

**Aus dem Institut für Anatomie und Zellbiologie
an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg**
(Direktor: Prof. Dr. Dr. Bernd Fischer)



**Der Einfluss von Melatonin auf die IP₃-Signalkaskade der
pankreatischen β -Zelle**

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Medizin (Dr. med.)

vorgelegt
der Medizinischen Fakultät
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Andreas Gunter Bach

geboren am 05.03.1980 in Halle (Dölau)

Gutachter:

1. Prof. Dr. Stefan Reuss, Mainz
2. Prof. Dr. Manfred Wußling, Halle
3. Prof. Dr. Elmar Peschke, Halle

Öffentliche Verteidigung der Promotion : 08.02.2006

urn:nbn:de:gbv:3-000009986

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000009986>]

Referat und bibliographische Beschreibung

Die Interaktionen von Glukosestoffwechsel und biologischen Rhythmen bei Säugetieren bildeten den Hintergrund der Untersuchungen. Im Besonderen interessierte die Wirkung des Hormons Melatonin auf die Insulin-produzierenden pankreatischen β -Zellen. Frühere Arbeiten hatten eine Insulin-hemmende Wirkung des Hormons, vermittelt über die intrazelluläre cAMP-Signalkaskade, nachgewiesen. Die hier vorgestellten Studien der IP₃-Signalkaskade sollten diese Befunde ergänzen und das Verständnis der Wirkung von Melatonin auf den Glukosestoffwechsel erweitern.

Zur Klärung der Fragestellung dienten *in vitro* Versuche mit INS1 Ratten-Insulinomazellen, einem Modell für pankreatische β -Zellen. Die Zellen wurden unter statischen Batch-Bedingungen und in einem dynamischen Superfusionssystem untersucht. Gemessen wurden Insulin und intrazelluläre IP₃-Mengen. Ein IP₃-Radiorezeptorassay wurde eigens zu diesem Zweck etabliert. Flankiert wurden die Studien durch molekularbiologische Untersuchungen des IP₃-Rezeptors.

Im Ergebnis zeigte sich eine spezifische, dosisabhängige Stimulation der IP₃-Signalkaskade pankreatischer β -Zellen durch Melatonin in Konzentrationen von 1 bis 100 nmol/l. Carbachol wurde als Modellsubstanz der IP₃-getriggerten Insulinausschüttung eingesetzt. Die Melatonin stimulierte IP₃-Erhöhung verursachte nur eine gesteigerte Insulinsekretion, wenn die cAMP-Signalkaskade durch PTX gehemmt wurde. Die cAMP- und damit Insulin-hemmende Wirkung des Hormons ist unter normalen Bedingungen dominierend.

Die gleichzeitige Nutzung antagonistischer Signalkaskaden durch Melatonin ist nicht ungewöhnlich und für zahlreiche andere Zelltypen beschrieben. Bei der Einordnung in den physiologischen Kontext ist der Zeitfaktor aufschlussreich. Die volle Ausprägung der cAMP-inhibierenden Wirkung von Melatonin dauert einige Stunden, während die IP₃-stimulierende Wirkung sofort eintritt. Melatonin wird an der pankreatischen β -Zelle unter anderem eine Funktion als circadianer Synchronisator zuerkannt. Für diese Aufgabe ist eine sinnvolle Interaktion beider Signalkaskaden vorstellbar.

Inhaltsverzeichnis

	Seite
Abkürzungsverzeichnis	IV
1. Einleitung	1
1.1 Biologische Rhythmen und Melatonin	1
1.2 Glukosestoffwechsel und Melatonin	2
1.3 Die pankreatische β -Zelle und Melatonin	4
1.4 Die IP ₃ -Signalkaskade	5
1.5 Zielstellung der Arbeit	7
2. Material und Methoden	8
2.1 INS1 Zellzucht	8
2.2 IP ₃ -Bestimmung	8
2.2.1 Zellstimulation	8
2.2.2 Zellaufschluss	9
2.2.3 IP ₃ -Radiorezeptorassay	11
2.3 Molekularbiologische Untersuchung	12
2.4 Insulin-Bestimmung	14
2.4.1 Batch-Kultur	14
2.4.2 Superfusion	14
2.4.3 Insulin-Radioimmunoassay	16
2.5 Statistische Auswertung	16
3. Ergebnisse	17
3.1 IP ₃ -Befunde	17
3.1.1 Wirkung verschiedener Carbacholkonzentrationen	17
3.1.2 Wirkung von Melatonin	18
3.1.3 Wirkung von Melatonin plus Carbachol	21
3.2 Molekularbiologische Untersuchungen	22
3.2.1 Qualitative Analyse der IP ₃ -Rezeptor Isoformen	22
3.2.2 Quantitative Analyse der IP ₃ -Rezeptor Isoformen	23
3.3 Insulin-Befunde in Batch-Kulturen	24

