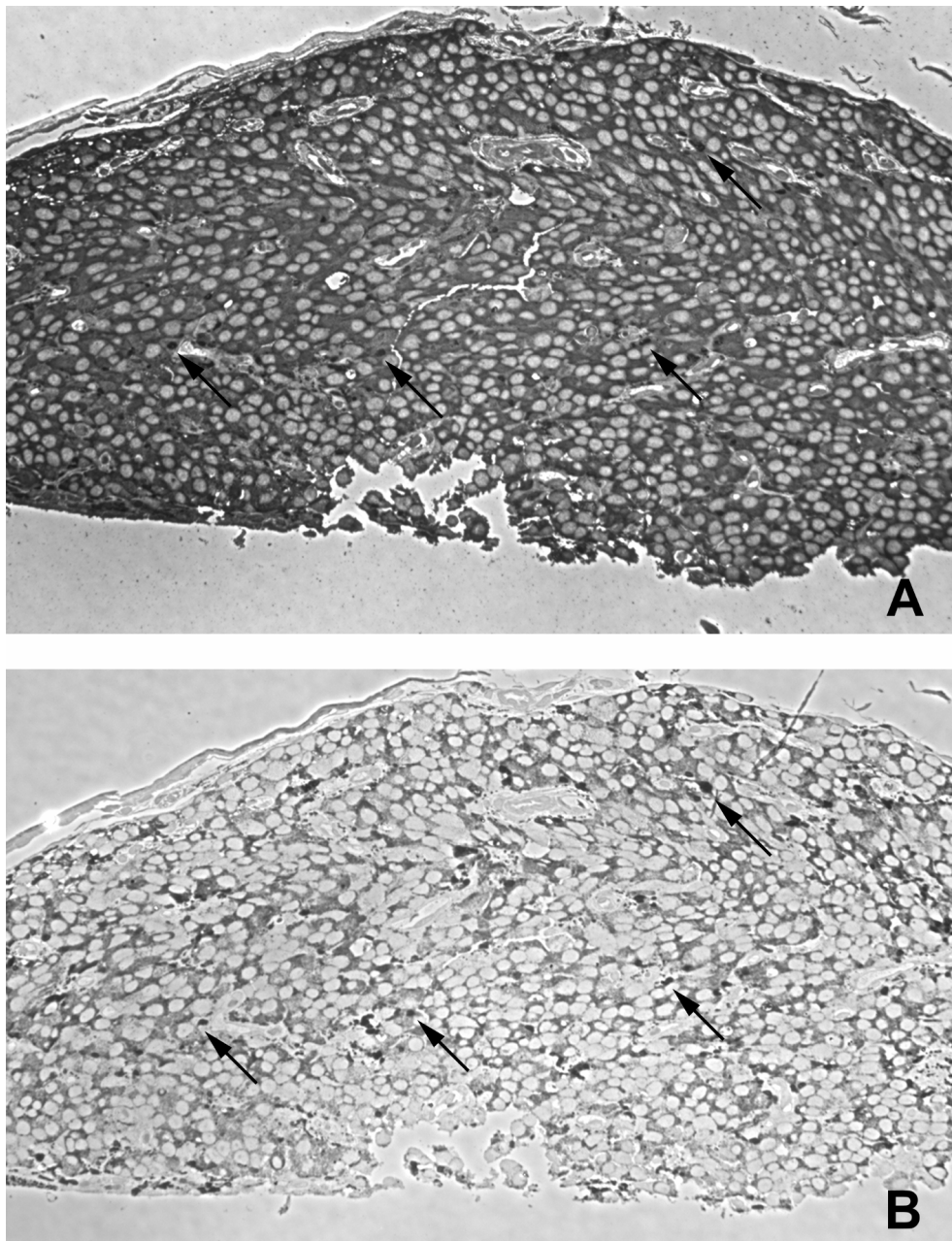
Die Markierungen für alle Proteine waren zu diesem Zeitpunkt mehr oder weniger gleichmäßig im Parenchym verteilt (Abb. 13 A – D). Ungefähr 30 – 50% aller Zellen zeigten Immunreaktivitäten. Erstmals während der Ontogenese des Pinealorgans konnte nachgewiesen werden, daß die Färbemuster der untersuchten Synapsenproteine überlappten, d.h. daß in einer einzelnen Zelle alle untersuchten Proteine koexprimiert wurden (Pfeile). Allerdings unterschied sich das Ausmaß der Immunreaktivitäten voneinander. Besonders die Markierungen mit Antikörpern gegen Synaptobrevin und CSP erschienen im Vergleich zu den Immunreaktivitäten der anderen Proteine schwächer. In der ersten postnatalen Woche nahm dann sowohl die Intensität der Immunreaktivitäten als auch die Zahl der immunpositiven Zellen zu, so daß am Tag P 7 fast alle Zellen markiert wurden (Abb. 14 A, B). Ab diesem Zeitpunkt konnte außerdem beobachtet werden, daß die Fortsatzendigungen der Pinealocyten erstmals deutlich die untersuchten Synapsenproteine anreicherten (Pfeile). In zusätzlich durchgeführten elektronenmikroskopischen Untersuchungen wurde bestätigt, daß synaptoide Mikrovesikel zu Beginn der zweiten postnatalen Woche in den Endkolben der Pinealocytenfortsätze akkumuliert werden. Bis zum Tag P 14 nahm die Stärke der Immunmarkierungen in Soma und Fortsätzen nochmals zu (Abb. 15 A, B). Im weiteren Verlauf der Ontogenese bis zum letzten untersuchten Tag P 38 konnten keine Veränderungen mehr im Markierungsmuster festgestellt werden.



**Abb. 13** Benachbarte Semidünnschnitte eines Gerbilpinealorgans am Tag der Geburt (P 0). Zahlreiche Zellen im Parenchym zeigen Immunreaktivitäten für die untersuchten Synapsenproteine Synaptophysin (A), SNAP-25 (B), Synaptobrevin (C) und Rab3a (D). Zu diesem Zeitpunkt konnte erstmals eine Koexpression aller Synapsenproteine in denselben Pinealozyten festgestellt werden (Pfeile). Phasenkontrast. Vergrößerung x 200.



**Abb. 14** Benachbarte Semidünnschnitte eines Gerbilpinealorgans am siebten Tag nach der Geburt (P 7). Erstmals können besonders stark immungefärbte Fortsatzendigungen im Pinealorgan beobachtet werden (Pfeile). Synaptophysin (A), Synaptobrevin (B). Phasenkontrast. Vergrößerung x 200.



**Abb. 15** Benachbarte Semidünnschnitte eines Gerbilpinealorgans am Tag P 14. Fast alle Zellen sind immunreaktiv für die untersuchten Proteine. Auffällig sind die stark markierten Fortsatzendigungen, die im Parenchym und im perivaskulären Raum verteilt liegen (Pfeile). Synaptophysin (A), Synaptobrevin (B). Phasenkontrast. Vergrößerung x 200.

---

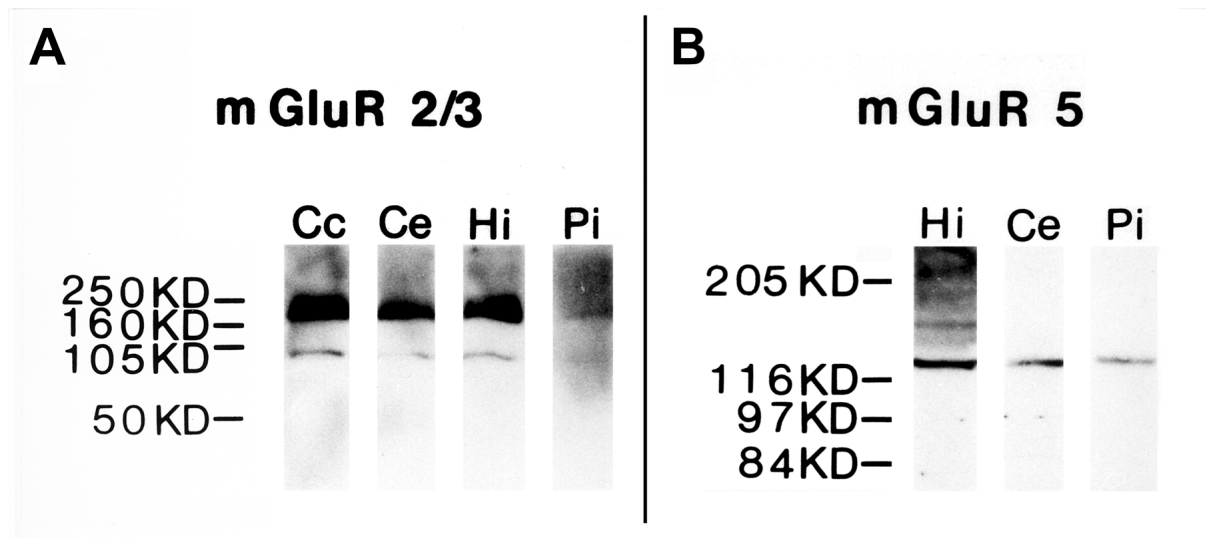
### 3. Nachweis von metabotropen Glutamatrezeptoren

Untersuchungen verschiedener Arbeitsgruppen (REDECKER und VEH 1994, MORIYAMA und YAMAMOTO 1995) deuten darauf hin, daß die Mikrovesikel in den Pinealozyten als Botensubstanz den Neurotransmitter Glutamat speichern. Detaillierte Studien zum Nachweis und zur Verteilung von Glutamatrezeptoren könnten Aufschluß über die Zielzellen des freigesetzten Glutamats geben und Rückschlüsse auf die Wirkmechanismen des Glutamats im Pinealorgan zulassen. Nach neueren Erkenntnissen (YAMADA *et al.* 1998) sollen im Pinealorgan metabotrope Rezeptoren die Glutamatwirkungen vermitteln.

In der vorliegenden Arbeit wurden für den immunhistochemischen Nachweis der Rezeptoren zwei spezifische, polyklonale Antikörper verwendet. Der erste Antikörper unterscheidet nicht zwischen den beiden metabotropen Rezeptoren der Gruppe II mGluR2 und mGluR3 und wird fortan als Antikörper gegen mGluR2/3 bezeichnet. Der zweite Antikörper ist gegen den metabotropen Glutamatrezeptor mGluR5 aus der Gruppe I gerichtet.

#### 3.1 mGluR2/3

In *Western Blots* (Abb. 16 A) von Gehirn- und Pinealhomogenaten reagierte das Antiserum gegen mGluR2/3 mit einer Proteinbande von ca. 100 kDa. In der Pinealfraktion vom Gerbil ließ sich die Bande allerdings erst nach verlängerter Filmexposition darstellen, während der Rezeptor im Homogenat von Rattenpinealorganen nicht nachweisbar war. Im Gerbilgewebe markierte der Antikörper zusätzlich eine zweite Bande bei ungefähr 200 kDa. Diese Bande mit hohem Molekulargewicht wurde häufig beobachtet und repräsentiert wahrscheinlich Aggregate der Rezeptorproteine. Verwendete man Dithiothreitol (DTT) in einer Konzentration von 20 mM im Laufpuffer bei der Gelelektrophorese, dann wurde die Bande mit dem niedrigeren Molekulargewicht begünstigt (siehe auch TESTA *et al.* 1998).



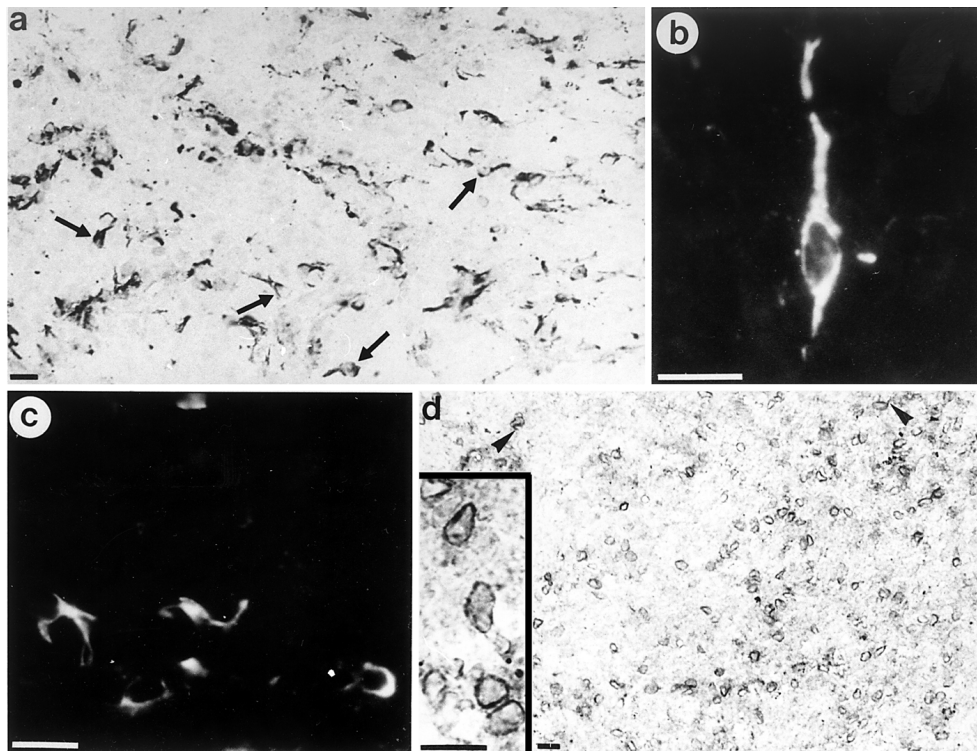
**Abb. 16** *Western Blot* zum Nachweis der Glutamatrezeptoren mGluR2/3 (A) und mGluR5 (B). Untersucht wurden Gewebekomponenten des cerebralen Cortex (Cc), des Cerebellums (Ce), des Hippocampus (Hi) und des Pinealorgans (Pi) von Gerbils. Am jeweils linken Rand des *Western Blots* ist die Verteilung der Molekulargewichtsmarker aufgetragen.

Der immunhistochemische Nachweis der metabotropen Glutamatrezeptoren gestaltete sich zunächst schwierig. Sowohl in Paraffin- als auch in Semidünnschnitten konnten keine spezifischen Markierungen erzielt werden. Erst in Kryostatschnitten wurden Immunreaktivitäten sichtbar. Verglichen mit den üblichen Fixierungsmethoden bewirkte die Mikrowellenbehandlung der Kryostatschnitte ein positives Verhältnis von spezifischer Immunreaktivität zu Hintergrundfärbung und führte somit zu deutlichen, reproduzierbaren Färbemustern. Aus diesem Grund wurde in dieser Arbeit ausschließlich diese Methode für die immunhistochemische Analyse der Glutamatrezeptoren mGluR2/3 und mGluR5 verwendet.

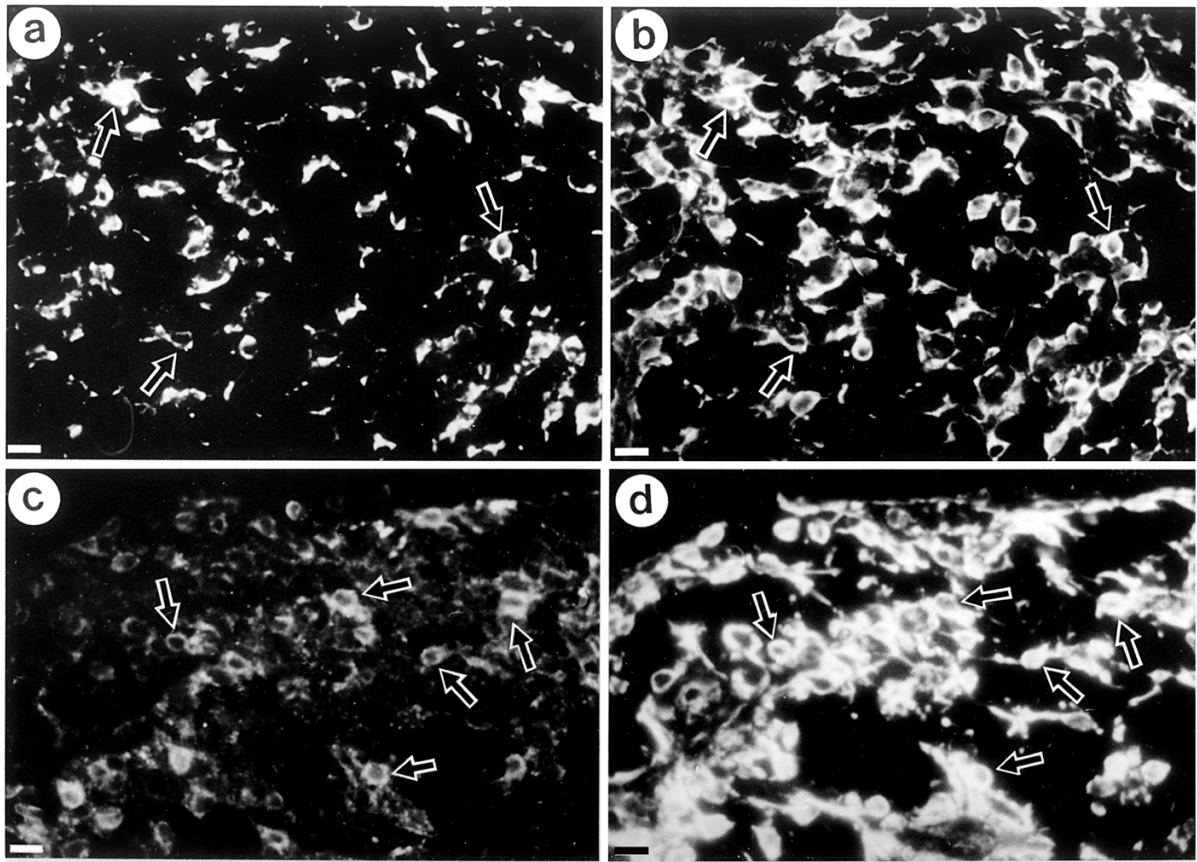
mGluR2/3-immunpositive Zellen wurden nur im Pinealorgan des Gerbils gefunden (Abb. 17 A - C). Im Pinealorgan der Ratte konnte mGluR2/3 mit immunhistochemischen Methoden nicht nachgewiesen werden.

Die starken Immunreaktivitäten im Pinealorgan des Gerbils waren auf eine Subpopulation von Zellen beschränkt, die im Parenchym verteilt lagen. Diese Zellen waren klein, unregelmäßig geformt und besaßen eine variable Anzahl von Fortsätzen, die zwischen den zahlreichen ungefärbten Zellen zu finden sind (Abb. 17 A). Um die immunreaktiven Zellen näher zu bestimmen, wurden Antikörper gegen die im Pinealorgan vorkommenden Markerproteine

Synaptophysin (in Pinealozyten), Vimentin (in gliaähnlichen, interstitiellen Zellen) und saures Gliafibrillenprotein (GFAP; in astrozytenartigen Zellen) verwendet. Das Ergebnis der Doppelmarkierungen ergab, daß die mGluR2/3-positiven Zellen gleichzeitig vimentinpositiv waren, aber keine Immunreaktivitäten für Synaptophysin aufwiesen (Abb. 18 A, B). Das heißt, daß es sich bei den mGluR2/3-reaktiven Zellen eindeutig um gliaähnliche, interstitielle Zellen handelt. Ungefähr 30 – 50% aller interstitieller Zellen wurden mit Antikörpern gegen mGluR2/3 markiert. Überlappungen von Markierungen für mGluR2/3 und GFAP in den gleichen Zellen traten nicht auf.



**Abb. 17** Immunmarkierungen für mGluR2/3 (A – C) und mGluR5 (D) in Kryostatschnitten eines Gerbilpinealorgans. Es wurde sowohl die ABC-Technik (A, D) als auch die Immunfluoreszenz-Methode (B, C) verwendet. Abbildung A zeigt mGluR2/3-positive Zellen, die im Parenchym verteilt liegen. Sie besitzen größtenteils lange, schmale Fortsätze und sind hier mit Pfeilen markiert. Abbildung B und C stellen diese Zellen vergrößert dar. mGluR5-positive Zellen sind in Abbildung D zu erkennen. Sie zeichnen sich durch eine Markierung der Plasmamembran aus, Fortsätze werden nur sehr selten markiert (Pfeilspitzen). Das kleine Bild in (D) stellt diese Zellen in der Vergrößerung dar. Phasenkontrast (A, D). Fluoreszenzmikroskopie (B, C). Balken 10  $\mu\text{m}$ .



**Abb. 18** Doppelmarkierungen mit Antikörpern gegen mGluR2/3 (A) und Vimentin (B) bzw. mGluR5 (C) und Vimentin (D) im Gerbilpinealorgan. Die mGluR2/3- bzw. mGluR5-positiven Zellen exprimieren ebenfalls den Marker für interstitielle Zellen, das Intermediärfilamentprotein Vimentin (Pfeile). Immunfluoreszenz. Balken 10  $\mu$ m.

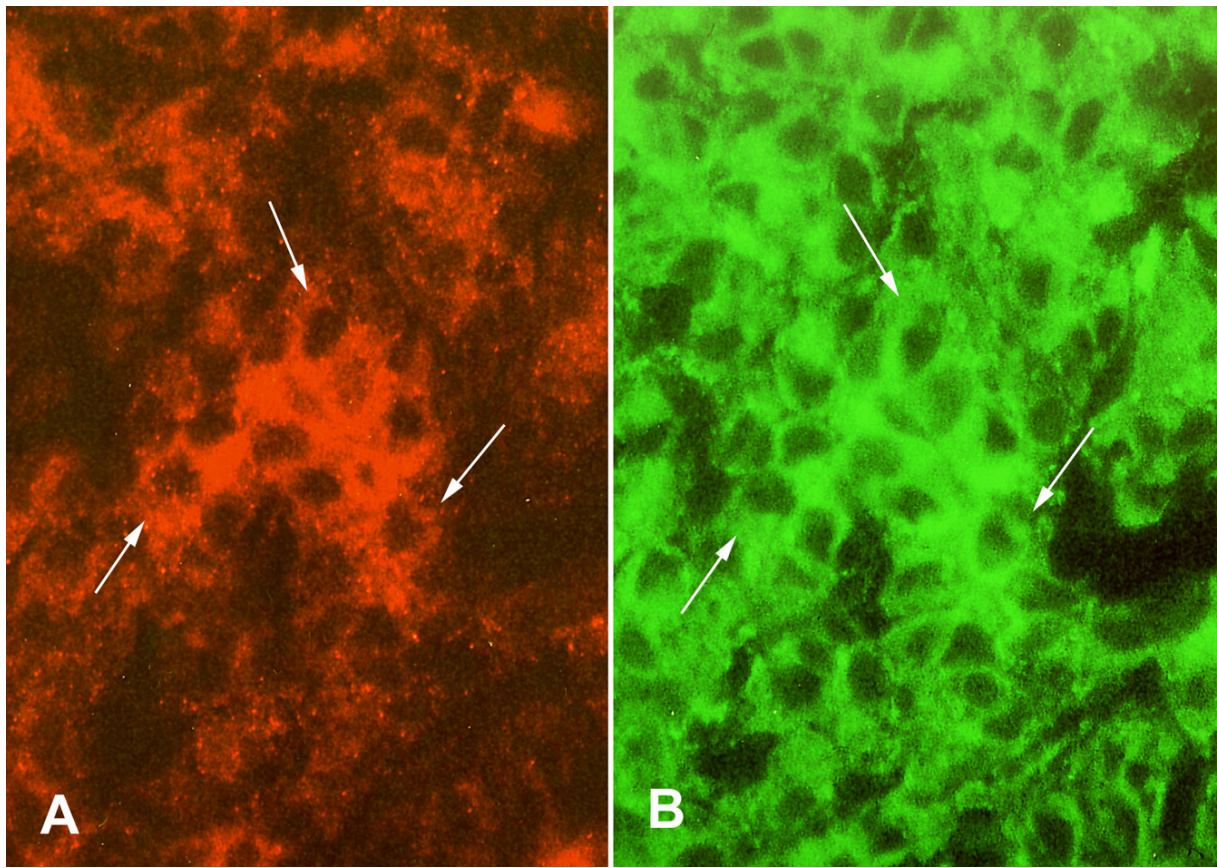


### 3.2 mGluR5

Im Unterschied zu mGluR2/3 konnte der Glutamatrezeptor mGluR5 im *Western Blot* sowohl in Pinealhomogenaten von Gerbils (Abb. 16 B) als auch in denen von Ratten nachgewiesen werden. Als Positivkontrollen dienten Gewebe aus unterschiedlichen Gehirnregionen. Der Antikörper gegen mGluR5 markierte eine Bande bei 130 – 140 kDa in den Gehirn- und Pinealhomogenaten und außerdem eine relativ breite Bande bei ca. 150 – 160 kDa, die sowohl in den Gehirnfractionen als auch nach längerer Filmexposition in der Pinealfraction sichtbar wurde. Diese Molekulargewichte entsprechen den Größen der Isoformen von mGluR5, wobei die Bande mit dem niedrigeren Molekulargewicht die unglykosylierte und diejenige mit dem höheren Molekulargewicht die glykosylierte Form repräsentiert. Wie im Falle von mGluR2/3 konnte auch für mGluR5 eine hochmolekulare Bande (> 250 kDa) detektiert werden, die wahrscheinlich aggregierten Proteinen entsprach.

Mittels Immunhistochemie an mikrowellenbehandelten Kryostatschnitten konnten Immunreaktivitäten für mGluR5 im Pinealgewebe beider untersuchter Tierarten nachgewiesen werden. Die Markierung war sowohl in Ratten- als auch in Gerbilpinealorganen auf eine Subpopulation von Pinealzellen begrenzt, die im Drüsengewebe verteilt lagen. Auffällig war, daß im Gegensatz zum Färbemuster des mGluR2/3-Antikörpers mit dem Antiserum gegen mGluR5 nur die Plasmamembran markiert wurde, nicht aber Zellfortsätze und Fortsatzendigungen (Abb. 17 D).

Zur Identifizierung der immunpositiven Zellen wurden wiederum Antikörper gegen die schon genannten Markerproteine Synaptophysin, Vimentin und GFAP eingesetzt. Dabei wurden Speziesunterschiede beobachtet. Im Pinealorgan vom Gerbil (Abb. 18 C, D) koexprimierten die mGluR5-positiven Zellen Vimentin, jedoch kein Synaptophysin, was sie zweifelsfrei als gliaähnliche, interstitielle Zellen auswies. Ungefähr 90% aller interstitiellen Zellen exprimierten den Glutamatrezeptor mGluR5 im Gerbilpinealorgan. Im Rattenpinealorgan hingegen war mGluR5 primär auf Pinealozyten zu finden. Die mGluR5-immunpositiven Zellen (Abb. 19 A) zeigten in Doppelmarkierungen nämlich Immunreaktivität für Synaptophysin (Abb. 19 B). Nur wenige mGluR5-reaktive Zellen waren statt dessen vimentinpositiv. Generell war in beiden Spezies keine Koexpression von mGluR5 und GFAP zu beobachten.



**Abb. 19** Doppelmarkierung mit Antikörpern gegen mGluR5 (A) und Synaptophysin (B). Im Rattenpinealorgan werden mGluR5 und Synaptophysin in denselben Zellen exprimiert (Pfeile). Immunfluoreszenz. Vergrößerung x 400.

