

Zeitgeber im Nervensystem: Untersuchungen zur Wirkung von Melatonin auf Hippocampusfunktionen *in vitro*

Das photoneuroendokrine System der Ratte

Circadiane Rhythmen sind durch eine endogene Periodenlänge von ungefähr 24 Stunden charakterisiert, die unter konstanten Umweltbedingungen, also ohne tageszeitliche Information, bestehen bleiben. Verantwortlich für diese „circa-diane Uhr“ sind bei den Säugetieren bestimmte zentralnervöse Strukturen (Abb. 1, vgl. Vanecek, 1998). Das endogene rhythmusgebende Schrittmacherzentrum der Circadianperiodik befindet sich oberhalb der Kreuzung des Sehnerven im paarig angelegten Nucleus suprachiasmaticus (SCN). Die Synchronisation der inneren Uhr mit dem äußeren Tagesablauf erfolgt durch so genannte „Zeitgeber“. Der wichtigste natürliche Zeitgeber ist der Licht-Dunkel-Wechsel. Nach photischer Stimulation der Retina und Umwandlung in elektrische Aktivität werden die neuronalen Signale über direkte und indirekte Projektionen zum SCN weitergeleitet. Über efferente, z. T. multi-synaptische Projektionen steuert der SCN eine Vielzahl zyklischer Körper- und Gehirnfunktionen, darunter auch die Sekretion des vom Pinealorgan produzierten Hormons Melatonin. Dem circadianen Rhythmus der neuronalen Aktivität des SCN folgend, unterliegt die Melatonin-Sekretion tagesperiodischen Schwankungen. Dabei treten in der Nacht hohe und am Tag sehr niedrige Werte auf. Das endogene Schrittmacherzentrum, das die Synthese und Sekretion des Melatonins kontrolliert, ist zugleich auch ein Zielgebiet für „feedback“-Wirkungen des Hormons. So ist Melatonin in der Lage, die neuronale Aktivität im SCN zu

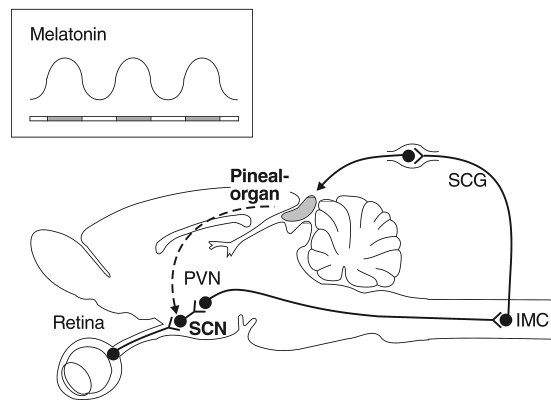


Abb. 1: Das circadiane System der Ratte. Photische Information gelangt von der Retina über den retino-hypothalamischen Trakt zum Nucl. suprachiasmaticus (SCN). Die Weiterleitung der Aktivität des SCN zum Pinealorgan erfolgt über Nucl. paraventricularis (PVN), Col. intermedio-lateralis (IMC) und Ggl. cervicale superior (SCG). Die rhythmischen Aktivitätsänderungen des SCN bewirken eine rhythmische Synthese und Freisetzung von Melatonin (s. Inset; graues Raster = Dunkelphase) (modifiziert nach Korf et al., 1996).

blockieren und darüber eine Synchronisierung als auch Phasenverschiebung im circadianen System zu bewirken (Stehle et al., 1989). Das Hormon Melatonin erfüllt damit die Aufgabe eines nicht photischen Zeitgebers für den SCN. Innerhalb des circadianen Systems stellt das Pinealorgan damit eine neuro-endokrine Schnittstelle dar, in der photische Informationen, vermittelt durch den SCN, in ein hormonelles Signal übersetzt wird.

Melatonin-Rezeptoren und ihre Verteilung im ZNS der Säugetiere

Melatonin kann eine Vielzahl von Prozessen beeinflussen, die mit der tages- und jahreszeitlichen

Regulation und Anpassung verschiedener physiologischer Funktionen zu tun haben (Vanecek,

* Institut für Physiologie des Universitätsklinikums Münster, Bundesrepublik Deutschland

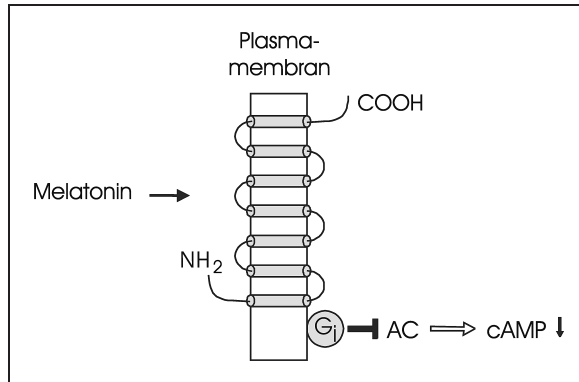


Abb. 2: Membrantopologie des Melatonin-Rezeptors. Der Rezeptor zählt zur Superfamilie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren. Kennzeichnend für diese Rezeptoren sind sieben Transmembran-Regionen (graue Zylinder). Die Melatonin-Rezeptoren modulieren über G_i-Proteine die Aktivität der Adenylatcyclase (AC).

1998). In physiologischen Konzentrationen werden die Wirkungen von Melatonin über hochaffine Rezeptoren vermittelt (Abb. 2). Bei Säugetieren wurden bisher die beiden Rezeptortypen MT₁ und MT₂ kloniert und näher charakterisiert (Reppert et al., 1994, 1996). Es handelt sich dabei um Plasmamembran-gebundene, G_i-Protein-gekoppelte Rezeptoren, die nach Aktivierung durch Melatonin in den Zellen inhibitorisch die Adenylatcyclase beeinflussen und darüber das „second messenger“-Molekül cAMP herunterregulieren.

Mit Hilfe verschiedener Nachweis-Methoden, wie z. B. in-vitro-Rezeptorautoradiographie und konventioneller Bindungsstudien, wurden Melatonin-Rezeptoren an spezifischen Stellen des Säugetiergehirns lokalisiert. Dabei konnte eine hohe Dichte von Melatonin-Rezeptoren im SCN (Weaver et al., 1989) sowie in der Pars tuberalis der Hypophyse (Williams und Morgan, 1988) nachgewiesen werden. Weitere Areale wurden im Kleinhirn, Pons, Thalamus, Hirnstamm und in der Retina (Vanecek, 1998) gefunden. Im mensch-

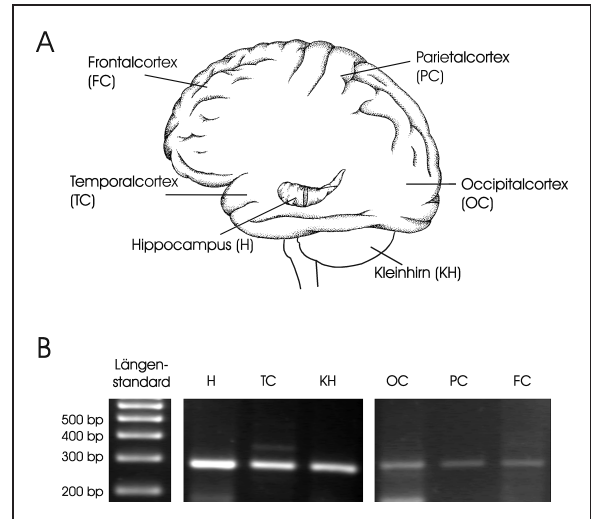


Abb. 3: Nachweis von Transkripten des MT₁-Rezeptors im menschlichen Gehirn. (A) Schematische Darstellung des menschlichen Gehirns mit Kennzeichnung der Regionen, in denen Transkripte für Melatonin-Rezeptoren nachgewiesen wurden. (B) Gelelektrophoretischer Nachweis der Transkripte aus autoptischen Hirngewebe mit Hilfe der RT-PCR-Technik. Es wurden Sonden (Primer) verwendet, die spezifisch für die humane cDNA-Sequenz des MT₁-Rezeptors sind. Das PCR-Produkt hat eine Länge von 285 Basenpaaren (bp) (Teil A modifiziert nach Kandel und Hawkins, 1992).

lichen Gehirn wurde eine hohe Dichte an Bindungsstellen im SCN gefunden (Reppert et al., 1988). Weiterhin wurden Transkripte für Melatonin-Rezeptoren mit Hilfe der Reversen-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) in praktischen allen Gebieten des cerebralen Cortex und im Hippocampus nachgewiesen (Abb. 3). Während Melatonin im circadianen System eine Rolle als nicht photischer Zeitgeber besitzt, ist die funktionelle Bedeutung der Melatonin-Rezeptoren in Bereichen des ZNS, die nicht unmittelbar zum circadianen System zählen, weitgehend unbekannt.

Der Hippocampus: Morphologischer Aufbau und funktionelle Bedeutung

Die Hippocampus-Formation ist eine der am genauesten charakterisierten corticalen Strukturen des Säugetiergehirns (vgl. Brown und Zador, 1990). Das Interesse an dieser corticalen Struktur entstammt dabei nicht nur seiner wesentlichen Beteiligung an verschiedenen neurologischen Erkrankungen (z. B. Epilepsie und Alzheimer), sondern

auch seiner elementaren Bedeutung für bestimmte kognitive Prozesse.

Als Teil des limbischen Systems bildet die Hippocampus-Formation eine bilateral auftretende, zylindrische Struktur (Abb. 4A), dessen longitudinale Achse einen Halbkreis um den Thalamus bildet. Die stereotyp wiederholte Mikroarchitektur

soll im Folgenden an einem schematisch dargestellten Gewebeschnitt erläutert werden, der transversal zur longitudinalen Achse orientiert ist (Abb. 4B). Der überwiegende Teil des Hippocampus besteht aus der CA3- und der CA1-Region. Mit dem Gyrus dentatus, dem Subiculum und dem entorhinalen Cortex bilden sie die sog. Hippocampus-Formation. Sowohl der Hippocampus als auch der Gyrus dentatus zeigen eine Gliederung der einzelnen Regionen in drei Hauptschichten: Stratum oriens mit zahlreichen basalen Dendriten, Str. pyramidale mit den Zellkörpern sowie Str. radiatum mit Str. lacunosum-moleculare, die die proximalen und distalen Dendriten der Pyramidenzellen umfassen.

Die wichtigsten neuronalen Verschaltungen der Hippocampus-Formation sind in Abbildung 4B dargestellt. Direkte Afferenzen aus dem entorhinalen Cortex erreichen die Hippocampus-Formation über den Tractus perforans. Dieser projiziert auf dendritische Anteile der Körnerzellen des Gyrus dentatus. Die Axone der Körnerzellen, die zusammengefasst als Moosfasern bezeichnet werden, enden wiederum auf dendritischen Bereichen der CA3-Pyramidenzellen. Die Axone der CA3-Pyramidenzellen entsenden zum einen Efferenzen durch den Fornix in corticale und subcorticale Gebiete, zum anderen projizieren sie über die Schaffer-Kollateralen zu den Dendriten der Pyramidenzellen der CA1-Region. Die Fasern der CA1-Pyramidenzellen wiederum bilden Efferenzen, die durch den Fornix in corticale und subcorticale Gebiete gelangen und gleichzeitig direkt oder indirekt über Neurone des Subiculus auf Bereiche des entorhinalen Cortex projizieren.