3.3.1	Wirkung verschiedener Carbacholkonzentrationen	24
3.3.2	Wirkung von Melatonin	25
3.3.3	Wirkung von Melatonin plus Carbachol	26
3.4	Insulin-Befunde in Superfusion	27
3.4.1	Wirkung verschiedener Carbacholkonzentrationen	27
3.4.2	Wirkung von Melatonin	28
3.4.3	Wirkung von Melatonin plus Carbachol	31
4.	Diskussion	34
4.1	Die INS1-Zelllinie als Modellsystem	34
4.2	Auswahl der IP ₃ -Detektionsmethode	36
4.3	Transduktion des Melatoninsignals in pankreatischen β -Zellen	37
4.3.1	IP ₃ -Liberalisierung durch Melatonin	38
4.3.2	Der MT ₁ -Rezeptor und die IP ₃ -Signalkaskade	40
4.3.3	G-Proteine in der IP ₃ -Signalkaskade	41
4.3.4	IP ₃ -Rezeptoren	41
4.3.5	Intrazelluläre Ca ²⁺ -Ionen in der IP ₃ -Signalkaskade	43
4.3.6	IP ₃ -vermittelte Insulinsekretion	45
4.3.7	Modell der Wirkung von Melatonin auf die pankreatische β -Zelle	46
4.4	Melatonin im physiologischen Kontext	48
5.	Zusammenfassung	50
6.	Literaturverzeichnis	53
7.	Thesen	66
	Lebenslauf	V
	Selbständigkeitserklärung	VI
	Erklärung über Promotionsversuche	VI
	Danksagung	VII
	Publikationen von Ergebnissen der Dissertation	VIII

Abkürzungsverzeichnis

ATP	Adenosin-5'-triphosphat
bp	Basenpaare
BSA	<i>bovine serum albumin</i>
Ca ²⁺	<i>calcium</i>
cAMP	<i>cyclic adenosine-3',5'-monophosphate</i>
cDNA	<i>complementary deoxyribose nucleic acid</i>
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
DNA	<i>deoxyribose nucleic acid</i>
FSH	Follikelstimulierendes Hormon
GIP	<i>gastric inhibitory polypeptide</i>
GLP	<i>glucagon-like peptide</i>
GLUT2	Glukose-Transporter Isoform 2
HCl	Chlorwasserstoff (Salzsäure)
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-1-ethansulfonsäure
IP ₃	Inositol-1,4,5-trisphosphat
IP ₃ -R	Inositol-1,4,5-trisphosphat Rezeptor
K ⁺	Kalium
KClO ₄	Kaliumperchlorat
KOH	Kaliumhydroxid
LH	Luteinisierendes Hormon
MAPK	<i>mitogen activated protein kinase</i>
mRNA	<i>messenger ribonucleic acid</i>
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PTX	Pertussis Toxin
RT-PCR	<i>reverse-transcription polymerase-chain-reaction</i>
RNA	<i>ribonucleic acid</i>
SCN	<i>suprachiasmatic nucleus</i>
SEM	<i>standard error of mean</i>

feststehende, fremdsprachige Begriffe sind klein und kursiv geschrieben

1. Einleitung

1.1 Biologische Rhythmen und Melatonin

Viele, möglicherweise alle, biologischen Vorgänge unterliegen einer rhythmischen Regulation, der tägliche Ablauf von Aktivitäts- und Ruhephasen fast aller Lebewesen, der alljährliche Winterschlaf von Hibernatoren oder auch die jahreszeitliche Ausbildung von Sommer- und Winterfell vieler Säugetiere: überall spielt die „Innere Uhr“ eine Rolle [Van Cauter et al., 1997; Pevet, 2000].

Hinsichtlich der Periodenlänge τ biologischer Rhythmen werden ultradiane ($\tau \approx$ weniger als ein Tag), circadiane ($\tau \approx$ ein Tag bzw. 20 bis 28 h) und infradiane ($\tau \approx$ viele Tage, beispielsweise ein Jahr) Rhythmen unterschieden [Binkley, 1993; Reiter, 1993; Peschke, 2002a].