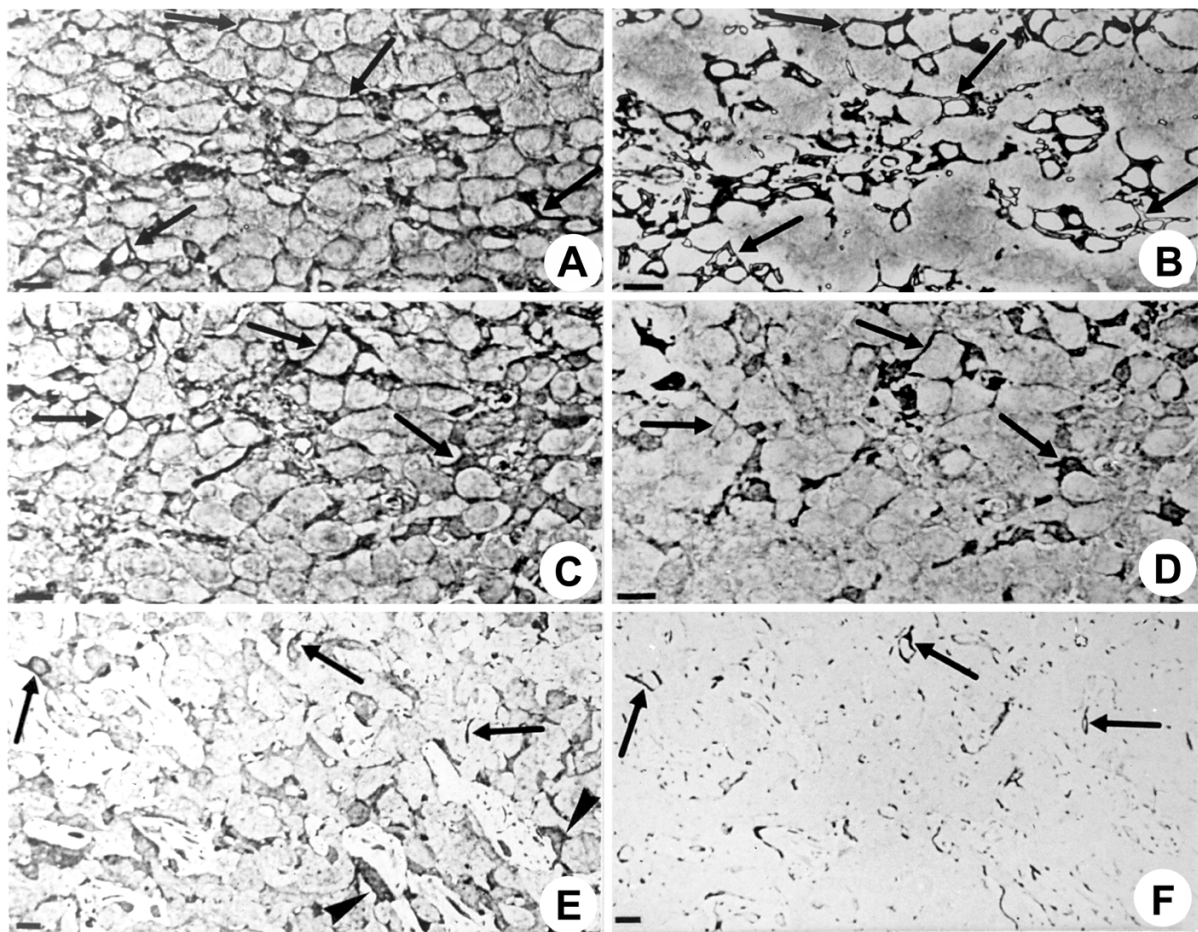
---

#### 4. Nachweis von Glutamattransportern

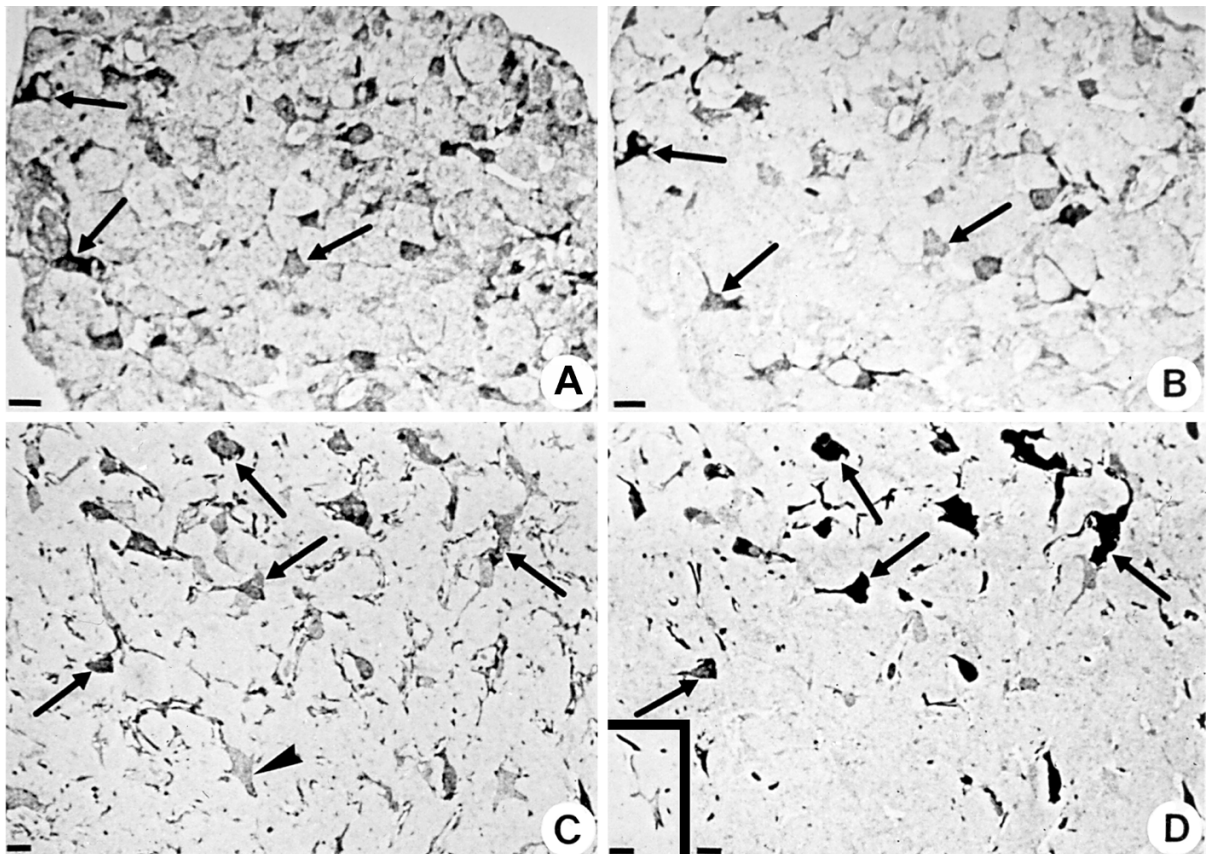
Im Nervensystem kommen die Glutamattransporter GLT-1, GLAST und EAAC1 (ROTHSTEIN *et al.* 1994, 1996, KANAI *et al.* 1995, LEHRE *et al.* 1995, SCHMITT *et al.* 1996, VELAZ-FAIRCLOTH *et al.* 1996) vor. Sie sorgen dort für eine schnelle Inaktivierung des Glutamats, indem sie den Botenstoff aus dem Interzellularraum in angrenzende Zellen transportieren und damit eine schnelle und fehlerfreie Signalübertragung gewährleisten. Mit immunhistochemischen Methoden an seriellen Semidünnschnitten sollte die Frage geklärt werden, ob diese Glutamattransporter auch im Pinealorgan zu finden sind.

##### 4.1 GLT-1 und GLAST

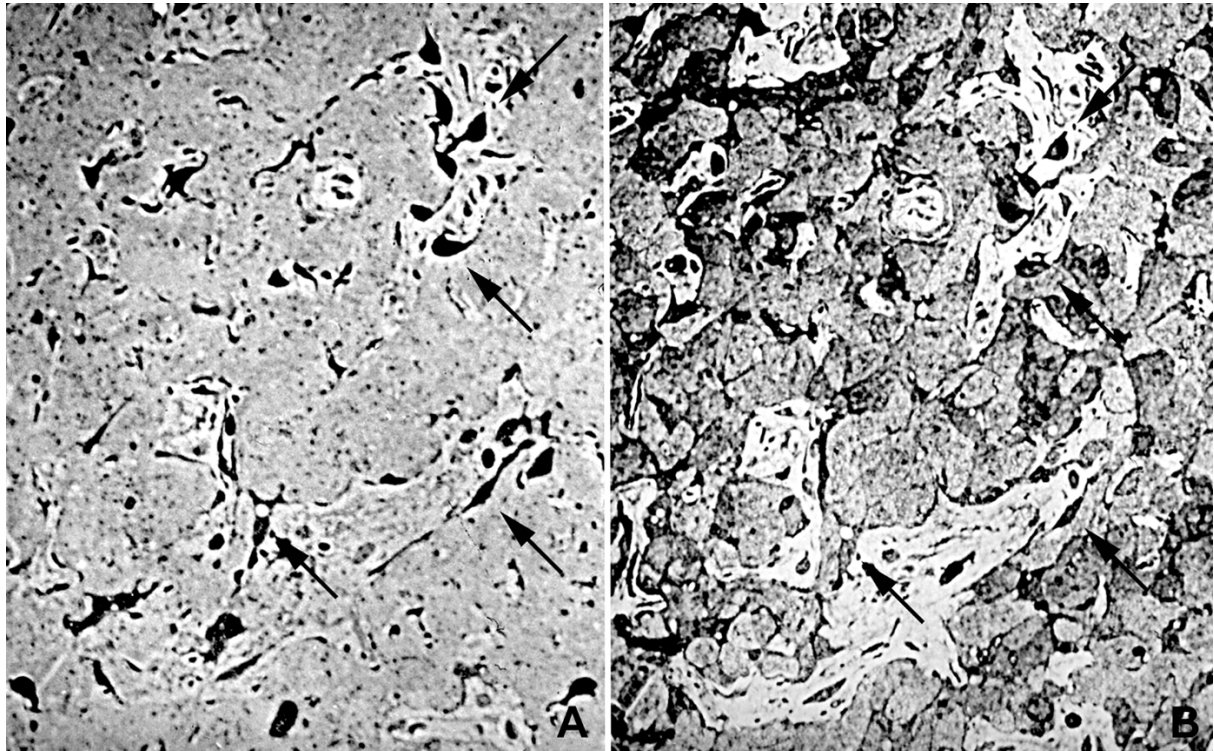
Generell wurden in den untersuchten Pinealorganen von Ratte und Gerbil Immunreaktivitäten für GLT-1 und GLAST gefunden (Abb. 20 und 21). In beiden Tierarten wurde eine Subpopulation von Zellen markiert, die im Gewebe gleichmäßig verteilt lag. Diese Zellen besaßen einen kleinen Zellkörper mit schmalen, meist langen Fortsätzen, die die ungefärbten Zellen umgaben. Schon anhand der Morphologie dieser Zellen konnte man vermuten, daß es sich um interstitielle Zellen handelte. Zur Bestätigung der Vermutung wurden die benachbarten Semidünnschnitte, wie schon in den anderen genannten Untersuchungen mit Antikörpern, gegen Markerproteine der verschiedenen pinealen Zelltypen gefärbt. Die GLAST-immunpositiven und die meisten GLT-1-positiven Zellen zeigten auch Immunreaktivität für Vimentin (Abb. 20 A, B, E, F). Außerdem konnten die GLAST-positiven und zahlreiche GLT-1-positive Zellen mit dem Calbindin-Antikörper in der Ratte (Abb. 21 C, D) und mit dem Calretinin-Antikörper im Gerbil (Abb. 20 C, D und 21 A, B) markiert werden. Damit wurden die Zellen zweifelsfrei als gliaähnliche, interstitielle Zellen identifiziert. Die Immunreaktivitäten für GLAST und den Pinealozytenmarker Synaptophysin und Synaptobrevin überlappten im Gerbilpinealorgan nicht. Im Rattenpinealorgan hingegen wird GLT-1 jedoch in einer geringen Anzahl von Pinealozyten exprimiert (Abb. 20 E, Pfeilköpfe). Einige GFAP-positive Zellen waren zugleich auch GLT-1- und GLAST-positiv (Abb. 21 C, D kleines Bild). Bemerkenswert ist, daß beide Glutamattransporter GLT-1 und GLAST zum Teil in denselben Zellen lokalisiert werden konnten (Abb. 22 A, B).



**Abb. 20** Im Gerbilpinealorgan wurden kleine GLT-1-immunpositiven Zellen und ihre schmalen Fortsätze (A, C) detektiert. Dieselben Zellen wurden in benachbarten Semidünnschnitten mit Antikörpern gegen Vimentin (B) oder Calretinin (D) markiert und somit als interstitielle Zellen identifiziert. Im Rattenpinealorgan konnte anhand von seriellen Semidünnschnitten ebenfalls eine Koexpression von GLT-1 (E) und Vimentin (F) nachgewiesen werden (Pfeile). Außerdem wurde GLT-1 auch in einigen Pinealozyten lokalisiert (Pfeilköpfe in E). Phasenkontrast. Balken 10  $\mu\text{m}$ .



**Abb. 21** Viele kleine GLAST-positive Zellen (A) im Gerbilpinealorgan zeigten auch Immunreaktivitäten für Calretinin (B). Dies konnte in benachbarten Semidünnschnitten nachgewiesen werden. Im Rattenpinealorgan wurden GLAST (C) und Calbindin (D) in denselben Zellen koexprimiert. In beiden Tiermodellen war GLAST also in interstitiellen Zellen zu finden. Die Pfeilspitze in Abbildung C markiert eine GLAST-positive Zelle, die ebenfalls mit einem Antikörper gegen GFAP gefärbt werden konnte (kleines Bild in D). Phasenkontrast. Balken 10  $\mu\text{m}$ .

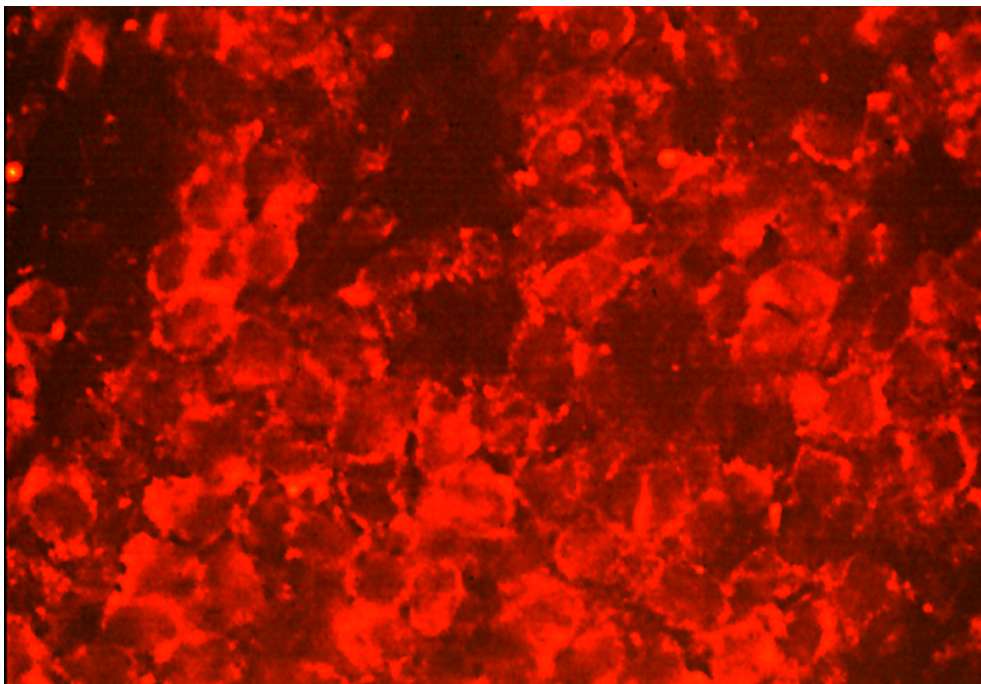


**Abb. 22** Kolokalisation von GLT-1 (A) und GLAST (B) in denselben interstitiellen Zellen (Pfeile). Phasenkontrast. Vergrößerung x 200.



## 4.2 EAAC1

Der Glutamattransporter EAAC1, der im zentralen Nervensystem auf Neuronen vorkommt (KANAI *et al.* 1994, ROTHSTEIN *et al.* 1994), konnte im Pinealorgan beider untersuchter Tierarten auf Pinealozyten lokalisiert werden. Der spezifische, polyklonale Antikörper gegen EAAC1 markierte zahlreiche, relativ große Zellen. Anhand der Morphologie der Zellen kann man darauf schließen, daß es sich sehr wahrscheinlich um Pinealozyten handelt. (Abb. 23).



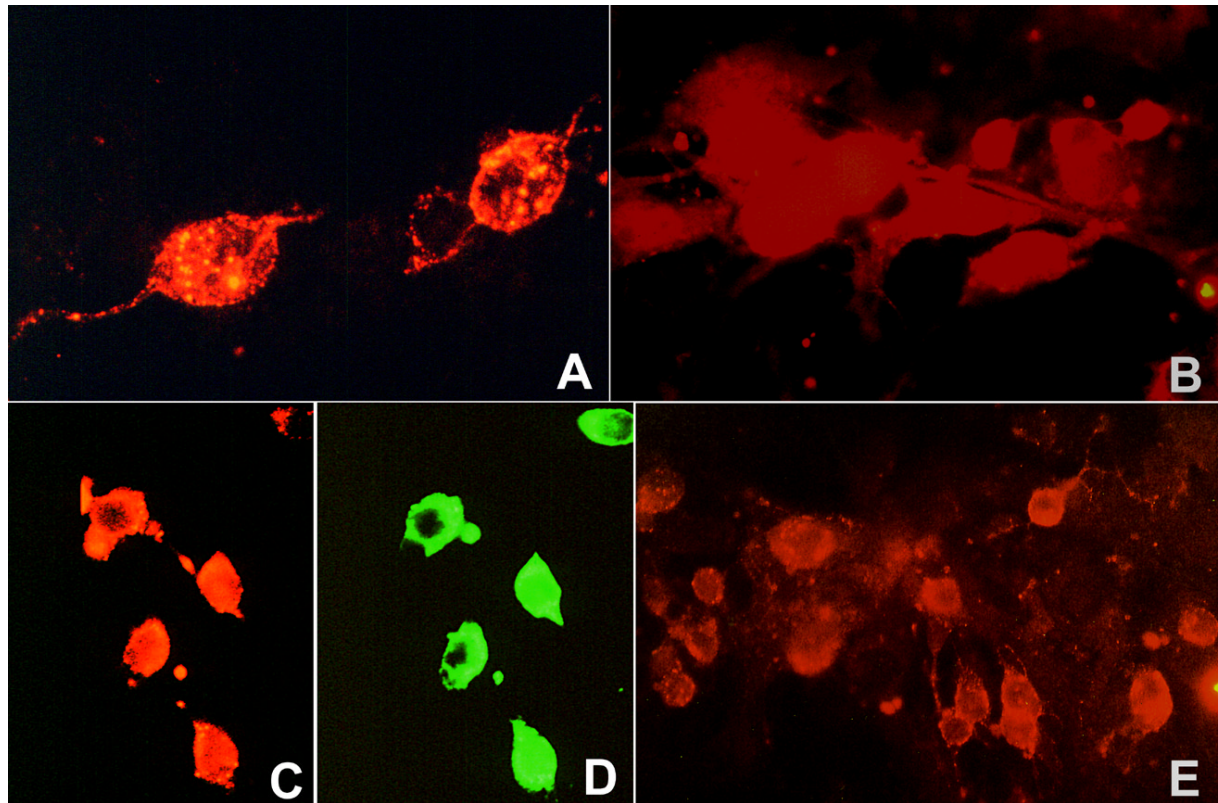
**Abb. 23** Im fluoreszenzgefärbten Semidünnschnitt konnte die Expression von EAAC1 in Pinealozyten nachgewiesen werden. Immunfluoreszenz. Vergrößerung x 400.

### 5. Exozytose-Assay

Zur lichtmikroskopischen Darstellung von Vesikelexozytosen ist ein *Assay* verwendet worden, in dem ein spezifischer Antikörper gegen die lumenale Domäne des Vesikelmembranproteins Synaptotagmin zum Einsatz kommt. Ursprünglich wurde dieser *Assay* von MATTEOLI *et al.* (1992) für kultivierte Hippocampusneurone entwickelt. Der *Assay* beruht auf einem einfachen Prinzip: Durchlaufen synaptoider Vesikel Exozytosen, so öffnen sich die Vesikel durch Fusion mit der Zellmembran zum Kulturmedium hin. Während dieser kurzen Zeit können die im Kulturmedium vorhandenen Antikörper in das Lumen der Vesikel eindringen und an ihr spezifisches Epitop binden. Sie werden durch die darauffolgende Endozytose internalisiert. Da der Antikörper zuvor mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt wurde, ist der Vorgang direkt mikroskopisch nachweisbar.

Mit dieser Methode wurden in den Pinealozyten spezifische, punktförmige Markierungen erzeugt. Diese Immunreaktivitäten wurden in allen Zellabschnitten der Pinealozyten, nicht nur im Soma, sondern auch in den Fortsätzen und ihren verdickten Terminalen gefunden (Abb. 24 A). Allerdings waren die Immunmarkierungen deutlich größer als einzelne Vesikel. Doppelmarkierungen mit Antikörpern gegen die Vesikelmembranproteine Synaptophysin, Synaptobrevin und Synaptotagmin einerseits und dem Synaptotagmin<sub>(lum)</sub>-Antikörper andererseits überlappten in allen Bereichen der Pinealozyten (Abb. 24 C, D). Schon in unstimulierten Pinealozyten wurden Immunmarkierungen beobachtet, die auf basale Exozytosevorgänge in den Zellen schließen lassen (Abb. 24 E). Durch Depolarisation der Pinealozyten mittels erhöhter KCl-Gaben konnten die Fluoreszenzsignale quantitativ und qualitativ verstärkt werden (Abb. 24 A). Um auszuschließen, daß es sich bei dieser Markierung um eine unspezifische Aufnahme des Synaptotagmin<sub>(lum)</sub>-Antikörpers handelt, wurden Kontrollen durchgeführt. Sowohl unstimulierten als auch depolarisierten Pinealzellen wurden *in vitro* Kontrollantikörper, die nicht an Epitope im Vesikelinneren binden können, in hohen Konzentrationen zugegeben. Dafür wurde unter anderem ein Cy3-konjugierter Sekundärantikörper verwendet. Dieser Antikörper war weder in der Lage unstimulierte noch depolarisierte Pinealozyten (Abb. 24 B) zu markieren. Damit konnte eine unspezifische Aufnahme des Antikörpers gegen Synaptotagmin<sub>(lum)</sub> weitgehend ausgeschlossen werden.





**Abb. 24** Ergebnisse des Exozytose-Assays, der an kultivierten Gerbilpinealzellen durchgeführt wurde. Alle Zellregionen (Soma, Fortsätze und Endigungen) der dargestellten Pinealocyten konnten mit dem Antikörper gegen Synaptotagmin<sub>(lum)</sub> bei gleichzeitiger Stimulation mit erhöhten KCl-Konzentrationen markiert werden (A). Die Immunmarkierungen der synaptoiden Vesikel (C) wurden durch Doppelmarkierungen mit dem Antikörper gegen das Vesikelmembranprotein Synaptobrevin (D) als Vesikelcluster identifiziert. Abbildung E zeigt, daß auch unstimulierte Pinealocyten den Antikörper aufnehmen können. In der Abbildung B ist das Ergebnis eines Kontrollversuchs zu sehen. Der Kontrollantikörper (Cy3-konjugierter Sekundärantikörper) wurde nicht von den Zellen internalisiert.

---

## 6. Sekretion von neuroaktiven Aminosäuren und Regulation der Vesikelexozytosen

In den letzten Jahren konnte mit biochemischen und immunhistochemischen Techniken sowohl die Speicherung von Glutamat und Aspartat in synaptoiden Mikrovesikeln als auch deren Sekretion aus Pinealozyten nachgewiesen werden (REDECKER und VEH 1994, MORIYAMA und YAMAMOTO 1995, YAMADA *et al.* 1996, YATSUSHIRO *et al.* 1997). In dieser Arbeit sollten anhand von zellbiologischen Methoden weitere Fragen zu diesem Themenkreis geklärt werden:

- 1) Sezernieren auch Pinealozyten anderer Tierarten als der Ratte die Aminosäuren Glutamat und Aspartat?
- 2) Werden darüber hinaus noch weitere neuroaktive Aminosäuren durch Exozytosevorgänge freigesetzt?
- 3) Sind die im Pinealorgan vorkommenden Neurotransmitter und -peptide in der Lage, Vesikelexozytosen zu regulieren?

### 6.1 Induzierte Sekretion von Aminosäuren durch Depolarisation

Unter Kulturbedingungen können Vesikelexozytosen und die damit verbundene Sekretion der in den Vesikeln gespeicherten neuroaktiven Substanzen durch Depolarisation der Zellen induziert werden. In dieser Arbeit wurden Ratten- und Gerbilpinealozyten *in vitro* durch 80 mM KCl im Ringer (K80-Ringer) depolarisiert. Anschließend wurden die Veränderungen der Aminosäurenkonzentrationen im Zellüberstand mittels HPLC gemessen. Als Referenz dienten Zellüberstände nicht depolarisierter Zellen (K5-Ringer). Insgesamt wurden drei voneinander unabhängige Versuche durchgeführt. Die Ergebnisse werden als Mittelwerte und Standardfehler dargestellt.

Die Depolarisation der Zellen führte in den Gerbilpinealkulturen zu einer signifikant erhöhten Freisetzung von Glutamat und Aspartat (Abb. 25). Im Zellüberstand wurden Konzentrationen von  $3,43 \mu\text{M} \pm 0,32 \mu\text{M}$  Glutamat/ $10^5$  Zellen gemessen. Die Glutamatkonzentrationen im Überstand nicht depolarisierter Zellen (K5) war mit  $0,58 \mu\text{M} \pm 0,13 \mu\text{M}/10^5$  Zellen vergleichsweise gering. Für die Aminosäure Aspartat erhielt man ähnliche Ergebnisse. Durch Depolarisation konnte die Aspartatkonzentration im Überstand von  $0,51 \mu\text{M} \pm 0,14 \mu\text{M}/10^5$  Zellen auf  $2,67 \mu\text{M} \pm 0,31 \mu\text{M}/10^5$  Zellen erhöht werden.

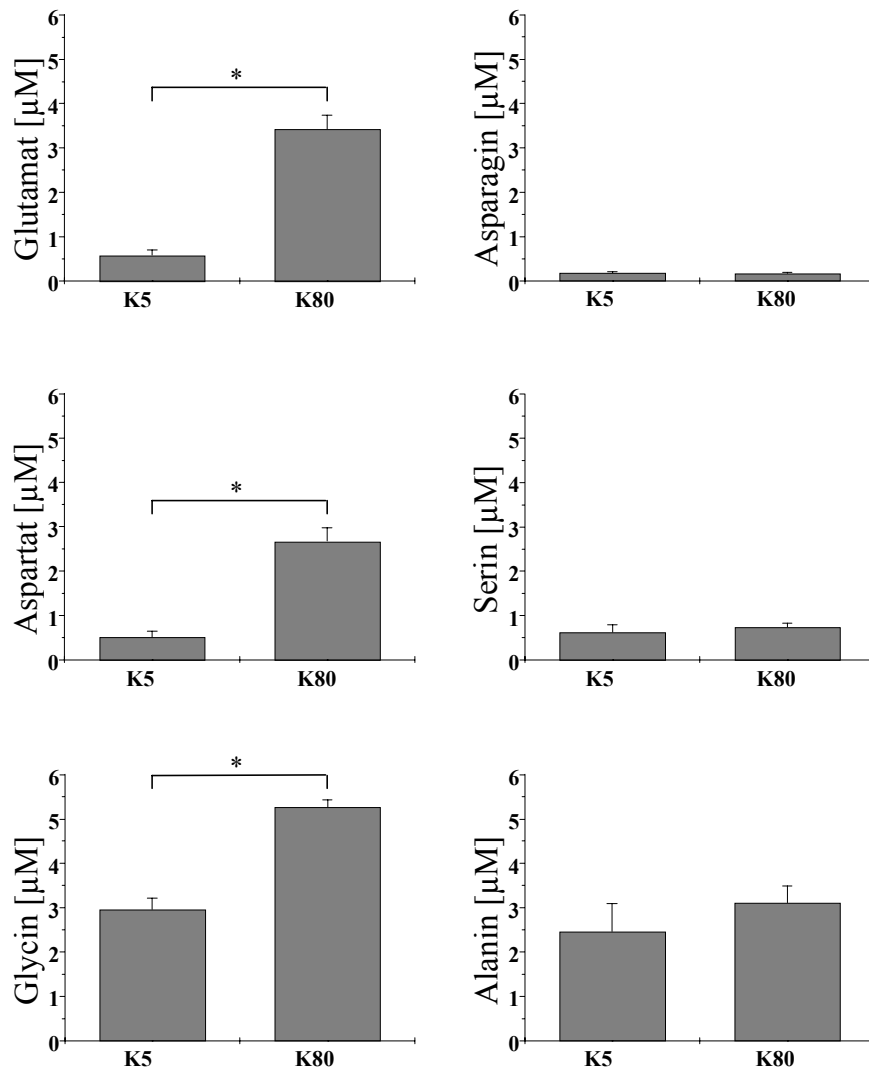
---

Um sicherzustellen, daß die Freisetzung der Aminosäuren auf depolarisationsabhängigen Vesikelexozytosen beruhte und nicht durch andere Effekte hervorgerufen wurde, ist zusätzlich der Gehalt an nicht vesikulär gespeicherten Aminosäuren Asparagin, Serin und Alanin im Zellüberstand ermittelt worden. Die Mengen dieser Aminosäuren im Zellüberstand sollten durch erhöhte KCl-Gaben nicht beeinflußt werden. In der Tat konnten keine signifikanten Konzentrationsunterschiede gemessen werden.

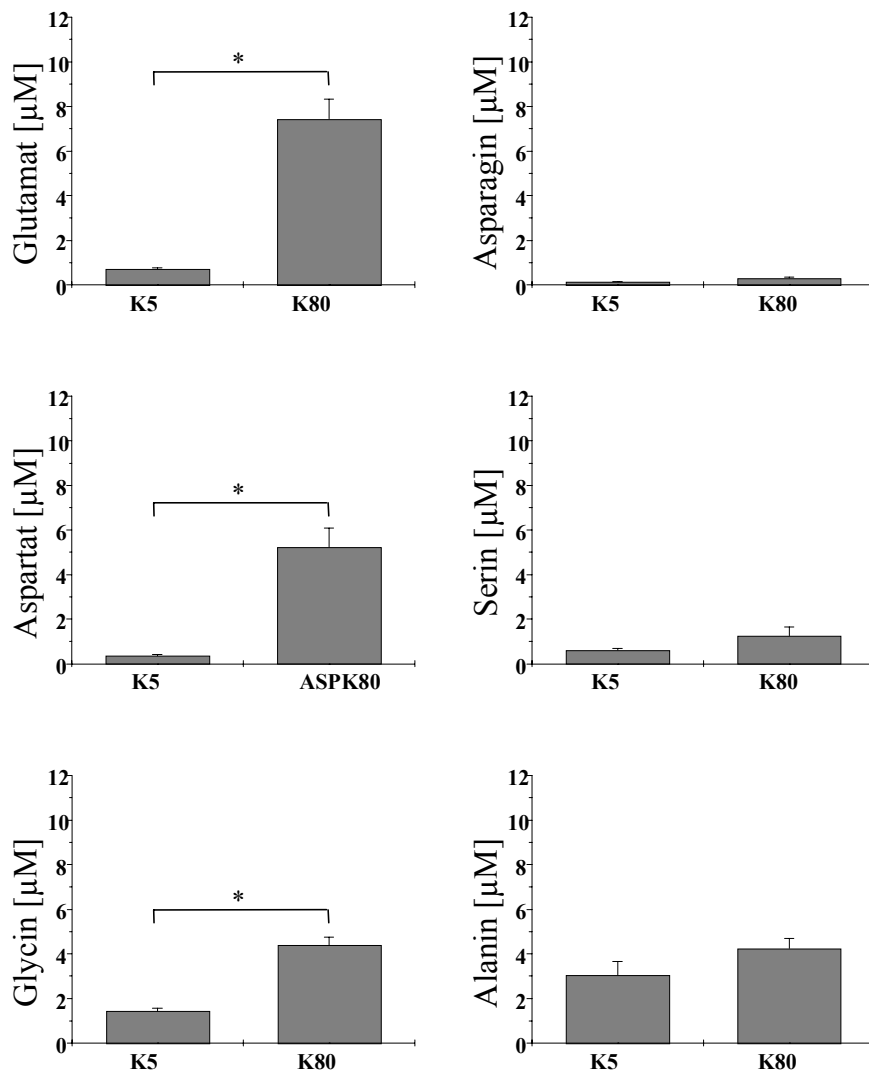
Überraschenderweise ließ sich auch die Glycinkonzentration im Zellüberstand durch Depolarisation von  $2,96 \mu\text{M} \pm 0,26 \mu\text{M}/10^5$  Zellen auf  $5,26 \mu\text{M} \pm 0,17 \mu\text{M}/10^5$  Zellen nahezu verdoppeln (Abb. 21 C). Bisher ist jedoch nicht bekannt, ob Glycin vesikulär in Pinealozyten gespeichert wird.

Da GABA im Pinealorgan einiger Säugerarten eine mutmaßliche parakrin wirksame Substanz zu sein scheint und da man in der Vergangenheit die depolarisationsabhängige Sekretion von GABA aus Pinealozyten zeigen konnte, wurde in diesem Versuch zusätzlich der Gehalt an GABA im Zellüberstand untersucht. Die GABA-Konzentrationen lagen allerdings generell unterhalb der Nachweisgrenze des Meßverfahrens von  $0,3 \mu\text{M}$ , so daß keine Angaben über mögliche Änderungen der extrazellulären GABA-Konzentration gemacht werden konnten.

Die Untersuchungen an Rattenpinealozyten führten erwartungsgemäß zu ähnlichen Ergebnissen. So konnten durch Depolarisation der Zellen *in vitro* die Konzentrationen von Glutamat, Aspartat und Glycin im Zellüberstand signifikant erhöht werden, während die Mengen an Asparagin, Serin und Alanin nahezu unverändert blieben (Abb. 26).