Die Hippocampus-Formation ist von zentraler Bedeutung für kognitive Vorgänge, die mit Lernen und Gedächtnisbildung im Zusammenhang stehen (Knight, 1996; Squire, 1992). Entsprechend können Patienten mit bilateralen Läsionen des Hippocampus zwar Gedächtnisinhalte aus dem Langzeitgedächtnis abrufen, allerdings ist es ihnen nicht mehr möglich, neue Inhalte aus dem Kurzzeitgedächtnis in das deklarative Langzeitgedächtnis zu überführen (Milner, 1966). Diese Unfähigkeit zur Konsolidierung neuer Gedächtnisinhalte wird als anterograde Amnesie bezeichnet. Bei Ratten spielt die Hippocampus-Formation eine ähnlich wichtige Rolle bei der Gedächtniskonsoli-

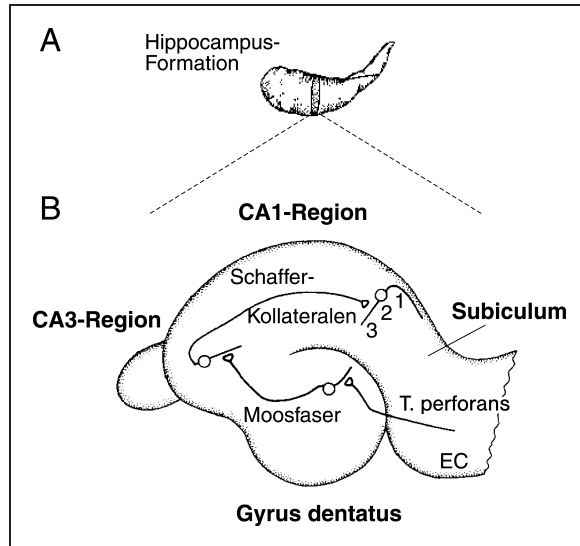


Abb. 4: Schematische Darstellung der wichtigsten neuronalen Verbindungen in der Hippocampus-Formation. Das Eingangssystem (Tractus perforans) kommt aus dem entorhinalen Cortex (EC). Die Information gelangt über drei synaptische Schaltstellen teilweise zum EC zurück. Die drei Hauptschichten sind durch Zahlen dargestellt (1: Stratum oriens, 2: Stratum pyramidale, 3: Stratum radiatum und Stratum lacunosum-moleculare) (modifiziert nach Kandel und Hawkins, 1992).

dierung. Funktionelle oder strukturelle Läsionen führen bei diesen Tieren zu einer starken Beeinträchtigung in der räumlichen Orientierung.

In tierexperimentellen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass Lernvorgänge mit plastischen Veränderungen an den Nervenzellen des Hippocampus einhergehen (vgl. Brown und Zador, 1990; Nicoll et al., 1988). Ein mögliches zelluläres Korrelat solcher lernbedingter plastischer Veränderungen zeigt sich darin, dass hochfrequente Stimulationen von Fasern des Hippocampus die synaptische Übertragung über längere Zeiträume verstärken können. Diese aktivitätsabhängige Verstärkung in der synaptischen Übertragung wird als „long term potentiation“ (LTP) bezeichnet. In Untersuchungen an Gewebeschnitt-Präparaten des Hippocampus zeigte sich, dass LTP, auch unter diesen in-vitro-Bedingungen, an den wesentlichen synaptischen Kontakten (Tractus perforans/Körnerzellsynapse; Moosfaser/CA3-Synapse; Schaffer-Kollateral/CA1-Synapse) auslösbar ist (Brown und Zador, 1990).

Nachweis und Charakterisierung von Melatonin-Rezeptoren im Hippocampus der Ratte

Der molekularbiologische Nachweis und die funktionelle Charakterisierung von Melatonin-Rezeptoren der Hippocampus-Formation erfolgte mit Hilfe zweier methodischer Ansätze, die schematisch in Abbildung 5 dargestellt sind:

- Zur Analyse der Genexpression von MT_1 - und MT_2 -Rezeptoren wurde das Verfahren der Reversen-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) angewandt (Abb. 5A). Dabei werden Transkripte für die Melatonin-Rezeptoren aus dem hippocampalen Gewebe isoliert, in cDNA revers transkribiert und mit Hilfe spezifischer Sonden in der Polymerase-Kettenreaktion amplifiziert. Der Nachweis der PCR-Produkte erfolgte gelelektrophoretisch.
- Die elektrophysiologische und pharmakologische Charakterisierung der Melatonin-Rezeptoren erfolgte im heterologen Expressionssystem der *Xenopus*-Oozyten (Abb. 5B). Dabei werden Transkripte aus dem hippocampalen Gewebe isoliert, in Oozyten des südafrikanischen

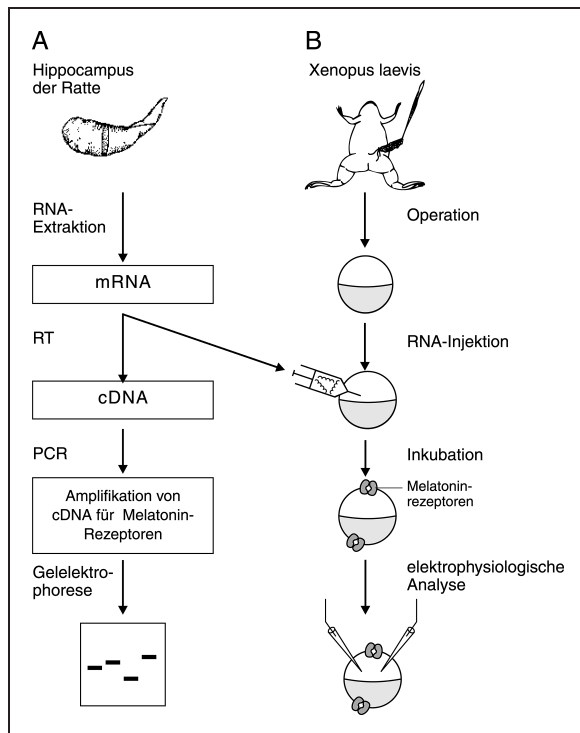


Abb. 5: Methodische Vorgehensweise zum molekularen Nachweis (A) und zur funktionellen Charakterisierung (B) der Melatonin-Rezeptoren. Es sind die wesentlichsten Schritte dargestellt. RT: Reverse-Transkriptase-Reaktion, PCR: Polymerase-Kettenreaktion.

Krallenfrosches *Xenopus laevis* injiziert und die durch Melatonin induzierten Reaktionen mit der Zwei-Elektroden-Spannungsklemmtechnik registriert.

Genexpression von MT_1 - und MT_2 -Rezeptoren in der Hippocampus-Formation

Mit Hilfe der RT-PCR-Technik wurden Transkripte für den MT_1 - und den MT_2 -Rezeptortyp im hippocampalen Gewebe nachgewiesen (Abb. 6; vgl. Musshoff et al., 2002). Bei Anwendung MT_1 -spezifischer Sonden konnte aus der hippocampalen cDNA/mRNA ein PCR-Produkt amplifiziert wer-

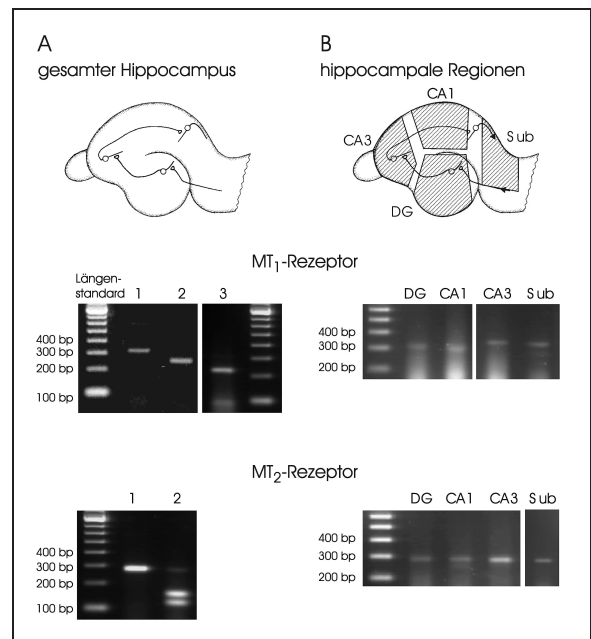


Abb. 6: Gelelektrophoretischer Nachweis der Transkripte für die MT_1 - und MT_2 -Rezeptoren im hippocampalen Gewebe der Ratte. Der Nachweis erfolgt mit Hilfe der RT-PCR-Technik. Es wurden Sonden (Primer) verwendet, die spezifisch für die Ratten-cDNA-Sequenzen des MT_1 -Rezeptors (Spur 1, PCR-Produkt: 329 Basenpaare) und des MT_2 -Rezeptors (Spur 1, PCR-Produkt: 292 Basenpaare) sind. Spezifitätskontrollen erfolgen über Restriktionsenzym-Analyse des PCR-Produktes für MT_1 (MseI, Spur 2) und MT_2 (MfeI, Spur 2) sowie durch eine „nested“ PCR mit einem intern gelegenen Primer für das MT_1 -spezifische PCR-Produkt (Spur 3). Die isolierten hippocampalen Regionen sind grau schraffiert dargestellt.

den, das der erwarteten Länge von 329 Basenpaaren (bp) entsprach (Abb. 6A oben, Spur 1). Zur Spezifitätskontrolle wurden zwei Tests durchgeführt: (a) nach Behandlung wurde mit dem Restriktionsenzym MseI das PCR-Produkt in die erwarteten Fragmente der Länge 233 und 96 bp geschnitten (Spur 2), (b) es wurde eine verschachtelte („nested“) PCR mit einem intern gelegenen Primer durchgeführt. Die Reamplifikation des PCR-Produktes ergab ein Produkt in der erwarteten Länge von 260 bp (Spur 3). Die Anwendung MT₂-spezifischer Sonden führte ebenfalls zu einem positiven Nachweis (Abb. 6A unten, Spur 1). Das PCR-Produkt in der erwarteten Länge von 292 bp wurde nach Behandlung mit dem Restriktionsenzym MfeI in die zu erwartenden Fragmente der Länge 161 und 131 bp geschnitten (Spur 2). Zum Nachweis der Genexpression in den verschiedenen hippocampalen Regionen wurden aus Hippocampus-Gewebeschnitten die entsprechenden Anteile herausgetrennt und jeweils gesondert analysiert (Abb. 6B). Dabei zeigte sich, dass Transkripte für beide Rezeptortypen in allen hippocampalen Regionen, also im Gyrus dentatus, in der CA3- und CA1-Region sowie im Subiculum vorhanden sind (Abb. 6B).