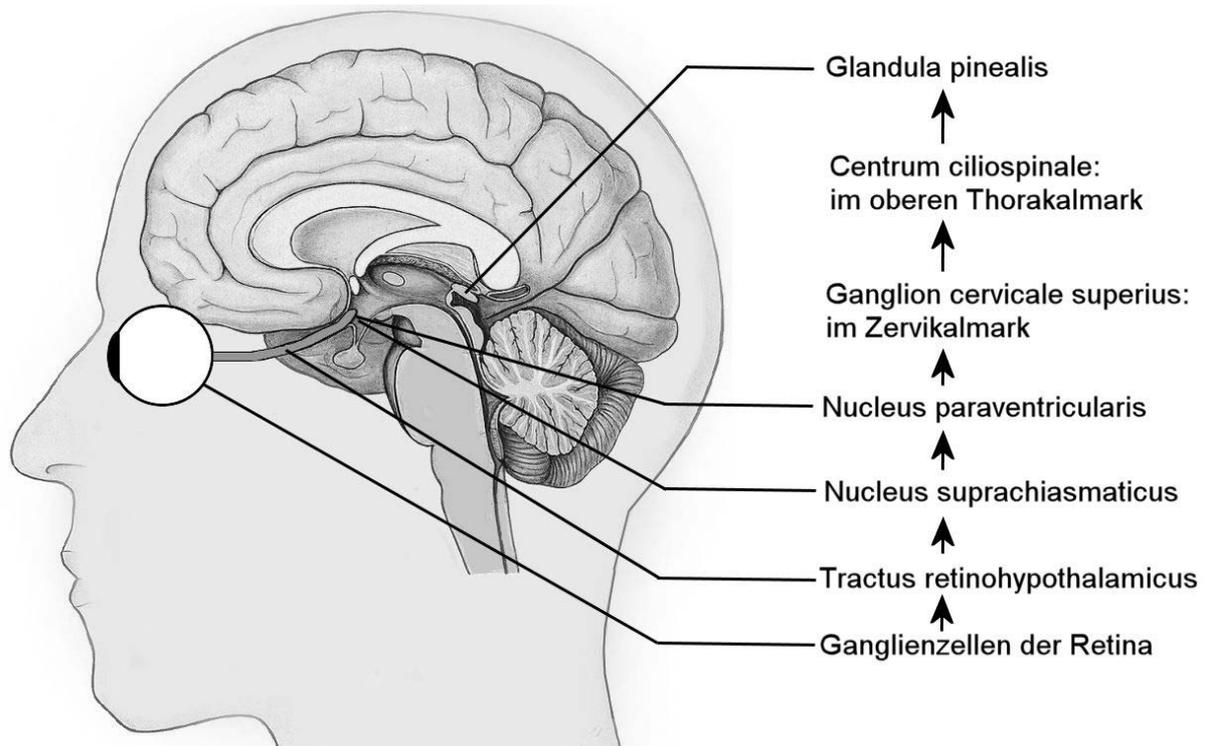


Abb. 1: Vom Licht zum Hormon: wichtige Stationen der „Inneren Uhr“ des Menschen

Säugetiere besitzen einen zentralen, endogenen Rhythmusgenerator, dessen wichtigster Synchronisator das Licht ist [Reiter, 1993; Dubocovich 1995; Hardeland 1997; Peschke, 2002a]. Aus der Länge der täglichen Lichteinwirkung ist für den Organismus die Tages- und Jahreszeit ableitbar: es wird direkt von einer Uhren- und Kalenderfunktion gesprochen [Reiter, 1993; Hardeland, 1997]. Die Lichtinformation

wird mittels spezialisierter Sinneszellen der Retina aufgenommen [Foster, 2004] und über einen gesonderten Nervenfasernzug (Tractus retinohypothalamicus) zu einem hypothalamischen Kerngebiet geleitet, dem Nucleus suprachiasmaticus (SCN). Dieser gilt als der primäre, endogene Schrittmacher circadianer Rhythmen bei Säugetieren [Dubocovich, 1995; Peschke, 2002a].

Die Signale des SCN gelangen über verschiedene Zwischenstationen (Nucleus paraventricularis, Centrum ciliospinale, Ganglion cervicale superius) [Kalsbeek et al., 2002] zum Epithalamus des Diencephalon, der Epiphysis cerebri [Dubocovich, 1995; Peschke, 2002a]. Aufgrund ihrer Lage war die Epiphyse in den vergangenen 2000 Jahren oftmals Gegenstand esoterischer und philosophischer Spekulationen. So wurde sie als Ventil der Seele (Herophilus, um 335 v.Chr.) oder Sitz der Träume (Schopenhauer, 1788-1860) bezeichnet. Bereits Galen (etwa 130 bis 201 n. Chr.) identifizierte das Organ als Drüse und der Aufklärer Descartes (1596-1650) hebt die Verbindung zum optischen System heraus [Peschke, 2002a].

Die Epiphyse, oder wegen ihres an einen Pinienzapfen erinnernden Aussehens auch Pinealorgan bzw. Glandula pinealis genannt, übersetzt die nervale circadiane Information aus dem SCN in ein hormonelles Signal: das Melatonin. Die Epiphyse ist damit ein Photoneuroendokriner Vermittler. Das Hormon mit einer ausgeprägten circadianen Sekretionsrhythmik erreicht höchste Blutspiegelwerte in der Nacht und fällt am Tag stark ab. Dabei ist dieses Tagesprofil bei tages- und nachtaktiven Tieren gleichermaßen zu finden. Bei Säugetieren ist Melatonin neben anderen Markern wie der Körperkerntemperatur oder dem Plasmacortisolspiegel ein wichtiges circadian rhythmisierendes Signal mit zahlreichen Einflüssen auf das Endokrinium [Klerman et al., 2002; Peschke, 2002a].

1.2 Glukosestoffwechsel und Melatonin

Stoffwechselprozesse unterliegen einer circadianen Beeinflussung [Bizot-Espiard et al., 1998; Peschke et al., 1998; Picinato et al., 2002]. Die gewöhnlich während der Aktivitätsphasen aufgenommene Nahrung bedingt eine Erhöhung des Blutglukosespiegels. Reaktiv steigt die Insulinsekretion. Bei Ausschaltung dieses dominanten Zeitgebers durch Nahrungskarenz, Dauerfütterung oder Dauerglukoseinfusion wird ein endogener Rhythmus von Glukose- und Insulinspiegel sichtbar. Dieser

nahrungsunabhängige Rhythmus ist bei der Aufrechterhaltung der Glukosehomöostase von Bedeutung [Bizot-Espiard et al., 1998; Peschke et al., 1998; Picinato et al., 2002].

Die Wichtigkeit einer intakten Stoffwechselregulation wird an der am stärksten verbreiteten Stoffwechselentgleisung der Gegenwart deutlich: dem Diabetes mellitus Typ 2. Im Jahr 2000 litten weltweit 171 Millionen Menschen an der chronischen Krankheit [Wild et al., 2004], welche erhebliche gesundheitliche, soziale und ökonomische Belastungen verursacht.