**Abb. 25** Aminosäurefreisetzung nach Depolarisation, untersucht an kultivierten Gerbilpinealzellen. Die Zellen wurden 20 min mit 80 mM KCl im Ringer (K80) depolarisiert. Anschließend wurde mittels HPLC die Konzentrationen der sechs Aminosäuren Glutamat, Aspartat, Glycin, Asparagin, Serin und Alanin im Zellüberstand gemessen. Der Zellüberstand von Kulturen, die 20 min mit 5 mM KCl im Ringer (K5) inkubiert worden waren, diente als Basiswerte. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardfehler (n = 3). Signifikante Unterschiede (\*,  $p < 0,01$ ) wurden mit dem Lord-Test für geringe Stichproben ermittelt.



**Abb. 26** Aminosäurefreisetzung nach Depolarisation, untersucht an kultivierten Rattenpinealzellen. Nach einer 20 minütigen Depolarisation (K80) wurde der Zellüberstand gewonnen und die einzelnen Aminosäurenspiegel mittels HPLC ermittelt. Der Zellüberstand unbehandelter Kulturen (K5) diente als Referenz. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardfehler (n = 3). Mit dem Lord-Test konnten signifikante Unterschiede (\*,  $p < 0,01$ ) festgestellt werden.

---

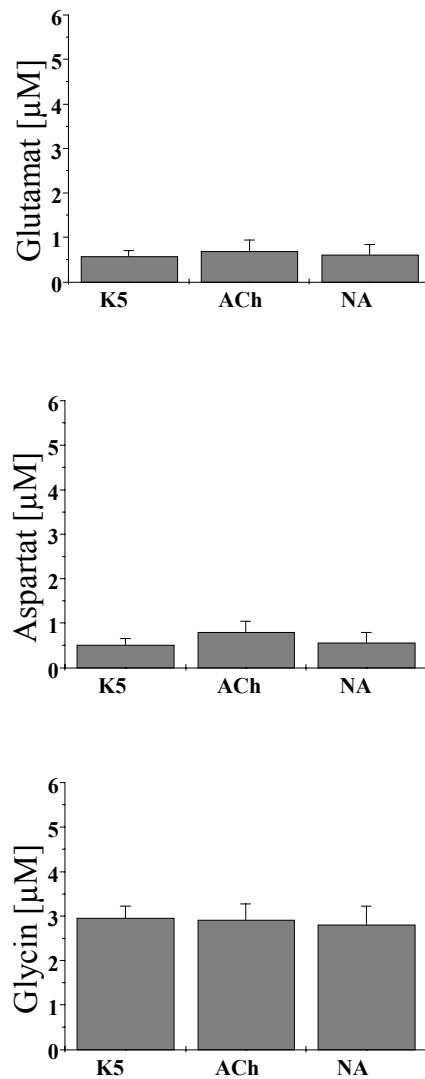
## 6.2 Einfluß der Neurotransmitter Acetylcholin und Noradrenalin auf Vesikelexozytosen

In einem weiteren *in vitro*-Versuch sollte überprüft werden, ob und welchen Einfluß die Neurotransmitter Noradrenalin und Acetylcholin auf die Freisetzung von Aminosäuren aus synaptoiden Mikrovesikeln haben.

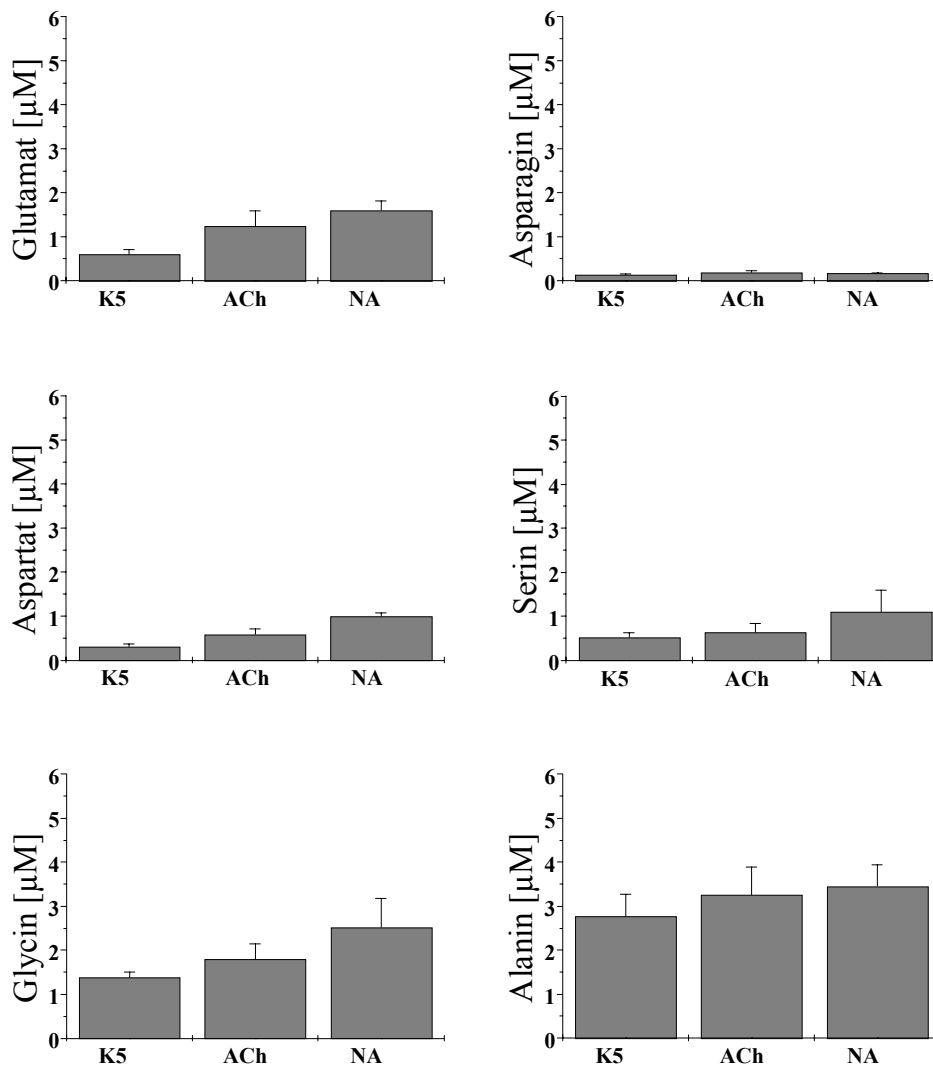
In den Gerbilkulturen hatten beide Neurotransmitter keinen Einfluß (Abb. 27). Am Beispiel Glutamat wird das besonders deutlich. Nach Stimulation mit Acetylcholin wurden  $0,69 \mu\text{M} \pm 0,25 \mu\text{M}/10^5$  Zellen gemessen. Die Konzentrationen nach Stimulation mit Noradrenalin betragen  $0,61 \mu\text{M} \pm 0,23 \mu\text{M}/10^5$  Zellen. Verglichen mit dem basalen Glutamat-Spiegel von  $0,58 \mu\text{M} \pm 0,13 \mu\text{M}/10^5$  Zellen stellen diese Werte keine nennenswerten Veränderungen dar. Auch die extrazellulären Konzentrationen von Aspartat und Glycin wurden nicht beeinflusst.

In Rattenkulturen bewirkte Acetylcholin einen diskreten, aber nicht signifikanten Anstieg der neuroaktiven Aminosäuren Glutamat, Aspartat und Glycin im Vergleich zum nichtdepolarisierenden Ringer K5 (Abb. 28). Die Konzentration an Glutamat wurde durch Acetylcholin-Gaben von  $0,6 \mu\text{M} \pm 0,11 \mu\text{M}/10^5$  Zellen auf  $1,24 \mu\text{M} \pm 0,34 \mu\text{M}/10^5$  Zellen erhöht. Der Gehalt an Aspartat stieg ebenfalls von  $0,31 \mu\text{M} \pm 0,06 \mu\text{M}/10^5$  Zellen auf  $0,57 \mu\text{M} \pm 0,14 \mu\text{M}/10^5$  Zellen. Acetylcholin induzierte auch eine leichte Erhöhung der Glycin-Konzentration von  $1,39 \mu\text{M} \pm 0,11 \mu\text{M}/10^5$  Zellen auf  $1,80 \mu\text{M} \pm 0,35 \mu\text{M}/10^5$  Zellen. Außerdem bewirkte Acetylcholin eine leichte Erhöhung der bekanntermaßen nicht vesikulär gespeicherten Aminosäuren Serin, Asparagin und Alanin.

Noradrenalin verursachte ähnlich wie Acetylcholin einen Anstieg der extrazellulären Aminosäurespiegel. Die Werte für Glutamat ( $1,59 \mu\text{M} \pm 0,22 \mu\text{M}/10^5$  Zellen), Aspartat ( $0,99 \mu\text{M} \pm 0,08 \mu\text{M}/10^5$  Zellen) und Glycin ( $2,52 \mu\text{M} \pm 0,65 \mu\text{M}/10^5$  Zellen) lagen sogar höher als die durch Acetylcholin bedingten Werte, unterschieden sich aber ebenfalls nicht signifikant von den Kontrollwerten (K5). Außerdem war durch Zugabe von Noradrenalin ein diskreter Anstieg der Kontrollaminosäuren Serin, Asparagin und Alanin im Zellüberstand festzustellen.



**Abb. 27** Aminosäurefreisetzung aus Gerbilpinealzellen nach Zugabe von  $100 \mu\text{M}$  Achetylcholin (ACh) bzw.  $1 \mu\text{M}$  Noradrenalin (NA). Die Messungen der Aminosäurekonzentrationen in den Zellüberständen ergaben, daß beide Neurotransmitter nicht in der Lage waren, Vesikelexozytosen in Gerbilpinealocyten zu induzieren und somit Glutamat, Aspartat und Glycin freizusetzen. Die Abbildung zeigt Mittelwerte und Standardfehler von drei unabhängigen Versuchen. Signifikanzen wurden mit dem Lord-Test überprüft.



**Abb. 28** Aminosäurefreisetzung aus Rattenpinealocyten nach Zugabe von 100  $\mu\text{M}$  Acetylcholin (ACh) bzw. 1  $\mu\text{M}$  Noradrenalin (NA). Acetylcholin bewirkte eine nicht signifikante Verdopplung der Aminosäurekonzentrationen von Glutamat, Aspartat und Glycin im Vergleich zum Ringer (K5). Acetylcholin hatte auch einen leichten Einfluß auf den Gehalt an nicht vesikulär gespeichertem Aminosäuren Asparagin, Serin und Alanin im Zellüberstand. Die Zugabe von Noradrenalin (NA) führte ebenfalls zu einem Anstieg aller untersuchten Aminosäurespiegel im Vergleich zum Ringer (K5). Darstellung der Mittelwerte und Standardfehler (n = 4). Die Werte wurden mittels Lord-Test auf Signifikanz geprüft.



---

### 6.3 Einfluß von Neuropeptiden auf Vesikelexozytosen

Schließlich wurde eine orientierende Vorstudie durchgeführt, die erste Hinweise darauf liefern sollte, ob im Pinealorgan vorkommende Neuropeptide einen Einfluß auf Vesikel-exozytosen haben. Für das *screening* wurden zwei unabhängige Versuche durchgeführt, in denen jeweils die Neuropeptide PACAP-38, VIP, NPY, CGRP, Substanz P und Somatostatin in Konzentrationen von 100 pM bis 100 nM zu unbehandelten und depolarisierten Zellen gegeben wurden.

Die Ergebnisse dieser Vorstudie sind in den Abbildungen 29 – 31 dargestellt. Aufgrund der zum Teil starken Unterschiede der ermittelten Werte im 1. und 2. Versuch konnten keine eindeutigen Aussagen getroffen werden, aber es zeichneten sich Tendenzen ab: So bewirkten 100 pM VIP in beiden Versuchen eine erhöhte Freisetzung von Glutamat, Aspartat und Glycin aus nichtdepolarisierten Zellen (K5-Ringer) (Abb. 29). Die Konzentration an Glutamat im Zellüberstand stieg im ersten Versuch von  $0,65 \mu\text{M}/10^5$  Zellen auf  $1,57 \mu\text{M}/10^5$  Zellen und im zweiten Versuch von  $0,6 \mu\text{M}/10^5$  Zellen auf  $5,22 \mu\text{M}/10^5$  Zellen. Ähnliche Werte konnten für extrazelluläres Aspartat gemessen werden. Im ersten Versuch wurden die extrazellulären Aspartat-Konzentrationen von  $0,41 \mu\text{M}/10^5$  Zellen auf  $0,82 \mu\text{M}/10^5$  Zellen und im zweiten Versuch sogar von  $0,38 \mu\text{M}/10^5$  Zellen auf  $3,02 \mu\text{M}/10^5$  Zellen erhöht. VIP verursachte außerdem eine Verdopplung der Glycin-Sekretion von  $0,83 \mu\text{M}/10^5$  Zellen auf  $1,95 \mu\text{M}/10^5$  Zellen (1. Versuch) und von  $1,71 \mu\text{M}/10^5$  Zellen auf  $2,80 \mu\text{M}/10^5$  Zellen (2. Versuch). Die Mengen an Alanin, der nicht vesikulär gespeicherten Kontrollaminosäure, wurden hingegen in beiden Versuchen nicht nennenswert verändert. Das ist ein Zeichen dafür, daß VIP die vesikuläre Sekretion beeinflusst und nicht auf anderem Wege eine vermehrte Freisetzung der neuroaktiven Aminosäuren hervorruft.

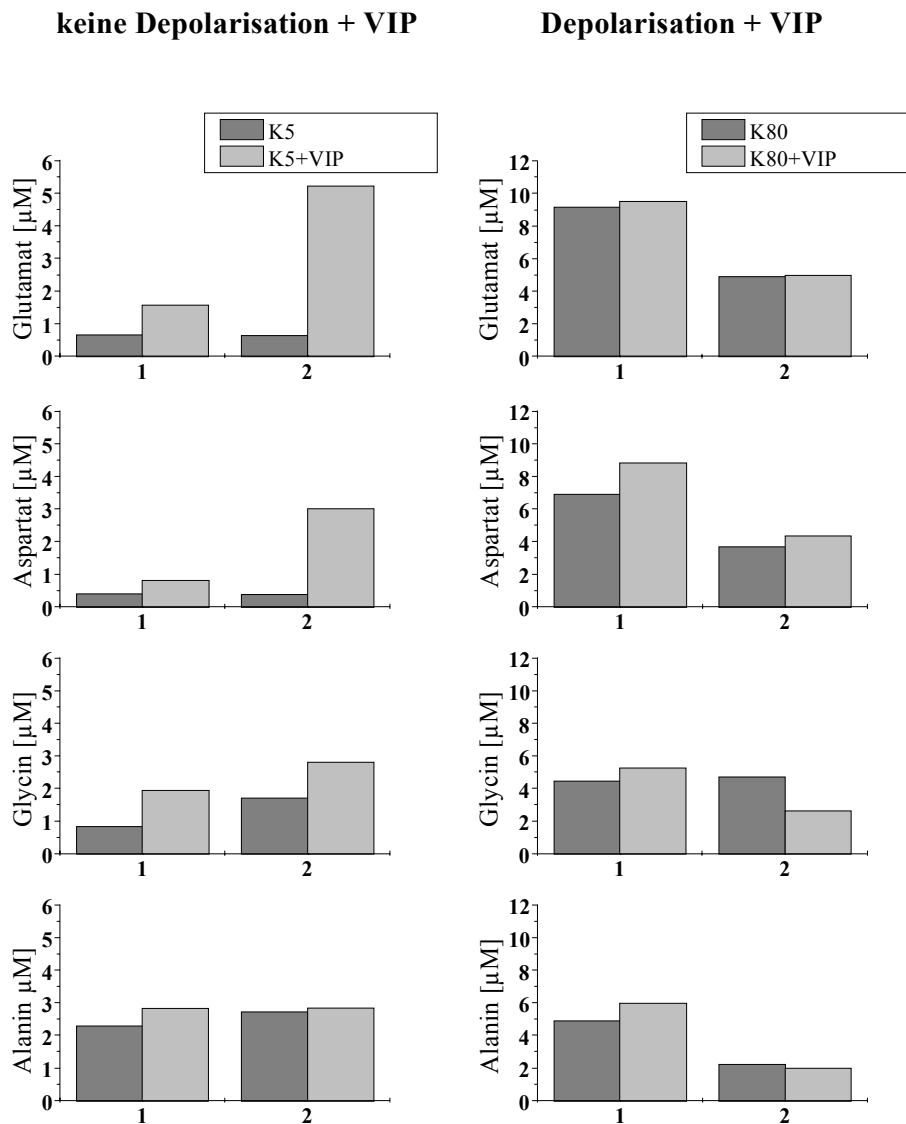
Die durch 80 mM KCl induzierte Sekretion der Aminosäuren konnte in der Regel durch VIP nicht weiter erhöht werden. Lediglich eine leichte Erhöhung der Aspartatkonzentration im Zellüberstand wurde beobachtet.

Das Neuropeptid PACAP zeigte im großen und ganzen eine ähnliche Wirkung wie VIP (Abb. 30). Die Sekretion von Glutamat, Aspartat und Glycin aus nicht depolarisierten Zellen konnte durch 100 pM PACAP verdoppelt werden. Außerdem bewirkte PACAP eine leichte Zunahme der Glutamat- und Aspartatkonzentrationen und eine schwache Reduktion der Glycinkonzentration bei gleichzeitiger Depolarisation der Zellen mit 80 mM KCl. Die beiden

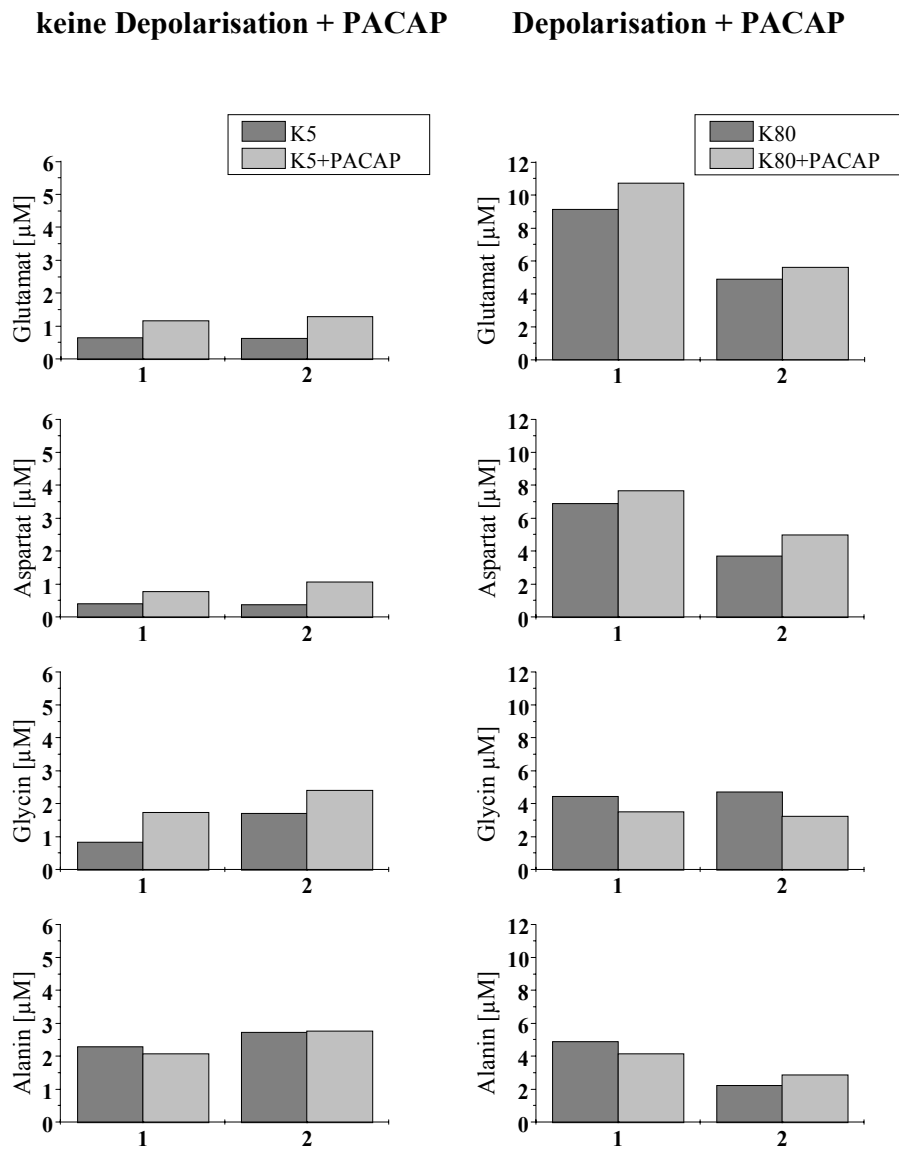
---

Neuropeptide VIP und PACAP waren am wirksamsten bei einer Konzentration von 100 pM, höhere Konzentrationen zeigten entweder eine ähnliche oder eine geringere Wirkung.

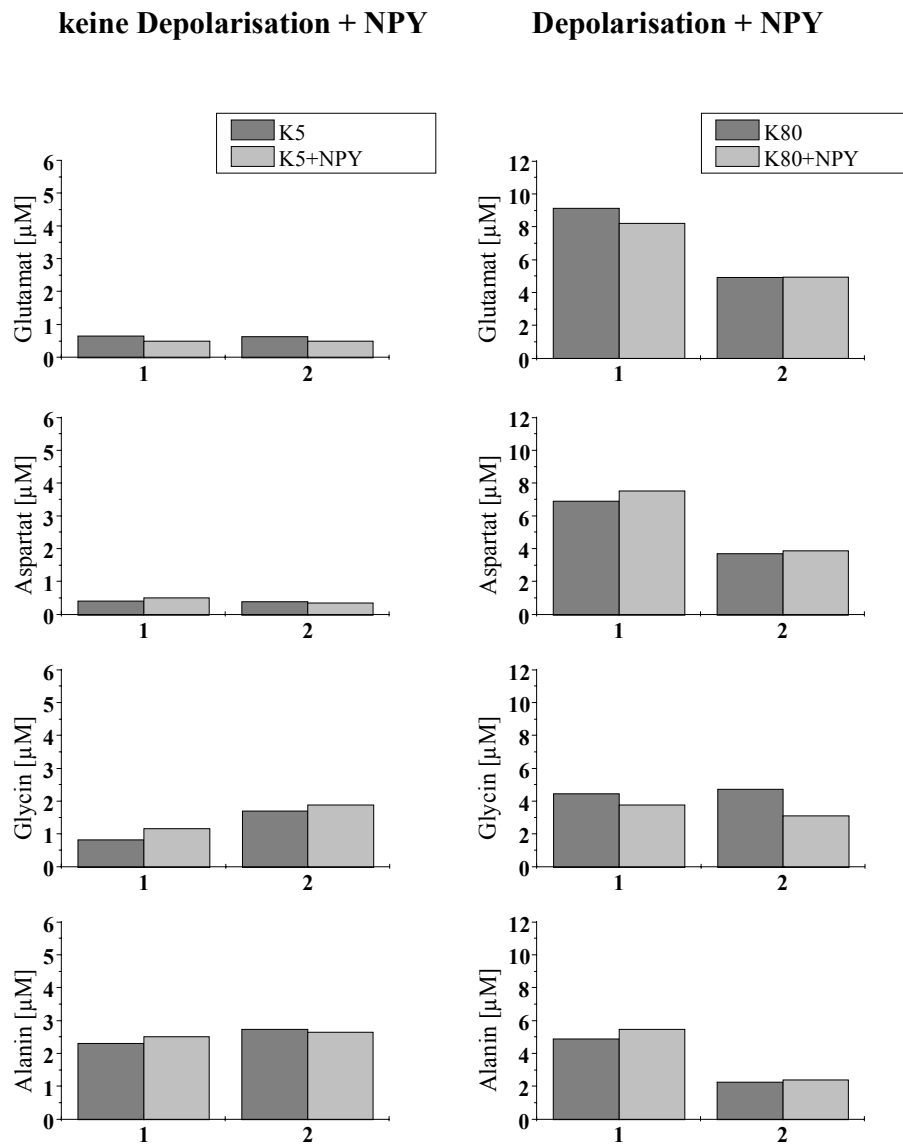
Die anderen ausgetesteten Neuropeptide (NPY, CGRP, Substance P, Somatostatin) hatten keine oder keine eindeutigen Veränderungen der extrazellulären Aminosäurespiegel zur Folge, wie es am Beispiel des Neuropeptids NPY in Abbildung 31 dargestellt wurde.



**Abb. 29** Einfluß von 100 pM VIP auf die Sekretion von Glutamat, Aspartat, Glycin und Alanin aus Pinealozysten. In der linken Spalte ist die Wirkung von VIP auf unbehandelte Pinealozysten (K5) und in der rechten Spalte die Wirkung nach Depolarisation der Zellen (K80) dargestellt. Es wurden zwei unabhängige Versuche durchgeführt, die in dieser Graphik mit 1 und 2 bezeichnet sind.



**Abb. 30** Einfluß von 100 pM PACAP auf die Sekretion von Glutamat, Aspartat, Glycin und Alanin aus Pinealocyten. Gegenübergestellt wurde die Wirkung von PACAP auf unbehandelte, nicht depolarisierte Zellen (K5) und auf depolarisierte Zellen (K80). Die Ziffern 1 und 2 bezeichnen die zwei unabhängigen Versuche.



**Abb. 31** Einfluß von 100 pM NPY auf die Sekretion von Glutamat, Aspartat, Glycin und Alanin aus nicht depolarisierten (K5) bzw. depolarisierten Pinealozysten (K80). Die beiden durchgeführten, unabhängigen Versuche sind mit 1 und 2 benannt.

---

## V. Diskussion

Als extraretinale Komponente des photoneuroendokrinen Systems ist das Pinealorgan durch die tagesperiodische Produktion des Hormons Melatonin bei Säugetieren maßgeblich an der Generierung saisonaler Anpassungsvorgänge beteiligt. Die Melatoninsynthese wird überwiegend durch Umweltreize, insbesondere durch Licht, reguliert. Das Pinealorgan der *Mammalia* ist aber nicht selbst lichtempfindlich, sondern steht über neuronale Projektionen mit der Retina in Verbindung. Während der Nacht wird der Neurotransmitter Noradrenalin aus den Nervenendigungen der *Nervi conarii* verstärkt freigesetzt und induziert über verschiedene Rezeptoren, insbesondere über  $\beta$ -adrenerge Rezeptoren, die Melatoninsynthese. Bisher hat man allerdings kaum Kenntnisse über die negative Regulation der Melatoninsynthese. Gegenwärtig wird vermutet, daß synaptoiden Mikrovesikel, die zahlreich in den endokrinen Zellen des Pinealorgans zu finden sind, an dem Regulationsprozeß beteiligt sein könnten. Diese Mikrovesikel, die den synaptischen Vesikeln in Neuronen hinsichtlich ihrer Morphologie und molekularen Zusammensetzung ähneln, haben vermutlich sekretorische Funktion und könnten als Bestandteil eines ausgedehnten parakrinen Kommunikationssystems innerhalb des Pinealorgans fungieren. In der Tat gibt es erste Hinweise, daß die Mikrovesikel neuroaktive Aminosäuren, wie z.B. Glutamat, speichern, die als parakrine Botensubstanzen über eine Aktivierung metabotroper Rezeptoren die Melatoninsynthese in benachbarten Pinealozyten hemmen könnten.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, zur Aufklärung der physiologischen Rolle der synaptoiden Mikrovesikel in Pinealozyten beizutragen. Zu diesem Zweck wurden verschiedene Ebenen der mutmaßlichen parakrinen Kommunikation untersucht: molekulare Komponenten der Vesikelexozytose und ihre Expression während der Ontogenese, Rezeptoren und Transporter eines möglichen Botenstoffs sowie Regulationsmechanismen der mikrovesikulären Sekretion. Nachfolgend wird diskutiert, inwieweit die gewonnenen Ergebnisse den bestehenden Modellvorstellungen entsprechen.

---

## 1. Synaptische Vesikelmembranproteine

Die molekularen Mechanismen, die in Pinealozyten zur Freisetzung neuroaktiver Aminosäuren führen könnten, sind bisher nur in Ansätzen bekannt. Ein erster Schritt zur Aufklärung dieser molekularen Mechanismen ist die Identifikation der beteiligten Komponenten. Im Nervensystem haben solche Untersuchungen besondere Fortschritte gemacht. So wurden in Synapsen zahlreiche Proteine mit möglichen Funktionen in der Neurotransmission charakterisiert. In den letzten Jahren konnten einige dieser synaptischen Proteine auch in endokrinen Zellen detektiert werden. Der Nachweis weiterer exozytoserelevanter Proteine in Pinealozyten könnte die Hypothese bestätigen, daß die Exozytosevorgänge synaptoider Vesikel aufgrund einer gleichartigen molekularen Maschinerie ähnlich ablaufen wie die der synaptischen Vesikel in Nervenzellen. Aus diesem Grund wurde in der vorliegenden Arbeit überprüft, ob die für die synaptische Transmission essentiellen Proteine Munc 18, CSP und SV2 auch in Pinealozyten vorhanden sind.

### Munc 18-1

Munc 18 ist ein Protein mit einem Molekulargewicht von 67 kDa, das in Säugetieren vorkommt. Es weist Homologien zu Proteinen in *Drosophila* (ROP) und in Nematoden (UNC 18) auf. Munc 18 bindet spezifisch und mit hoher Affinität an Syntaxin (HATA *et al.* 1993, GARCIA *et al.* 1994, PEVSNER *et al.* 1994) und verhindert dadurch die Bildung des *core*-Komplexes, bestehend aus dem vesikulären Protein Synaptobrevin sowie den Plasmamembranproteinen SNAP-25 und Syntaxin. Da die Bildung dieses *core*-Komplexes aber notwendig für Vesikelexozytosen ist, stellt Munc 18 somit einen wichtigen negativen Regulator der Neurotransmission dar. In der Vergangenheit wurden verschiedene Isoformen charakterisiert: Munc 18-1 ist die neuronenspezifische Form, während Munc 18-2 und Munc 18-3 in nichtneuronalen Geweben lokalisiert wurden (HATA und SÜDHOF *et al.* 1995, TELLAM *et al.* 1995, 1997).

In dieser Arbeit wurde das neuronenspezifische Munc 18-1 mit immunhistochemischen Techniken erstmals im Pinealorgan von Ratten und Gerbils nachgewiesen (siehe auch REDECKER *et al.* 1998). Die immunpositiven Zellen konnten eindeutig als Pinealozyten identifiziert werden. Dieses Ergebnis deckt sich mit Ergebnissen anderer Autoren (HODEL *et al.* 1994, JACOBSSON *et al.* 1994, ZHAO *et al.* 1997), die die überwiegend im Nervengewebe vorkommende Isoform ebenfalls in endokrinen Zellen detektieren konnten.