Funktionelle Expression hippocampaler MT₁-Rezeptoren in Xenopus-Oozyten

Die Injektion hippocampaler mRNA-Lösung in Xenopus-Oozyten führte bei ca. 50 % der Oozyten ($n = 26/51$) zur funktionellen Expression Melatonin-sensitiver Rezeptoren (vgl. Musshoff et al., 2002). Demgegenüber zeigten unbehandelte Oozyten und solche, denen Aqua bidest. zur Kontrolle injiziert wurden, keine Reaktionen auf die Applikation von Melatonin ($n = 30$). Eine typische Stromantwort auf die Applikation von Melatonin ist in Abbildung 7 dargestellt. Es kommt dabei zu oszillierenden, transmembranösen Einwärtsströmen, die in der Regel nach Applikationsbeginn verzögert auftraten (20. . .60 s) und in den meisten Fällen über das Applikationsende hinaus persistierten (bis zu 60 min).

In einer Serie von Experimenten wurden elektrophysiologische Charakteristika der durch die Melatonin-Rezeptoren induzierten Stromantworten analysiert. Eine Zusammenfassung der Ergebnisse ist in Abbildung 8 wiedergegeben (vgl. Fi-

scher et al., 1996). Danach führt die Injektion von hippocampaler mRNA zur funktionellen Expression von Melatonin-Rezeptoren mit folgenden Eigenschaften:

- der Melatonin-Rezeptor ist an ein Pertussis-toxin-sensitives G-Protein gekoppelt (Abb. 8A);
- die oszillierenden Einwärtsströme sind Calcium-aktivierte Chlorionenströme, da (a) das Umkehrpotenzial des Ionenstromes von ca. -35 mV in der Nähe des Umkehrpotenzials von Chlorionen liegt (Abb. 8B), (b) der Ionenstrom durch den Chlorid-Kanalblocker 9-Anthracencarbonsäure unterdrückt wird (Abb. 8C) und (c) der Ionenstrom durch den IP₃-Rezeptorblocker Coffein blockiert wird (Abb. 8D);
- der Melatonin-Rezeptor beeinflusst nicht den cAMP-Signalweg, da Forskolin-stimulierte Reaktionen durch Melatonin nicht verändert werden (Abb. 8E).

Zur pharmakologischen Charakterisierung der heterolog exprimierten Melatonin-Rezeptoren wurden verschiedene Rezeptorantagonisten eingesetzt (Abb. 9; vgl. Blumenau et al., 2001). Dabei führte die simultane Applikation von Melatonin mit 2-Phenylmelatonin (MT₁/MT₂-Antagonist) oder Luzindol (MT₁/MT₂-Antagonist) zur vollständigen Blockade der Melatonin-Antwort. Der für den MT₂-Rezeptor selektivere Antagonist 4-P-PDOT zeigte dagegen

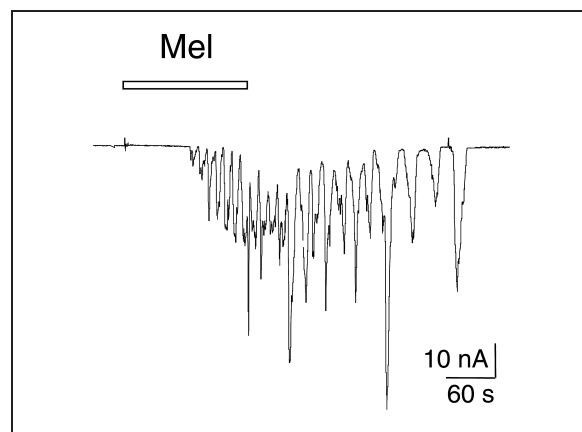


Abb. 7: Transmembranöse Ionenströme nach Applikation von Melatonin. Die oszillierenden Ionenströme wurden an Oozyten von *Xenopus laevis* am 5. Tag nach Injektion von mRNA aus dem Hippocampus der Ratte durch Melatonin (Mel; $10 \mu\text{mol/l}$) ausgelöst. Die Ionenströme wurde mit der Zwei-Elektroden-Spannungsklemm-Technik bei einem Haltepotenzial von -70 mV registriert. Deflektion nach unten: Einwärtsstrom. Horizontaler Balken: Applikationsdauer.

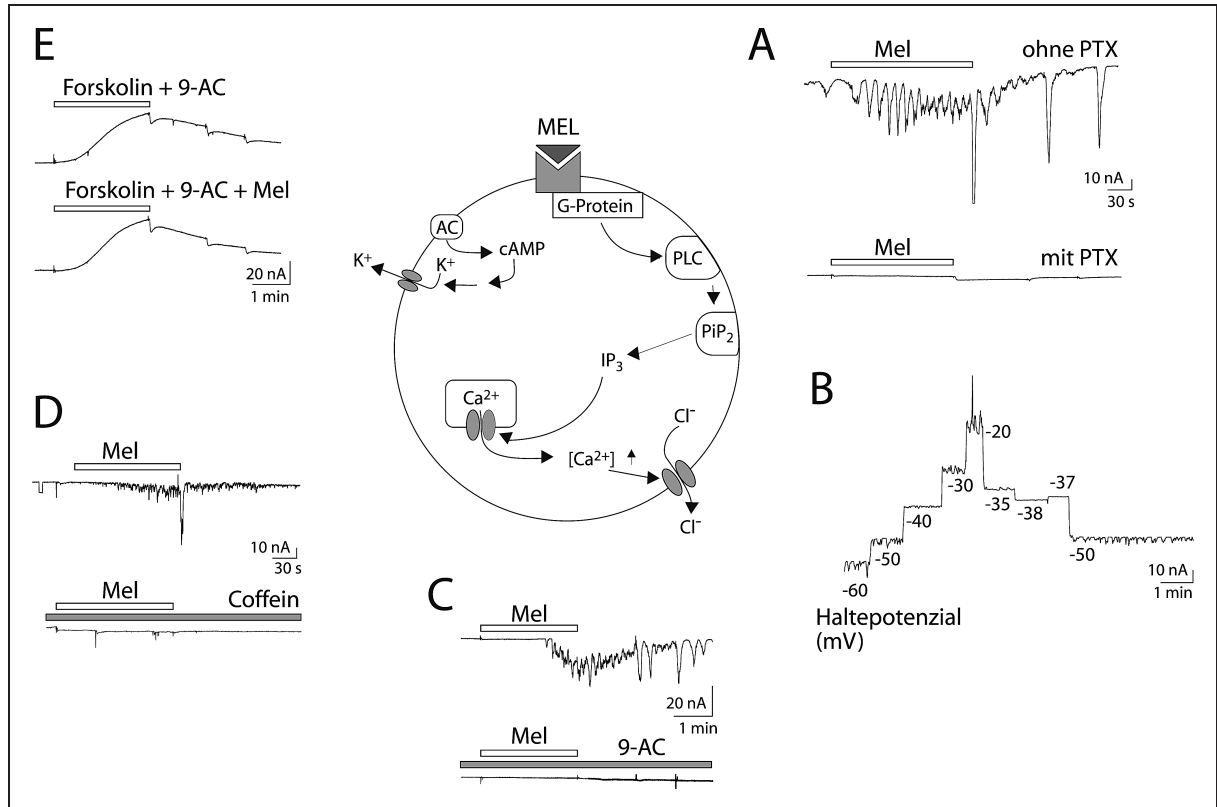


Abb. 8: Charakterisierung der Melatonin-induzierten Ionenströme. (A) Nach Inkubation mit Pertussistoxin (PTX) sind die oszillierenden Ionenströme nicht mehr auslösbar. (B) Das Umkehrpotential der oszillierenden Ionenströme liegt in der Nähe des Umkehrpotentials für Chlorionen. (C) Der Chlorionenkanal-Blocker Anthracencarbonsäure (9-AC) unterdrückt die oszillierenden Ionenströme. (D) Coffein blockiert die Freisetzung von Ca^{2+} aus IP_3 -sensitiven Speichern und verhindert damit die Ausbildung der oszillierenden Ionenströme. (E) Bei bestehender Blockade der oszillierenden Ionenströme durch 9-AC wird der Forskolin-induzierte Auswärtsstrom durch Melatonin nicht beeinflusst. – Die Untersuchungen wurden an unterschiedlichen mRNA-injizierten Oozyten durchgeführt. Konzentration von Melatonin: 10...100 $\mu\text{mol/l}$. Die Ionenströme wurden mit der Zwei-Elektroden-Spannungsklemm-Technik bei einem Haltepotential von -70 mV (außer in B) registriert. Ausschlag nach unten: Einwärtsstrom. Horizontaler Balken: Applikationsdauer (modifiziert nach Fauteck et al., 1997).

keinen wesentlichen Einfluss auf die Melatonin-Antwort. Die pharmakologische Analyse deutet damit auf eine überwiegende, wenn nicht ausschließliche Expression von MT_1 -Rezeptoren hin. Eine solche pharmakologische Charakterisierung erlaubt allerdings nur eingeschränkte Aussagen, da kommerziell verfügbare Melatoninrezeptor-Antagonisten keine eindeutige Differenzierung zwischen MT_1 - und MT_2 -Rezeptoren gewährleisten. Es wurden daher ergänzend Untersuchungen durchgeführt, die eine selektive Inhibierung der MT_1 -Rezeptorexpression durch Einsatz MT_1 -spezifischer antisense-Moleküle zum Ziel hatten. Für diese Versuchsserie musste allerdings aufgrund der höheren Expressionsrate für Melatonin-Rezeptoren mRNA aus dem Gesamt-Rattenhirn verwendet werden. Ei-

ne vergleichende funktionelle und pharmakologische Analyse der exprimierten Melatonin-Rezeptoren aus Gesamtgehirn und Hippocampus zeigte dabei keine Unterschiede. Die Ergebnisse der antisense-Experimente sind in Abbildung 10 dargestellt (vgl. Blumenau et al., 2001). In der Kontrollgruppe (mRNA + Aqua bidest.) zeigten 83 % der Oozyten eine funktionelle Rezeptorexpression. Demgegenüber zeigte die antisense-Gruppe (mRNA + antisense- MT_1) eine signifikant reduzierte Rezeptorexpression auf 13 %. Die Fähigkeit der Oozyten zur Translation heterologer mRNA war dabei sowohl in der Kontroll- wie auch in der antisense-Gruppe prinzipiell vorhanden, da die Expressionsrate für den Glutamat-Rezeptor vom AMPA-Typ in beiden Gruppen zu 100 % vorlag.