Erste Hinweise auf einen Zusammenhang von Glukosestoffwechsel und Melatonin gehen auf Parhon zurück. Er beschrieb 1939 eine Insulin-ähnliche, hypoglykämisierende Wirkung eines aus Rinderepiphysen gewonnenen Extraktes. Wurde Versuchstieren die Epiphyse entfernt, konnte gehäuft ein verringerter Insulinspiegel und ein erhöhter Glukosespiegel beobachtet werden. Melatoninapplikation vermochte die Stoffwechselentgleisung wieder auszugleichen oder zumindest abzumildern [Parhon, 1939].

Die Situation ist jedoch komplex. In den vergangenen 60 Jahren erschienen unzählige widersprüchliche Mitteilungen, welche die Beobachtungen von Parhon entweder stützten [Shima et al., 1997; Lima et al., 2001], genau das Gegenteil ermittelten [John et al., 1990; Prakash et al., 1998], oder überhaupt keine Wirkung feststellen konnten [Bizot-Espiard et al., 1998; Niiijima et al., 1998]. Offenbar gibt es bei der Wirkung von Melatonin auf die Insulinsekretion wichtige Nebenbedingungen, welche seinen Einfluss stark modulieren.

Bei der Wirkung des Melatoninsignals spielen das Alter, Geschlechtsspezifika und Zuchtbedingungen der Versuchstiere eine Rolle [Peschke, 2002a]. Ebenso ist die untersuchte Spezies von Bedeutung, denkt man allein an den Unterschied zwischen tag- und nachtaktiven Organismen. Weiterhin ist der Ernährungszustand zu berücksichtigen. So zeigt ein Metabolismus im Hungerzustand andere Reaktionen als bei Nährstoffüberangebot. Und schließlich ist das untersuchte Objekt entscheidend. Im intakten Organismus sind andere Reaktionsmuster zu erwarten als bei einzelnen Langerhans'schen Inseln oder isolierten pankreatischen β -Zellen.

Dennoch zeichnete sich in der Mehrzahl der Studien die Beobachtung ab, dass der Melatoninspiegel invers mit dem Insulinspiegel korreliert, also hohe Melatoninspiegel mit niedrigen Insulinspiegeln verbunden sind und umgekehrt [Boden et al., 1996].

Ein zentraler Mechanismus bei der Modulation des Glukosestoffwechsel durch Melatonin ist seine direkte Wirkung auf die insulinproduzierende pankreatische β -Zelle.

1.3 Die pankreatische β -Zelle und Melatonin

Das menschliche Pankreas enthält etwa eine Millionen Inselorgane mit jeweils etwa 500 β -Zellen, jede davon etwa 6 μm groß [Dean et al., 1968].

Die β -Zelle ist *in vivo* zahlreichen humoralen, nervalen und parakrinen Einflüssen ausgesetzt [Berggren et al., 1994; Gillison et al., 1994; Rorsman et al., 1994]. Viele dieser Signale werden über zellmembranständige, G-Protein gekoppelte Rezeptoren vermittelt. Die Vorstellung einer direkten Beeinflussung der Insulinsekretion durch Melatonin wurde durch die Bestätigung der Existenz spezifischer Melatoninrezeptoren (Subtyp MT_1) auf pankreatischen β -Zellen bestärkt [Peschke et al., 2000; 2002a; b; Kemp et al. 2002].

Der MT_1 -Rezeptor ist an ein $\text{G}_i\alpha$ -Protein gekoppelt, welches typischerweise eine inhibierende Wirkung auf die cAMP-Signalkaskade durch Hemmung der Adenylatzyklase ausübt. Die vermutete Existenz dieses Signalweges konnte in einer Reihe von Zelltypen bzw. Organen nachgewiesen werden, beispielsweise in kultivierten Pigment-Epithelien des Menschen [Nash et al., 1995], in der Hypophyse des Schafes [Morgan et al., 1995] und der Ratte [Vanecek et al., 1995], in der Niere des Huhns [Song et al., 1996] und im Nebenhoden der Ratte [Shiu et al., 2000].

Schließlich bestätigte sich die Existenz dieses Signalweges in pankreatischen β -Zellen [Peschke et al., 1997; 1998; 2000; 2002b; Kemp et al., 2002; Picinato et al., 2002]. Melatonin hemmte nach mehrstündiger Inkubation die cAMP-Bildung und konsekutiv die cAMP-stimulierte Insulinsekretion.

Dennoch blieb die Frage unbeantwortet, ob sich der Einfluss von Melatonin auf die pankreatische β -Zelle allein in der Hemmung der cAMP-Signalkaskade erschöpft. Es gab gute Gründe, dies zu bezweifeln. In anderen Zelltypen beeinflussen Melatoninrezeptoren neben cAMP weitere intrazelluläre Botenstoffe, darunter cGMP [Petit et al., 1999], Diazylglyzerol [Vanecek, 1998], Arachidonsäure [Vanecek, 1998], Ca^{2+} [Vanecek, 1998], und IP_3 [Popova et al., 1995; Godson et al., 1997; Brydon et al., 1999; Zemkova et al., 2000; Blumenau et al., 2001; Lai et al., 2001; 2002;

MacKenzie et al., 2002; Balik et al., 2004; Girouard et al., 2004; Markowska et al., 2004]. Insbesondere die Beteiligung der IP₃-Signalkaskade an der Vermittlung des Melatoninsignals ist in den letzten Jahren zunehmend diskutiert worden. Das war der Ausgangspunkt, den Einfluss von Melatonin auf den IP₃-Signalweg in der pankreatischen β-Zelle zu untersuchen.