---

Von besonderem Interesse war die subzelluläre Verteilung des Proteins im Pinealorgan. In Neuronen wurde es aufgrund seiner hydrophilen Eigenschaften überwiegend im Cytosol und in geringem Umfang auch an der Plasmamembran lokalisiert (GARCIA *et al.* 1995, PEVSNER *et al.* 1994, HALACHMI und LEV 1996). Die lichtmikroskopische Untersuchung in der vorliegenden Arbeit zeigte Speziesunterschiede in der intrazellulären Verteilung von Munc 18-1. In Rattenpinealozyten wurde mit spezifischen Antikörpern gegen Munc 18-1 vor allem die Plasmamembran markiert. In Gerbilpinealozyten hingegen fiel eine starke Immunreaktivität in den vesikelreichen Fortsatzendigungen auf; Plasmamembran und Soma hingegen wurden nur schwach markiert. Munc 18-1 wurde also (ähnlich wie die vesikulären Membranproteine Synaptophysin, Synaptobrevin oder Rab3) in dem Zellbereich akkumuliert, in dem die synaptoiden Mikrovesikel vermutlich Exo-/Endozytosezyklen durchlaufen. Auf ultrastruktureller Ebene konnte durch Immungold-Markierung gezeigt werden, daß im Gewebe des Gerbils ein beachtlicher Anteil des in den Fortsatzendigungen detektierten Munc 18-1 mit synaptoiden Mikrovesikeln assoziiert war. Diese ungewöhnliche Lokalisation erschien zunächst fragwürdig, denn GARCIA *et al.* (1995) hatten in ihrer Untersuchung Munc 18-1 nicht in Membranen von synaptischen Vesikeln oder sekretorischen Granula gefunden. In den letzten Jahren mehren sich jedoch Hinweise, die für eine vesikuläre Lokalisation von Munc 18 sprechen. So wurde z. B. Munc 18-1 in der Membran sekretorischer Granula in chromaffinen Zellen (HODEL *et al.* 1994) und die ubiquitäre Isoform Munc 18-3 in Membranen vesikulärer Strukturen in Adipozyten (TELLAM *et al.* 1997) nachgewiesen. Geringe Mengen Munc 18-1 wurden zudem im *Western Blot* in Homogenaten isolierter synaptischer Vesikel detektiert (OKAMOTO und SÜDHOF 1997).

Da Munc 18 keine transmembrane Domäne besitzt, muß die Membranbindung auf andere Weise vermittelt werden. GARCIA *et al.* (1995) erhielten in ihrer Studie Hinweise darauf, daß die Assoziation von Munc 18 an die Plasmamembran durch hydrophobe Modifikationen des Proteins vermittelt wird. Außerdem könnte die Membranassoziation von Munc 18 durch Bindung an membranständige Proteine erzielt werden. Der vielversprechendste Kandidat für diese These wäre das integrale Plasmamembranprotein Syntaxin, dessen starke Affinität zu Munc 18 schon erwähnt worden ist. Da Syntaxin auch in vesikulären Membranen lokalisiert wurde (WALCH-SOLIMENA *et al.* 1995, KRETZSCHMAR *et al.* 1996), könnte es dort ebenfalls die Assoziation von Munc 18 mit synaptischen und synaptoiden Vesikeln vermitteln. Außerdem wurden in den letzten Jahren spezifische Interaktionen von Munc 18 mit dem vesikelassoziierten Protein DOC2 (VERHAGE *et al.* 1997) und mit den Plasmamembran-



---

proteinen Mint1 und Mint2 (OKAMOTO und SÜDHOF 1997) beschrieben. Durch diese Interaktionen könnten die Bindung des zytosolischen Munc 18 an Membranen vermittelt werden.

Über die funktionelle Bedeutung der vesikulären Assoziation von Munc 18 in Pinealozyten gibt es mehrere Hypothesen. Zum einen könnte vesikuläres Munc 18 am *docking*-Prozeß der Vesikel an die Plasmamembran beteiligt sein. Andererseits wird vermutet, daß Munc 18 eine Rolle beim Vesikel-*recycling* spielt (GRAHAM *et al.* 1997). Nach einer weiteren interessanten Theorie tragen Vesikel alle relevanten Proteine des *core*-Komplexes und sind somit in der Lage, aneinander zu binden und gegebenenfalls durch Membranfusionen zu verschmelzen (KRETZSCHMAR *et al.* 1996, OTTO *et al.* 1997). Nach den bisher vorliegenden Ergebnissen wäre es denkbar, daß Munc 18 auch an einem solchen Prozeß funktionell beteiligt sein könnte.

### CSP

Das *cysteine-string protein* (CSP) wurde 1990 erstmals in der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* entdeckt (ZINSMAIER *et al.* 1990). Kurz darauf wurden homologe Proteine auch im elektrischen Organ einer Rochenart (GUNDERSEN und UMBACH 1992) und im Rattenhirn (MASTROGIACOMO und GUNDERSEN 1995) gefunden. CSP wurde vor allem in synapsenreichen Geweben lokalisiert und ist Bestandteil der Membran synaptischer Vesikel (GANETZKY 1994). Das 35 kDa große Protein (Ratte), dessen N- und C-Termini in den zytoplasmatischen Raum ragen, weist zwei interessante Strukturmerkmale auf:

- einen Strang von 11 Cysteinresten, die kovalent mit Palmitinsäuremolekülen verbunden sind und dem Protein seinen Namen gaben
- eine J-Domäne im N-terminalen Bereich

Anfänglich vermutete man, daß die Verankerung des Proteins in der Vesikelmembran durch die Fettsäurereste erreicht wird. Nach neueren Untersuchungen ist die cysteinreiche Domäne für die Verankerung jedoch nicht zwingend notwendig. Stattdessen vermitteln wahrscheinlich andere posttranslationale Modifikationen des Proteins die Assoziation mit der Vesikelmembran (BUCHNER und GUNDERSEN 1997, CHAMBERLAIN und BURGOYNE 1998 b). Nun nimmt man an, daß die cysteinreiche Domäne durch ihre amphipathische Struktur am Prozeß der Membranfusion von Vesikel- und Plasmamembran beteiligt ist (GUNDERSEN *et al.* 1995, BUCHNER und GUNDERSEN 1997).

---

Die J-Domäne im N-terminalen Bereich von CSP zeigt signifikante Homologien zur J-Domäne der bakteriellen und eukaryotischen DnaJ-Proteine (BRAUN und SCHELLER 1995, BRAUN *et al.* 1996). Dies ist eine Gruppe von Proteinen, die als Co-Chaperone mit Hsp70/Hsc70 (70 kDa heat shock protein/70 kDa heat shock cognate protein) interagieren. Durch die Bindung von CSP an Hsc70 wird die ATPase-Aktivität von Hsc70 stimuliert und eine Konformationsänderung des Proteins verursacht, so daß eine Bindung an Substratproteine ermöglicht wird (BRAUN *et al.* 1996, CHAMBERLAIN und BURGOYNE 1997 a, b). CSP kann aber auch direkt an Proteine binden und dadurch Konformationsänderungen bewirken (CHAMBERLAIN und BURGOYNE 1997 b). CSP hat eine Bindungsstelle für  $Ca^{++}$ -Kanäle, aber auch für Syntaxin I, SNAP-25, Synaptobrevin und Synaptotagmin (LEVEQUE *et al.* 1998, CHAMBERLAIN und BURGOYNE 2000). Damit könnte CSP als Chaperon direkt an der Bildung oder dem Zerfall des *core*-Komplexe in der Nähe von  $Ca^{++}$ -Kanälen beteiligt sein.

CSP wurde nicht nur in neuronalen Geweben, sondern auch in neuroendokrinen und endokrinen Organen gefunden. Das Protein konnte in den chromaffinen Zellen des Nebennierenmarks (KOHAN *et al.* 1995, CHAMBERLAIN *et al.* 1996), in den neurosekretorischen Nervenendigungen der Neurohypophyse (PUPIER *et al.* 1997) und in den  $\beta$ -Zellen des endokrinen Pankreas (ZHANG *et al.* 1998) nachgewiesen werden. In allen Fällen war CSP an der Membran der sekretorischen Granula assoziiert.

Jetzt wurde CSP erstmals auch im Pinealorgan lokalisiert (siehe auch REDECKER *et al.* 1998). Damit wurde ein weiterer Beweis für die Existenz dieses Proteins in nichtneuronalen Geweben geliefert. Ähnlich wie in Neuronen ist es vor allem in den Fortsatzendigungen zu finden. Immungold-Markierungen bestätigten die Vermutung, daß CSP dort mit synaptoiden Mikrovesikeln assoziiert ist. Diese Lokalisation gleicht der in Neuronen und läßt vermuten, daß CSP in endokrinen Zellen ebenfalls an der Regulation von Sekretionsprozessen beteiligt ist.

## SV2A

Synaptisches Vesikelprotein 2 (SV2) ist ein Glykoprotein, das in neuronalen und endokrinen Zellen in den Membranen sekretorischer Vesikel lokalisiert wurde und durch 12 transmembrane Domänen charakterisiert ist (BAJJALIEH *et al.* 1992). SV2 zeigt signifikante Sequenzhomologien zu einer Familie von Protonen-Kotransportern in Bakterien sowie Pilzen und ist mit einer Familie von Glukosetransportern verwandt (BAJJALIEH *et al.* 1993). In der Klasse der *Mammalia* wurden drei Isoformen identifiziert: SV2A ist die

---

ubiquitäre Form, die in vielen Hirnregionen und in endokrinen Zellen exprimiert wird (BAJJALIEH *et al.* 1993, 1994), während SV2B (BAJJALIEH *et al.* 1993, 1994) und SV2C (JANZ und SÜDHOF 1999) auf neuronale Gewebe begrenzt sind. In der vorliegenden Arbeit wurde SV2A in einem weiteren endokrinen Zelltyp, den Gerbilpinealozyten, detektiert. Die Akkumulation der Immunreaktivitäten in den Fortsatzendigungen der Pinealozyten deuten darauf hin, daß SV2A in diesen neuroendokrinen Zellen, ähnlich wie in Nervenzellen, in der Membran der synaptoiden Mikrovesikel lokalisiert ist. HAYASHI *et al.* (1998) haben ebenfalls SV2 in Pinealozyten nachgewiesen. Ihnen ist es erstmals gelungen, die Assoziation von SV2 mit synaptoiden Mikrovesikeln in den Fortsatzendigungen mit der Immungold-Technik mikroskopisch sichtbar zu machen. Doch überraschend ist, daß sie nicht SV2A, sondern SV2B in den Pinealozyten detektiert haben. Diese differierenden Ergebnisse könnten auf Speziesunterschieden beruhen, denn HAYASHI *et al.* (1998) haben ihre Studie an Ratten durchgeführt. Generell ist der Nachweis von SV2 im Pinealorgan, unabhängig von unterschiedlichen Isoformen, ein Hinweis darauf, daß dieses Protein ein gemeinsamer Bestandteil von sekretorischen Vesikeln in neuronalen *und* in endokrinen Geweben ist. In beiden Gewebetypen könnte SV2 an zahlreichen Prozessen beteiligt sein, z.B. an der Akkumulation von Neurotransmittern in Vesikeln (HAYASHI *et al.* 1998). Dabei ist SV2 kein direkter Transporter für Neurotransmitter. Man vermutet vielmehr, daß das Protein aufgrund seiner Ähnlichkeiten zu Protonen-Kotransportern in Bakterien und Pilzen den Aufbau eines pH-Gradienten an der Vesikelmembran regulieren könnte (HAYASHI *et al.* 1998). Außerdem scheint SV2 durch spezifische Interaktionen mit Synaptotagmin, dem Ca<sup>++</sup>-Rezeptor des SNARE-Komplexes, Exozytosevorgänge beeinflussen zu können (SCHEVILL *et al.* 1996, PYLE *et al.* 2000).

In der vorliegenden Arbeit konnten die drei synaptischen Proteine Munc 18-1, CSP und SV2A auch in Pinealozyten nachgewiesen werden. Damit wurde ein weiterer Hinweis dafür geliefert, daß synaptoiden Mikrovesikel in neuroendokrinen Zellen molekulare Ähnlichkeiten zu synaptischen Vesikeln in neuronalen Zellen zeigen. Außerdem führten die Ergebnisse zu der Vermutung, daß die untersuchten Proteine, die in Nervenzellen eine essentielle Bedeutung für die Regulation der Neurotransmission haben, auch in Pinealozyten an den Exozytosevorgängen der synaptoiden Mikrovesikel beteiligt sind. Insgesamt konnte bestätigt werden, daß Synapsenproteine nicht nur in Neuronen, sondern auch in nichtneuronalen Zellen

---

weit verbreitet sind und dort universelle Funktionen im allgemeinen Prozeß der Exozytose ausüben können.

## 2. Synapsenproteine während der Ontogenese des Pinealorgans

In Untersuchungen der vergangenen Jahre und in dieser Arbeit sind zahlreiche Proteine in Pinealozyten nachgewiesen worden, die vermutlich an der Regulation der mikrovesikulären Exozytoseprozesse beteiligt sind und somit Transmissionsvorgänge steuern, die ihrerseits wiederum einen Einfluß auf die Melatoninsynthese haben könnten. Diese Studien wurden jedoch fast ausschließlich an Organen adulter Tiere durchgeführt. Bis zum heutigen Tag gibt es nur zwei Arbeiten von FUJIEDA *et al.* (1997) und REDECKER (2000), die sich mit der Expression synaptischer Proteine während der Ontogenese des Pinealorgans beschäftigten. Beide Autoren haben ihre Untersuchungen am Pinealorgan der Ratte durchgeführt. Die vorliegende Arbeit ist die erste immunhistochemische Studie, in der am Tiermodell Gerbil die Expressionsmuster mehrerer Synapsenproteine über einen Zeitraum vom embryonalen Tag E 20,5 bis zum postnatalen Tag P 38 im Pinealorgan untersucht wurden.

Zum besseren Verständnis wurden die Ergebnisse im Zusammenhang mit der morphologischen Entwicklung beschrieben, da es zwar Daten zur Morphogenese des Pinealorgans der Ratte (Überblick: siehe CALVO und BOYA 1981) aber nicht zur Entwicklung des Pinealorgans vom Gerbil gibt. Die embryonale Entwicklung des Gerbilpinealorgans ist vergleichbar mit der Ontogenese des Pinealorgans der Ratte, aber aufgrund einer längeren Trächtigkeit beim Gerbil (26 – 28 Tage) im Vergleich zur Ratte (21 – 22 Tage) zeitverzögert. So entspricht der untersuchte embryonale Tag E20,5 des Gerbils ungefähr dem Tag E17 und der Tag E24,5 dem Tag E19 – E20 in der Entwicklung der Ratte. Postnatal scheint die Ontogenese des Pinealorgans beider Spezies zeitgleich zu verlaufen.

Vor diesem morphogenetischen Hintergrund wurde die Expression der synaptischen Membranproteine Synaptobrevin, SNAP-25, Synaptophysin, Rab3a, Munc 18-1 und CSP untersucht. Diese Proteine scheinen auch in Pinealozyten maßgeblich an der Regulation der Exozytose synaptoider Mikrovesikel beteiligt zu sein (REDECKER *et al.* 1990, REDECKER und BARGSTEN 1993, REDECKER 1995, REDECKER 1996, REDECKER *et al.* 1996). In der hier durchgeführten Untersuchung konnten die exozytoserelevanten Membranproteine schon am Tag E20,5 im Pinealorgan des Gerbils detektiert werden. Diese Ergebnisse stehen im

---

Einklang mit den Ergebnissen von REDECKER (2000), der im Pinealorgan von Ratten ebenfalls eine frühe Expression von Synapsenproteinen nachweisen konnte.

Im Nervensystem beginnt die Expression von Synapsenproteinen ebenfalls sehr früh in der Ontogenese und geht oft der Synaptogenese voran (LECLERC *et al.* 1989, BERGMANN *et al.* 1991, GRABS *et al.* 1994, STETTLER *et al.* 1996, CONFALONI *et al.* 1997, BERGMANN *et al.* 1999, NOAKES *et al.* 1999). Dieses Phänomen führte zu der Vermutung, daß Synapsenproteine eine Rolle in der Morphogenese spielen. In der Tat konnte diese Vermutung für einige Proteine bestätigt werden: Die selektive Hemmung der Expression von SNAP-25 während der Ontogenese bzw. *in vitro* verhinderte z.B. das Fortsatzwachstum corticaler Neuronen und endokriner PC12-Zellen (OSEN-SAND *et al.* 1993). Weiterhin konnte das Axonwachstum während der Hirnentwicklung gehemmt werden, wenn Syntaxin durch den Einsatz von Botulinum Neurotoxin C 1 gespalten wurde (IGARASHI *et al.* 1996). Auch für die Proteine Synaptophysin, Synaptobrevin, Synaptotagmin und SV2 (LECLERC *et al.* 1989, BERGMANN *et al.* 1991, GRABS *et al.* 1994, STETTLER *et al.* 1996, CONFALONI *et al.* 1997, BERGMANN *et al.* 1999, NOAKES *et al.* 1999) gibt es vermehrt Hinweise auf eine Beteiligung an morphogenetischen Prozessen im sich entwickelnden Nervensystem. Man nimmt an, daß diese Proteine das axonale Wachstum fördern, indem sie an zielgerichteten, regulierten Exozytoseprozessen von Versorgungsvesikeln beteiligt sind, die Membrankomponenten zur Plasmamembran liefern und so eine Membranvergrößerung bewirken (OSEN-SAND *et al.* 1993, IGARASHI *et al.* 1997). Rab3 ist hingegen ein Protein, das erst nach der Synaptogenese in den präsynaptischen Nervenendigungen auftritt, wenn regulierte Neurotransmissionen stattfinden. Im Soma ist es allerdings schon relativ früh in der Entwicklung zu finden, wo es eine bisher unbekannte Funktion ausübt.

Da die Pinealzellen während der Ontogenese des Pinealorgans starken Umbildungen von einer polaren Epithelzelle zu einer endokrinen Zelle unterworfen sind, wäre es denkbar, daß die synaptischen Proteine, ähnlich wie im Nervensystem, an den dazu notwendigen Membranumbildungen beteiligt sind. Allerdings kann nicht ausgeschlossen werden, daß durch Fusionsvorgänge auch Neurotransmitter wie z.B. Glutamat oder Aspartat freigesetzt werden; bisher gibt es aber noch keine Daten zur erstmaligen Akkumulation von Neurotransmittern in synaptoiden Mikrovesikeln. In neonatalen Pinealorganen wurden jedoch hohe Konzentrationen an Glutamat und Taurin gemessen (MCNULTY *et al.* 1990). Eine eventuelle Sekretion von Aminosäuren im fetalen Pinealorgan könnte, ähnlich wie die der Neurotransmitter GABA oder Glutamat im sich entwickelnden Nervensystem (LAUDER *et al.*

---

1998, WEISS *et al.* 1998), einen Einfluß auf das Wachstum, die Differenzierung, die Zellwanderungen und das Überleben der Pinealzellen nehmen.

In dieser Untersuchung war ferner die Verteilung der synaptischen Membranproteine im Pinealorgan von Interesse, da sie möglicherweise Aufschluß über Funktionen der Synapsenproteine während der Entwicklung des Pinealorgans geben könnte. So wurden Synaptophysin-positive Zellen zum Zeitpunkt E24,5 vorwiegend im distalen Teil des Pinealorgans an der Grenze zur Basallamina detektiert. Im embryonalen Nervengewebe wird Synaptophysin in postmitotischen Zellen, die Zellwanderungen durchlaufen haben, exprimiert und gilt daher als Marker für differenzierte Zellen (BERGMANN *et al.* 1991, FUJIEDA *et al.* 1997). Untersuchungen verschiedener Arbeitsgruppen haben gezeigt, daß Bestandteile der Basallamina wie z.B. Laminin in der Lage sind, Differenzierungsvorgänge zu induzieren (EKBLÖM 1996, JIANG *et al.* 1999). Auch REDECKER (2000) fand in seinen Untersuchungen zahlreiche für Synaptophysin immunreaktive, also differenzierte Zellen, die direkt an eine intakte Basalmembran angeheftet waren.

Andererseits wurden in der vorliegenden Arbeit Synaptophysin-positive, differenzierte Zellen auch außerhalb der Basalmembran im umgebenden Stroma gefunden. Verschiedene Arbeitsgruppen (BERGMANN *et al.* 1991, FUJIEDA *et al.* 1997) beobachteten, daß wandernde Zellen ihre Polarität, die sie als Epithelzellen hatten, verlieren und durch eine fehlende Verankerung im Zellverband oder an der Basalmembran ihre Form verändern. Diese Veränderungen der Zellform könnten jene Kontrollmechanismen beeinflussen, die eine Zelldifferenzierung auslösen und letztendlich zur Expression von Synaptophysin führen (FUJIEDA *et al.* 1997).

Die Expressionsmuster der weiteren, hier untersuchten synaptischen Membranproteine zeigten teilweise Ähnlichkeiten. Insbesondere die Immunreaktivitäten für SNAP-25 und Synaptobrevin deckten sich in vielen Bereichen des sich entwickelnden Pinealorgans. IGARASHI *et al.* (1997) beobachteten in neuronalen Wachstumskegeln ebenfalls eine Kolokalisation von Synaptobrevin, Syntaxin und SNAP-25. Diese Proteine bilden, wie schon erwähnt, während der Exozytosen synaptischer Vesikel in reifen Synapsen den essentiell notwendigen *core*-Komplex. Auch in sich entwickelnden Axonen scheinen diese *core*-Proteine schon an frühen Fusionsvorgängen zwischen Vesikeln und Plasmamembran beteiligt zu sein und bewirken durch Proteininteraktionen einen Membranzuwachs im Wachstumskegel.

---

Im Pinealorgan neugeborener Gerbils zeigten bis zu 50% der Zellen Immunreaktivitäten. Zu diesem Entwicklungszeitpunkt wurden erstmals alle untersuchten synaptischen Proteine in einer einzelnen Zelle nachgewiesen. Dieses interessante Phänomen läßt vermuten, daß sich vom Tag E24,5 bis zur Geburt ein Wechsel von morphogenetischen Funktionen der Synapsenproteine zu regulatorischen Aufgaben in der Vesikelexozytose vollzogen haben könnte. IGARASHI *et al.* (1997) postulierten einen solchen Funktionswechsel der Synapsenproteine in den Wachstumskegeln und hielten diesen Wechsel für einen Schlüsselschritt in der Entwicklung des präsynaptischen Nervenendes.

Ein weiterer Schlüsselschritt in der Entwicklung des präsynaptischen Nervenendes ist die Akkumulierung von synaptischen Vesikeln (MATTEOLI *et al.* 1992). Ein vergleichbarer Prozeß scheint auch in den Pinealozyten vollzogen zu werden, und zwar vermutlich am Ende der ersten postnatalen Woche. Zu diesem Zeitpunkt konnte erstmals immunhistochemisch eine deutliche Anreicherung von Synapsenproteine in den erweiterten Fortsatzendigungen detektiert werden. Im gleichen Entwicklungsstadium ließen sich auch Anreicherungen von Mikrovesikeln in Fortsatzterminalen der Pinealozyten mittels Elektronenmikroskopie dokumentieren. Das Auftreten von vesikelreichen Fortsatzendigungen ist ein Hinweis auf beginnende Exo-/Endozytosezyklen in diesen Fortsätzen.

Am 14. Lebenstag scheint die Entwicklung der synaptoiden Mikrovesikel in den Pinealozyten abgeschlossen zu sein, denn es konnten bis zum Tag P38 keine weiteren Veränderungen der Immunreaktivitäten für die Synapsenproteine beobachtet werden. Alle Pinealozyten und ihre Fortsatzenden wiesen eine maximale Immunreaktivität für die untersuchten Proteine auf. Tag P14 ist auch exakt der Zeitpunkt, an dem erstmals im Pinealorgan von Ratten und Hamstern eine rhythmische und durch Licht regulierte Hormonsynthese auftritt (TAMARKIN *et al.* 1980, YELLON *et al.* 1985, VAN VEEN *et al.* 1978). Damit fällt der Beginn einer etablierten, sekretorischen Aktivität der synaptoiden Mikrovesikel offenbar zeitlich mit dem Beginn der rhythmischen Hormonsynthese im Pinealorgan zusammen. Diese zeitliche Übereinstimmung der beiden Vorgänge ist ein Hinweis darauf, daß die synaptoiden Mikrovesikel die Hormonsynthese der Pinealozyten von Anfang an parakrin beeinflussen können.

---

### 3. Metabotrope Glutamatrezeptoren

Glutamat ist der vorherrschende excitatorische Neurotransmitter im zentralen Nervensystem der Vertebraten. Physiologische, pharmakologische und molekularbiologische Untersuchungen haben gezeigt, daß Glutamat mit einer Vielzahl von Rezeptoren agiert, um seine unterschiedlichen Wirkungen auf prä- und postsynaptischer Ebene zu vermitteln. Im Pinealorgan konnten in den letzten Jahren zahlreiche, überwiegend ionotrope Glutamatrezeptoren lokalisiert werden (SATO *et al.* 1993, MICK 1995, YATSUSHIRO *et al.* 2000), die vermutlich die Wirkung des aus synaptoiden Mikrovesikeln freigesetzten Glutamats vermitteln.

Ziel dieser Untersuchung war es, zu überprüfen, ob metabotrope Glutamatrezeptoren (mGluR2/3 und mGluR5) auch im Pinealorgan von Ratte und Gerbil vorkommen. Mit immunhistochemischen Methoden konnte mGluR5 im Pinealorgan der Ratte nachgewiesen werden. Dieser Rezeptor gehört der Klasse I der metabotropen Glutamatrezeptoren an. Wie alle G-Protein-gekoppelten Rezeptoren weist mGluR5 sieben transmembrane Bereiche auf und besitzt zusätzlich eine große extrazelluläre Domäne, die die Bindung des Glutamats ermöglicht (ABE *et al.* 1992). Aus Untersuchungen an Neuronen ist bekannt, daß der Rezeptor über G-Proteine an die Phosphoinositidkaskade gekoppelt ist, die zur Freisetzung der intrazellulär gespeicherten  $Ca^{++}$ -Ionen führt. Außerdem wird die Proteinkinase K aktiviert, die Serin- und Threoninreste der Zielproteine phosphoryliert. mGluR5 zeigt Sequenzhomologien zu mGluR1, dem zweiten Rezeptor der Klasse I. Um zu überprüfen, ob der verwendete polyklonale Antikörper gegen mGluR5 mit mGluR1 kreuzreagiert, wurden Kontrollfärbungen im Gehirn durchgeführt. Da der Antikörper nicht in der Lage war, die mGluR1-reichen Purkinje-Zellen im Cerebellum zu markieren, konnte eine Kreuzreaktivität des Antikörpers mit mGluR1 weitgehend ausgeschlossen werden.

Der immunhistochemische Nachweis von mGluR5 in den Kryostatschnitten der Ratte und denen des Gerbils ergab ein auffälliges zelluläres Färbemuster. Der Antikörper gegen mGluR5 markierte überraschend nur das Soma, aber keine Zellfortsätze. Für diese Erscheinung gibt es zwei mögliche Erklärungen: Entweder kommt mGluR5 in Pinealzellen tatsächlich nur in der Plasmamembran des Somas vor oder die Rezeptoren in den Fortsätzen waren für den Antikörper unter den gegebenen Versuchsbedingungen nicht zugänglich. Letzteres wurde in den Golgizellen des Cerebellums beobachtet (NEKI *et al.* 1996). Hier erkannte der Antikörper in Abhängigkeit von der Art der Fixierung nur die „unreife“



---

Tertiärstruktur des metabotropen Glutamatrezeptors im Zellkörper, aber nicht die membranständige, aktive Form in den Zellfortsätzen.

In der vorliegenden Studie wurden desweiteren Doppelmarkierungen zur Identifizierung der mGluR5-positiven Zellen im Pinealorgan der Ratte durchgeführt. Dabei konnten die rezeptortragenden Zellen eindeutig als Pinealozyten erkannt werden. Dieses Ergebnis entspricht den Ergebnissen von YATSUSHIRO *et al.* (1999), die ebenfalls mGluR5 auf Pinealozyten der Ratte detektiert haben. Eine genaue Funktion dieses Glutamatrezeptors auf den Pinealozyten ist bisher jedoch nicht bekannt. Nach den Beobachtungen von YATSUSHIRO *et al.* (1999) scheint der Rezeptor nicht an der glutamatvermittelten Inhibition der Melatoninsynthese beteiligt zu sein. Aber es gibt Hinweise darauf, daß mGluR5 auch in Pinealozyten an die Phosphoinositidkaskade gekoppelt ist. Zum Beispiel konnte gezeigt werden, daß die Pinealozyten den IP<sub>3</sub>-Rezeptor exprimieren (YATSUSHIRO *et al.* 1999), dessen Aktivierung nachweislich eine Freisetzung von Ca<sup>++</sup>-Ionen aus intrazellulären Speichern bewirkt. Außerdem könnte mGluR5 in Pinealozyten, wie in Neuronen, die Proteinkinase C aktivieren.

YAMADA *et al.* (1998) konnten zusätzlich zu mGluR5 auch den metabotropen Glutamatrezeptor mGluR3 im Pinealorgan der Ratte lokalisieren. Dieser Nachweis gelang in der hier beschriebenen Untersuchung nicht, obwohl zahlreiche unterschiedliche Verfahren zur Fixierung und Färbung des Gewebes ausgetestet wurden. Selbst durch eine Mikrowellenbehandlung der Kryostatschnitte, die in der Regel eine verbesserte Zelloberflächenmarkierung bei gleichzeitiger Reduktion der unspezifischen Hintergrundfärbung gewährleistet, konnten keine Immunreaktivitäten für den Antikörper gegen mGluR2/3 im Pinealorgan der Ratte nachgewiesen werden. Dennoch scheint mGluR3 im Pinealorgan der Ratte vorhanden zu sein, da YAMADA *et al.* (1998) diesen metabotropen Rezeptor sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene in den Pinealozyten des neuroendokrinen Organs nachweisen konnten. mGluR3 gehört zu den Klasse II-Glutamatrezeptoren, die negativ an die Adenylatzyklase gekoppelt sind und dadurch den cAMP-Gehalt der Zelle senken. In Pinealozyten der Ratte führt die Bindung von Glutamat an mGluR3 zu einer Erniedrigung des cAMP-Spiegels und der NAT-Aktivität und bewirkt so eine komplette Hemmung der durch Noradrenalin induzierten Melatoninsynthese (YAMADA *et al.* 1998). Da Noradrenalin seine Wirkung durch die Erhöhung des intrazellulären cAMP-Spiegels vermittelt, scheinen Glutamat und Noradrenalin in dieser Tierart direkte Gegenspieler an der gleichen *second messenger*-Kaskade darzustellen.