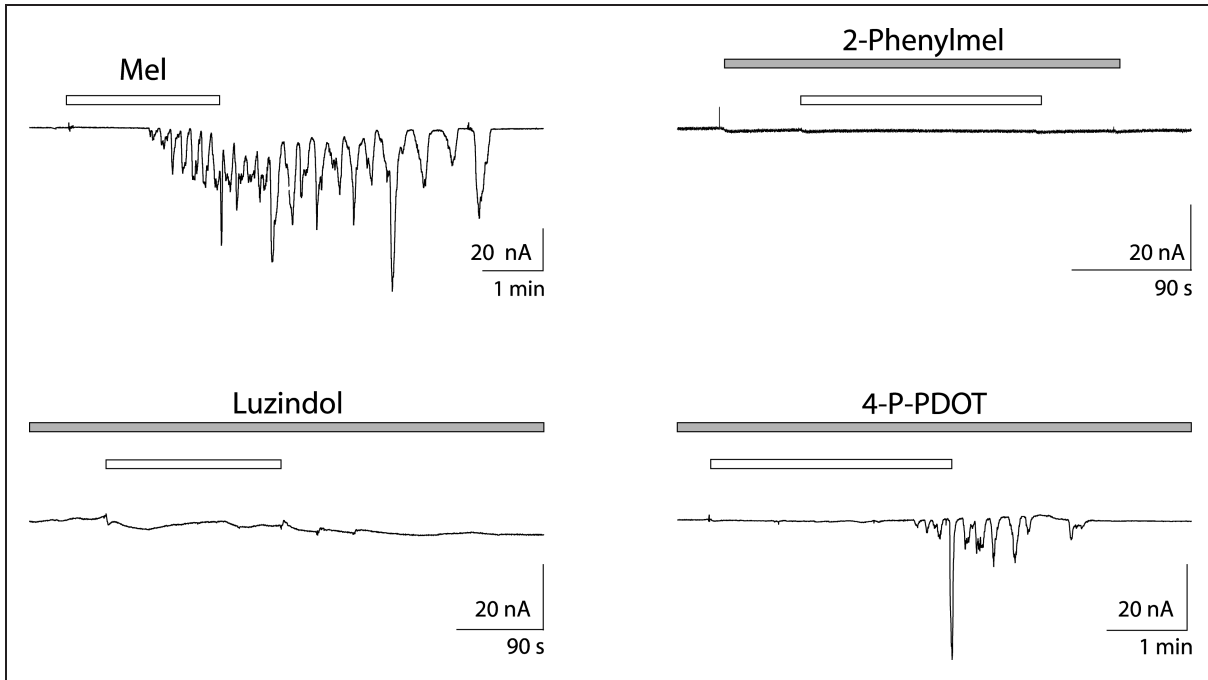


Abb. 9: Pharmakologische Charakterisierung der heterolog exprimierten Melatonin-Rezeptoren. Die durch Melatonin (10...100 $\mu\text{mol/l}$) ausgelösten transmembranösen Ionenströme werden durch die Rezeptorantagonisten 2-Phenylmelatonin (100 $\mu\text{mol/l}$) und Luzindol (50 $\mu\text{mol/l}$) blockiert, während 4-P-PDOT keinen Einfluss auf die durch Melatonin ausgelösten Ionenströme hat. Die Ionenströme wurden mit der Zwei-Elektroden-Spannungsklemm-Technik bei einem Haltepotenzial von -70 mV registriert. Ausschlag nach unten: Einwärtsstrom. Horizontaler Balken: Applikationsdauer (modifiziert nach Musshoff et al., 2002).

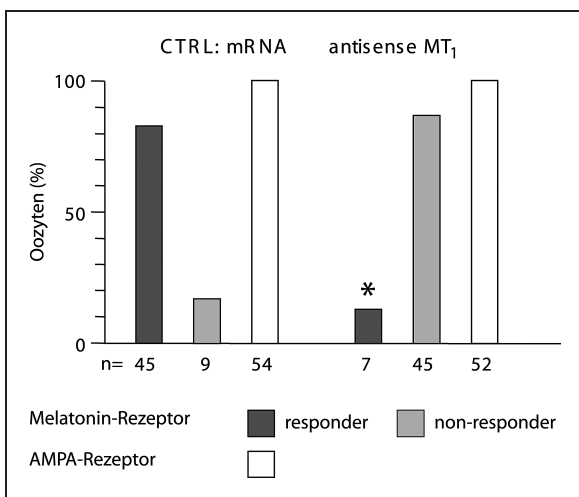


Abb. 10: Molekularbiologische Charakterisierung der heterolog exprimierten Melatonin-Rezeptoren. Funktionelle Expression von Melatonin-Rezeptoren nach Injektion von mRNA aus dem Gesamtgehirn der Ratte (CTRL: mRNA) und nach Co-Injektion von mRNA und antisense-RNA, spezifisch für MT₁. Responder: Membranstrom auf Applikation des Agonisten; non-responder: kein Membranstrom auf Applikation des Agonisten. Der AMPA-Rezeptor ist ein Subtyp des Glutamat-Rezeptors.

Wirkungen von Melatonin auf Hippocampusfunktionen *in vitro*

Untersuchungen an Hippocampi *in vivo* haben zwar den Vorteil, dass die Mehrzahl der neuronalen Verbindungen und damit die physiologischen Funktionen erhalten bleiben, jedoch ist die differenzierte Analyse einzelner Faktoren hierbei schwierig und bei manchen Fragestellungen un-

möglich. Aus diesem Grunde erfolgte in den vorliegenden Experimenten die funktionelle Analyse an hippocampalen Gewebeschnittpräparaten. Diese *in-vitro*-Präparate stellen ein gängiges und wohl etabliertes „Modell“ in der experimentellen Neurophysiologie dar. Bei der Gewebeschnitt-

Technik werden die aus dem Gehirn entnommenen Hippocampi in 500 µm dicke Schnitte zerlegt und in künstlicher Zerebrospinalflüssigkeit bei ständiger Sauerstoffzufuhr und konstanter Temperatur gehalten. Unter diesen Bedingungen überleben die Schnittpräparate bis zu 18 Stunden. Aufgrund der stereotyp wiederholten Mikroarchitektur bleiben in den Gewebeschnitten wesentliche neuronale Verbindungen erhalten, an denen sich physiologische Reaktionen untersuchen lassen.

Folgende neuronale Funktionen im Hippocampus wurden hinsichtlich einer möglicher Beeinflussbarkeit durch Melatonin analysiert:

- Einfluss von Melatonin auf die Spontanaktivität (Aktionspotenziale) der Nervenzellen;
- Einfluss von Melatonin auf die synaptische Aktivität (synaptische Potenziale) der Nervenzellen.

Die Untersuchungen konzentrierten sich dabei auf neuronale Vorgänge an den CA1-Pyramidenzellen. Dabei wurde die neuronale Reagibilität dieser Zellen auf Melatonin auch hinsichtlich tageszeitabhängiger Prozesse untersucht. Dazu wurden die Tiere unter definierten Licht-Dunkel-Bedingungen (LD 12/12 Std.) gehalten. Die Präparation der hippocampalen Gewebeschnitte erfolgte zu den Zeitpunkten („zeitgeber time“, ZT) ZT 3 bzw. 8 („Tag“) und ZT 15 („Nacht“), wobei die Lichtperiode mit ZT 0 einsetzt. Ein Teil der Versuche wurde an Tieren durchgeführt, die für 6 Wochen in einem inversen LD-Rhythmus gehalten wurden. Die Präparation erfolgte hier bei ZT 13 („subjektive Nacht“).

Melatonin beeinflusst die spontane Entladungsrate von CA1-Neuronen

Spontane neuronale Aktivität wurde mit Hilfe von Glasmikroelektroden aus dem Stratum pyramidale der CA1-Region abgeleitet. Die Anordnung der Feldpotenzial-Elektrode im Gewebeschnitt sowie eine typische Folge von Aktionspotenzialen (AP) ist in Abb. 11A dargestellt (vgl. Musshoff et al., 2002). Die spontane Entladungsrate war in den Gewebeschnitten sehr variabel (18...1373 AP/min), wobei zwischen den Tag- und den Nachtversuchen keine signifikanten Unterschiede auftraten. Die Überspülung der hippocampalen Gewebeschnitte mit Melatonin (1 µmol/l) für 10 min führte bei den Tagversuchen zu keiner wesentlichen Ände-

rung in der Entladungsfrequenz (Abb. 11B). Im Gegensatz dazu führte die Applikation von Melatonin bei den Nachtversuchen zu einer stark ansteigenden ($\approx 700\%$) und lang andauernden Erhöhung der Entladungsfrequenz (Abb. 11C). Die durch Melatonin induzierte Erhöhung der Frequenz während der Nachtversuche konnte durch den Melatonin-Rezeptorantagonisten Luzindol (10 µmol/l) vollständig unterdrückt werden (Abb. 11C).

Melatonin beeinflusst die spontane Entladungsrate von CA1-Neuronen über synaptische Mechanismen

Die rezeptorvermittelten Wirkungen von Melatonin auf die spontane Entladungsrate der CA1-Pyramidenzellen können grundsätzlich durch zwei alternative Mechanismen erklärt werden:

- Melatonin-Rezeptoren sind in den CA1-Pyramidenzellen exprimiert und modulieren direkt die Erregbarkeit der CA1-Zellen.
- Melatonin-Rezeptoren sind in anderen Zellen des neuronalen Netzwerkes exprimiert und modulieren indirekt die Erregbarkeit der CA1-Zellen über eine Beeinflussung synaptischer Prozesse.

Um die erste Möglichkeit zu testen, wurde die Genexpression von MT_1 -Rezeptoren in einzelnen CA1-Nervenzellen mit Hilfe der sog. „single cell“-PCR-Technik analysiert. Das Verfahren ist in Abbildung 12A schematisch dargestellt. Es wurde die CA1-Region herausgetrennt und die Zellen wurden durch Enzymbehandlung aus dem Zellverband isoliert. Nach dem Aufsaugen jeweils einzelner Pyramidenzellen in eine Glaselektrode (Abb. 12B) wurde der Zellinhalt in ein Reaktionsgefäß überführt und damit abschließend eine RT-PCR-Reaktion durchgeführt. Die Auswertung von insgesamt 12 isolierten CA1-Pyramidenzellen aus Nachttieren zeigte, dass keine mRNA-Moleküle für den MT_1 -Rezeptortyp in den Zellen vorliegen (Abb. 12C).