1.4 Die IP₃-Signalkaskade

Das IP₃-Molekül ist der an den Positionen 1, 4 und 5 phosphorylierte, zyklische Polyalkohol Inositol. Die Substanz mobilisiert Ca²⁺-Ionen aus intrazellulären Speichern [Biden et al., 1984; Berridge et al., 1989; Mikoshiba et al., 2000]. Den Großteil dieser IP₃-Rezeptor tragenden Kompartimente stellt das Endoplasmatische Retikulum [Gilon et al., 2001; Barker et al., 2002]. Die erhöhte intrazelluläre Ca²⁺-Konzentration führt konsekutiv zur Stimulation von Exozytosemechanismen. In der pankreatischen β-Zelle ist die Aktivierung der IP₃-Signalkaskade eine Möglichkeit, die Ausschüttung von Insulin zu erhöhen.

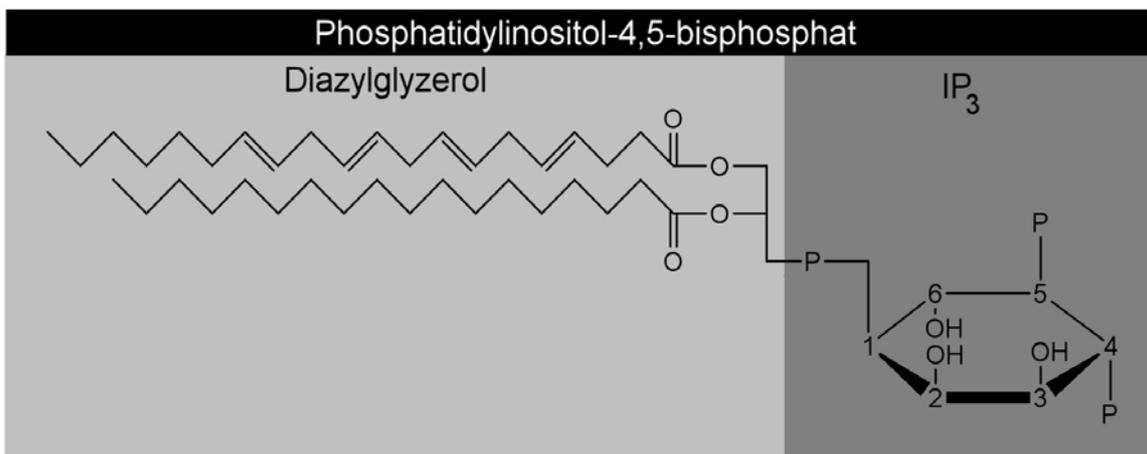


Abb. 2: Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat, bestehend aus IP₃-Komponente und Diacylglycerol-Komponente. Energiereiche Phosphatbindungen sind durch „P“ bezeichnet.

Am Beginn der IP₃-Signalkaskade steht die Aktivierung eines zytosolischen Enzyms, der Phospholipase C [Li et al., 1998]. Diese Lipase spaltet in der Schlüsselreaktion des IP₃-Metabolismus spezifisch die Diacylglycerolgruppe von der Position 1 des Zellmembranlipids Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphats ab (Abb. 2). Es entstehen

in äquimolarem Verhältnis IP_3 und Diazylglyzerol. Beide Spaltprodukte sind intrazelluläre Signalstoffe.

Es gibt verschiedene Isoformen der Phospholipase C, welche Bestandteil unterschiedlicher Signalkaskaden sind. Neben der Phospholipase $C\beta$, welche durch ein $G_q\alpha$ -Protein stimuliert wird, katalysieren die Tyrosinkinase aktivierte Phospholipase $C\gamma$ und die durch Ca^{2+} -Ionen aktivierte Phospholipase $C\delta$ die Reaktion [Berridge et al., 1989; Li et al., 1998; Barker et al., 2002].

Die Ausgangssubstanz der Reaktion, Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat, gehört zur Gruppe der Phosphatidylinositide. Unterschiedlich phosphorylierte Phosphatidylinositide stellen etwa 10 % des Lipidgehalts der Zelle und sind mit ihrem komplexen Metabolismus spezifischer Phosphatidylinositolkinasen und -phosphatasen selbst an einer breiten Palette eigenständiger Signalkaskaden beteiligt [Toker, 2002]. So soll in der pankreatischen β -Zelle Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat, der unmittelbare Vorläufer des IP_3 -Moleküls, einen direkten Einfluss auf den ATP-abhängigen K^+ -Kanal haben. Ein anderes Phosphatidylinositid, das Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat, soll in der pankreatischen β -Zelle an der Modulation der autokrinen Wirkung von Insulin beteiligt sein [Barker et al., 2002].

Die Beendigung des IP_3 -Signals geschieht auf zwei Wegen. Zum einen nimmt die Sensibilität des IP_3 -Rezeptors, insbesondere der Isoform 1 (IP_3R-1), mit zunehmender intrazellulärer Ca^{2+} -Konzentration im Sinne einer negativen Rückkopplung ab und verhindert eine Ca^{2+} -Überschwemmung. Zum anderen unterliegt das IP_3 -Molekül selbst einem relativ raschen Abbau zu Inositol durch Phosphatasen.