---

In der vorliegenden Arbeit wurde das Vorkommen der Glutamatrezeptoren mGluR2/3 und mGluR5 zusätzlich im Pinealorgan des Gerbils untersucht (siehe auch PABST und REDECKER 1999). Beide Rezeptoren konnten bei dieser Nagerspezies ebenfalls in Parenchymzellen nachgewiesen werden. Doch die immunhistochemische Identifizierung der rezeptortragenden Zellen hatte ein unerwartetes Ergebnis: Die metabotropen Glutamatrezeptoren wurden nicht in Pinealozyten exprimiert, sondern in gliaähnlichen, interstitiellen Zellen. Der im Vergleich zu anderen Spezies der Ordnung *Rodentia* abweichende Expressionsort der Glutamatrezeptoren im Pinealorgan deutet darauf hin, daß es artspezifisch unterschiedliche Wirkmechanismen von Glutamat im Pinealorgan gibt oder vielleicht sogar verschiedenartige Wirkungen. Die Lokalisation von Glutamatrezeptoren auf Gliazellen ist jedoch nicht ungewöhnlich. Auch MICK (1995) konnte die AMPA-Rezeptoren GluR1 und GluR4 auf interstitiellen Zellen nachweisen. Außerdem wurden in den letzten Jahren im Nervensystem in den verschiedensten Gehirnregionen die metabotropen Glutamatrezeptoren mGluR3 und mGluR5 auf Gliazellen lokalisiert (ABE *et al.* 1992, TANABE *et al.* 1992, PETRALIA *et al.* 1996). Da mGluR3 und mGluR5 verschiedenen Rezeptorklassen angehören, werden in den Gliazellen wahrscheinlich auch unterschiedliche *second messenger*-Systeme aktiviert. In der Tat konnten zahlreiche glutamatvermittelte intrazelluläre Wirkungen in den Gliazellen des Nervensystems gezeigt werden:

Die Aktivierung von mGluR5 in Gliazellen führt z.B. zu einer Erhöhung der  $Ca^{++}$ -Konzentration. Dieses  $Ca^{++}$ -Signal kann sich wellenförmig innerhalb der Zelle ausbreiten und durch *gap junctions* sogar auf benachbarte Gliazellen übertragen werden (SMITH 1994, SONTHEIMER 1995). Außerdem bewirkt die Bindung von Glutamat an Klasse I-Rezeptoren eine Phosphorylierung von Zielproteinen, wie z.B. die Phosphorylierung von GFAP (WOFCHUK und RODNIGHT 1994), die letztendlich die Proliferation von Gliazellen (NICOLETTI *et al.* 1990, MILLER *et al.* 1995) beeinflussen kann.

Ferner wurde beobachtet, daß durch die Aktivierung des mGluR5 die Glutaminsynthase in Gliazellen stimuliert wird (NICOLETTI *et al.* 1990, MILLER *et al.* 1992), die eine vermehrte Umbildung von Glutamat zu Glutamin induziert. Dieser metabolische Prozeß fördert die Entfernung des Glutamats aus dem synaptischen Spalt und beendet somit die glutamaterge Neurotransmission. Metabotrope Glutamatrezeptoren der Klasse I scheinen auch an der Wahrnehmung eines erhöhten Glutamatgehalts im Zellzwischenraum beteiligt zu sein, in dem sie über *second messenger*-Kaskaden den entsprechenden Glutamattransporter stimulieren,

---

was schließlich ebenfalls zur effektiven Beseitigung des Transmitters aus dem Extrazellularraum führt (KANNER 1993).

Außerdem konnte gezeigt werden, daß cortikale Astrozyten auf eine Aktivierung der metabotropen Glutamatrezeptoren mit Volumenänderungen reagieren und dadurch die Größe des Zellzwischenraums beeinflussen. Dieser Prozeß führt zu Änderungen der effektiven Konzentrationen von Neurotransmittern und Ionen im Zellzwischenraum (HANSSON und RÖNNBÄCK 1995).

Die Aktivierung von mGluR3 auf Gliazellen im Zusammenspiel mit einer Aktivierung des  $\beta$ -adrenergen Rezeptors bewirkt die Freisetzung von cAMP oder Metaboliten (z.B. Adenosin) aus den Gliazellen in den Extrazellularraum (GEREAU *et al.* 1995, WINDER und CONN 1996, WINDER *et al.* 1996). Die Substanzen binden dann an  $A_1$ -Adenosin-Rezeptoren auf benachbarten Nervenendigungen und führen zu einer Reduktion der Glutamatfreisetzung. Im Nervensystem sind Gliazellen folglich auch an der negativen Regulation der Glutamat-ausschüttung beteiligt.

Letztgenannte Regulationsmechanismen scheinen im Pinealorgan ebenfalls möglich zu sein. Diese Vermutung stützt sich auf die Tatsache, daß im Pinealorgan ein Adenosin-Rezeptor nachgewiesen werden konnte, dessen zelluläre Verteilung allerdings bisher noch nicht bekannt ist (NICHOLLS *et al.* 1997). Der gleichfalls an diesem Prozeß beteiligte  $\beta$ -adrenerge Rezeptor wird in großen Mengen im Pinealorgan exprimiert.

Dieser Überblick über die Expression von metabotropen Glutamatrezeptoren in Gliazellen zeigt, daß metabotrope Glutamatrezeptoren im Nervensystem eine einzigartige und bedeutende Rolle in der Modulation glialer Funktionen spielen. Zudem sind Gliazellen wahrscheinlich durch die Expression dieser Rezeptoren zur modulierbaren, interzellulären Kommunikation mit anderen Gliazellen und Neuronen befähigt. Da metabotrope Glutamatrezeptoren nachweislich auch auf interstitiellen Zellen im Pinealorgan vorkommen, sind ähnliche Funktionen wie im Nervensystem auch im Pinealorgan denkbar. Zukünftige Untersuchungen sollten die Bestätigung für diese Hypothese liefern.

Nicht alle Gliazellen im Pinealorgan tragen metabotrope Glutamatrezeptoren. Nur ein Teil der vimentinpositiven Zellen exprimieren mGluR2/3 und mGluR5; in GFAP-positiven Zellen fehlen die metabotropen Glutamatrezeptoren völlig. Für diese beobachtete funktionelle Heterogenität der interstitiellen Zellen sprechen auch zahlreiche Beobachtungen verschiedener Arbeitsgruppen (SCHACHNER *et al.* 1984, LOPEZ-MUNOZ *et al.* 1992, PEDERSEN *et al.* 1993), die auf morphologischer Ebene unterschiedliche gliale Phänotypen erkannt

---

haben. Um weitere Hinweise auf mögliche Diversitäten der glialen Zellpopulation zu erhalten, wäre es interessant festzustellen, ob verschiedene Glutamatrezeptoren in denselben interstitiellen Zellen exprimiert werden.

Metabotrope Glutamatrezeptoren spielen also nicht nur im zentralen Nervensystem, sondern vermutlich auch im Pinealorgan eine bedeutende Rolle in der parakrinen Kommunikation. Durch die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit konnte das Verständnis um diese Vorgänge erweitert werden. So scheinen metabotrope Glutamatrezeptoren im Pinealorgan nicht nur auf Pinealozyten Glutamatwirkungen vermitteln zu können, die letztendlich zur negativen Regulation der Hormonsynthese im Pinealorgan führen, sondern sie regulieren bei mindestens einer Tierart auch auf glialer Ebene intra- und interzelluläre Funktionen. Damit stellen sich die parakrinen Kommunikationsvorgänge im Pinealorgan komplizierter dar, als bisher angenommen. Weitere Untersuchungen sollten an diese Arbeit anschließen, um die Funktion der metabotropen Glutamatrezeptoren im Pinealorgan genauer zu bestimmen und um mögliche interzelluläre Kommunikationen nicht nur zwischen Pinealozyten, sondern auch zwischen Pinealozyten und Gliazellen aufdecken zu können.

#### **4. Glutamattransporter**

Im zentralen Nervensystem sind niedrige extrazelluläre Konzentrationen des excitatorischen Neurotransmitters Glutamat eine Grundvoraussetzung für eine effiziente glutamaterge Neurotransmission. Zusätzlich wird das Nervengewebe durch Aufrechterhalten eines geringen Glutamatniveaus vor neurotoxischen Schäden bewahrt, denn Glutamat verursacht in hohen Konzentrationen den Tod neuronaler Zellen (ROTHSTEIN *et al.* 1996, HARADA *et al.* 1998). Für die Regulation der extrazellulären Glutamatkonzentration ist die Familie der hochaffinen Plasmamembrantransporter zuständig, die zur Zeit fünf bekannte Subtypen GLT-1, GLAST, EAAC1, EAAT4 und EAAT5 umfaßt (Überblick: siehe MALANDRO und KILBERG 1996, GEGELASHVILI und SCHOUSBOE 1998). Die ersten drei genannten Transporter wurden zu Beginn der neunziger Jahre kloniert und charakterisiert (PINES *et al.* 1992, STORCK *et al.* 1992, KANAI und HEDIGER 1992). Sie sind im zentralen Nervensystem vorrangig für die Entfernung von Glutamat aus dem Extrazellulärraum zuständig. Die Transporter GLT-1 und GLAST werden vor allem von Astrozyten exprimiert, während der EAAC1 überwiegend auf

---

Neuronen vorkommt. Da im Pinealorgan ebenfalls eine glutamaterge Transmission vermutet wird, stellte sich die Frage, ob und wenn, welche Glutamattransporter daran beteiligt sind.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, daß im Pinealorgan der zwei Nagerarten Ratte und Gerbil immunhistochemisch nachweisbare Mengen an GLT-1, GLAST und EAAC1 enthalten sind. GLT-1 und GLAST konnten auf interstitiellen Zellen lokalisiert werden (siehe auch REDECKER und PABST 2000), die Markerproteine für diesen pinealen Zelltyp koexprimierten. Das Färbemuster zeigte eindeutig, daß die große Mehrheit der interstitiellen Zellen die beiden Transportersubtypen GLT-1 und GLAST enthielten. YAMADA *et al.* (1997) hatten mit molekularbiologischen Techniken ebenfalls den Glutamattransporter GLT-1 im Pinealorgan der Ratte entdeckt. Auch mit biochemischen Methoden konnte die Arbeitsgruppe ein plasmamembranständiges, Na<sup>+</sup>-abhängiges Glutamat-Aufnahme-System nachweisen, das in seiner Kinetik der Glutamattransport-Maschinerie im Nervensystem ähnelt (YAMADA *et al.* 1997). Allerdings vermuteten sie aufgrund ihrer immunhistochemischen Daten eine Expression des Glutamattransporters in Pinealozyten. In dieser Untersuchung konnten im Pinealorgan der Ratte einzelne GLT-1-positive Pinealozyten identifiziert werden, aber der Großteil der markierten Zellen waren eindeutig interstitielle Zellen.

Der japanischen Arbeitsgruppe gelang es nicht, die Transporter GLAST oder EAAC1 auf mRNA- oder Proteinebene im Pinealorgan nachzuweisen. Aber sie schlossen die Möglichkeit einer Mitwirkung von GLAST, EAAC1 und EAAT4 an der Aufnahme von Glutamat in entsprechende Zellen nicht aus. In der vorliegenden Arbeit wurde somit erstmals in Pinealorganen der Ratte sowie des Gerbils der gliale Transporter GLAST eindeutig auf interstitiellen Zellen lokalisiert. In einem Teil der GLAST-positiven Zellen wurde zudem GLT-1 exprimiert. Eine Koexpression dieser beiden Glutamattransporter konnte auch im Nervensystem beobachtet werden (CHAUDHRY *et al.* 1995, LEHRE *et al.* 1995). In einer kürzlich erschienenen Arbeit von BERGER und HEDIGER (2000) wurde ebenfalls eine Expression des Glutamattransporters GLAST im Pinealorgan der Ratte beschrieben.

Ferner wurde in der vorliegenden Studie der Transporter EAAC1 im Pinealorgan nachgewiesen, der im Gegensatz zu den anderen Glutamattransportern in einer großen Anzahl von Pinealozyten lokalisiert wurde. EAAC1 wurde von KANAI und HEDIGER erstmals 1992 kloniert und charakterisiert. Es ist ein 69 kDa großes Protein, das im Nervensystem überwiegend von Neuronen exprimiert wird. Die funktionelle Aufgabe des Transporters ist noch nicht vollständig geklärt. EAAC1 scheint aber nicht vorrangig an der Entfernung von Glutamat aus dem Extrazellularraum beteiligt zu sein: Knockout-Versuche zeigten, daß der

---

Verlust von EAAC1 nicht, wie im Fall von GLT-1 oder GLAST, zu einer Erhöhung des extrazellulären Glutamats führt (ROTHSTEIN *et al.* 1996). Da EAAC1 unter anderem in postsynaptischen Membranen GABAerger Neuronen lokalisiert wurde (ROTHSTEIN *et al.* 1994), vermutet man, daß dieser Transporter dort an der Bereitstellung von Glutamat für die GABA-Synthese beteiligt ist.

Die in der vorliegenden Untersuchung gewonnenen Ergebnisse demonstrieren anschaulich die Existenz eines Wiederaufnahmesystems für Glutamat im Pinealorgan von Ratten und Gerbils, das aus den im Nervensystem funktionell wichtigen Transportern GLT-1, GLAST und EAAC1 besteht. Im Pinealorgan scheinen die Transporter, ähnlich wie im Nervensystem, schnell und effektiv die glutamaterge Transmission zu beenden. Da Glutamat die Noradrenalin-stimulierte Melatoninproduktion hemmt, könnten sie somit für eine präzise Kontrolle der Melatoninsynthese notwendig sein.

Bemerkenswert ist, daß vor allem interstitielle Zellen die Terminierung der Glutamatvermittelten Kommunikation bewirken zu scheinen. Im vorigen Kapitel wurde schon ihre Bedeutung an der Signaltransduktion durch die Expression verschiedener metabotroper Glutamatrezeptoren in interstitiellen Zellen herausgestellt. Anhand der genannten Befunde kann die alte Vorstellung von gliaähnlichen, interstitiellen Zellen, deren Aufgaben sich in Stützgewebefunktionen und allgemeinen Stoffwechselprozessen erschöpft, nicht mehr aufrechterhalten werden. Vielmehr scheinen diese Zellen aktiv und im Wechselspiel mit den Pinealozyten an der funktionalen Regulation des Organs beteiligt zu sein.

Die beschriebenen Ergebnisse zeigen, daß Pinealozyten die molekulare Ausstattung einer glutamatergen Signalmaschinerie besitzen. Dazu gehören a) die Proteinzusammensetzung der synaptoiden Mikrovessel, die die Speicherung und Sekretion von Glutamat ermöglichen, b) metabotrope Glutamatrezeptoren, die die Signalaufnahme vermitteln und c) Glutamattransporter, die für eine Terminierung des Glutamatsignals sorgen. Diese molekularen Bausteine des glutamatergen Kommunikationssystems im Pinealorgan zeigen Gemeinsamkeiten mit den Elementen im Nervensystem und lassen dementsprechend mechanistische und funktionelle Ähnlichkeiten beider Systeme vermuten.

## 5. Exozytose-Assay

Aufgrund der molekularen Zusammensetzung der synaptoiden Mikrovesikel wurde die Hypothese aufgestellt, daß sie ähnlich wie die synaptischen Vesikel in Nervenzellen als hoch spezialisierte sekretorische Organellen Neurotransmitter speichern und freisetzen können. Nach dieser Hypothese fusionieren die synaptoiden Vesikel während des Exozytosevorgangs mit der Plasmamembran und setzen den Neurotransmitter in den extrazellulären Raum frei. Anschließend wird die Vesikelmembran internalisiert und für neue funktionelle Vesikel wiederverwendet. Bisher wurden solche Exo-/Endozytose-Zyklen der synaptoiden Mikrovesikel niemals direkt mikroskopisch sichtbar gemacht. Man konnte in den verschiedenen neuroendokrinen Organen lediglich indirekt über den Nachweis von freigesetzten Neurotransmittern auf vesikelvermittelte Sekretionsprozesse schließen (SCHUBERT und KLIER 1977, AHNERT-HILGER und WIEDENMANN 1992, BAUERFEIND 1993, YAMADA *et al.* 1996, YATSUSHIRO *et al.* 1997).

In der vorliegenden Arbeit wurde nun erstmals ein Exozytose-Assay angewandt, der eine direkte, lichtmikroskopische Darstellung von Vesikelexozytosen in Pinealozyten unabhängig von der Transmitterfreisetzung ermöglichte. Ursprünglich wurde dieser Assay entwickelt, um Exozytosevorgänge in sich entwickelnden Hippocampus-Neuronen darzustellen (MATTEOLI *et al.* 1992). Er beruht auf dem Einsatz eines spezifischen, polyklonalen Antikörpers, der gegen den lumenalen N-Terminus des Vesikelmembranproteins Synaptotagmin gerichtet ist. Der Antikörper (Synaptotagmin<sub>(lum)</sub>-Antikörper), der dem extrazellulären Medium zugefügt wird, kann nur dann an sein Epitop binden, wenn sich die Vesikel während der Fusion mit der Plasmamembran zum Extrazellularraum hin öffnen. Durch dieses Verfahren werden nur Vesikel markiert, die einen Exo-/Endozytosezyklus durchlaufen haben. Die Verwendung dieses spezifischen Synaptotagmin<sub>(lum)</sub>-Antikörpers hat einen besonderen Vorteil gegenüber anderen Membranfarbstoffen, z.B. gegenüber FM1-43: Er bindet spezifisch nur an Synaptotagmin-tragende Vesikel und markiert nicht unspezifisch alle internalisierte Membranen (BETZ und WU 1995). Da Synaptotagmin, wie eingangs schon erwähnt, ein wichtiges und häufiges Protein der synaptoiden Mikrovesikel ist, erschien dieser Assay auch für die Darstellung von Vesikelexozytosen in Pinealozyten geeignet zu sein. In dieser Untersuchung wurde der Antikörper vor seinem Einsatz mit dem Fluorochrom Cy3 konjugiert. Er konnte somit als Vitalfarbstoff eingesetzt werden, um den Exozytosevorgang im Lichtmikroskop direkt sichtbar zu machen.

---

Mit diesem *Assay* konnten punktförmige, intrazelluläre Strukturen in Pinealozyten markiert werden. Da nichtneuronale Zellen in der Kultur nicht markiert wurden und Kontrollantikörper nicht in der Lage waren, Immunmarkierungen hervorzurufen, kann man davon ausgehen, daß überwiegend endozytierte synaptoide Mikrovesikel durch den Synaptotagmin<sub>(lum)</sub>-Antikörper dargestellt wurden. Auffällig war allerdings die ungewöhnliche Größe der markierten Strukturen, die nicht der Größe einzelner Vesikel entsprach. Dieses Phänomen trat auch in neuronalen Zellen auf. Dort konnte gezeigt werden, daß es sich bei großen, rundlichen Strukturen um Vesikelcluster handelte (KRASZEWSKI *et al.* 1996). In der vorliegenden Studie wurden die durch den Synaptotagmin-Antikörper markierten Strukturen durch Doppelmarkierungen mit Antikörpern gegen verschiedene Vesikelmembranproteine (Synaptobrevin, Synaptophysin, zytoplasmatische Domäne von Synaptotagmin) ebenfalls eindeutig als synaptoide Mikrovesikel identifiziert.

Bemerkenswert war, daß die Immunmarkierungen der Antikörper gegen Synaptobrevin und Synaptophysin, vor allem aber gegen die zytoplasmatische Domäne von Synaptotagmin sehr viel stärker erschienen als die Färbung mit dem Antikörper gegen die lumenale Domäne. Diese Diskrepanz konnte auch in Nervenzellen beobachtet werden (MUNDIGL *et al.* 1995) und wurde dort folgendermaßen erklärt:

Der Synaptotagmin<sub>(lum)</sub>-Antikörper hat nur für kurze Zeit, nämlich während der Exozytose, Gelegenheit, an sein Epitop zu binden und zudem verläuft die Bindungskinetik des Antikörpers sehr langsam (MUNDIGL *et al.* 1995). Ein Grund für diese limitierte Bindung scheinen Diffusionsbarrieren zu sein. Man nimmt an, daß die Vesikel nicht vollständig mit der Plasmamembran fusionieren, sondern lediglich eine schmale Fusionspore ausbilden, durch die der Vesikelinhalt in den Extrazellulärraum entlassen wird. Der Antikörper muß dabei in entgegengesetzter Richtung diffundieren (Kiss-and-Run-Theorie, siehe FESCE *et al.* 1994). Die Gegenfärbung der anderen Vesikelmembranproteine wurde im Gegensatz zu der oben geschilderten Vesikelmarkierung an fixiertem Material durchgeführt. Die Antikörper hatten dadurch unbegrenzten Zutritt zu ihren Bindungsdomänen, so daß diese Färbung in ihrer Intensität sehr viel kräftiger ausfiel.

Immunreaktivitäten für Synaptotagmin<sub>(lum)</sub> waren in allen Teilen der Zelle zu beobachten. Wie erwartet wurden Markierungen in den Fortsätzen und deren erweiterten Endigungen gefunden. Außerdem zeigten auch viele punktförmige Strukturen im Soma Immunreaktivitäten für den Synaptotagmin<sub>(lum)</sub>-Antikörper. Zum einen kommen synaptoide Mikrovesikel auch im Soma der Pinealozyten vor. Zum anderen befinden sich hier sogenannte



---

synaptische Bänder, die mit einer Vielzahl von Vesikeln assoziiert sind. Synaptische Bänder sind zelluläre Organellen, die regelmäßig in Pinealozyten (WARTENBERG 1968, WELSH und REITER 1978, KARASEK und REITER 1992) und in retinalen Photorezeptorzellen auftreten. Im letztgenannten Zelltyp stellen sie spezialisierte synaptische Strukturen für die Neurotransmission dar. Man vermutet, daß synaptische Bänder auch in Pinealozyten an einem sekretorischen Prozeß beteiligt sind (KARASEK 1973).

Ein retrograder Transport der markierten Vesikel zum Soma kann ebenfalls nicht völlig ausgeschlossen werden. Informationen darüber könnten zusätzliche Untersuchungen liefern, indem der retrograde Transport, der von Mikrotubuli abhängt, inhibiert wird.

Immunmarkierungen wurden auch in unstimulierten Pinealozyten beobachtet. Sie dokumentieren dort wahrscheinlich spontane, basale Exozytosevorgänge. Durch Stimulation der Zellen mit depolarisierenden Konzentrationen an KCl konnten die Immunmarkierungen in ihrer Intensität erhöht werden. Augenscheinlich schienen auch mehr Vesikel markiert zu sein. Die Stimulation verursachte demnach vermutlich, ähnlich wie in den Nervenzellen (MUNDIGL *et al.* 1995, KRASZEWSKI *et al.* 1995, 1996), eine vermehrte Anzahl der Exozytosevorgänge. Mit dem *Assay* lassen sich folglich auch quantitative Aussagen machen, da die Menge des gebundenen Antikörpers anscheinend mit der Anzahl der Exozytosevorgänge korreliert (MUNDIGL *et al.* 1995, KRASZEWSKI *et al.* 1995, 1996). Ein weiterer Vorteil des genannten *Assays* ist eine stabile Bindung zwischen Antikörper und Epitop, so daß Vesikeltransporte unabhängig von weiteren Exozytosen der Vesikel über einen langen Zeitraum beobachtet werden können. Dieser *Assay* ist damit ein effektives Werkzeug, um Vesikelexozytosevorgänge auch in neuroendokrinen Zellen zu untersuchen – unabhängig von Neurotransmitterfreisetzung oder postsynaptischen Antworten.

## 6. Freisetzung neuroaktiver Aminosäuren aus Pinealozyten nach Depolarisation

Nachdem im vorangegangenen Kapitel gezeigt werden konnte, daß synaptoide Mikrovesikel in Pinealozyten tatsächlich Exo-/Endozytose-Zyklen durchlaufen, stellt sich zwangsläufig die Frage nach den Botenstoffen, die durch diesen Prozeß freigesetzt werden. Als ein möglicher Kandidat gilt seit langem die neuroaktive Aminosäure Glutamat, da sie im Pinealorgan in hohen Konzentrationen vorliegt (NIR *et al.* 1973, 1974, MCNULTY *et al.* 1990) und die Bedingungen einer parakrinen Substanz im untersuchten neuroendokrinen Organ erfüllt:

Glutamat bewirkt in Pinealozyten bei gleichzeitiger Stimulation durch Noradrenalin eine Hemmung der Aktivität der N-Acetyltransferase, des Schlüsselenzyms der Melatonin synthese (GOVITRAPONG und EBADI 1988) und ist damit maßgeblich an der Regulation der Melatoninproduktion beteiligt (KUS *et al.* 1994). Außerdem spricht der in der vorliegenden Arbeit geführte Nachweis von Glutamatrezeptor- und transporterproteinen ebenfalls für eine glutamaterge Kommunikation im Pinealorgan. Zusätzlich zum Glutamat wurden auch beträchtliche Mengen Aspartat im Pinealorgan gefunden, das in seiner Wirkung dem Glutamat sehr ähnlich zu sein scheint (GOVITRAPONG und EBADI 1988).

1996 gelang erstmals in einem *in vitro*-Experiment der Nachweis, daß Glutamat aus Rattenpinealozyten sezerniert wird (YAMADA *et al.* 1996). Etwas später konnte auch die Freisetzung von Aspartat aus kultivierten Pinealozyten gezeigt werden (YATSUSHIRO *et al.* 1997). Die Sekretion der neuroaktiven Aminosäuren wurde durch erhöhte KCl-Konzentrationen induziert und war  $Ca^{++}$ -abhängig. Der Einsatz von  $Ca^{++}$ -Kanal-Blockern hemmte die Sekretion. Eine Hemmung wurde ebenfalls durch eine Behandlung der Zellkulturen mit Botulinum-Neurotoxin E und C1 erzielt. In Neuronen spalten diese Neurotoxine synaptische Proteine des *core*-Komplexes, die den Exozytosevorgang steuern, und verhindern somit die Freisetzung von Neurotransmittern aus synaptischen Vesikeln. Daß die Neurotoxine in Pinealozyten die Freisetzung von Glutamat und Aspartat in gleicher Weise inhibieren können, zeigt, daß diese Aminosäuren vesikulär in synaptoiden Mikrovesikeln gespeichert und daraus ausgeschüttet werden. Neben dem Pinealorgan konnte auch in anderen neuroendokrinen Geweben und Zellen eine Sekretion von Neurotransmittern beobachtet werden. So sezernieren  $\beta$ -Zellen des endokrinen Pankreas z.B. GABA in einem KCl- und  $Ca^{++}$ -abhängigen Prozeß (AHNERT-HILGER und WIEDENMANN 1992); in PC12-Zellen wurde eine  $Ca^{++}$ -abhängige Sekretion von Acetylcholin nachgewiesen (SCHUBERT und KLIER 1977).

---

In der vorliegenden Arbeit konnte die Freisetzung von neuroaktiven Aminosäuren aus kultivierten Pinealozyten demonstriert werden. Die Zellkulturen beider Tierarten (Ratte und Gerbil) reagierten auf depolarisierende Stimuli mit einer vermehrten Ausschüttung von Glutamat und Aspartat. Nennenswerte Speziesunterschiede wurden nicht beobachtet. Einziger Unterschied war, daß zur Depolarisation der Gerbilpinealozyten höhere Mengen an KCl (80 mM) eingesetzt werden mußten, als zur Depolarisation von Rattenpinealozyten (50 mM). Überraschend konnten zusätzlich zu Glutamat und Aspartat auch erhöhte Mengen an Glycin im Zellüberstand gemessen werden. Bisher ist kaum etwas über diesen inhibitorischen Transmitter im Pinealorgan bekannt. Kürzlich wurden jedoch erste Untersuchungen durchgeführt, die Hinweise auf eine mögliche Funktion von Glycin im Pinealorgan liefern. Es konnte z.B. der vesikuläre Transporter für inhibitorische Aminosäuren (VIAAT = vesicular inhibitory amino acid transporter) im Pinealorgan nachgewiesen werden (REDECKER *et al.*, zur Publikation eingereicht). Im Nervensystem ist dieser Transporter ein Marker für Neuronen, die GABA oder Glycin für die synaptische Neurotransmission verwenden. Er vermittelt die Aufnahme von GABA und Glycin in die synaptischen Vesikel. Im Pinealorgan könnte VIAAT für die Speicherung von Glycin in synaptoiden Mikrovesikeln verantwortlich sein. Ein weiteres Indiz für eine funktionelle Bedeutung von Glycin im Pinealorgan ist die Beobachtung, daß auch ein in der Plasmamembran lokalisierter Glycintransporter, nämlich GlyT2, im Pinealorgan vorkommt (REDECKER, nichtpublizierter Befund). Die Untersuchungen zu einer Beteiligung von Glycin am pinealen Stoffwechsel stehen erst am Anfang. Es müssen noch zahlreiche weitere Experimente durchgeführt werden, um genauere Aussagen über die Aufgabe von Glycin im Pinealorgan machen zu können.

Neben den bereits genannten Transmittern scheint auch GABA im Pinealorgan alle Kriterien einer parakrin wirksamen Substanz zu erfüllen: Es kommt in erhöhten Konzentrationen im Pinealorgan verschiedener Spezies vor. Außerdem wurden die wichtigen Enzyme des GABA-Stoffwechsels, die Glutamatdecarboxylase als Syntheseenzym und das für den Abbau zuständige Enzym GABA-Transaminase, im Pinealorgan von Ratte (SCHON *et al.* 1975) und Rind (EBADI und CHAN 1980) nachgewiesen. Sowohl die Aufnahme (YOUNG *et al.* 1973, EBADI und CHAN 1980) als auch die Sekretion von GABA aus Pinealzellen (ROSENSTEIN *et al.* 1989 a, b) konnten demonstriert werden. Ferner gelang die Identifizierung von GABA-Rezeptoren (CHAN und EBADI 1979, EBADI und CHAN 1980, CARDINALI *et al.* 1987) und die Lokalisation von GABA-Transportern auf zellulärer Ebene im Pinealorgan (REDECKER 1999). Die Effekte von GABA im Pinealorgan scheinen der Wirkung von Glutamat und Aspartat

---

ähnlich zu sein. Im Pinealorgan des Rindes (EBADI *et al.* 1984, ROSENSTEIN *et al.* 1989 b) und der Ratte (ROSENSTEIN *et al.* 1989a, 1990 a) wird die durch Noradrenalin stimulierte NAT-Aktivität durch GABA dosisabhängig gehemmt.