Um die zweite Möglichkeit zu testen, wurde die spontane Entladungsrate der CA1-Pyramidenzellschicht unter pharmakologischer Blockade der exzitatorischen synaptischen Übertragung abgeleitet. Die experimentelle Vorgehensweise soll anhand der Abbildung 13A erläutert werden. Die synaptische Übertragung an der Schaffer-Kollateral/

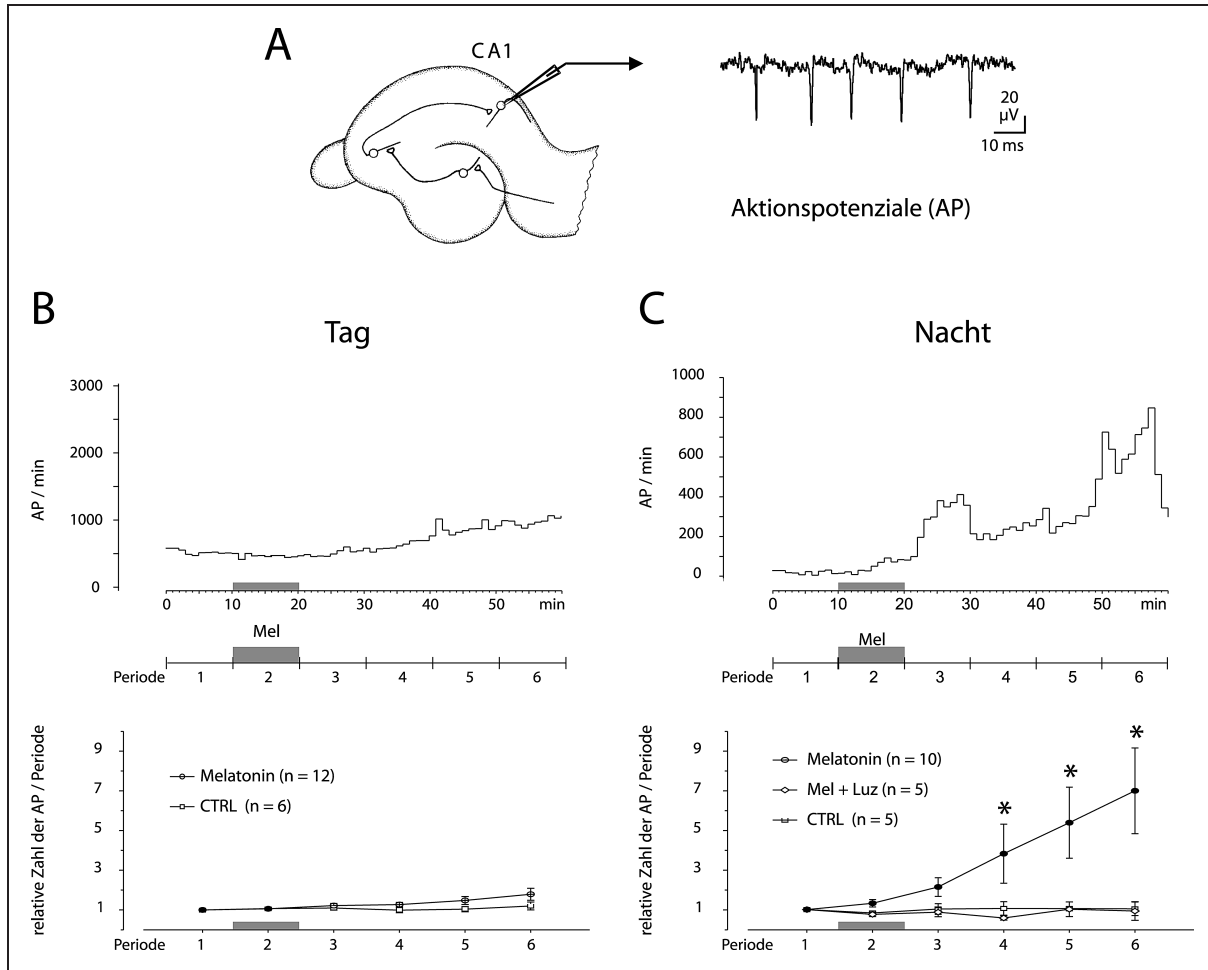


Abb. 11: Tageszeitabhängige Modulation der spontanen Entladungsrates von CA1-Neuronen durch Melatonin. (A) Schematische Darstellung der extrazellulären Ableitung von Aktionspotentialen (AP; Originalregistrierung) mit Glasmikroelektroden aus einem Hippocampus-Gewebeschnitt (Dicke: 500 μ m) der Ratte. (B) Effekt von Melatonin (graues Raster, 1 μ mol/l) auf die spontane Entladungsrates von CA1-Neuronen am Tag. Obere Grafik: Auswertung eines typischen Einzelversuchs. Untere Grafik: Zusammenfassung aller Versuche. Die Präparation erfolgte zum Zeitpunkt ZT 3 oder 8. (C) Effekt von Melatonin (graues Raster, 1 μ mol/l) auf die spontane Entladungsrates von CA1-Neuronen in der Nacht. Obere Grafik: Auswertung eines typischen Einzelversuchs. Untere Grafik: Zusammenfassung aller Versuche. Die Präparation erfolgte zum Zeitpunkt ZT 15 (modifiziert nach Musshoff et al., 2002).

CA1-Synapse lässt sich durch Reizung der Schaffer-Kollaterale und Registrierung der Reizantwort im Stratum pyramidale der CA1-Region analysieren. Nach Reizung der Fasern kann man in der nachgeschalteten Pyramidenzelle mit Hilfe einer Feldpotential-Elektrode einen „population spike“ ableiten. Hierbei handelt es sich um eine Überlagerung des synaptischen Potentials (genauer ausgedrückt: exzitatorischen postsynaptischen Potentials, EPSP) und gruppierten Aktionspotentialen. Eine pharmakologische Blockade der erregenden synaptischen Übertragung lässt sich durch spezifische Antagonisten für Glutamat-Re-

zeptoren hervorrufen. Dabei blockieren die Antagonisten APV (Aminophosphonovalerat) und CNQX (6-Cyano-7-Nitroquinoxalin-2,3-Dion) die NMDA- und AMPA-gesteuerten Glutamat-Rezeptortypen. Wenn nach längerer Einwirkung der Antagonisten der population spike nicht mehr registrierbar ist, kann davon ausgegangen werden, dass die synaptische Übertragung vollständig blockiert ist (Abb. 13B). Unter diesen Bedingungen generieren die CA1-Pyramidenzellen allerdings weiterhin spontane Aktionspotenziale. Appliziert man nun bei bestehender synaptischer Blockade Melatonin, so führt dies zu keiner Steigerung in

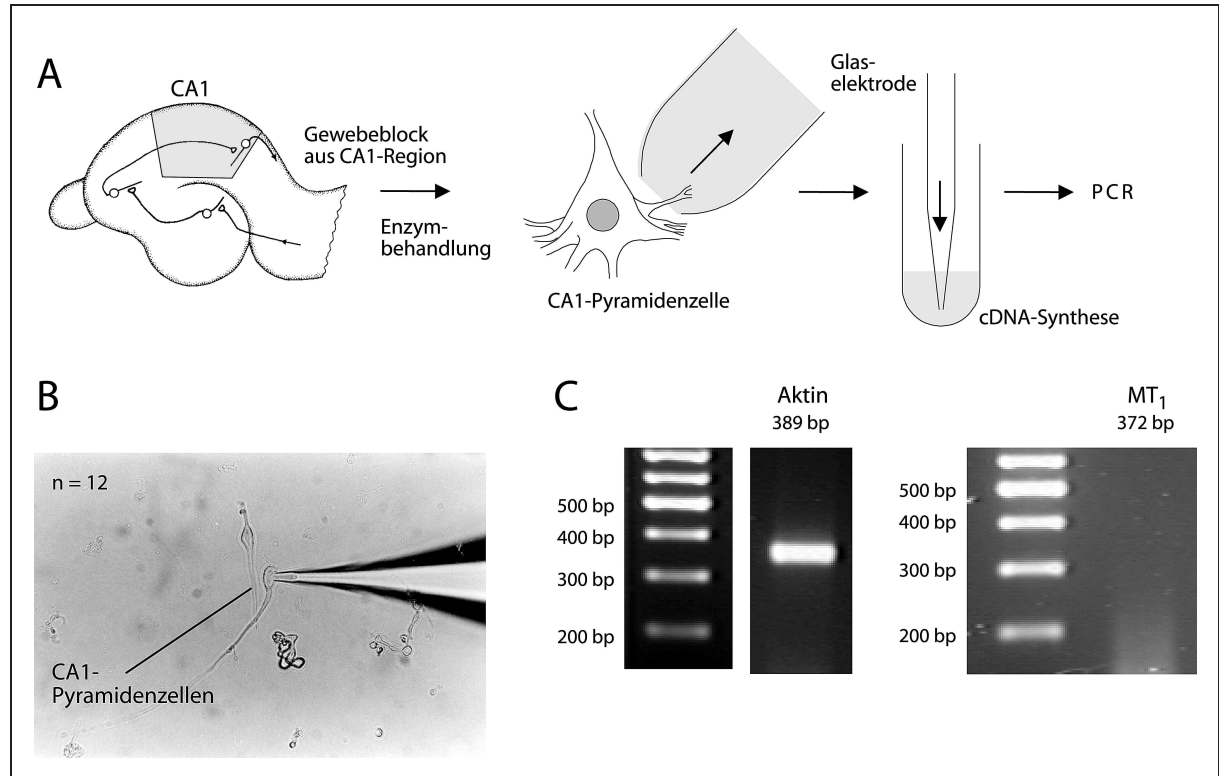


Abb. 12: Fehlende Genexpression für den MT_1 -Rezeptor in einzelnen CA1-Neuronen. (A) Methodisches Vorgehen bei der Isolierung von CA1-Neuronen und der Durchführung der „single cell PCR“. Die Präparation der Zellen erfolgte während der subjektiven Nacht. (B) Die fotografische Aufnahme zeigt den Moment des Aufsaugens einer CA1-Zelle in die Glaselektrode. (C) Gelelektrophoretischer Nachweis der Transkripte für den MT_1 -Rezeptor im hippocampalen Gewebe der Ratte. Es wurden Sonden verwendet, die spezifisch für die Ratten-cDNA-Sequenzen des MT_1 -Rezeptors sind. Zur Kontrolle wurden Sonden für β -Actin eingesetzt.

der Frequenz der Aktionspotenziale (Abb. 13C). Damit deuten die Experimente darauf hin, dass Melatonin über die zweite, oben aufgeführte Möglichkeit, also die Beeinflussung synaptischer Übertragungsmechanismen, die Erregbarkeit der CA1-Pyramidenzellen moduliert.

Melatonin beeinflusst die synaptische Übertragung an der Schaffer-Kollateral/CA1-Synapse

In einem nächsten Schritt wurde die Wirkungsweise von Melatonin auf die synaptische Übertragung an der Schaffer-Kollateral/CA1-Synapse getestet. Die experimentelle Vorgehensweise soll anhand der Abbildung 14A erläutert werden. Durch elektrische Reizung der Schaffer-Kollateralen wird in den dendritischen Bereichen der CA1-Pyramidenzellen (Stratum radiatum) ein EPSP evoziert, das

sich durch Feldpotential-Elektroden ableiten lässt. Die Wirkung von Melatonin auf die Steigung bzw. Amplitude des EPSP wurde in Abhängigkeit von der Tageszeit untersucht.