Die IP_3 -Signalkaskade im weiteren Sinne umfasst die Synthese der Phosphatidylinositide, die unterschiedlichen Wege zur Aktivierung der verschiedenen Formen der Phospholipase C, die Ca^{2+} -Ionen liberalisierende Wirkung von IP_3 sowie schließlich sein Abbau durch Phosphatasen. Über das gleichzeitig entstehende Diazylglyzerol gibt es Querverbindungen zum Proteinkinase C/MAPK Signalweg.

Intrazelluläre Signalstoffe wie IP_3 , Diazylglyzerol und cAMP erlauben eine Amplifikation der vom Zellrezeptor erhaltenen Signalinformation. Durch Modulation und Interaktion dieser Signalwege werden die Reaktionsmöglichkeiten der Zelle auf verschiedene Reize flexibler. Veränderungen im IP_3 -Spiegel markieren Reaktionen eines komplexen Signalnetzwerkes.

1.5 Zielstellung der Arbeit

An einem Modell der pankreatischen β -Zelle, der INS1 Ratten-Insulinomazelle, sollte der mutmaßliche Einfluss von Melatonin auf die IP_3 -Signalkaskade untersucht werden. Um die gewonnenen Daten in einen physiologischen Kontext einzuordnen, sollten die dabei entstehenden Effekte auf die Insulinsekretion erfasst werden.

Im Folgenden sind die verfolgten Einzelziele der Arbeit dargestellt:

1. Auswahl und Etablierung einer Methode zur IP_3 -Quantifizierung in INS1-Zellen.
2. Validierung der Methode mit dem bekannten IP_3 -Stimulator Carbachol.
3. Untersuchung der bisher unbekanntem Wirkung von Melatonin auf die IP_3 -Signalkaskade der INS1-Zelle.
4. Überprüfung der Beteiligung des Melatoninrezeptors an der IP_3 -Signalkaskade der INS1-Zelle.
5. Charakterisierung des Expressionsprofils von IP_3 -Rezeptoren der INS1-Zelle.
6. Beschreibung der Carbachol-stimulierten, IP_3 -medierten Insulinsekretion der INS1-Zelle.
7. Analyse des Einflusses von Melatonin auf die IP_3 -vermittelte Insulinsekretion.
8. Bewertung des Einflusses von Melatonin auf die IP_3 -Signalkaskade in der INS1-Zelle und Abgrenzung von der cAMP-Signalkaskade.

2. Material und Methoden

2.1 INS1 Zellzucht

INS1 Ratten-Insulinomazellen wuchsen in 75 cm² großen Flaschen unter einer angefeuchteten Atmosphäre (95 % Luft, 5 % CO₂). Alle 14 Tage erfolgte eine gleichmäßige Aufteilung des Zellmaterials auf zwei neue Flaschen (Passage). Als Medium fand RPMI 1640 Verwendung. Zugesezt wurden 10 % fetales Kälberserum, 1 mmol/l HEPES-Puffer, 2 mmol/l L-Glutamine, 1 mmol/l Natriumpyruvat, 50 µmol/l 2-Mercaptoethanol, 100 IU/ml Penicillin und 100 µmol/ml Streptomycin [Peschke et al., 2002b]. Vor den Passagen und Experimenten erfolgte routinemäßig eine Kontrolle der Zellzucht durch lichtmikroskopische morphologische Beurteilung der adhären wachsenden Zellen und Auszählung der Zellanzahl in einer Zählkammer.

Der jeweilige Umgang mit den Zellen im Einsatz der speziellen experimentellen Methoden wird im Folgenden beschrieben.

2.2 IP₃-Bestimmung

2.2.1 Zellstimulation

Für die Stimulation der Zellen wurde ein Protokoll entwickelt, welches eine genügend hohe Anzahl von Zellen pro Batch-Ansatz bei hinreichender Vergleichbarkeit der Batches untereinander gewährleistete. Weiterhin konnte ein zügiger Probendurchlauf realisiert werden, welcher der hohen Dynamik des IP₃-Umsatzes gerecht wurde.

INS1-Zellen wuchsen nach Passage in 75 cm² großen Zellkulturflaschen 14 Tage lang. Im Ergebnis lagen im Mittel etwa 50 Millionen Zellen pro Flasche vor. Für jedes Experiment wurden diese Zellen, wie im Folgenden beschrieben, gleichmäßig auf acht Zentrifugenröhrchen verteilt, um acht vergleichbare Aliquots zu gewinnen.

Nach Entfernung des Mediums erfolgte die Waschung mit PBS-Puffer, um Zelldetritus und nicht adhären Zellen zu entfernen. Im Anschluß wurde zwei Minuten mit 37 °C warmer Trypsinlösung inkubiert, um die Ablösung der adhären Zellen zu erreichen. Der Abdauvorgang wurde durch Zugabe von serumhaltigem Medium beendet.

Die Zellsuspension in der Zellkulturflasche wurde mechanisch homogenisiert. Es folgte die Überführung in ein 14-ml Polyethylen-Röhrchen. Dieses wurde bei Raumtemperatur mit 500 x g zehn Minuten lang zentrifugiert, so dass sich ein festes Zellpellet bildete. Der Überstand wurde dekantiert, das Pellet in 4 ml Medium resuspendiert und erneut mechanisch homogenisiert.