Vor diesem Hintergrund wurde in der vorliegenden Arbeit auch die Freisetzung von GABA aus kultivierten Pinealozyten untersucht. Doch die Konzentration von GABA im Kulturmedium lag unterhalb der Nachweisgrenze des eingesetzten Meßverfahrens, so daß hier keine Aussagen über eine vesikuläre Sekretion von GABA im Pinealorgan von Ratte und Gerbil gemacht werden konnte. In Zukunft müssen sensitivere Methoden eingesetzt werden, um zu klären, ob GABA tatsächlich aus Pinealozyten freigesetzt wird. Bisher kann man nicht ausschließen, daß die GABA-Effekte vielleicht auch durch die GABAerge Innervation hervorgerufen werden, die im proximalen Bereich des Pinealorgans zu finden sind (ROSENSTEIN *et al.* 1989 b).

Aufgrund der Tatsache, daß im Pinealorgan verschiedener Tierarten mehrere neuroaktive Aminosäuren nachgewiesen werden konnten, die wahrscheinlich durch vesikelvermittelte, regulierte Exozytosen freigesetzt werden, kann man auf ein sehr komplexes, parakrines Kommunikationssystem schließen. Dieses Kommunikationssystem wird bisher nur in Ansätzen verstanden und könnte nach dem heutigen Wissensstand die hormonellen Funktionen des Pinealorgans regulieren.

## **7. Einfluß der Neurotransmitter Acetylcholin und Noradrenalin auf Vesikelexozytosen**

Wie schon in der Einleitung beschrieben, wandelt das Pinealorgan der *Mammalia* photoperiodische Informationen durch die rhythmische Synthese und Sekretion von Melatonin in ein neuroendokrines Signal um. Um den durch Licht synchronisierten Rhythmus der Melatoninsynthese aufrechtzuerhalten, ist die sympathische Innervierung des Pinealorgans unerlässlich. Dabei wird die noradrenerge Wirkung über unterschiedliche Signaltransduktionswege vermittelt. Die Stimulation des  $\beta$ -Rezeptors erhöht den intrazellulären cAMP-Spiegel, der wiederum für die Aktivierung von NAT, dem Schrittmacherenzym der Melatoninsynthese, verantwortlich ist. Die Stimulation des  $\alpha$ -Rezeptors potenziert den  $\beta$ -adrenergen Effekt durch einen Anstieg des intrazellulären  $\text{Ca}^{++}$ -Spiegels (Übersicht: siehe KLEIN 1985). Die essentielle Rolle des Noradrenalins für die Melatoninsynthese ist demnach gut untersucht und allgemein anerkannt. Im Gegensatz dazu

---

ist bisher unklar, ob auch nichtsympathische Innervationen an der Regulation der Melatoninsynthese und damit an der Funktion des Pinealorgans beteiligt sind. Verschiedene morphologische Untersuchungen weisen auf die Existenz einer parasymphatischen Innervation hin, die vom *Ganglion pterygopalatinum* stammen könnte und vermutlich Acetylcholin als primären Neurotransmitter verwendet (MØLLER *et al.* 1992). Hinweise für eine cholinerge Kommunikation im Pinealorgan wurden durch den immunhistochemischen Nachweis verschiedener Proteine geliefert, die für einen cholinergen Stoffwechsel verantwortlich sind. Zu den detektierten Proteinen gehören Cholinacetyltransferase (Synthaseenzym), Acetylcholinesterase (abbauendes Enzym) sowie muskarinerge und nicotinerge Rezeptoren (GOVITRAPONG *et al.* 1989, LUO *et al.* 1990, PUJITO *et al.* 1991, REUSS *et al.* 1992, LAITINEN *et al.* 1995, DRIJFHOUT *et al.* 1996). Acetylcholin führt im Pinealorgan zu einer Hemmung der Melatoninsynthese. Die Wirkung wird vermutlich über zwei alternative Signalwege vermittelt, nämlich über muskarinerge (DRIJFHOUT *et al.* 1996) und nicotinerge Rezeptoren (REUSS *et al.* 1992). Vor allem der nicotinerge Acetylcholinrezeptor findet seit einiger Zeit besondere Beachtung: Er wurde auf Pinealozyten lokalisiert (REUSS *et al.* 1992) und vermittelt in diesen Zellen wahrscheinlich als unselektiver Kationen-Kanal eine durch Acetylcholin induzierte,  $\text{Na}^+$ -abhängige Depolarisation der Zellmembran. Die Depolarisation aktiviert anschließend spannungsgesteuerte  $\text{Ca}^{++}$ -Kanäle des L-Typs, die für den Anstieg des intrazellulären  $\text{Ca}^{++}$ -Spiegels verantwortlich sind (LETZ *et al.* 1997). Es wird vermutet, daß der Anstieg der  $\text{Ca}^{++}$ -Konzentration in den Pinealozyten Vesikelexozytosen auslösen kann, die letztendlich zur Sekretion von Glutamat führen (LETZ *et al.* 1997, YAMADA *et al.* 1998, SCHOMERUS und KORF 1999). Das freigesetzte Glutamat könnte dann durch Aktivierung metabotroper Glutamatrezeptoren der Klasse II, vermutlich mGluR3, den cAMP-Spiegel in benachbarten Pinealozyten senken, die Aktivität der NAT negativ beeinflussen und die Melatoninsynthese hemmen. Acetylcholin wäre über diese Signalkaskade ein direkter Gegenspieler zum Noradrenalin. Diese Hypothese wurde ausführlich von MORIYAMA *et al.* (2000) beschrieben und in einer Abbildung zusammengefaßt (siehe Einleitung, Seite 14).

Um die Hypothese zu überprüfen, wurden in dieser Studie *in vitro*-Experimente durchgeführt, die zeigen sollten, ob Acetylcholin tatsächlich in der Lage ist, Vesikelexozytosen und eine damit verbundene Freisetzung der gespeicherten neuroaktiven Aminosäuren zu induzieren. Dieses Experiment führte zu unterschiedlichen Ergebnissen in den untersuchten Tierarten. In Pinealzellkulturen des Gerbils zeigte Acetylcholin keine Wirkung auf die Freisetzung von

---

neuroaktiven Aminosäuren. Kultivierte Rattenpinealozyten hingegen reagierten auf Acetylcholin-Gaben mit einer annähernden Verdopplung der extrazellulären Konzentrationen von Glutamat, Aspartat und Glycin. Diese ermittelten Daten waren allerdings nicht statistisch signifikant, da sie einer großen Streuung unterworfen waren. Eine durch Acetylcholin induzierte Freisetzung von Glutamat aus kultivierten Pinealozyten wurde auch von YAMADA *et al.* (1998) gemessen. Anhand von pharmakologischen Untersuchungen demonstrierte die genannte Arbeitsgruppe (YAMADA *et al.* 1998), daß der nicotinische Acetylcholinrezeptor im funktionellen Zusammenspiel mit dem L-Typ-Ca<sup>++</sup>-Kanal die Acetylcholin-induzierte Freisetzung von Glutamat vermittelt. Daß es sich hierbei um eine vesikelvermittelte Freisetzung handelt, wurde durch Zugabe des Botulinum-Neurotoxins E zur Zellkultur nachgewiesen. Die Behandlung der kultivierten Rattenpinealozyten mit dem Neurotoxin, das nachweislich Vesikelexozytosen unterbindet, führte zu einer Hemmung der Acetylcholin-induzierten Glutamatsekretion. Außerdem konnten sie zeigen, daß sowohl Acetylcholin als auch der Rezeptoragonist Nicotin die NAT-Aktivität und die Melatoninsynthese teilweise hemmen können und daß an diesem Prozeß metabotrope Klasse II-Glutamatrezeptoren beteiligt sind (YAMADA *et al.* 1998). Alle diese Ergebnisse bekräftigten die Hypothese von MORIYAMA *et al.* (2000). Doch es stellt sich die Frage, wie relevant dieser Regulationsmechanismus tatsächlich für die Hemmung der Melatoninsynthese ist. Einige Ergebnisse der vorliegenden Arbeit lassen vermuten, daß die Acetylcholin-induzierte Freisetzung neuroaktiver Aminosäuren nur eine untergeordnete Rolle in der Regulation der Melatoninproduktion spielt:

1. Die Hypothese von MORIYAMA *et al.* (2000) scheint nicht auf alle Tierarten übertragbar zu sein. Acetylcholin-induzierte Vesikelexozytosen konnten bisher nur an Pinealozyten der Ratte nachgewiesen werden. In Pinealzellkulturen des Gerbils zeigte Acetylcholin keine Wirkung auf die Freisetzung von Glutamat, Aspartat oder Glycin.
2. Eine wesentliche Grundlage für die Hypothese war die von YAMADA *et al.* (1998) gemessene, um ein Vielfaches erhöhte, extrazelluläre Glutamatkonzentration durch Stimulation mit Acetylcholin im Vergleich zu den Kontrollwerten. In der vorliegenden Arbeit konnte jedoch nur eine moderate Freisetzung von neuroaktiven Aminosäuren durch Acetylcholin-Gaben induziert werden, die deutlich unter der durch KCl-stimulierten Freisetzung lag. Die unterschiedlichen Befunde kommen dadurch zustande, daß in den Untersuchungen von unterschiedlichen Kontrollwerten ausgegangen wurde. In der vorliegenden Arbeit wurden sowohl die basalen Exozytosevorgänge als auch die

---

Acetylcholin induzierten Exozytosen unter physiologischen Bedingungen bei 37°C und im Ca<sup>++</sup>-haltigem Medium bestimmt. Die Wissenschaftler der japanischen Arbeitsgruppe (YAMADA *et al.* 1998) hingegen ermittelten die Kontrollwerte unter unphysiologischen Bedingungen bei 28°C und Ca<sup>++</sup>-freiem Medium, um spontan auftretende basale Exozytosevorgänge weitgehend auszuschließen. Die Stimulation mit Acetylcholin dagegen erfolgte in Ca<sup>++</sup>-haltigem Medium. Durch diese Vorgehensweise kamen die deutlichen Effekte von Acetylcholin zustande, die in der vorliegenden Arbeit nicht bestätigt werden konnten.

3. Noradrenalin erzielte in kultivierten Pinealozyten (Ratte) annähernd die gleiche Wirkung wie Acetylcholin und konnte ebenfalls in geringem Ausmaß Aminosäurefreisetzungen induzieren. Über die Mechanismen, die zu dieser noradrenergen Stimulation der Vesikelexozytosen führten, kann man zur Zeit nur Vermutungen anstellen. Es wäre denkbar, daß eine durch  $\alpha$ -adrenerge Rezeptoren vermittelte Ca<sup>++</sup>-Erhöhung in den Pinealozyten (SCHOMERUS *et al.* 1995, MARIN *et al.* 1996) Vesikelexozytosen in geringem Umfang auslösen kann.

Da Acetylcholin und Noradrenalin anscheinend die gleiche Wirkung auf Vesikelexozytosen haben, erscheint es unwahrscheinlich, daß sie in diesem Prozeß als Gegenspieler auftreten.

4. Zudem wurden auch die Mengen an nicht vesikulär gespeicherten Aminosäuren durch Acetylcholin und Noradrenalin leicht erhöht. Dieser Befund deutet darauf hin, daß die Neurotransmitter nicht nur Vesikelexozytosen stimulieren, sondern auch über andere Mechanismen eine Freisetzung von Aminosäuren hervorrufen können.

Die hier gewonnenen Befunde zeigen, daß Acetylcholin zwar in der Lage ist, eine Freisetzung neuroaktiver Aminosäuren zu induzieren, aber nur in geringem Umfang. Der parasympathische Neurotransmitter scheint folglich nur eine untergeordnete Rolle in der Regulation der Vesikelexozytosen zu spielen. Damit ist gleichzeitig die Hypothese (MORIYAMA *et al.* 2000) in Frage gestellt, die besagt, daß der nicotinische Acetylcholinrezeptor, der im funktionellen Zusammenspiel mit dem L-Typ-Ca<sup>++</sup>-Kanal die Acetylcholin-induzierte Freisetzung von Glutamat vermittelt soll, maßgeblich an der Regulation der Melatoninsynthese beteiligt ist. Auch DRIJFHOUT *et al.* (1996) konnten in Mikrodialyse-Experimenten demonstrieren, daß der nicotinerge Rezeptoragonist Nicotin nur eine geringe Wirkung hatte, während die muskarinergen Rezeptoragonisten Carbachol und Oxotremorin im Rattenpinealorgan zu einer deutlichen Reduktion der Melatoninfreisetzung

---

während der Nachtperiode führten. Muskarinerge Rezeptoren wurden im Pinealorgan vor allem auf präsynaptischen, sympathischen Nervenfasern lokalisiert. Dort hemmen sie die Freisetzung von Noradrenalin und führen über diesen Signalweg zu einer verringerten NAT-Aktivität und Melatoninsynthese (DRIJFHOUT *et al.* 1996).

Die parasymphatische Innervation des Pinealorgans könnte also in der Tat an der Regulation der Melatoninsynthese beteiligt sein und damit die Funktion des Pinealorgans beeinflussen. Nach dem heutigen Wissensstand werden die cholinergen Effekte im Pinealorgan aber vermutlich überwiegend von muskarinergen Rezeptoren vermittelt. Die Bedeutung der nicotinergen Rezeptoren für die Funktion des Pinealorgans muß noch geklärt werden.

Da Acetylcholin als Hauptregulator von Vesikelexozytosen in Pinealozyten unter diesen Voraussetzungen in Frage gestellt werden kann, muß in weiteren Untersuchungen nach Substanzen gesucht werden, die einen Einfluß auf die Exozytosevorgänge in Pinealozyten haben könnten.

## **8. Einfluß von Neuropeptiden auf Vesikelexozytosen**

Es mehren sich die Hinweise, daß weitere Nervenfasern nichtsympathischen Ursprungs an der funktionellen Kontrolle des Pinealorgans beteiligt sind. Ein möglicher Kandidat stellt die peptiderge Innervation dar, die relativ häufig im Pinealorgan zahlreicher Säugetierarten vorkommt und verschiedenartige Neuropeptide (z.B. NPY, PACAP, VIP, CGRP, Substance P und Somatostatin) als Botenstoffe enthält (SHIOTANI *et al.* 1986, PÉVET 1994, SIMONNEAUX 1995, MØLLER *et al.* 1996). Einige dieser Neuropeptide scheinen die Melatoninsynthese modulieren zu können.

In der vorliegenden Arbeit stellte sich die Frage, ob die Modulation der Melatoninsynthese möglicherweise über die vesikelvermittelte Freisetzung von Glutamat und anderen neuroaktiven Aminosäuren erfolgt. Um erste Hinweise zu erlangen, wurde in dieser Arbeit eine Vorstudie an kultivierten Rattenpinealozyten durchgeführt. Dieses Experiment umfaßte zwei unabhängige Versuche, in denen die dosisabhängige Wirkung der sechs genannten Neuropeptide auf die vesikelvermittelte Freisetzung von Glutamat, Aspartat und Glycin getestet wurde.

Die Ergebnisse dieser Vorstudie waren nicht immer eindeutig, aber in vielen Fällen konnten Tendenzen ausgewiesen werden. Die Neuropeptide CGRP, Substanz P und Somatostatin



---

zeigten z.B. keine oder keine eindeutige Wirkung. Für diese Neuropeptide sind bisher auch keine Effekte im Pinealorgan bekannt (SIMONNEAUX *et al.* 1996).

Anders gestaltet sich die Situation bei NPY. Es ist das häufigste Neuropeptid im Pinealorgan und man nimmt an, daß es aufgrund seiner Kolokalisation mit Noradrenalin in den sympathischen Fasern eine wichtige Rolle in der Funktion des Pinealorgans spielt. Die Wirkung von NPY wird auf präsynaptischer Seite (sympathische Nervenendigungen) durch den Y2-Rezeptor vermittelt, der die K<sup>+</sup>-abhängige Freisetzung von Noradrenalin hemmt (SIMONNEAUX *et al.* 1994). Auf postsynaptischer Seite (Pinealozyten) bewirkt NPY über Y1-Rezeptoren eine Erhöhung des cAMP-Spiegels (SIMONNEAUX *et al.* 1994, MIKKELSEN *et al.* 1999). Außerdem kann NPY auch den intrazellulären Ca<sup>++</sup>-Spiegel von Pinealozyten in Abhängigkeit zur extrazellulären Ca<sup>++</sup>-Konzentrationen steigern (SIMONNEAUX *et al.* 1999). Doch diese Änderungen des Ca<sup>++</sup>-Spiegels scheinen nicht in der Lage zu sein, Vesikelexozytosen zu induzieren; NPY hat keinen Einfluß auf Vesikelexozytosen im Pinealorgan der Ratte.

PACAP-38 und VIP bewirkten überraschend eine Erhöhung der extrazellulären Konzentrationen an Glutamat, Aspartat und Glycin. Die Mengen an nicht vesikulär gespeicherten Aminosäuren im Zellüberstand blieben hingegen unverändert, so daß man davon ausgehen kann, daß diese pinealen Neuropeptide sehr wahrscheinlich Vesikelexozytosen auslösen können. Diese ersten Befunde wurden jedoch in einer nichtrepräsentativen Vorstudie gewonnen und konnten aufgrund der geringen Zahl an unabhängigen Versuchen nicht statistisch ausgewertet werden. Deshalb müssen sich jetzt umfangreichen Untersuchungen anschließen, mit denen die hier beschriebenen Ergebnisse überprüft werden können.

Eine durch die Neuropeptide PACAP und VIP induzierte Freisetzung von Neurotransmittern bzw. Hormonen konnte auch in anderen endokrinen Geweben sowie im Nervensystem beobachtet werden. So stimuliert PACAP z.B. im endokrinen Pankreas die Sekretion von Insulin und Glukagon (FILIPSSON *et al.* 1997, YADA *et al.* 1997) und im Nebennierenmark die Freisetzung von Katecholaminen (GENG *et al.* 1997). VIP induziert ebenfalls zahlreiche Sekretionsprozesse; dazu zählen die Androgenfreisetzung aus adrenergen, chromaffinen Zellen (BORNSTEIN *et al.* 1993), die Sekretion des Parathyroidhormons (JOBORN *et al.* 1991), die Sekretion von Cortisol und Aldosterol aus der Nebennierenrinde (EHRHART-BORNSTEIN *et al.* 1991) sowie die Freisetzung von Prolactin, Wachstumshormon, ACTH und Vasopressin im Hypothalamus und in der Hypophyse (LAM 1991). Die Wirkung der Neuropeptide wird in

---

den genannten Geweben durch zwei Arten von Rezeptoren vermittelt: Typ I-Rezeptoren haben eine hohe Affinität für PACAP und eine geringe Affinität für VIP, Typ-II-Rezeptoren zeigen gleiche Affinitäten für beide Neuropeptide (GONZALEZ *et al.* 1997).

Der durch PACAP induzierte Signalweg ist ebenfalls in den letzten Jahren gut untersucht worden. Danach aktiviert PACAP eine G-Protein-gesteuerte Adenylatzyklase, die über den *second messenger* cAMP Proteinkinasen (PKA und/oder PKC) stimuliert. Die Proteinkinasen ihrerseits sind wiederum in der Lage, den Einstrom von  $\text{Ca}^{++}$ -Ionen durch Phosphorylierung von L-Typ- $\text{Ca}^{++}$ -Kanälen zu erhöhen (GENG *et al.* 1997, SHIODA *et al.* 1997, TANAKA *et al.* 1997, YADA *et al.* 1997). VIP scheint seine Wirkung gleichermaßen über den *second messenger* cAMP zu vermitteln (GKONAS *et al.* 1996, JOBORN *et al.* 1991).

Ähnliche Signaltransduktionskaskaden könnten auch im Pinealorgan durch VIP und PACAP in Gang gesetzt werden. Erste Hinweise darauf wurden bereits in der Literatur beschrieben:

- VIP und PACAP kommen in moderaten Mengen im Pinealorgan vor. Für PACAP-38 z.B., das den überwiegenden Teil des PACAP-Gehalts im Pinealorgan ausmacht, wurden Konzentrationen von ca. 20 pmol/g Gewebe gemessen (MØLLER *et al.* 1999).
- Die drei bekannten VIP/PACAP-Rezeptoren werden im Pinealorgan exprimiert. Der VIP1/PACAP-Rezeptor, der zum Typ II-Rezeptortyp gezählt wird und gleiche Affinitäten für VIP und PACAP aufweist, stellt den häufigsten Rezeptortypus im Pinealorgan dar (CHRISTOPHE 1993, SIMONNEAUX *et al.* 1998).
- PACAP und VIP stimulieren die Melatoninsynthese (SIMONNEAUX *et al.* 1990, MØLLER und MIKKELSEN 1992, SIMONNEAUX *et al.* 1993, MØLLER 1994). An diesem Prozeß scheinen cAMP, Proteinkinase C und der L-Typ- $\text{Ca}^{++}$ -Kanal beteiligt zu sein (CHIK und HO 1995).

In weiterführenden Untersuchungen muß geklärt werden, ob die genannten VIP/PACAP-Rezeptoren und Signaltransduktionsketten an der Induktion von Vesikelexozytosen in Pinealozyten beteiligt sind oder ob andere, bisher unbekannte Mechanismen die Neuropeptid-induzierten Exozytosevorgänge steuern.

In dem hier beschriebenen Experiment konnte erstmals gezeigt werden, daß VIP und PACAP die Freisetzung von neuroaktiven Aminosäuren stimulieren. Seit langem ist bekannt, daß diese Aminosäuren, insbesondere Glutamat, eine inhibitorische Wirkung auf die Melatoninsynthese haben. Allerdings ist ebenfalls bekannt, daß VIP und PACAP die Melatoninsynthese stimulieren. Diese Diskrepanz in der Wirkung der Neuropeptide kann zur Zeit noch nicht erklärt werden und bedarf ebenfalls weiterer Untersuchungen.

---

Zusammenfassend kann man feststellen, daß an der komplexen Feinregulierung der Melatoninsynthese nicht nur die sympathische Innervation des Pinealorgans eine Rolle spielt, sondern zusätzlich auch bestimmte Neuropeptide beteiligt sein können.

## 9. Ausblick

Die Hauptaufgabe des Pinealorgans ist die tagesperiodische Synthese und Sekretion von Melatonin, um zeitabhängige physiologische Prozesse im Körper zu synchronisieren. Noradrenalin stellt bei diesem biochemischen Vorgang den wichtigsten Regulator dar, der in Abhängigkeit vom Licht die Melatoninsynthese aktiviert. Seit langem wird postuliert, daß es auch negative Regulatoren geben muß. In den letzten Jahren hat man zunehmend Hinweise gewonnen, die vermuten lassen, daß die synaptoiden Mikrovesikel in den Pinealozyten durch Freisetzung von Botenstoffen an der Regulation der Melatoninsynthese beteiligt sein könnten. In der vorliegenden Arbeit konnte durch den immunhistochemischen Nachweis von drei wichtigen regulatorischen Proteinen des neuronalen synaptischen Exozytoseprozesses (Munc 18, CSP und SV2A) gezeigt werden, daß die synaptoiden Mikrovesikel der Pinealozyten zweier *Rodentia*arten (Gerbil und Ratte) die molekularen Voraussetzungen besitzen, um regulierte Exo-/Endozytosezyklen durchlaufen zu können. Die für die Exozytosevorgänge notwendigen Proteine werden schon frühzeitig in der Ontogenese exprimiert. Zum Zeitpunkt der erstmaligen rhythmischen Hormonsynthese im Pinealorgan sind die sekretorischen Vesikel vollständig ausgebildet und vermutlich zur Freisetzung von Botenstoffen fähig. Anhand eines durchgeführten, auf spezifischen Antikörpern basierenden *Assays* konnten die Exozytosen der synaptoiden Vesikel in dieser Arbeit erstmals mikroskopisch direkt dargestellt werden. Die Regulation der vesikulären Aminosäurefreisetzung ist bisher noch nicht geklärt, aber es gibt erste Hinweise, daß die Neuropeptide VIP und PACAP daran beteiligt sind. Weiterhin wurde demonstriert, daß die neuroaktiven Aminosäuren Glutamat, Aspartat und Glycin aus Pinealozyten nach Depolarisation freigesetzt werden. Glutamat gilt seit längerem als ein effektiver, negativer Regulator der Melatoninsynthese. Durch den Nachweis von metabotropen Glutamatrezeptoren und  $-$ transportern konnte in dieser Arbeit ein Beitrag zum Verständnis des glutamatergen Signaltransduktionsweges im Pinealorgan geleistet werden. Zur vollständigen Aufklärung der funktionellen Bedeutung synaptoider Vesikel für die

---

Regulationsprozesse der Melatoninsynthese müssen aber noch zahlreiche Fragen beantwortet werden.

1. Welche der im Pinealorgan vorkommenden Substanzen sind zusätzlich zu den Neuropeptiden VIP und PACAP in der Lage, Vesikelexozytosen auszulösen?
2. Sind die freigesetzten neuroaktiven Aminosäuren Glutamat, Aspartat oder Glycin auch in anderen Tierarten als der Ratte an der Regulation der Melatoninsynthese beteiligt?
3. Über welche Signaltransduktionswege können die neuroaktiven Aminosäuren Einfluß auf die Melatoninsynthese nehmen? Welche Rezeptorsubtypen sind beteiligt?
4. In welchem Ausmaß sind interstitielle Zellen an den Signalwegen beteiligt?

Diese Fragestellungen sollten in nachfolgenden Untersuchungen geklärt werden, da sie zum Verständnis der komplexen Regulationsmechanismen im Pinealorgan nötig sind.



---

## VI. Zusammenfassung

Viele endokrine Zellen, so auch die hormonbildenden Zellen des Pinealorgans, enthalten kleine elektronenhelle Vesikel. Diese zeigen hinsichtlich ihrer Morphologie und ihres molekularen Aufbaus Ähnlichkeiten mit den synaptischen Vesikeln in Nervenzellen. Untersuchungen der vergangenen Jahre führten zu der Hypothese, daß diese „synaptoiden“ Mikrovesikel eine neue Klasse sekretorischer Organellen in endokrinen Zellen darstellen. Für das Pinealorgan könnte das bedeuten, daß diese Mikrovesikel möglicherweise neuroaktive Aminosäuren wie z.B. Glutamat als Botensubstanzen speichern und sezernieren und dadurch Einfluß auf die Melatoninsynthese nehmen.

Diese Hypothese konnte in der vorliegenden Arbeit dadurch untermauert werden, daß in Pinealozyten weitere, bisher in diesen Zellen nicht nachgewiesene Proteine lokalisiert wurden, die in Nervenzellen an der Zielsteuerung und Kontrolle der Exozytose synaptischer Vesikel beteiligt sind (Munc 18-1, CSP und SV2A). Außerdem bekräftigen die Befunde zur Expression und zellulären Lokalisation verschiedener Glutamatrezeptoren (mGluR2/3 und mGluR5) und –transmitter (GLT-1, GLAST und EAAC1) im Pinealorgan sowie die Ergebnisse zur Ontogenese der Mikrovesikel und ihrer regulatorischen Proteine nachdrücklich das Konzept einer sekretorischen Funktion der endokrinen Mikrovesikel und einer parakrinen Wirkung ihrer mutmaßlichen Transmitter.

Weiterhin wurden in Pinealzellkulturen Vesikelexozytosen durch depolarisierende Stimuli ausgelöst und anschließend die Art und Menge der freigesetzten Transmitter bestimmt. Daraus ergab sich, daß neben den bekannten exzitatorischen Aminosäure-Transmittern Glutamat und Aspartat offenbar auch der inhibitorisch wirksame Transmitter Glycin aus synaptoiden Mikrovesikeln freigesetzt wird.

Im Zusammenhang mit bisher ungeklärten Fragen zur Regulation der Mikrovesikelexozytose in Pinealozyten wurden weitere *in vitro*-Experimente durchgeführt. In diesen Experimenten wurde der Einfluß verschiedener, im Pinealorgan vorkommender Neurotransmitter und –peptide auf die Freisetzung neuroaktiver Aminosäuren aus den synaptoiden Vesikeln untersucht. Die aktuelle Hypothese, daß Acetylcholin im Pinealorgan als direkter Gegenspieler zu Noradrenalin wirkt, in dem es die Glutamatfreisetzung induziert, konnte durch die hier gewonnenen Ergebnisse nur bedingt bestätigt werden. Allerdings gibt es erste Hinweise, daß die Neuropeptide VIP und PACAP einen modulatorischen Einfluß auf Vesikelexozytosen ausüben.

---

Schließlich konnten in dieser Arbeit mit Hilfe eines speziellen Antikörper-Assays erstmals Vesikelexozytosen auf Einzelzellebene direkt mikroskopisch in Pinealozyten nachgewiesen werden.