Die Applikation von Melatonin (10 nmol/l) führte gegenüber Kontrollversuchen (ohne Melatonin) zu keinen Veränderungen des EPSP bei Versuchen während der subjektiven Nacht (Präparation: ZT 13; Abb. 14B). Demgegenüber kommt es jedoch zu einer deutlichen Steigerung um ca. 120% in der Steigung bzw. Amplitude des EPSP bei Versuchen, die während des Tages durchgeführt wurden (Präparation: ZT 2; Abb. 14C). Dieser Effekt blieb unter der Melatonin-Applikation (insgesamt 60 min) bestehen und war reversibel (Daten nicht gezeigt). Der durch Melatonin hervorgerufene „Verstärkungseffekt“ bei den Tagversuchen ist offensichtlich über Rezeptoren vermittelt, da durch gleichzeitige Gabe von Melatonin und Luzindol dieser Effekt unterdrückt werden konnte (Abb. 14C).

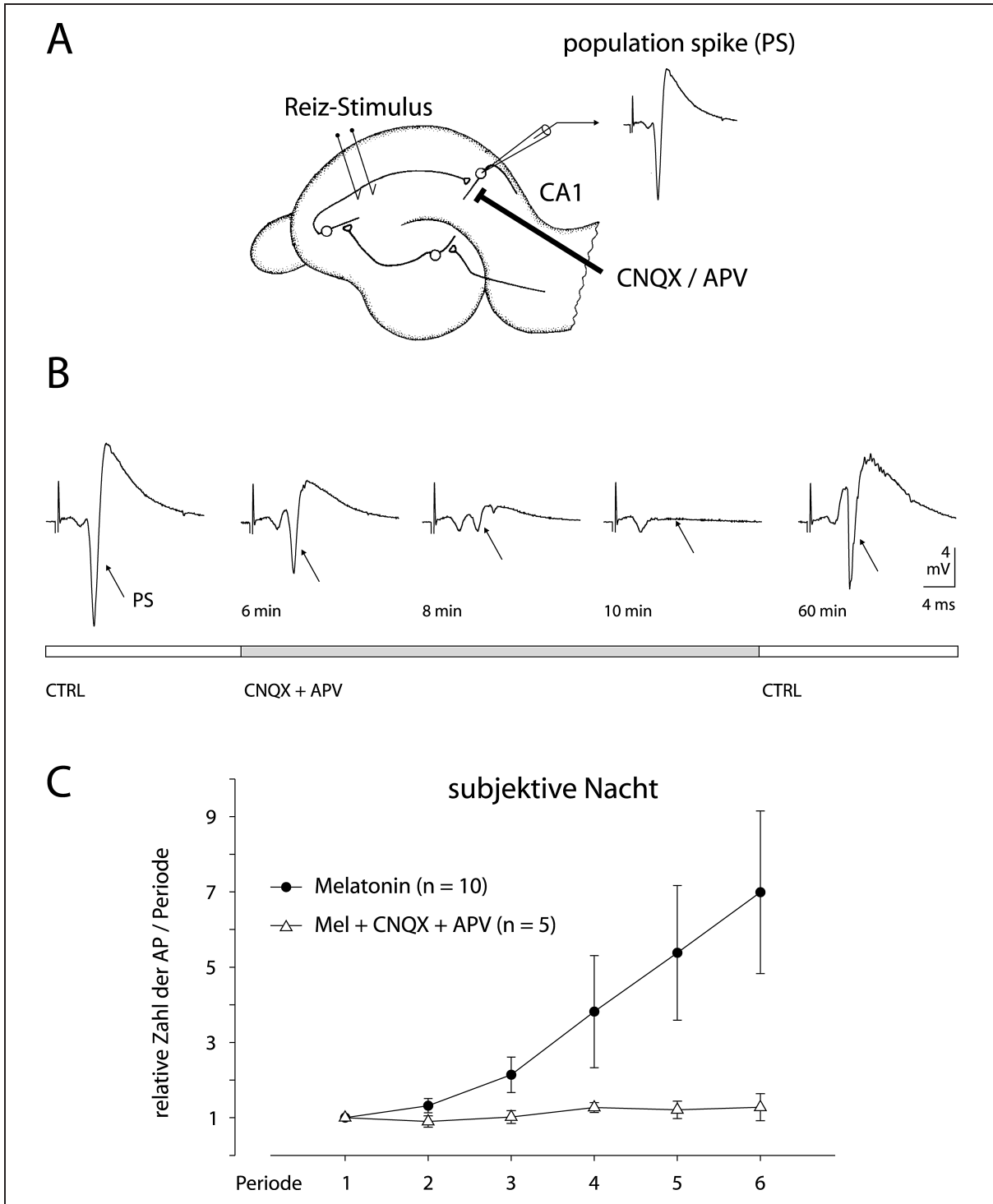


Abb. 13: Fehlende Modulation der spontanen Entladungsrates von CA1-Neuronen durch Melatonin bei synaptischer Blockade. (A) Schematische Darstellung der Versuchsanordnung. Reizelektroden stimulieren die Schaffer-Kollaterale und verursachen einen „population spike“ (PS, Originalregistrierung) im Stratum pyramidale der CA1-Region. Die Glutamat-Rezeptorantagonisten APV und CNQX blockieren die erregende synaptische Übertragung im Stratum radiatum. (B) Registrierungen von PS im Stratum pyramidale nach Einwaschen der Antagonisten. Der PS ist nach 10 min vollständig unterdrückt. (C) Effekt von Melatonin ($1 \mu\text{mol/l}$, appliziert in Periode 2) auf die spontane Entladungsrates von CA1-Neuronen in der Nacht. Die Präparation erfolgte zum Zeitpunkt ZT 15. Zum Vergleich sind die Daten ohne Blockade der synaptischen Transmission (s. Abbildung 11) dargestellt.

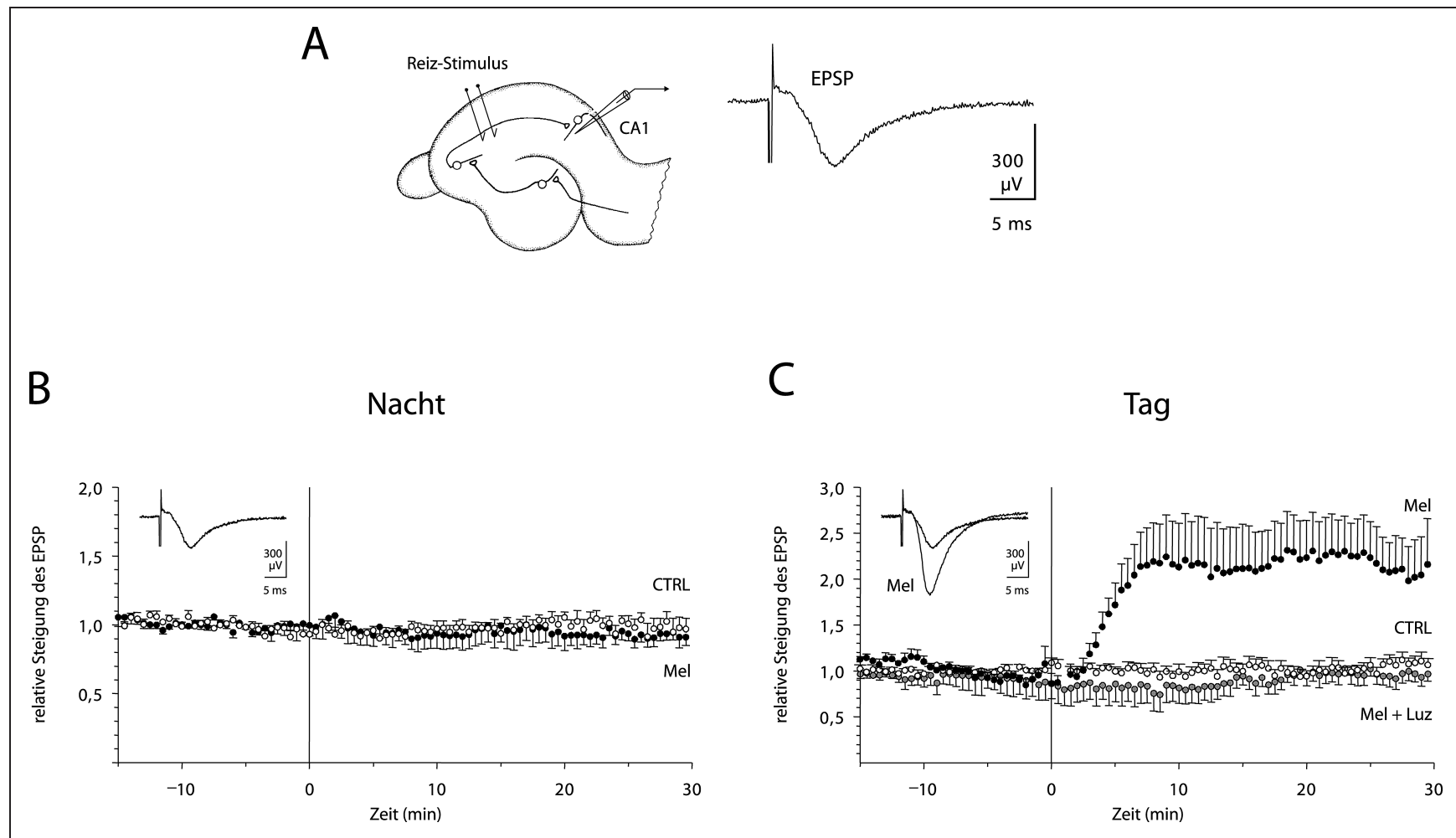


Abb. 14: Tageszeitabhängige Modulation der synaptischen Übertragung auf CA1-Neurone durch Melatonin. (A) Schematische Darstellung der Versuchsanordnung. Reizelektroden stimulieren die Schaffer-Kollaterale und verursachen ein exzitatorisches postsynaptisches Potenzial (EPSP, Originalregistrierung) im Stratum radiatum der CA1-Region. (B) Effekt von Melatonin (10 nmol/l; Applikation zum Zeitpunkt 0) auf das EPSP; die Präparation erfolgte zum Zeitpunkt ZT 13. (C) Effekt von Melatonin (10 nmol/l; Applikation zum Zeitpunkt 0) auf das EPSP; die Präparation erfolgte zum Zeitpunkt ZT 2.

