

Die Funktion des Proto-Onkogens c-fos in der Zirbeldrüse ist weitgehend unbekannt. Ein Zusammenhang von c-fos und der Melatoninsynthese in der Zirbeldrüse wird vermutet.

1. Mit Hilfe eines indirekten, immunozytochemischen Nachweisverfahrens, der Avidin-Biotin-Komplexmethode, wird das Produkt des Proto-Onkogens c-fos, das Phosphoprotein Fos, in kultivierten, bovinen Pinealozyten dargestellt.

Die Pinealozyten wurden durch das gleiche indirekte, immunozytochemische Nachweisverfahren mit einem für Rinderpinealozyten sehr spezifischen Marker, dem "Maus-Anti-HIOMT Antikörper", charakterisiert.

Es stellten sich Zellen mit unterschiedlich intensiver HIOMT Anfärbung und verschiedenartiger Morphologie dar. Rundliche, fortsatzlose Zellen mit wenig Zytoplasma zeigen eine schwächere HIOMT Anfärbung als die intensiv HIOMT immunopositiven, länglichen Pinealozyten mit langen Fortsätzen. Diese Beobachtung läßt unterschiedliche Pinealozytenpopulationen vermuten.

Für die c-Fos Immunozytochemie erweist sich eine Verdünnung des polyklonalen Primärantikörpers (Anti c-Fos 456(Medac)) und auch des Sekundärantikörpers (Biotinylierte Schwein gegen- Kaninchen Immunoglobuline) von 1:500 als optimal. Es zeigt sich in der bovinen Pinealozytenprimärkultur eine maximale c-Fos Expression von ca. 14% immunopositiver Pinealozyten im Bezug zur Gesamtzellzahl. Diese relativ geringe Zahl läßt sich durch die lange Präinkubationszeit der bovinen Zellen erklären. Das Verhältnis von Pinealozyten, (welche sich in der Zellkultur nicht teilen) und Gliazellen (teilen sich sehr schnell unter den beschriebenen Kulturbedingungen), verschiebt sich nach sechs Tagen Präinkubation deutlich zu Gunsten der Gliazellen.

2. In Versuchen zur Kinetik der c-Fos Expression zeigt sich das in der Literatur beschriebene rapide und transiente Muster.

3. Experimente zu Dosis-Wirkungs-Beziehungen mit unterschiedlichen Konzentrationen der Adrenergika Isoproterenol und Noradrenalin zeigen in den Konzen-

trationen von 10 E-4 bis 10 E-6 eine relativ gleiche c-Fos Antwort. Bei einer Konzentration von 10 E-8 fällt die beobachtete c-Fos Expression deutlich geringer aus.

- 4 Die c-Fos Expression in Prozent in Bezug auf die Gesamtzellzahl ist unabhängig von der Zelldichte in der bovinen Zellkultur.
5. In Parallelversuchen wurde neben der c-Fos Expression immer die Melatoninfreisetzung aus den kultivierten Pinealozyten ermittelt. Eine meßbare Melatoninantwort nach Stimulierung der Zellen mit Isoproterenol und Noradrenalin zeigte sich im Kinetikversuch nach zwei Stunden und das Maximum der Melatoninsekretion war nach acht Stunden Stimulationsdauer erreicht.

Dosis-Wirkungsexperimente ergaben, analog zur c-Fos Expression, eine wesentlich geringere Melatoninfreisetzung bei einer Konzentration von 10 E-8 sowohl bei Isoproterenol und Noradrenalin.

6. Durch den in einer Konzentration von 10 E-7 überwiegend $\alpha 1$ -mimetischen Agonisten Phenylephrin, wurde ebenfalls eine c-Fos Expression in den bovinen Pinealozyten hervorgerufen. Phenylephrin ergibt in dieser Verdünnung jedoch keine Melatoninantwort (RÜPPEL u. OLCESE 1991). Diese Beobachtung widerspricht der These, daß die c-Fos Expression in der Zirbeldrüse in Zusammenhang mit der Melatoninsynthese steht.

7 SUMMARY

The function of the proto-oncogene product c-Fos in the mammalian pineal gland is largely unknown. A link between c-fos expression and melatonin synthesis has been proposed.

1. The phosphoprotein Fos, produced from the proto-oncogene c-fos, was localized by means of an indirect immunocytochemical procedure - the streptavidin-biotin staining method - in cultured bovine pinealocytes. Using a similar procedure the pinealocytes were identified with a highly specific marker, a monoclonal antibody to the melatonin synthesizing enzyme HIOMT.

Cells of various HIOMT-immunoreactivity and variable morphology were seen. Round cells without processes and little cytoplasm showed a less intense HIOMT staining than those longer cells with long processes, which stained quite strongly. This observation supports the possibility that different pinealocyte populations exist in culture.

A 1:500 dilution of the primary anti-c-Fos antibody (Medac 456) as well as the secondary antibody, a biotinylated swine anti-rabbit immunoglobulin (DAKO) was found to be optimal for the immunocytochemical staining of these cells. Maximal c-Fos expression in primary cultures of bovine pinealocytes was seen in approximately 14% of the total plated cells. This relatively low expression frequency can be explained in part by the necessarily long pre-incubation time required by the bovine culture. The proportion of non-dividing pinealocytes to glia cells, which divide repetitively in culture, declines steadily throughout the six day pre-incubation period.

2. The time-course of c-Fos expression in bovine pinealocytes was rapid and transient, agreeing well with that described in the proto-oncogene literature.
3. Dose-response studies with the adrenergic agents isoproterenol and noradrenaline demonstrated a maximal c-Fos expression at $10E-6$ to $10E-4$ M for both substances.

At $10E-8$ M the expression of c-Fos was not greater than that seen in unstimulated cells.

4. The expression of c-Fos as a percentage of total cell number was independent of cell density through a range of 50,000 to 800,000 cells/*well*.
5. Melatonin release was compared to c-Fos expression in parallel cultures of bovine pinealocytes. Melatonin release was elevated within two hours following isoproterenol or noradrenaline stimulation while maximal melatonin release was reached after eight hours. Dose-response experiments showed that at a dose of $10E-8$ M both isoproterenol and noradrenaline were only very weakly capable of stimulating melatonin release in analogy also to the lack of c-Fos expression at this dose.
6. At a concentration of $10E-7$ M the α 1-adrenergic agonist, phenylephrine, induced c-Fos expression in bovine pinealocytes. However, at this dose phenylephrine does not stimulate melatonin release (RÜPPEL and OLCESE, 1991). This observation seems to indicate that c-Fos expression in the bovine pineal gland may not always be linked to the activation of melatonin secretion.