---

## VII. Literaturverzeichnis

ABE T, SUGIHARA H, NAWA H, SHIGEMOTO R, MIZUNO N & NAKANISHI S (1992) Molecular characterization of a novel metabotropic glutamate receptor mGluR5 coupled to inositol phosphate/Ca<sup>++</sup> signal transduction. *J. Biol Chem* 267 (19): 13361-13368

AHNERT-HILGER G & WIEDENMANN B (1992) The ampicrine pancreatic cell line, AR42J, secretes GABA and amylase by separate regulated pathways. *FEBS* 314 (1): 41-44

ANNAERT WG, LLONA L, BACKER AC, JACOB WA & DE POTTER WP (1993) Catecholamines are present in a synaptic-like microvesicle-enriched fraction from bovine adrenal medulla. *J. Neurochem.* 60: 1746-1754

ARSTILA AU (1967) Electron microscopic studies on the structure and histochemistry of the pineal gland of the rat. *Neuroendocrinology Suppl.* 2: 1-101

AXELROD J & WEISSBACH H (1960) Enzymatic O-methylation of N-acetyl-serotonin to melatonin. *Science* 131: 1312

BAJJALIEH SM, PETERSON K, LINIAL M & SCHELLER RH (1993) Brain contains two forms of synaptic vesicle protein 2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90 (6): 2150-2154

BAJJALIEH SM, PETERSON K, SHINGHAL R & SCHELLER RH (1992) SV2, a brain synaptic vesicle protein homologous to bacterial transporters. *Science* 257 (5074): 1271-1273

BAJJALIEH SM, FRANTZ GD, WEIMANN JM, MCCONNEL SK, SCHELLER RH (1994) Differential expression of synaptic vesicle protein 2 (SV2) isoforms. *J. Neurosci.* 14 (9): 5223-5235

BARGMANN W (1943) Die Epiphysis cerebri. in: von Möllendorff W (ed.) *Handbuch der mikroskopischen Anatomie des Menschen*, Bd. VI, 4: 309-502, Springer, Berlin

BARK IC, HAHN KM, RYABININ AE & WILSON MC (1995) Differential expression of SNAP-25 protein isoforms during divergent vesicle fusion events of neural development. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92 (5): 1510-1514

BAUERFEIND R, REGNIER-VIGOUROUX A, FLATMARK T & HUTTNER WB (1993) Selective storage of acetylcholine, but not catecholamines, in neuroendocrine synaptic-like microvesicles of early endosomal origin. *Neuron* 11: 105-121

BENNETT MK & SCHELLER RHA (1994) A molecular description of synaptic vesicle membrane trafficking. *Ann. Rev. Biochem.* 63: 63-100

BERGER UV & HEDIGER MA (2000) Distribution of the glutamate transporters GLAST and GLT-1 in rat circumventricular organs, meninges, and dorsal root ganglia. *J. Comp. Neurol.* 421: 385-399



- 
- BERGMANN M, GRABS D & RAGER G (1999) Developmental expression of dynamin in the chick retinotectal system. *J. Histochem. Cytochem.* 47 (10): 1297-1306
- BERGMANN M, LAHR G, MAYERHOFER A & GRATZL M (1991) Expression of synaptophysin during the prenatal development of the rat spinal cord: correlation with basic differentiation processes of neurons. *Neuroscience* 42 (2): 569-582
- BERNARD M, KLEIN DC & ZATZ M (1997) Chick pineal clock regulates serotonin N-acetyltransferase mRNA rhythm in culture. *Pro. Natl. Acad. Sci. USA* 94 (1): 304-309
- BETZ WJ & WU LG (1995) Kinetics of synaptic-vesicle recycling. *Curr. Biol.* 5 (10): 1098-1101
- BOECKMANN D (1980) Morphological investigation of the deep pineal of the rat. *Cell Tissue Res.* 210: 283-294
- BORNSTEIN SR, EHRHART-BORNSTEIN M, STROMEYER HG, ADLER G, SCHERBAUM WA & HOLST JJ (1993) Vasoactive intestinal peptide (VIP) stimulates androstenedione release in isolated perfused pig adrenals. *Life Science* 52 (2): 135-140
- BRAUN JEA & SCHELLER RH (1995) Cysteine string protein, a DnaJ family member, is present on diverse secretory vesicles. *Neuropharm.* 34 (11): 1361-1369
- BRAUN JEA, WILBANKS SM & SCHELLER RH (1996) The cysteine string secretory vesicle protein activates Hsc70 ATPase. *J. Biol. Chem.* 271 (42): 25989-25993
- BUCHNER E & GUNDERSEN CB (1997) The DnaJ-like cysteine string protein and exocytotic neurotransmitter release. *Trends Neurosci.* 20: 223-227
- BUCKLEY K & KELLY RB (1985) Identification of a transmembrane glycoprotein specific for secretory vesicles of neural and endocrine cells. *J. Cell Biol.* 100: 1284-1294
- CALVO J & BOYA J (1981) Embryonic development of the rat pineal gland. *Anat. Rec.* 200: 491-500
- CARDINALI DP, VACAS MI, ROSENSTEIN RE, ETCHOGOYEN GS, SARMIENTO MI, SOLVEYRA CG & PEREYRA EN (1987) Multifactorial control of pineal melatonin synthesis: an analysis through binding studies. *Adv. Pineal Res.* 2: 51-66
- CHAMBERLAIN LH & BURGOYNE RD (1997 a) Activation of the ATPase activity of heat-shock proteins Hsc70/Hsp70 by cysteine string protein. *Biochem. J.* 322 (Pt 3): 853-858
- CHAMBERLAIN LH & BURGOYNE RD (1997 b) The molecular chaperone function of the secretory vesicle cysteine string proteins. *J. Biol. Chem.* 272 (50): 31420-31426
- CHAMBERLAIN LH & BURGOYNE RD (1998) Cysteine string protein functions directly in regulated exocytosis. *Mol. Biol. Cell* 9 (8): 2259-2267
- CHAMBERLAIN LH & BURGOYNE RD (2000) Cysteine-string protein: the chaperone at the synapse. *J. Neurochem.* 74 (5): 1781-1789

---

CHAMBERLAIN LH, HENRY J & BURGOYNE RD (1996) Cysteine string proteins are associated with chromaffin granules. *J. Biol. Chem.* 271 (32): 19514-19517

CHAUDHRY FA, LEHRE KP, VAN LOOKEREN M, CAMPAGNE M, OTTERSEN OP, DANBOLT NC & STORM-MATHISEN J (1995) Glutamate transporters in glial plasma membranes: Highly differentiated localizations revealed by quantitative ultrastructural immunocytochemistry. *Neuron* 15: 711-720

CHIK CL & HO AK (1995) Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide: control of rat pineal cyclic AMP and melatonin but not cyclic GMP. *J. Neurochem.* 64 (5): 2111-2117

CHRISTOPHE J (1993) Type I receptors for PACAP (a neuropeptide even more important than VIP?). *Biochimica et Biophysica Acta* 1154 (2): 183-199

CONFALONI A, LYCKMAN AW & MOYA KL (1997) Developmental shift of synaptic vesicle protein 2 from axons to terminals in the primary visual projection of the hamster. *Neurosci.* 77 (4): 1225-1236

COTO-MONTES A, MASSON-PÉVET M, PÉVET P & MØLLER M (1994) The presence of opioidergic pinealocytes in the pineal gland of the European hamster (*Cricetus cricetus*). An immunocytochemical study. *Cell Tiss. Res.* 278: 483-491

CROWDER KM, GUNTHER JM, JONES TA, HALE BD, ZHANG HZ, PETERSON MR, SCHELLER RH, CHAVKIN C & BAJALIEH SM (1999) Abnormal neurotransmission in mice lacking synaptic vesicle protein 2 A (SV2A)

DE CAMILLI P, HARRIS SM, HUTTNER WB & GREENGARD P (1983) Synapsin I (protein I), a nerve terminal-specific phosphoprotein. II Its specific association with synaptic vesicles demonstrated by immunocytochemistry in agarose-embedded synaptosomes. *J. Cell Biol.* 96: 1355-1373

DE ROBERTIS E & PELLEGRINO DE IRALDI A (1961) Plurivesicular secretory processes and nerve endings in the pineal gland of the rat. *J. Biophys. Biochem. Cyt.* 10: 361-372

DRIJFHOUT WJ, GROL CJ & WESTERING BH (1996) Parasympathetic inhibition of pineal indole metabolism by prejunctional modulation of noradrenaline release. *Eur. J. Pharm.* 308 (2): 117-124

EBADI M & CHAN A (1980) Characteristics of GABA binding sites in bovine pineal gland. *Brain Res. Bull.* 5 (Suppl. 2): 175-187

EBADI M, CHAN A, ATOH M, HAMMAD H, SWANSON S & GOVITRAPONG P (1984) The role of  $\gamma$ -aminobutyric acid in regulation of melatonin synthesis in bovine pineal gland. In: HANIN I (ed.) *Dynamics of neurotransmitter function*: 177-187, Raven Press, New York

EBADI M, GOVITRAPONG P & MURRIN LC (1986) The presence and function of glutamate receptors in the pineal gland. In: *Advances in Pineal Research*, REITER RJ & KARASEK M (eds.) 99-109, Libbey, New York

- 
- EHRHART-BORNSTEIN M, BORNSTEIN SR, SCHERBAUM WA, PFEIFFER EF & HOLST JJ (1991) Role of the vasoactive intestinal peptide in a neuroendocrine regulation of the adrenal cortex. *Neuroendocrinology* 54 (6): 623-628
- EKBLUM P (1996) Receptors for laminins during epithelial morphogenesis. *Curr. Opin. Cell Biol.* 8: 700-706
- FEANY MB, LEE S, EDWARDS RH & BUCKLEY KM (1992) The synaptic vesicle protein 2 is a novel type of transmembrane transporter. *Cell* 70: 861-867
- FERRO-NOVICK S & JAHN R (1994) Vesicle fusion from yeast to man. *Nature* 370: 191-193
- FESCE R, GROHOVAZ F, VALTORTA F & MELDOLESI J (1994) Neurotransmitter release: fusion or „kiss and run“? *Trends Cell Biol.* 4: 1-4
- FILIPSSON K, TORNØE K, HOLST J & AHRÉN B (1997) Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide stimulates insulin and glucagon secretion in humans. *J. Clin. Endocrin. Metabol.* 82 (9): 3093-3098
- FRICTSCHY JM, WEINMANN O, WENZEL A & BENKE D (1998) Synapse-specific localization of NMDA and GABA<sub>A</sub> receptor subunits revealed by antigen-retrieval immunohistochemistry. *J. Comp. Neurol.* 390: 194-210
- FUJIEDA H, SATO T, SHI J & WAKE K (1997) Remodeling of pineal epithelium in the fetal rat as delineated by immunohistochemistry of laminin and cadherin. *Cell Tissue Res.* 287: 263-274
- FUKUHARA C, INOUE SI, MATSUMOTO Y, TSUJIMOTO G, AOKI K & MASUO Y (1998) Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide rhythm in the rat pineal gland. *Neurosci. Lett.* 241 (2-3): 115-118
- GANETZKY B (1994) Cysteine strings, calcium channels and synaptic transmission. *Bioessays* 16 (7): 461-463
- GARCIA EP, GATTI E, BUTLER M, BURTON J & DE CAMILLI P (1994) A rat brain sec1 homologue related to ROP and UNC18 interacts with syntaxin. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 91: 2003-2007
- GARCIA EP, MCPHERSON PS, CHILCOTE TJ, TAKEI K & DE CAMILLI P (1995) rbSec1A and B colocalize with syntaxin 1 and SNAP-25 throughout the axon, but are not in a stable complex with syntaxin. *J. Cell Biol.* 129: 105-120
- GASKINS HR, BALDEÓN ME, SELASSIE L & BEVERLY JL (1995) Glucose modulates  $\gamma$ -aminobutyric acid release from the pancreatic  $\beta$ TC6 cell line. *J. Biol. Chem.* 270: 30286-30289
- GEGELASHVILI G & SCHOUSBOE A (1998) Cellular distribution and kinetic properties of high-affinity glutamate transporters. *Brain Res. Bull.* 45 (3) 233-238

- 
- GENG G, GASPO R, TRABELSI F & YAMAGUCHI N (1997) Role of L-type  $\text{Ca}^{++}$ -channel in PACAP-induced adrenal catecholamine release in vivo. *Am. J. Physiol.* 273: R1339-R1345
- GEPPERT M, BOLSHAKOV V, SIEGELBAUM SA, TAKEI K, DE CAMILLI P, HAMMER RE & SÜDHOF TC (1994) The role of Rab3a in neurotransmitter release. *Letters to Nature* 368: 493-497
- GEREAU R, WINDER DG & CONN PJ (1995) Pharmacological differentiation of the effects of coactivation of  $\beta$ -adrenergic and metabotropic glutamate receptors in rat hippocampus. *Neurosci. Lett.* 186: 119-122
- GKONOS PJ, ASHBY MH & ANDRADE AA (1996) Vasoactive intestinal peptide stimulates prostate-specific antigen secretion by LNCaP prostate cancer cells. *Regulatory Peptides* 65 (2): 153-157
- GONZALEZ BJ, BASILLE M, VAUDRY D, FOURNIER A & VAUDRY H (1997) Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide promotes cell survival and neurite outgrowth in rat cerebellar neuroblasts. *Neurosci.* 78 (2): 419-430
- GOVITRAPONG P & EBADI M (1988) The inhibition of pineal arylalkylamine N-acetyltransferase by glutamic acid and its analogues. *Neurochem. Int.* 13 (2), 223-230
- GOVITRAPONG P, EBADI M & MURRIN LC (1986) Identification of a  $\text{Cl}^-/\text{Ca}^{++}$ -dependent glutamate (quisqualate) binding site in bovine pineal organ. *J. Pineal Res.* 3: 223-234
- GOVITRAPONG P, PHANSUWAN-PUJITO P & EBADI M (1989) Studies on the properties of muscarinic cholinergic receptor sites in bovine pineal gland. *Comp. Biochem. Physiol. Comp. Pharmacol.Toxicol.* 94 (1): 159-164
- GRABS D, BERGMANN M, SCHUSTER T, FOX PA, BRICH M & GRATZ M (1994) Differential expression of synaptophysin and synaptoporin during pre- and postnatal development of the rat hippocampal network. *Eur. J. Neurosci.* 6 (11): 1765-1771
- GRAHAM ME, SULOW AW & BURGOYNE RD (1997) Evidence against an acute inhibitory role of nSec-1 (Munc-18) in late steps of regulated exocytosis in chromaffin and PC12 cells. *J. Neurochem.* 69: 2369-2377
- GRUBE D & KUSUMOTO Y (1986) Serial semithin sections in immunohistochemistry: techniques and applications. *Arch. Histol. Jpn* 49: 391-410
- GUNDERSEN CB & UMBACH JA (1992) Suppression cloning of the cDNA for a candidate subunit of a presynaptic calcium channel. *Neuron* 9: 527-537
- GUNDERSEN CB, MASTROGIACOMO A & UMBACH JA (1995) Cysteine-string proteins as templates for membrane fusion: models of synaptic vesicle exocytosis. *J. Theoretical Biology* 172 (3): 269-277
- HALACHMI N & LEV Z (1996) The sec1 family: a novel family of proteins involved in a synaptic transmission and general secretion. *J. Neurochem.* 66: 889-97

- 
- HANSSON E & RÖNNBÄCK L (1995) Astrocytes in glutamate neurotransmission. *FASEB J.* 9: 343-350
- HARADA T, HARADA C, WANTANBE M, INOUE Y, SAKAGAWA T, NAKAYAMA N, SASAKI S, OKUYAMA S, WATASE K, WADA K & TANAKA K (1998) Functions of the two glutamate transporters GLAST and GLT-1 in the retina. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95 (8): 4663-4666
- HATA Y & SÜDHOF TC (1995) A novel ubiquitous form of Munc 18 interacts with multiple syntaxins. *J. Biol. Chem.* 270 (22): 13022-13028
- HATA Y, SLAUGHTER CA & SÜDHOF TC (1993) Synaptic vesicle fusion complex contains Munc 18 homologue bound to syntaxin. *Nature* 366: 347-351
- HAYASHI M, YAMAMOTO A, YATSUSHIRO S, YAMADA H, FUTAI M, YAMAGUCHI A & MORIYAMA Y (1998) Synaptic vesicle protein SV2B, but not SV2A, is predominantly expressed and associated with microvesicles in rat pinealocytes. *J. Neurochem.* 71 (1): 356-365
- HODEL A, SCHÄFER T, GEROSA D & BURGER MM (1994) In chromaffin cells, the mammalian *sec1p* homologue is a syntaxin 1A-binding protein associated with chromaffin granules. *J. Biol. Chem.* 269: 8623-8626
- HSU SM, RAINE L & FANGER H (1981) Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques. A comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. *J. Histochem. Cytochem.* 29: 577-580
- IGARASHI M, TAGAYA M & KOMIYA Y (1997) The soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attached protein receptor complex in growth cones: molecular aspects of the axon terminal development. *J. Neurosci.* 17 (4): 1460-1470
- IGARASHI M, KOZAKI S, TERAKAWA S, KAWANO S, IDE C & KOMIYA Y (1996) Growth cone collapse and inhibition of neurite growth by *Botulinum* neurotoxin C1: a t-SNARE is involved in axonal growth. *J. Cell Biol.* 134: 205-215
- JACOBSSON G, BEAN AJ, SCHELLER RH, JUNTTI-BERGGREN L, DEENEY JT, BERGGREN PO & MEISTER B (1994) Identification of synaptic proteins and their isoform mRNAs in compartments of pancreatic endocrine cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 12487-12491
- JAHN R & SÜDHOF TC (1994) Synaptic vesicles and exocytosis. *Ann. Rev. Neurosci.* 17: 219-246
- JAHN R & SÜDHOF TC (1999) Membrane fusion and exocytosis. *Ann. Rev. Biochem.* 68: 863-911
- JANZ R & SÜDHOF TC (1999) SV2C is a synaptic vesicle protein with an unusually restricted localization: anatomy of a synaptic vesicle protein family. *Neurosci.* 94 (4): 1279-90
- JIANG FX, CRAM DS, DEAIZPURUA HJ & HARRISON LC (1999) Laminin-1 promotes differentiation of fetal mouse pancreatic  $\beta$  cells. *Diabetes* 48: 722-730

- 
- JOBORN H, LARSSON R, RASTAD J, NYGREN P, AKERSTROEM G & LJUNGHALL S (1991) Vasoactive intestinal polypeptide stimulates parathyroid hormone release by interaction with cyclic adenosine monophosphate production of bovine parathyroid cells. *Acta Endocrinologica* 124 (1): 54-59
- KANAI Y & HEDIGER MA (1992) Primary structure and functional characterization of a high-affinity glutamate transporter. *Nature* 360: 467-471
- KANAI Y, SMITH GP & HEDIGER MA (1994) A new family of neurotransmitter transporters: the high-affinity glutamate transporters. *FASEB J.* 8: 1450-1459
- KANAI Y, BHIDE PG, DIFIGLIA M & HEDIGER MA (1995) Neuronal high-affinity glutamate transport in the rat central nervous system. *NeuroReport* 6: 2357-2362
- KANNER BJ (1993) Glutamate transporters from brain: a novel neurotransmitter transporter family. *FEBS* 325 (1,2): 95-99
- KAPPERS JA (1960) The development, topographical relations and innervation of *epiphysis cerebri* in the albino rat. *Z. Zellforsch. Mikrosk. Anat.* 52: 163-215
- KARASEK M (1973) The ultrastructure of the rat pineal body in organotypic culture. *Folia Histochem. Cytochem.* 11 (3): 329-330
- KARASEK M & REITER RJ (1992) Morphofunctional aspects of the mammalian pineal gland. *Microsc. Res. Tech.* 21: 136-157
- KLEIN DC (1985) Photoneural regulation of the mammalian pineal gland. *Ciba Foundation Symposium* 117: 38-56
- KLEIN DC, COON SL, ROSEBOOM PH, WELL JL, BERNARD M, GASTEL JA, ZATZ M, IUVONE PM, RODRIGUEZ IR, BEGAY V, FALCON J, CAHILL GM, CASSONE VM & BALER R (1997) The melatonin rhythm-generating enzyme: molecular regulation of serotonin-N-acetyltransferase in the pineal gland. *Recent Progress in Hormone Res.* 52: 307-358
- KOHAN SA, PESCATORI M, BRECHA NC, MASTROGIACOMO A, UMBACH JA & GUNDERSEN CB (1995) Cysteine string protein immunoreactivity in the nervous system and adrenal gland of rat. *J. Neurosci.* 15 (9): 6230-6238
- KRASZEWSKI K, DANIELL L, MUNDIGL O & DE CAMILLI P (1996) Mobility of synaptic vesicles in nerve endings monitored by recovery from photobleaching of synaptic vesicle-associated fluorescence. *J. Neurosci.* 16 (9): 5905-5913
- KRASZEWSKI K, MUNDIGL O, DANIELL L, VERDERIO C, MATTEOLI M & DE CAMILLI P (1995) Synaptic vesicle dynamics in living cultured hippocampal neurons visualized with Cy3-conjugated antibodies directed against the luminal domain of synaptotagmin. *J. Neurosci.* 15 (6): 4328-4342

- 
- KRETZSCHMAR S, VOLKNANDT W & ZIMMERMANN H (1996) Colocalization on the same synaptic vesicles of syntaxin and SNAP-25 with synaptic vesicle proteins: a re-evaluation of functional models required? *Neurosci. Res.* 26: 141-148
- KUS L, HANDA RJ & MCNULTY JA (1993) Characterization of a [<sup>3</sup>H] glutamate binding site in the rat pineal gland: Enhanced affinity followed superior cervical ganglionectomy. *J. Pineal Res.* 14: 39-44
- KUS L, HANDA RJ & MCNULTY JA (1994) Glutamate inhibition of the adenergetic-stimulated production of melatonin in rat pineal gland in vitro. *J. Neurochem.* 62 (6): 2241-2245
- LAEMMLI UK (1970) Cleavage of structural proteins during assembly of head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685
- LAITINEN JT, LAITINEN KS & KOKKOLA T (1995) Cholinergic signaling in the rat pineal gland. *Cell. Mol. Neurobiol.* 15 (2) 177-192
- LAM KS (1991) Vasoactive intestinal peptide in hypothalamus and pituitary. *Neuroendocrinology* 53 (Suppl. 1): 45-51
- LAUDER JM, LIU J, DEVAUD L & MORROW AL (1998) GABA as a trophic factor for developing monoamine neurons. *Perspect. Dev. Neurobiol.* 5: 247-259
- LECLERC N, BEESLEY PW, BROWN I, COLONNIER M, GURD JW, PALADINO T & HAWKES R (1989) Synaptophysin expression during synaptogenesis in the rat cerebellar cortex. *J. Comp. Neurol.* 280 (2): 197-212
- LEHRE KP, LEVY LM, OTTERSEN OP, STORM-MATHISEN J & DANBOLT NC (1995) Differential expression of two glial glutamate transporters in the rat brain: Quantitative and immunocytochemical observations. *J. Neurosci.* 15: 1835-1853
- LEONHARDT H (1990) *Histologie, Zytologie und Mikroanatomie des Menschen.* 8. überarb. u. erw. Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York
- LERNER AB, CASE JD, TAKAHASHI Y, LEE TH & MORI W (1958) Isolation of melatonin, the pineal gland factor that lightens melanocytes. *J. Am. Chem. Soc.* 80: 2587
- LETZ B, SCHOMERUS C, MARONDE E, KORF HW & KORBMACHER C (1997) Stimulation of a nicotinic ACh receptor causes depolarization and activation of L-type Ca<sup>++</sup> channels in rat pinealocytes. *J. Physiol.* 499 (2): 329-340
- LEVEQUE C, PUIPIER S, MARQUEZE B, GESLIN L, KATAOKA M, TAKAHASHI M, DE WAARD M & SEAGAR M (1998) Interaction of cysteine string proteins with the alpha1A subunit of the P/Q-type calcium channel. *J. Biol. Chem.* 273 (22): 13488-13492
- LINK & JAHN R (1996) Freisetzung von Transmittern in Neuronen – auf dem Weg zu einem molekularen Verständnis. *Neuroforum* 1/96: 18-25

- 
- LITTLETON JT, UPTON L & KANIA A (1995) Immunocytochemical analysis of axonal outgrowth in synaptotagmin mutations. *J. Neurochem.* 65: 32-40
- LÖSCHER W, HÖNACK D & FABBENDER CP (1991) Regional alterations in brain amino acids after administration of the N-methyl-D-aspartate receptor antagonists MK-801 and CGP39551 in rats. *Neurosci. Lett.* 124: 115-118
- LÖSCHER W, HÖRSTERMANN D, HÖNACK D, RUNDFELDT C & WAHNSCHAFFE U (1993 a) Transmitter amino acid levels in rat brain regions after amygdala-kindling: Evidence for a pro-kindling effect of prolonged electrode implantation. *Neurochem. Res.* 18 (7): 775-781
- LÖSCHER W, FABBENDER CP, GRAM L, GRAMER M, HÖRSTERMANN D, ZAHNER B & STEFAN H (1993 b) Determination for GABA and vigabatrin in human plasma by a rapid and simple HPLC method: correlation between clinical response of vigabatrin and increase in plasma GABA. *Epilepsy Res.* 14: 245-255
- LÓPEZ-MUNOZ F, CALVO JL, BOYA J & CARBONELL AL (1992) Coexpression of vimentin and glial fibrillary acidic protein in glial cells of the adult rat pineal gland: *J. Pineal Res.* 12: 145-148
- LUES G (1971) Die Feinstruktur der Zirbeldrüse normaler, trächtiger und experimentell beeinflusster Meerschweinchen. *Z. Zellforsch.* 114: 38-60
- LUO ZR, SCHULTZ RL & WHITTER EF (1990) Ultrastructural localization of acetylcholinesterase in the guinea pig pineal gland. *Anat. Rec.* 226 (4): 481-488
- MALADRO MS & KILBERG MS (1996) Molecular biology of mammalian amino acid transporters. *Ann. Rev. Biochem.* 65: 305-336
- MARIN A, URENA J & TABARES L (1996) Intracellular calcium release mediated by noradrenaline and acetylcholine in mammalian pineal cells. *J. Pineal Res.* 21 (1): 15-28
- MASTROGIACOMO A & GUNDERSEN CB (1995) The nucleotide and deduced amino acid sequence of a rat cysteine string protein. *Mol. Brain Res.* 28: 12-18
- MATSUMOTO, A & ISHII S (1992) Atlas of Endocrine Organs, 11-23, Springer Verlag
- MATTEOLI M, TAKEI K, PERIN MS, SÜDHOF TC & DE CAMILLI P (1992) Exo-endocytotic recycling of synaptic vesicles in developing processes of cultured hippocampal neurons. *J. Cell Biol.* 117: 849-861
- MC NULTY JA, McREYNOLDS HD & BOWMAN DC (1990) Pineal gland free amino acids and indoles during postnatal development of the rat: correlations in individual glands. *J. Pineal Res.* 9 (1): 65-73
- MELEGA WP & HOWARD BD (1984) Biochemical evidence that vesicles are the source of the acetylcholine released from stimulated PC12 cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81: 6535-6538



- 
- MICK G (1995) Non-N-methyl-D-aspartate glutamate receptors in glial cells and neurons of the pineal gland in a higher primate. *Neuroendocrinology* 61: 256-264
- MIKKELSEN JD, HAUSER F & OLCESE J (1999) Neuropeptide Y (NPY) and NPY receptors in the rat pineal gland. *Adv. Exp. Med. Biol.* 460: 95-107
- MILLER S, COTMAN CW & BRIDGES RJ (1992) 1-Aminocyclopentane-*trans*-1,3-dicarboxylic acid induces glutamine synthase activity in cultured astrocytes. *J. Neurochem.* 58: 1967-1970
- MILLER S, ROMANO C & COTMAN CW (1995) Growth factor upregulation of a phosphoinositide-coupled metabotropic glutamate receptor in cortical astrocytes. *J. Neurosci.* 15: 6103-6109
- MILOFSKY AH (1957) The fine structure of the pineal in the rat, with special reference to parenchyma. *Anat. Rec.* 127: 435-436
- MIYATA A, JIANG L, DAHL RD, KITADA C, KUBO K, FUJINO M, MINAMINO N & ARIMURA A (1990) Isolation of a neuropeptide corresponding to the N-terminal 27 residues of the pituitary adenylate cyclase activating polypeptide which stimulates adenylate cyclase in pituitary cells. *Biochem. biophys. Res. Commun.* 164: 567-574
- MØLLER M (1992) Fine structure of the pinealopetal innervation of the mammalian pineal gland. *Microsc. Res Tech.* 21: 188-204
- MØLLER M (1994) Neuropeptides in the mammalian pineal gland. Precursor processing and functional implications. *Adv. Pineal Res.* 7: 1-11
- MØLLER M & MIKKELSEN JD (1992) Molecular messengers in brain-pineal interactions. In: *Recent advances in cellular and molecular biology. Vol. 3: Neurobiochemical transmitter pathways, adrenoceptors and muscarinic receptors.* WEGMANN RA & WEGMANN MA (eds.): 141-147, Peeters Press, Leuven (Belgium)
- MØLLER M, FAHRENKRUG J & HANNIBAL J (1999) Innervation of the rat pineal gland by pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP)-immunoreactive nerve fibres. *Cell Tissue Res.* 296 (2): 247-257
- MØLLER M, INGILD A & BOCK E (1978) Immunohistochemical demonstration of S-100 protein and GFA protein in interstitial cells of rat pineal gland. *Brain Res.* 140: 1-13
- MØLLER M, MIKKELSEN JD & PHANSUWAN-PUJITO P (1991) Demonstration of nerve fibres immunoreactive to met-enkephalin, leu-enkephalin, and  $\beta$ -endorphin in the bovine pineal gland. In: *Role of melatonin and peptides in neuroimmunomodulation.* FRASCHINI F & REITER RJ (eds.) Plenum New York
- MØLLER M, RAVVAULT JP & COZZI B (1996) The chemical neuroanatomy of the mammalian pineal gland: neuropeptides. *Neurochem. Int.* 28 (1): 23-33
- MØLLER M, HOLST JJ, MATO E, WEBB S & MIKKELSEN JD (1995) Presence of somatostatin-containing neuronal-like cells in the rat pineal gland. *Neuroendocrinol. Lett.* 17 (2): 71-80

---

MOORE PY (1978) The innervation of the pineal gland. In: The pineal and reproduction. Reiter RJ (ed.) 1-29, Karger, Basel

MORIYAMA Y & YAMAMOTO A (1995 a) Microvesicles isolated from bovine pineal gland specifically accumulate L-glutamate. FEBS Lett. 367: 233-236

MORIYAMA Y & YAMAMOTO A (1995 b) Vesicular L-glutamate transporter in microvesicles from bovine pineal glands: Driving force, mechanism of chloride anion-activation. and substrate specificity. J. Biol. Chem. 270: 22314-22320

MORIYAMA Y, HAYASHI M, YAMADA H, YATSUSHIRO S, ISHIO S & YAMAMOTO A (2000) Synaptic-like microvesicles, synaptic vesicle counterparts in endocrine cells, are involved in a novel regulatory mechanism for the synthesis and secretion of hormones. J. Exp.Biol. 203: 117-125

MUNDIGL O, VERDERIO C, KRASZEWSKI K, DE CAMILLI P & MATTEOLI M (1995) A radioimmunoassay to monitor synaptic activity in hippocampal neurons in vitro. Eur. J. Cell Biol. 66: 246-256

NAVONE F, GREENGARD P & DE CAMILLI P (1984) Synapsin I in nerve terminals: selective association with small synaptic vesicles. Science 226: 1209-1211

NAVONE F, JAHN R, DI GIOIA G, STUKENBROK H, GREENGARD P & DE CAMILLI P (1986) Protein p 38: an integral membrane protein specific for small vesicles of neurons and neuroendocrine cells. J. Cell Biol 103: 2511-2527

NEKI A, OHISHI H, KANEKO T, SHIGEMOTO M, NAKANISHI S & MIZUNO N (1996) Metabotropic glutamate receptors mGluR2 and mGluR5 are expressed in two non-overlapping populations of Golgi-cells in the rat cerebellum. Neurosci. 75 (3): 815-826

NICHOLLS J, SKENE DJ & HOURANI SM (1997) Use of newly developed technique to isolate rat pinealocytes and study the effects of adenosine agonists on melatonin production. J. Pineal Res. 23: 164-168

NICOLETTI F, MAGRI G, INGRAO F, BRUNO V, CATANIA MV, DELL'ALBANI P, CONDORELLI DF & AVOLA R (1990) Excitatory amino acids stimulate inositol phospholipid hydrolysis and reduce proliferation in cultured astrocytes. J. Neurochem. 54: 771-777

NIR I, BIREL G, DAMES W & NEUHOFF V (1973) Rat pineal free amino acids diurnal rhythm and effect of light. Arch. Int. Phys. Bioch. 81: 617-627

NIR I, BIREL G, DAMES W & NEUHOFF V (1974) Pineal proteins and free amino acids during ontogenesis in rats: Neuroendocrinology 14: 34-43

NOAKES PG, CHIN D, KIM SS, LIANG S & PHILLIPS WD (1999) Expression and localization of dynamin and syntaxin during neural development and neuromuscular synapse formation. J. Comp. Neurol. 410: 531-540