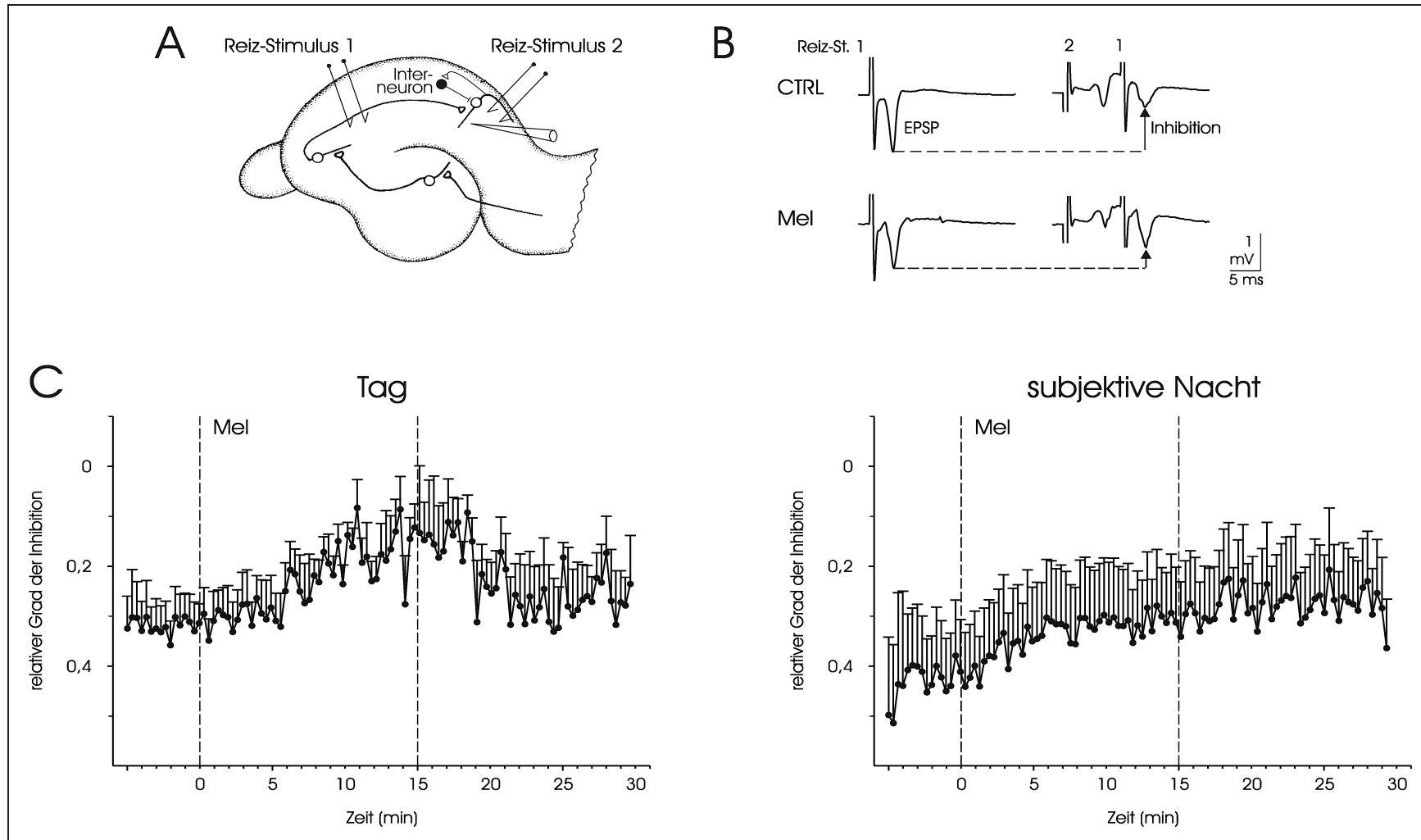


Abb. 15: Tageszeitabhängige Modulation der rekurrenten Inhibition in der CA1-Region durch Melatonin. (A) Schematische Darstellung der Versuchsanordnung. Reizelektroden stimulieren die Schaffer-Kollateralen (orthodromer Reiz) und die CA1-Fasern im Stratum oriens (antidromer Reiz). Die Reizeantworten werden über Glasmikroelektroden im Str. pyramidale bzw. Str. radiatum registriert. (B) Originalregistrierungen der exzitatorischen postsynaptischen Potentiale (EPSP, Originalregistrierungen) unter Kontrollbedingungen (ohne Melatonin) und unter Melatonin (10 nmol/l). Das Ausmaß der Inhibition ist durch die Größe des senkrechten Pfeils angegeben. (C) Effekte von Melatonin (10 nmol/l) auf die Inhibition in Versuchen während des Tages (Präparation: ZT 2; $n = 5$) und während der subjektiven Nacht (Präparation: ZT 13; $n = 4$).

Melatonin-Wirkungen sind wahrscheinlich über GABAerge Interneurone vermittelt

Die Erregbarkeit und die Effizienz der synaptischen Übertragung im Hippocampus wird entscheidend durch den hemmenden Einfluss GABAerger Interneurone bestimmt (Freund und Buzsaki, 1996). Die Interneurone vermitteln ihre Wirkung an den CA1-Pyramidenzellen u. a. über eine Rückwärtshemmung („recurrent inhibition“; Abb. 15A). Es ist daher prinzipiell denkbar, dass Melatonin über eine Beeinflussung dieser GABAergen Interneurone den verstärkenden Effekt auf die Größe des synaptischen Potenzials bei den Tagversuchen oder die Erregbarkeitssteigerung während der Nacht vermittelt. Um dies zu untersuchen, wurde der Einfluss von Melatonin auf die Aktivität der Interneurone getestet. Das experimentelle Vorgehen ist in Abbildung 15A dargestellt. Die hemmende Wirkung GABAerger Interneurone auf CA1-Pyramidenzellen lässt sich mit dem sog. „paired pulse inhibition“-Protokoll testen. Dazu wurden zum einen die Schaffer-Kollaterale (Reiz-Stimulus 1, orthodromer Reiz) und zum anderen die Fasern der CA1-Pyramidenzellen elektrisch gereizt (Reiz-Stimulus 2, antidromer Reiz). Die Reizantworten (EPSP) wurden mit Feldpotenzial-Elektroden im Stratum pyramidale und radiatum

der CA1-Region registriert. Folgendes Reizprotokoll wurde angewandt: Nach Auslösung eines einzelnen Testpulses (Reiz-Stimulation 1; orthodromer Reiz) wird ein Doppelpuls in der Reihenfolge Reizstimulation 2 / Reizstimulation 1 (Reizintervall 10 ms) gegeben. Die Amplitudenabnahme des EPSP der zweiten Reizantwort des Doppelpulses wird über die vorhergehende Aktivierung der GABAergen Interneurone durch den antidromen Reiz interpretiert (Freund und Buzsaki, 1996) und als „paired pulse inhibition“ bezeichnet. Das Amplitudenverhältnis des Testpulses zur zweiten Antwort des Doppelpulses stellt damit ein Maß für den Grad der Inhibition durch GABAerge Interneurone dar (Abb. 15B). Es wurde die Wirkung von Melatonin (10 nmol/l) auf die „paired pulse inhibition“ an Hippocampuspräparaten, die am Tag oder in der subjektiven Nacht präpariert wurden, getestet. Die Ergebnisse sind in Abbildung 15C dargestellt. Die Tagversuche (Präparation: ZT 3) zeigen, dass unter Melatonin der Grad der Inhibition um ca. 20 % abnimmt (Abb. 15C). Mit dem Auswaschen von Melatonin geht der Effekt reversibel zurück. Bei den Versuchen während der subjektiven Nacht (Präparation: ZT 13) führte die Applikation von Melatonin zu einer Abnahme der Inhibition um 10 %, allerdings war dieser Effekt nicht reversibel (Abb. 15C).

Zusammenfassung und Ausblick

Die Analyse der Genexpression hat gezeigt, dass die beim Säugetier bekannten Transkripte für die Melatonin-Rezeptortypen MT₁ und MT₂ im hippocampalen Gewebe exprimiert werden. Da Melatonin Veränderungen der neuronalen Aktivität im Hippocampus hervorruft, die durch spezifische Melatonin-Rezeptorblocker unterdrückbar sind, kann davon ausgegangen werden, dass die Transkripte in funktionsfähige Rezeptoren translatiert werden. Die Genexpression für die Rezeptoren tritt dabei in größeren Bereichen der Hippocampus-Formation auf, wie die Analysen des Gyrus dentatus, der CA3- und CA1-Region sowie des Subiculus gezeigt haben. Allerdings kann man aus diesen Daten nicht entnehmen, ob die Genexpression auf bestimmte neuronale Zelltypen, wie z. B. spezifische Pyramidenzellen oder Interneurone, beschränkt ist oder

ob sie in verschiedenen Zelltypen gehäuft stattfindet. Aus den Untersuchungen der CA1-Pyramidenneuronen mit der „single cell“-PCR-Technik lässt sich zumindest entnehmen, dass diese Zellen während der frühen Dunkelperiode (ZT 15) keine mRNA für Melatonin-Rezeptoren besitzen.

Die Untersuchungen im Xenopus-Expressionssystem zeigten einen funktionellen Einbau von G-Protein-gekoppelten Melatonin-sensitiven Rezeptoren. Die pharmakologischen und antisense-Untersuchungen zeigen, dass überwiegend, wenn nicht ausschließlich, der MT₁-Rezeptortyp exprimiert wird. Überraschenderweise aktiviert dieser Melatonin-Rezeptor in den Oozyten nicht den cAMP-Signalweg, sondern den IP₃-Signalweg und darüber calciumaktivierte Chlorionenströme. Untersuchungen an verschiedenen Expressionssystemen zeigten, dass heterologe G-Protein-

gekoppelte Rezeptoren mit endogenen G-Proteinen interagieren können, die unterschiedlich sind zu denen der nativen Zellen (Gudermann et al., 1997). Da in *Xenopus*-Oozyten insbesondere die endogenen G₀-, in manchen Fällen aber auch G_i- oder G_s-Proteine an den IP₃-Signalweg gekoppelt sind (Kaneko et al., 1992; Kasahara und Sugiyama, 1994; Pena et al., 1995), kann davon ausgegangen werden, dass die heterolog exprimierte Melatonin-Rezeptoren an eines oder mehrere dieser endogenen G-Proteine gekoppelt sind.

Die neuronale Aktivität von Hippocampus-Gewebeschnitten kann durch eine nahezu physiologische Konzentration (10 nmol/l) sowie durch eine pharmakologische Konzentration (1 µmol/l) von Melatonin moduliert werden. Im Gegensatz zur Hemmung der Entladungsrates der Aktionspotenziale im SCN (Stehle et al., 1989), bewirkt Melatonin in den CA1-Pyramidenzellen des Hippocampus eine allerdings nur in der Dunkelphase auftretende Steigerung der Aktionspotentialfrequenz. Dieser Melatonin-Effekt könnte die physiologische Umstellung der neuronalen Aktivität vom Schlaf- in den Wachzustand bei diesen nachtaktiven Tieren unterstützen. Ursächlich für die Erregbarkeitssteigerung ist dabei wahrscheinlich der

disinhibitorische Effekt von Melatonin über die GABAergen Interneurone. Es bleibt zu überprüfen, ob der tageszeitabhängige Effekt von Melatonin über eine entsprechend zeitabhängige Expression der Transkripte/Rezeptoren zu erklären ist. Die Verstärkung der synaptischen Übertragung zu den CA1-Pyramidenzellen lässt sich ebenfalls über eine Disinhibition erklären. Allerdings bleibt die physiologische Bedeutung unklar, da dieser Effekt nur während der Lichtphase auftritt.