Bis zu diesem Zeitpunkt entsprach das Protokoll dem Vorgehen bei einer Passage. Im Anschluß wurde die Zellsuspension gleichmäßig auf acht 2-ml Eppendorf Röhrchen verteilt, so dass jedes Röhrchen 500 µl Lösung mit etwa sechs Millionen Zellen enthielt. Unmittelbar darauf erfolgte die Stimulation der Zellen durch Zugabe von 100 µl Medium mit der erforderlichen Menge an Stimulationssubstanz. Die Menge war so bemessen, dass in der 600 µl Mischlösung die gewünschte Endkonzentration erzielt wurde. Die Eppendorf-Röhrchen mit den stimulierten Zellen wurden dann für die Dauer der gewünschten Stimulationszeit in einen Inkubator bei 37 °C und einer Begasung von 95 % Luft und 5 % CO₂ verbracht.

2.2.2 Zellaufschluss

Der Zellaufschluss zur IP₃-Extraktion folgte den Standardprotokollen [Maslanski et al., 1990; Palmer et al., 1990, Challiss, 1997; Shears, 1997], welche modifiziert wurden, um adhärent wachsenden Zellen gerecht zu werden und einen schnellen, sauberen Probendurchlauf zu garantieren. Der wesentliche Schritt war die Konservierung von IP₃-Molekülen in einer sauren Extraktion. Eine starke Säure fungierte als Protonendonator für die freien Phosphatgruppen des IP₃-Moleküls. Damit wurde ein Bindung des IP₃-Moleküls an Proteine verhindert. Um einen Abbau durch IP₃-Phosphatasen einzudämmen erfolgte die gesamte Extraktion im Eisbad [Challiss, 1997]. Weiterhin wurden ausschließlich Plastikmaterialien oder silikonisierte Glasgefäße verwendet, um einen Verlust der elektrisch negativ geladenen IP₃-Moleküle durch Adhärenz an geladenen Glasoberflächen zu vermeiden [Maslanski et al., 1990].

Nach Verstreichen der gewünschten Stimulationszeit wurden jedem INS1-Zellen enthaltendem Eppendorf-Röhrchen (s. Kapitel Zellstimulation) 150 µl eisgekühlte 20 % Perchlorsäure zugegeben (Abb. 3, Schritt A). Dies beendete unmittelbar den Metabolismus der Zellen. Die saure Suspension wurde dann für 20 Minuten auf Eis geschüttelt, um einen kompletten Zellaufbruch zu gewährleisten (Abb. 3, Schritt B).

Danach erfolgte die Abzentrifugation des Zelldetritus mit 2000 x g für 15 Minuten bei 4 °C (Abb. 3, Schritt C).