- 
- O'CONNOR V, AUGUSTINE GJ & BETZ H (1994) Synaptic vesicle exocytosis: molecules and models. *Cell* 76: 785-87
- OKAMOTO M & SÜDHOF TC (1997) Mints, Munc18-interacting proteins, in synaptic vesicle exocytosis. *J. Biol. Chem.* 272 (50): 31459-64
- OLCESE J (1991) Neuropeptide Y: an endogenous inhibitor of norepinephrine-stimulated melatonin secretion in the rat pineal gland. *J. Neurochem.* 7: 943-947
- OSEN-SAND A, CATSICAS M, STAPLE JK, JONES KA, AYALA G, KNOWLES J, GRENNINGLOH G & CATSICAS S (1993) Inhibition of axonal growth by SNAP-25 antisense oligonucleotides in vitro and in vivo (see comments). *Nature* 364: 445-448
- OTTO H, HANSON PI & JAHN R (1997) Assembly and disassembly of a ternary complex of synaptobrevin, syntaxin, and SNAP-25 in the membrane of synaptic vesicles. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 6197-6201
- PABST H & REDECKER P (1999) Interstitial glial cells of the gerbil pineal gland display immunoreactivity for the metabotropic glutamate receptors mGluR2/3 and mGluR5. *Brain Res.* 838: 60-68
- PEDERSEN EB, FOX LM, CASTRO AJ & McNULTY JA (1993) Immunocytochemical and electron-microscopic characterization of macrophage/microglia cells and expression of class II major histocompatibility complex in the pineal gland of the rat. *Cell Tissue Res.* 272: 257-265
- PELLEGRINO DE IRALDI A (1969) Granulated vesicles in the pineal gland of the mouse. *Z. Zellforsch.* 101: 408-418
- PETRALIA RS, WANG YX, NIEDZIELSKI AS & WENTHOLD RJ (1996) The metabotropic glutamate receptors, mGluR2 and mGluR3, show unique postsynaptic, presynaptic and glial localizations. *Neuroscience* 71: 949-976
- PÉVET P (1994) Physiological role of the neuropeptides in the mammalian pineal gland: a working hypothesis. In: Møller M, Pévet P (eds.) *Advances in pineal research* 8: 143-152, Libbey, London
- PEVSNER J & SCHELLER RH (1994) Mechanisms of vesicle docking and fusion: insights from the nervous system. *Curr. Biol.* 6: 555-560
- PEVSNER J, HSU SE & SCHELLER RH (1994) n-Sec1: A neural-specific syntaxin-binding protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 1445-1449
- PHANSUWAN-PUJITO P, GOVITRAPONG P & EBADI M (1990) Choline acetyltransferase in bovine pineal gland. *J. Pineal Res.* 9 (1): 29-38
- PHANSUWAN-PUJITO P, MIKKELSEN JD, GOVITRAPONG P & MØLLER M (1991) A cholinergic innervation of the bovine pineal gland visualized by immunohistochemical detection of choline acetyltransferase-immunoreactive nerve fibers. *Brain Res.* 545 (1-2): 49-58

- 
- PINES G, DANBOLT NC, BJORAS M, ZHANG Y, BENDAHAN A, EIDE L KOEPSSELL H, STORM-MATHISEN J, SEEBERG E & KANNER BI (1992) Cloning and expression of a rat brain L-glutamate transporter. *Nature* 360: 464-467
- PUJITO PP, GOVITRAPONG P & EBADI M (1991) Inhibitory actions of muscarinic cholinergic receptor agonists on NAT in bovine pineal explants in culture. *Neurochem. Res.* 16 (8): 885-889
- PUPIER S, LEVEQUE C, MARQUEZE B, KATAOKA M, TAKAHASHI M & SEAGAR MJ (1997) Cysteine string proteins associated with secretory granules of the rat neurohypophysis. *J. Neurosci.* 17: 2722-2727
- PYLE RA, SCHIVELL AE, HIDAKA H & BAJALIEH SM (2000) Phosphorylation of synaptic vesicle protein 2 modulates binding to synaptotagmin. *J. Biol. Chem.* 275 (22): 17195-17200
- REDECKER P (1995) The ras-like rab3a protein is present in pinealocytes of the gerbil pineal gland. *Neurosci. Lett.* 184: 117-120
- REDECKER P (1996) Synaptotagmin I, synaptobrevin II, and syntaxin I are coexpressed in rat and gerbil pinealocytes. *Cell Tissue Res.* 283: 443-454
- REDECKER P (1998) Developmental pattern of cell type-specific calretinin immunoreactivity in the postnatal gerbil pineal gland. *Dev. Brain Res.* 105: 43-50
- REDECKER P (1999) Immunoreactivity for multiple GABA transporters (GAT-1, GAT-2, GAT-3) in the gerbil pineal gland. *Neuroscience Lett.* 266: 117-120
- REDECKER P (2000) Expression of synaptic vesicle trafficking proteins in the developing rat pineal gland. *Cell Tissue Res.* 301: 255-265
- REDECKER P & BARGSTEN G (1993) Synaptophysin – A common constituent of presumptive secretory microvesicles in the mammalian pinealocyte: A study of rat and gerbil pineal glands. *J. Neurosci. Res.* 34: 79-96
- REDECKER P & PABST H (2000) Immunohistochemical study of the glutamate transporter proteins GLT-1 and GLAST in rat and gerbil pineal gland. *J. Pineal Res.* 28: 179-184
- REDECKER R & VEH RW (1994) Glutamate immunoreactivity is enriched over pinealocytes of the gerbil pineal gland. *Cell Tissue Res.* 278: 579-588
- REDECKER P, CETIN Y & KORF HW (1996) Differential immunocytochemical localization of calretinin in the pineal gland of three mammalian species. *J. Neurocytol.* 25: 9-18
- REDECKER P, GRUBE D & JAHN R (1990) Immunohistochemical localization of synaptophysin (p38) in the pineal gland of the Mongolian gerbil (*Meriones unguiculatus*). *Anat. Embryol.* 181: 433-440
- REDECKER P, PABST H & GRUBE D (1998) Munc-18-1 and cysteine string protein (csp) in pinealocytes of the gerbil pineal gland. *Cell Tissue Res.* 293: 245-252

- 
- REDECKER P, WEYER C & GRUBE D (1996) Rat and gerbil pinealocytes contain the synaptosomal-associated protein 25 (SNAP-25). *J. Pineal Res.* 21: 29-34
- REDECKER P, PABST H, LÖSCHER W & STEINLECHNER S (zur Publikation eingereicht) Evidence for microvesicular storage and release of glycine in rodent pinealocytes.
- REITER RJ (1981) The mammalian pineal gland; structure and function. *Am. J. Anat.* 162, 287-313
- REUSS S, SCHROEDER B, SCHROEDER H & MAELICKE A (1992) Nicotinic cholinceptors in the rat pineal gland as analyzed by western blot, light- and electron microscopy. *Brain Res.* 573 (1) 114-118
- RØNNEKLEIV OK & KELLY MJ (1984) Distribution of substance P neurons in the epithalamus of the rat: an immunohistochemical investigation. *J. Pineal Res.* 1: 355-379
- ROSEBOOM PH, COON SL, BALER R, MCCUNE SK, WELLER JL & KLEIN DC (1996) Melatonin synthesis: analysis of the more than 150-fold nocturnal increase in serotonin N-acetyltransferase messenger ribonucleic acid in the rat pineal gland. *Endocrinology* 137 (7): 3033-3045
- ROSENSTEIN RE, CHULUYAN HE & CARDINALI DP (1990 b) Presynaptic effects of gamma-aminobutyric acid on norepinephrine release and uptake in rat pineal gland. *J. Neural Transm.* 82 (2): 131-140
- ROSENSTEIN RE, SANJURJO C & CARDINALI DP (1989 b) Gamma aminobutyric acid uptake, release, and effect on  $^{36}\text{Cl}^-$ -influx in bovine pineal gland. *J. Neural Transm.* 77: 141-152
- ROSENSTEIN RE, CHULUYAN HE, DIAZ MC & CARDINALI DP (1990 a) GABA as a presumptive paracrine signal in the pineal gland. Evidence on an intrapineal GABAergic system. *Brain Res. Bull.* 25 (2): 339-344
- ROSENSTEIN RE, CHULUYAN HE, PEREYRA EN & CARDINALI DP (1989 a) Release and effect of  $\gamma$ -aminobutyric acid on rat pineal melatonin production in vitro. *Cell Mol. Neurobiol.* 9: 207-219
- ROTHMAN EC (1994) Mechanisms of intracellular protein transport. *Nature* 372: 55-63
- ROTHSTEIN JD, MARTIN L, LEVEY AI, DYKES-HOBERG M, JIN L, WU D, NASH N & KUNCL RW (1994) Localization of neuronal and glial glutamate transporters. *Neuron* 13: 713-725
- ROTHSTEIN JD, DYKES-HOBERG M, PARDO CA, BRISTOL LA, JIN L, KUNCL RW, KANAI Y, HEDIGER MA, WANG Y, SCHIELKE JP & WELTY DF (1996) Knockout of glutamate transporters reveals a major role for astroglial transport in excitotoxicity and clearance of glutamate. *Neuron* 16: 675-686
- SANO Y & MASHIMO T (1966) Elektronenmikroskopische Untersuchungen an der Epiphysis cerebri beim Hund. *Z. Zellforsch.* 69: 129-139

---

SAPER CB, LOEWY AD, SWANSON LW & COWAN WM (1976) Direct hypothalamic-autonomic connections. *Brain Res.* 79: 347-351

SATO K, KIYAMA H, SHIMADA S & TOHYAMA M (1993) Gene expression of KA type and NMDA receptors and of a glycine transporter in the rat pineal gland. *Neuroendocrinology* 58: 77-79

SCHACHNER M, HUANG SK, ZIEGELMÜLLER P, BIZZINI B & TAUGNER R (1984) Glial cells in the pineal gland of mice and rats. A combined immunofluorescence and electron-microscopic study. *Cell Tissue Res.* 237: 245-252

SCHIVELL AE, BATCHELOR RH & BAJJALIEH SM (1996) Isoform-specific, calcium-regulated interaction of the synaptic vesicle proteins SV2 and synaptotagmin. *J. Biol. Chem.* 271 (44): 27770-27775

SCHMITT E, ASAN E, PÜSCHEL B, JÖNS T & KUGLER P (1996) Expression of the glutamate transporter GLT-1 in neural cells of the rat central nervous system: Non-radioactive in situ hybridization and comparative immunocytochemistry. *Neuroscience* 71: 989-1004

SCHOMERUS C & KORF HW (1999) Cholinergic signal transduction cascades in rat pinealocytes: functional and ontogenetic aspects. *Reprod. Nutr. Dev.* 39 (3): 305-314

SCHOMERUS C, LAEDTKE E & KORF HW (1995) Calcium responses of isolated, immunocytochemically identified rat pinealocytes to noradrenergic, cholinergic and vasopressinergic stimulations. *Neurochem. Int.* 27 (2): 163-175

SCHOMERUS C, LAEDTKE E & KORF HW (1999) Analyses of signal transduction cascades in rat pinealocytes reveal a switch in cholinergic signaling during postnatal development. *Brain Res.* 833 (1): 39-50

SCHON F, BEART PM, CHAPMAN D & KELLY JS (1975) On GABA metabolism in the gliocyte cells of the rat pineal gland. *Brain Res.* 85 (3): 479-90

SCHRÖDER H, WEIHE E, NOHR D & VOLLRATH L (1988) Immunohistochemical evidence for the presence of peptides derived from proenkephalin, prodynorphin and proopioidmelanocortin in the guinea pig pineal gland. *Histochemistry* 88: 285-289

SCHUBERT D & KLIER FG (1977) Storage and release of acetylcholine by a clonal cell line. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74: 5184-5188

SESACK SR & SNYDER CL (1995) Cellular and subcellular localization of syntaxin-like immunoreactivity in the rat striatum and cortex. *Neuroscience* 67: 993-1007

SHERIDAN MN & REITER RJ (1968) The fine structure of the hamster pineal gland. *Amer. J. Anat.* 122: 357-376

SHERIDAN MN & REITER RJ (1970 a) Observations on the pineal system in hamster. I. Relations of the superficial and deep pineal to the epithalamus. *J. Morphol.* 131: 153-161

- 
- SHERIDAN MN & REITER RJ (1970 b) Observations on the pineal system in hamster. II Fine structure of the deep pineal. *J. Morphol.* 131: 163-178
- SHIODA S, YADA T, NAKAJO S, NAKAYA K, NAKAI Y & ARIMURA A (1997) Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP): a novel regulator of vasopressin-containing neurons. *Brain Res.* 765: 81-90
- SHIOTANI Y, YAMANO M, SHIOSAKA S, EMSON PC, HILLYARD CJ, GIRGIS S & MACINTYRE I (1986) Distribution and origins of substance P (SP)-, calcitonin gene-related peptide (CGRP)-, vasoactive intestinal polypeptide (VIP)- and neuropeptide Y (NPY)-containing nerve fibers in the pineal gland of gerbils. *Neurosci. Lett.* 70: 187-192
- SIMONNEAUX V (1995) Neuropeptides of the mammalian pineal gland. *Neuroendocrinol. Lett.* 17: 115-130
- SIMONNEAUX V, OUICHOU A & PÉVET P (1990) Vasoactive intestinal peptide stimulates melatonin release from perfused pineal glands of rats. *J. Neural Transm.* 79 (1-2): 69-79
- SIMONNEAUX V, OUICHOU A & PÉVET P (1993) Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) stimulates melatonin synthesis from rat pineal gland. *Brain Res.* 603: 148-152
- SIMONNEAUX V, OUICHOU A, CRAFT C & PÉVET P (1994) Presynaptic and postsynaptic effect of neuropeptide Y in the rat pineal gland. *J. Neurochem.* 62: 2464-2471
- SIMONNEAUX V, RIBELAYGA C, MIGUEZ JM & PÉVET P (1996) Physiological role of neuropeptides in the mammalian pineal gland. In: TANG PL, PANG SF & REITER RJ (eds.) *Melatonin: A universal photoperiodic signal with diverse actions* 21: 24-29, *Front Horm Res.* Basel, Karger
- SIMONNEAUX V, RODEAU JL, CALGARI C & PÉVET P (1999) Neuropeptide Y increases intracellular calcium in rat pinealocytes. *Eur. J. Neurosci.* 11 (2): 725-728
- SIMONNEAUX V, LIENLEN-CAMPARD P, LOEFFLER JP, BASILLE M, GONZALEZ BJ, VAUDRY H, ROBBERECHT P & PÉVET P (1998) Pharmacological, molecular and functional characterization of vasoactive intestinal polypeptide/ pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide receptors in the rat pineal gland. *Neurosci.* 85 (3): 887-896
- SMITH SJ (1994) Neuromodulatory astrocytes. *Curr. Biol.* 4: 807-810
- SONTHEIMER H (1995) Coupling in glial cells: Who is coupled, and why. *neuroscientist* 1:188-191
- STANKOV B, CIMINO M, MARINI P, LUCINI V, FRASCHINI F & CLEMENTI F (1993) Identification and functional significance of nicotinic cholinergic receptors in the rat pineal gland. *Neurosci. Lett.* 156: 131-134
- STEINLECHNER S (1986) Untersuchungen zur Regulation der Melatoninsynthese im Pinealorgan (*Epiphysis cerebri*) Habilitationsschrift, Philipps-Universität Marburg

- 
- STEINLECHNER S (1992) Melatonin: An endocrine signal for the night length. *Verh. Dtsch. Zool. Ges.* 85 (2): 217-229
- STERNBERGER LA (1986) *Immunocytochemistry*, 3<sup>rd</sup> edn. Wiley, New York
- STETTLER O, TAVITIAN B & MOYA KL (1996) Differential synaptic vesicle protein expression in the barrel field of developing cortex. *J. Comp. Neurol.* 375: 321-332
- STETTLER O, MOYA KL, ZAHRAOUI A & TAVITIAN B (1994) Developmental changes in the localization of the synaptic vesicle protein rab3a in rat brain. *Neuroscience* 62 (2): 587-600
- STORCK T, SCHULTE S, HOFMANN K & STOFFEL W (1992) Structure, expression, and functional analysis of a Na<sup>+</sup>-dependent glutamate/aspartate transporter from rat brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 10955-10959
- STUDNICKA FK (1905) Die Parietalorgane. in: Opperl A (ed.), *Lehrbuch der vergleichenden mikroskopischen Anatomie* 5: 1-254. Fischer, Jena
- SÜDHOF TC (1995) The synaptic vesicle cycle: a cascade of protein-protein interactions. *Nature* 375: 645-653
- TAMARKIN L, REPERT SM, ORLOFF DJ, KLEIN DC, YELLON SM & GOLDMAN BD (1980) Ontogeny of the pineal melatonin rhythm in the Syrian (*Mesocricetus auratus*) and Siberian (*Phodopus sungorus*) hamsters and in the rat. *Endocrinology* 107 (4): 1061-1067
- TANABE Y, MASU M, ISHII T, SHIGEMOTO R & NAKANISHI S (1992) A family of metabotropic glutamate receptors. *Neuron* 8: 169-179
- TANAKA K, SHIBUYA I, HARAYAMA N, NOMURA M, KABASHIMA N, UETA Y & YAMASHITA H (1997) Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide potentiation of Ca<sup>++</sup> entry via protein kinase C and A pathways in melanotrophs of the pituitary pars intermedia of rats. *Endocrinology* 138 (10): 4086-4095
- TELLAM JT, MCINTOSH S & JAMES DE (1995) Molecular identification of two novel Munc 18 isoforms expressed in nonneuronal tissues. *J. Biol. Chem.* 270 (11): 5857-5863
- TELLAM JT, MACAULAY SL, MCINTOSH S, HEWISH DR, WARD CW & JAMES DE (1997) Characterization of Munc 18c and Syntaxin 4 in 3T3-L1 adipocytes. *J. Biol. Chem.* 272 (10): 6179-6186
- TESTA CM, FRIBERG IK, WEISS SW & STANDAERT DG (1998) Immunohistochemical localization of metabotropic glutamate receptors mGluR1a and mGluR2/3 in the rat basal ganglia. *J. Comp. Neurol.* 390: 5-19
- THOMAS-REETZ A, HELL JW, DURING MJ, WALCH-SOLIMENA C, JAHN R & DE CAMILLI P (1993) A  $\gamma$ -aminobutyric acid transporter driven by a proton pump is present in synaptic-like microvesicles of pancreatic  $\beta$  cells. *Roc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 531-5321



- 
- VAN VEEN TH, BRACKMANN M, MOGHIMZADEH E (1978) Postnatal development of the pineal organ in the hamsters *Phodopus sungorus* and *Mesocricetus auratus*. *Cell Tissue Res.* 189: 241-250
- VELAZ-FAIRCLOTH M, MCGRAW TS, MALANDRO MS, FREMEAU RT, KILBERG MS & ANDERSON KJ (1996) Characterization and distribution of the neuronal glutamate transporter EAAC1 in rat brain. *Am. J. Physiol.* 270: C67-C75
- VERHAGE M, DE VRIES KJ, ROSHOL H, BURBACH JPH, GISPIN WH & SÜDHOF TC (1997) DOC2 Proteins in Rat Brain: Complementary distribution and proposed function as vesicular adapter proteins in early stages of secretion. *Neuron* 18: 453-61
- VOLLRATH L (1981) The pineal organ, in *Handbuch der Mikroskopischen Anatomie des Menschen*, Vol. VI/7 (Oksche A und Vollrath L, eds) Springer Berlin/ Heidelberg/ New York.
- WALCH-SOLIMENA C, BLASI J, EDELMANN L, CHAPMAN ER, FISCHER VON MOLLARD G & JAHN R (1995) The t-SNAREs syntaxin 1 and SNAP-25 are present on organelles that participate in synaptic vesicle recycling. *J. Cell. Biol.* 128: 637-645
- WARTENBERG H (1968) The mammalian pineal organ: Electron microscopic studies on the fine structure of pinealocytes, glial cells and on perivascular compartment. *Z. Zellforsch.* 86: 74-97
- WEISS ER, MANESS P & LAUDER JM (1998) Why do neurotransmitters act like growth factors? *Perspect. Dev. Neurobiol.* 5: 323-335
- WELSH MG & REITER RJ (1978) The pineal gland of the Mongolian gerbil, *Meriones unguiculatus*. I. An ultrastructural study. *Cell Tissue Res.* 193: 323-336
- WINDER DG & CONN PJ (1996) Roles of metabotropic glutamate receptors in glial function and glial-neuronal communication. *J. Neurosci. Res.* 46: 131-137
- WINDER DG, RITCH PS, GEREAU RW & CONN PJ (1996) Novel glial-neuronal signalling by coactivation of metabotropic glutamate and  $\beta$ -adrenergic receptors in rat hippocampus. *J. Physiol.* 494: 743-755
- WOFCHUK ST & RODNIGHT R (1994) Glutamate stimulates the phosphorylation of glial fibrillary acidic protein in slices of immature rat hippocampus via a metabotropic receptor. *Neurochem. Int.* 24: 517-523
- WOLFE DE (1965) The epiphyseal cell: An electron-microscopy study of its intercellular relationships and intracellular morphology in the pineal body of the albino rat. *Prog. Brain. Res.* 10: 332-386
- YADA T, SAKURADA M, ISHIHARA H, NAKATA M, SHIODA S, YAEKURA K, HAMAKAWA N, YANAGIDA K, KIKUCHI M & OKA Y (1997) Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) is an islet substance serving as an intra-islet amplifier of glucose-induced insulin secretion in rats. *J. Physiol.* 505 (2): 319-328

- 
- YAMADA H, YAMAGUCHI A & MORIYAMA Y (1997) L-aspartate-evoked inhibition of melatonin production in rat pineal glands. *Neuroscience Lett.* 228: 103-106
- YAMADA H, OGURA A, KOIZUMI S, YAMAGUCHI A & MORIYAMA Y (1998) Acetylcholine triggers L-glutamate exocytosis via nicotinic receptors and inhibits melatonin synthesis in rat pinealocytes. *J. Neurosci.* 18 (13): 4946-4952
- YAMADA H, YAMAMOTO A, YADOZAWA S, KOZAKI S, TAKAHASHI M, MORITA M, MICHIBATA H, FURUICHI T, MIKOSHIBA K & MORIYAMA Y (1996) Microvesicle-mediated exocytosis of glutamate is a novel paracrine-like chemical transduction mechanism and inhibits melatonin secretion in rat pinealocytes. *J. Pineal Res.* 21: 175-191
- YAMADA H, YATSUSHIRO S, ISHIO S, HAYASHI M, NISHI T, YAMAMOTO A, FUTAI M, YAMAGUCHI A & MORIYAMA Y (1998) Metabotropic glutamate receptors negatively regulate melatonin synthesis in rat pinealocytes. *J. Neuroscience* 18 (6): 2056-2062
- YAMADA H, YATSUSHIRO S, YAMAMOTO A, HAYASHI M, NISHI T, FUTAI M, YAMAGUCHI A & MORIYAMA Y (1997) Functional expression of a GLT-1 type Na<sup>+</sup>-dependent glutamate transporter in rat pinealocytes. *J. Neurochem.* 69: 1491-1498
- YATSUSHIRO S, YAMADA H, HAYASHI M, TSUBOI S & MORIYAMA Y (1999) Functional expression of metabotropic glutamate receptor type 5 in rat pinealocytes. *NeuroReport* 10: 1599-1603
- YATSUSHIRO S, YAMADA H, HAYASHI M, YAMAMOTO A & MORIYAMA Y (2000) Ionotropic glutamate receptors trigger microvesicle-mediated exocytosis of L-glutamate in rat pinealocytes. *J. Neurochem.* 75: 288-297
- YATSUSHIRO S, YAMADA H, KOZAKI S, KUMON H, MICHIBATA H, YAMAMOTO A & MORIYAMA Y (1997) L-aspartate but not the D form is secreted through microvesicle-mediated exocytosis and is sequestered through Na<sup>+</sup>-dependent transporter in rat pinealocytes. *J. Neurochem.* 69: 340-347
- YELLON SM, TAMARKIN L & GOLDMAN BD (1985) Maturation of the pineal melatonin rhythm in long- and short-day reared Djungarian hamsters. *Experimentia* 41: 651-652
- YOUNG JAC, BROWN DA, KELLEY JS & SCHON F (1973) Autoradiographic localization of sites of [<sup>3</sup>H] GABA accumulation in peripheral autonomic ganglion. *Brain Res.* 63: 479-486
- ZHANG E, MIKKELSEN JD & MØLLER M (1991) Tyrosine hydroxylase- and neuropeptide Y-immunoreactive nerve fibres in the pineal complex of untreated rats and rats following removal of the superior cervical ganglia. *Cell Tiss. Res.* 265: 63-71
- ZHANG H, KELLEY WL, CHAMBERLAIN LH, BURGOYNE RD, WOLLHEIM CB & LANG J (1998) Cysteine-string proteins regulate exocytosis of insulin independent from transmembrane ion fluxes. *FEBS Letters* 437 (3): 267-272
- ZHAO CM, JACOBSSON G, CHEN D, HÅKANSON R & MEISTER B (1997) Exocytotic proteins in enterochromaffin-like (ECL) cells of the rat stomach. *Cell Tissue Res.* 290: 539-551

---

ZINSMAIER KE, HOFBAUER A, HEIMBECK G, PFLUGFELDER GO, BUCHNER S & BUCHNER E (1990) A cysteine-string protein is expressed in retina and brain of *Drosophila*. *J. Neurogenet.* 7: 15-29

## Publikationen

Aus Prioritätsgründen wurden Teilergebnisse der vorliegenden Arbeit veröffentlicht:

REDECKER P, PABST H AND GRUBE D

Munc 18-1 and cysteine string protein (csp) in pinealocytes of the gerbil pineal gland.  
Cell Tissue Res. (1998) 293: 245 – 252

PABST H AND REDECKER P

Interstitial glial cells of the gerbil pineal gland display immunoreactivity for the metabotropic glutamate receptors mGluR2/3 and mGluR5.

Brain Res. (1999) 838: 60 – 68

REDECKER P AND PABST H

Immunohistochemical study of the glutamate transporter proteins GLT-1 and GLAST in rat and gerbil pineal gland.

J. Pineal Res. (2000) 28: 179 – 184

REDECKER P, PABST H, LÖSCHER W AND STEINLECHNER S

Evidence for microvesicular storage and release of glycine in rodent pinealocytes.

Neurosci. Lett. (2001) 299 (1 – 2): 93 – 96



## Vielen Dank

Das Gelingen einer solchen Arbeit hat durchaus nicht nur etwas Fleiß, Ausdauer und eine gute Ausbildung zur Voraussetzung, sondern mindestens genauso entscheidend ist der Rahmen, in dem man arbeitet: Die Unterstützung bei der Einarbeitung in ein neues Thema, die Betreuung, die Kooperativität und Hilfsbereitschaft der Kolleginnen und Kollegen und die zur Verfügung stehenden Mittel. Wenn all das vorhanden war, so daß am Ende etwas Brauchbares herauskommen konnte, ist es spätestens jetzt an der Zeit, sich zu bedanken.

Auch wenn ich weiß, daß ich mit meinem Dank niemandem gerecht werde, am wenigsten denen, die unerwähnt bleiben, möchte ich mich doch bedanken bei:

Prof. Dr. Dietrich Grube für die Möglichkeit, diese Arbeit an seinem Institut durchführen zu können.

Prof. Dr. Peter Redecker: Er hat mir ein interessantes und anspruchvolles Thema angeboten und für dessen Bearbeitung einen angemessenen Rahmen gestellt. Seine gute Betreuung, seine Anregungen und seine Diskussionsbereitschaft haben sehr zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen und seine Genauigkeit und Beharrlichkeit haben mich immer wieder motiviert.

Den Mitarbeiter der Abteilung Anatomie 1 der MHH, insbesondere bei Heike Böning, Silke Fischer und Dietlinde von Mayersbach, die mir während der Arbeit jederzeit mit Rat und Tat zur Seite standen und während der Zigarettenpausen durch freundschaftliche Gespräche so manche Frustration hinweggeblasen haben.

Martina Hanke für die hervorragenden Fotoarbeiten und die Geduld, die sie mit mir hatte.

Prof. Dr. Horst-W. Korf und Prof. Dr. Reinhard Jahn für die Überlassung der Antikörper.

Prof. Dr. Stephan Steinlechner danke ich dafür, daß ich die Zellkulturarbeiten in seinem Labor durchführen durfte. Er hat mich herzlich in seiner Arbeitsgruppe aufgenommen und mir im richtigen Augenblick die notwendige Motivationspritze verpaßt.

Siegrid Hilken, Marianne Brüning, Haiko Dernbach und Nikolai Hampel sowie allen Mitarbeitern des Institutes für Zoologie, die mit ihrer Hilfsbereitschaft und Freundschaft zu einer harmonischen und äußerst produktiven Atmosphäre beigetragen haben.

Frank Scherbarth für seine immerwährende freundliche und hilfsbereite Art sowie seiner ungeahnten Präzision und Sorgfalt beim Korrekturlesen dieser Arbeit.

Henning Voigt für seine Freundschaft und seine aufopferungsvolle Bereitschaft, Hard- und Software für mich gefügig zu machen.

Frauke Perl: Sie ist eine Freundin und Kollegin, deren überschäumendes Wesen, ihr Elan und Schaffensdrang mich aus mancher Lethargie und Verzweiflung gerissen haben. Außerdem hatten ihre germanistische Fähigkeiten einen sehr positiven Einfluß auf diese Arbeit.

Anke Hampel für ihre Freundschaft, ihre Ruhe und Zielstrebigkeit, für die ständige Diskussionsbereitschaft zu Fragen der Immunhistochemie und für die strenge Korrektur dieser Arbeit.

Dr. Peter Ebinger und Dr. Reinhard Löhmer, die immer ein aufmunterndes Wort für mich übrig hatten.

Rüdiger Brüning: Er ist ein Meister in Sachen Bildbearbeitung und ich durfte davon profitieren.

Prof. Dr. Löscher für die Möglichkeit, die Aminosäuremessungen in seinem Institut durchführen zu können.

Martina Gramer und Maria Malves, die mich in die Geheimnisse der HPLC eingeweiht und durch ihre Kompetenz und Leistungsbereitschaft die präzisen Messungen der zahlreichen Proben in so kurzer Zeit erst ermöglicht haben.

Andrea Krause für ihre Freundschaft, ihre direkte Art, die einem schon mal den Kopf zurecht rückt, ihr offenes Ohr für alle Sorgen aus dem Laboralltag und für die Endkontrolle dieser Arbeit.

Gabriele und Karl Langner: Die beiden waren für mich nicht nur Tante und Onkel, sondern Familie und Freunde gleichzeitig, die mich auf meinem Weg stets unterstützt und bestärkt haben.

Wolfgang Pabst: Seine Beiträge können aus Platzgründen nur in Stichworten angegeben werden: trösten, motivieren, ablenken, Überleben sichern, Sinn geben...