Die Ergebnisse zeigen insgesamt, dass Melatonin für die Erregbarkeit von neuronalen Strukturen auch außerhalb des eigentlichen circadianen Systems von großer Bedeutung zu sein scheint. Melatonin, als ein endogener Marker für Licht bzw. Dunkelheit, könnte dabei eine Schlüsselrolle in der Übertragung von Informationen der biologischen Uhr (SCN) in verschiedene neuronale (Hippocampus, Neocortex) und nicht neuronale Subsysteme spielen. Zur weiteren Klärung der Rolle von Melatonin könnten Tiere untersucht werden, bei denen eine vollständige Unterdrückung der Melatonin-Synthese, z. B. durch Entfernen des Pinealorgans, induziert ist.

In diesem Zusammenhang stellt sich die Frage, ob der Hippocampus einen „peripheren Oszilla-

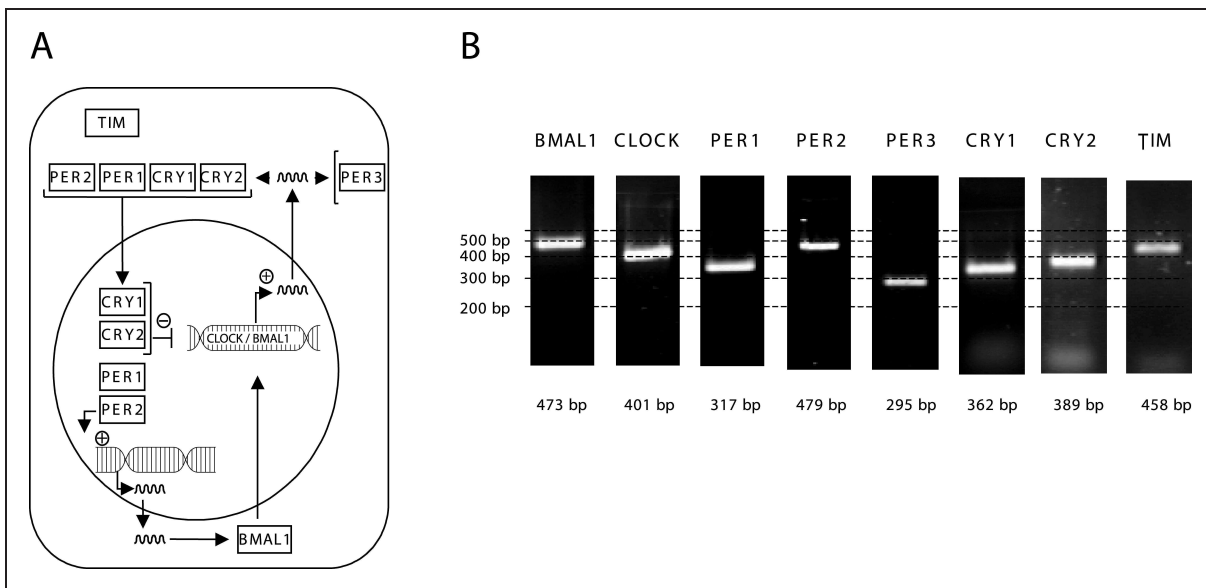


Abb. 16: Molekulare Komponenten der biologischen Uhr. (A) Schematische Darstellung der molekularen Komponenten der biologischen Uhr, wie sie in Zellen des SCN nachgewiesen sind. Die rhythmische Transkription/Translation verschiedener Uhren-Gene und ihrer Produkte steuert wiederum die Transkription weiterer Gene, die ihrerseits physiologische Zellfunktionen beeinflussen. (B) Nachweis von Transkripten molekularer Komponenten der biologischen Uhr im hippocampalen Gewebe mit Hilfe der RT-PCR-Technik. (Teil A modifiziert nach Chang und Reppert, 2001.)

tor“ darstellt, der möglicherweise einen eigenständigen Rhythmus besitzt und indirekt, z. B. über Melatonin, mit dem „zentralen Oszillator“ im SCN synchronisiert wird. Kennzeichen solcher Oszillatoren sind molekulare Komponenten in Gestalt von Transkripten bzw. Proteinen, die über positive und negative transkriptionale/translationale Rückkopplungsmechanismen miteinander interagieren (Allada et al., 2001). Der Aufbau einer solchen „molekularen Uhr“, wie sie in den Zellen des SCN nachgewiesen sind, ist in Abbildung 16A schematisch dargestellt. Der negative Rückkopplungsmechanismus besteht aus drei *PER(IOD)*-Genen und zwei *CRY(PTOCHROM)*-Genen. Die rhythmische Transkription dieser Gene ist gesteuert durch die Transkriptionsfaktoren *CLOCK* und *BMALI*. *CRY*- und *PER*-Proteine können Komplexe bilden, wobei die *CRY*-Proteine negativ mit *CLOCK* und *BMALI* interagieren. *PER2* wieder-

um ist an der rhythmischen Transkription von *BMALI* beteiligt. Ein mögliches Genprodukt, das die Transkription weiterer Gene moduliert, ist *PER3*. Die Funktion des *TIM(LESS)*-Proteins ist dagegen noch weitgehend unbekannt. In ersten eigenen Untersuchungen wurde die Genexpression dieser molekularen Komponenten im hippocampalen Gewebe analysiert. Wie in Abbildung 16B dargestellt, sind die Transkripte aller genannten Komponenten im Hippocampus vorhanden. Die nächsten Untersuchungen müssen klären, ob diese Transkripte rhythmisch transkribiert werden und in welchem Zeitgang dies erfolgt.

Danksagung: Die Ergebnisse wurden unter Mitarbeit von Eva Berger, Cirstin Blumenau, Bernhard Fischer, Daniel Riewenherm, Anke Wortmann und Erwin-Josef Speckmann gewonnen.

Literatur

- Allada, R., P. Emery, J. S. Takahashi, M. Rosbash (2001) Stopping time: The genetics of fly and mouse circadian clocks. *Ann. Rev. Neurosci.* 24: 1091–1119.
- Blumenau, C., E. Berger, J.-D. Fauteck, M. Madeja, W. Wittkowski, E.-J. Speckmann, U. Musshoff (2001) Expression and functional characterization of the MT₁ melatonin receptor from rat brain in *Xenopus* oocytes: Evidence for coupling to the phosphoinositol pathway. *J. Pineal Res.* 30: 139–146.
- Brown, T. H., A. M. Zador (1990) Hippocampus. In: The synaptic organization of the brain (ed. by G. M. Shepherd), Oxford University Press, New York, Oxford, pp. 346–388.
- Chang, D. C., S. M. Reppert (2001) The circadian clocks of mice and men. *Neuron* 29: 555–558.
- Fauteck, J.-D., U. Musshoff, B. Fischer, M. Madeja, E.-J. Speckmann, W. Wittkowski (1997) Melatonin-sensitive receptor: expression in mRNA-injected *Xenopus* oocytes involves IP₃ but not the cAMP signal transduction pathway. In: Pineal Update. From Molecular Mechanisms to Clinical Implications. Ed. by S. M. Webb, M. Puig-Domingo, M. Moller and P. Pevet. PJD Publications Limited, Westbury, N.Y., pp. 225–231.
- Fischer, B., U. Musshoff, J.-D. Fauteck, M. Madeja, W. Wittkowski, E.-J. Speckmann (1996). Expression and functional characterization of a melatonin-sensitive receptor in *Xenopus laevis*. *FEBS Lett.* 381: 98–102.
- Freund, T. F., G. Buzsaki (1996) Interneurons of the hippocampus. *Hippocampus* 6: 347–470.
- Gudermann, T., T. Schöneberg, G. Schultz (1997) Functional and structural complexity of signal transduction via G-protein-coupled receptors. *Ann. Rev. Neurosci.* 20: 399–427.
- Kandel, E. R., R. D. Hawkins (1992) Molekulare Grundlagen des Lernens. In: Spektrum der Wissenschaften Spezial: Gehirn und Geist, Spektrum Verlag, Heidelberg, S. 36–45.
- Kaneko, S., H. Takahashi, M. Satoh (1992) Metabotropic responses to acetylcholine and serotonin of *Xenopus* oocytes injected with rat brain mRNA are transduced by different G-protein subtypes. *FEBS Lett.* 299: 179–182.
- Kawahara, J., H. Sugiyama (1994) Inositol phospholipid metabolism in *Xenopus* oocytes mediated by endogenous G_o and G_i proteins. *FEBS Lett.* 355: 41–44.
- Knight, R. (1996) Contribution of human hippocampal region to novelty detection. *Nature* 383: 256–259.
- Korf, H.-W., C. Schomerus, E. Maronde, J. H. Stehle (1996) Signal transduction molecules in the rat pineal organ: Ca²⁺, pCREB, and ICER. *Naturwissenschaften* 83: 535–543.
- Milner, B. (1966) Amnesia following operation on the temporal lobes. In: Amnesia: Clinical, psychological and medicolegal aspects (ed. by C. W. M. Whitty, O. L. Zangwill), Butterworth.
- Musshoff, U., D. Riewenherm, E. Berger, J.-D. Fauteck, E.-J. Speckmann (2002) Melatonin receptors in rat hippocampus: Molecular and functional investigations. *Hippocampus* 12: 165–173.

- Nicoll, R. A., J. A. Kauer, R. C. Malenka (1988) The current excitement in long-term potentiation. *Neuron* 1: 97–103.
- Pena, P., D. Camino, L. A. Pardo, P. Dominguez, F. Barros (1995) G_s couples thyrotropin-releasing hormone receptors expressed in *Xenopus* oocytes to phospholipase C. *J. Biol. Chem.* 270: 3554–3559.
- Reppert, S. M., D. R. Weaver, S. A. Rivkees, E. G. Stopa (1988) Putative melatonin receptors in a human biological clock. *Science* 242: 78–81.
- Reppert, S. M., D. R. Weaver, T. Ebisawa (1994) Cloning and characterization of a mammalian melatonin receptor that mediates reproductive and circadian responses. *Neuron* 13: 1177–1185.
- Reppert, S. M., D. R. Weaver, C. Godson (1996) Melatonin receptors step into the light: cloning and classification of subtypes. *Trends Pharmacol. Sci.* 17: 100–102.
- Squire, L. R. (1992) Memory and the hippocampus: A synthesis from findings with rats, monkeys, and humans. *Psychological Rev.* 99: 195–231.
- Stehle, J., J. Vanecek, L. Vollrath (1989) Effects of melatonin on spontaneous electrical activity of neurons in rat suprachiasmatic nuclei: an in vitro iontophoretic study. *J. Neural. Transm.* 78: 173–177.
- Vanecek, J. (1998) Cellular mechanisms of melatonin action. *Physiol. Rev.* 78: 687–721.
- Weaver, D. R. S., S. A. Rivkees, S. M. Reppert (1989) Localization and characterization of melatonin receptors in rodent brain by in vitro autoradiography. *J. Neurosci.* 9: 2581–2590.
- Williams, L. M., P. J. Morgan (1988) Demonstration of melatonin-binding sites on the pars tuberalis of the rat. *J. Endocrinol.* 119: R1–3.