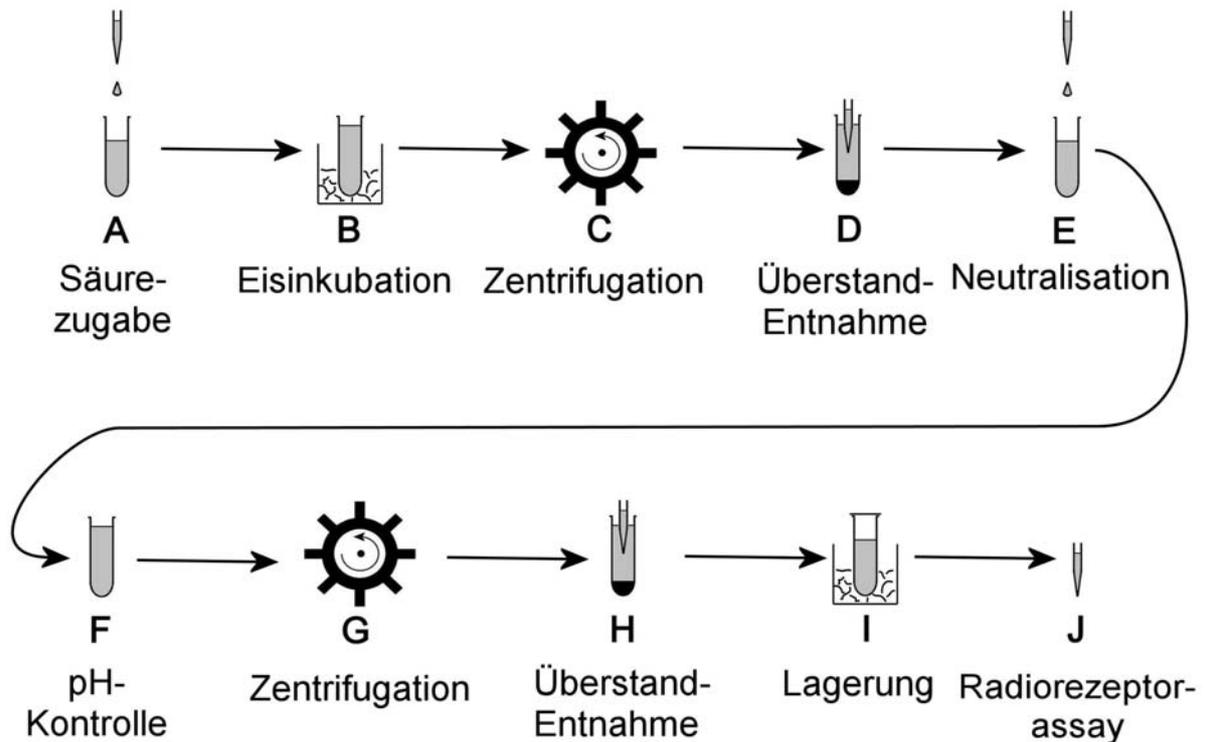


Abb. 3: Schematischer Ablauf der IP₃-Extraktion in Schlagworten

Vom IP₃-haltigen Überstand wurden 600 µl entnommen (Abb. 3, Schritt D) und auf einen pH-Wert von $7,5 \pm 0,1$ eingestellt (Abb. 3, Schritt E). Dies war nötig, da die Reaktionen des IP₃-Radiorezeptorassays im neutralen Milieu stattfanden und eine Lagerung der Proben im sauren Milieu zur Veränderung von IP₃-Molekülen (Phosphatgruppenmigration) [Shears, 1997] führen kann. Um das Probenvolumen und damit die Verdünnung möglichst gering zu halten, erfolgte zunächst eine Grobneutralisierung mit 25 µl 10 mol/l KOH. Die Feinjustierung geschah durch Zugabe von 10 bis 100 µl 1 mmol/l KOH, welche in 60 mmol/l HEPES-Puffer gelöst war. Die Verwendung von HEPES-Pufferlösung mit einem optimalen Pufferbereich von pH 6,8 bis pH 8,2 erleichterte die Einstellung des Ziel-pH durch eine Verbreiterung des Umschlagpunktes der Neutralisationsreaktion. Die Neutralisationsreaktion wurde durch Zugabe von Universal-Indikator Lösung überwacht (Abb. 3, Schritt F). Das zugegebene Laugenvolumen wurde für jede Probe protokolliert, um bei der

Berechnung der ursprünglichen IP₃-Konzentration berücksichtigt werden zu können (s. Formel 1; Laugenvolumen z [μl]).

Die neutralisierte Suspension wurde bei 2000 x g für 15 Minuten bei 4 °C zentrifugiert (Abb. 3, Schritt G), um präzipitiertes KClO₄ zu entfernen. 600 μl des IP₃-haltigen, neutralen Überstandes (Abb. 3, Schritt H) wurden bei -80 °C gelagert (Abb. 3, Schritt I) und jeweils innerhalb von vier Wochen der IP₃-Bestimmung zugeführt (Abb. 3, Schritt J).

2.2.3 IP₃-Radiorezeptorassay

Verwendet wurde ein kommerziell erhältlicher Radiorezeptorassay ("Biotrak cellular communication assays, D-myo-Inositol 1,4,5-trisphosphate [³H]assay system"; Amersham Pharmacia Biotech Europe GmbH, Freiburg, Deutschland). Das Vorgehen folgte den Anweisungen des Herstellers. ³H-markierte IP₃-Moleküle dienten als Tracer. Proben und Standards wurden in je 10 ml OptiPhase 'HiSafe 3' Szintillationsflüssigkeit verbracht und in einem β-Counter (Wallac 1409 liquid scintillation counter, Wallac Oy, Finland) in Doppelbestimmung 10 Minuten lang ausgemessen. Die IP₃-Konzentration in den Proben wurden mittels einer im selben Lauf angefertigten Standardkurve errechnet. Die Proben lagen im Messbereich von 1,9 bis 250 nmol/l.

Aus der gemessenen IP₃-Konzentration in der Probe K_{Probe} wurde die unbekannte IP₃-Konzentration im Batch-Ansatz K_{Batch} unter Berücksichtigung der zweimaligen Verdünnung bei der Zellextraktion und Neutralisation (Abb. 3, Schritte A, E) nach Formel (1) berechnet.

$$\text{Formel (1):} \quad K_{\text{Batch}} \left[\frac{\text{pmol}}{100 \mu\text{l}} \right] = K_{\text{RAA}} \left[\frac{\text{pmol}}{100 \mu\text{l}} \right] \cdot \left(\frac{600 \mu\text{l} + 150 \mu\text{l}}{600 \mu\text{l}} \right) \cdot \left(\frac{600 \mu\text{l} + z [\mu\text{l}]}{600 \mu\text{l}} \right)$$

$$\text{Formel (2):} \quad M_{\text{Batch}} [\text{pmol}] = K_{\text{Batch}} \left[\frac{\text{pmol}}{100 \mu\text{l}} \right] \cdot 600 \mu\text{l}$$

Bei bekannter Zellanzahl je Batch ließ sich aus dem Ergebnis von Formel (2) die Anzahl gemessener IP₃-Moleküle je Zelle mitteln. Im Interesse der durchgeführten Untersuchung lagen allerdings nicht absolute Mengen, sondern die durch Stimulationen verursachte Änderung der IP₃-Spiegel. Daher wurden in der Auswertung die Konzentrationen stimulierter Batch-Ansätze zu unstimulierten Kontrollen in Beziehung gesetzt.

2.3 Molekularbiologische Untersuchung

Zur qualitativen und quantitativen Untersuchung der mRNA der IP₃-Rezeptor Isoformen wurden vier INS1 Batch-Ansätze mit je etwa sechs Millionen Zellen herangezogen. Die RNA wurde entsprechend den Anweisungen des Herstellers (Invitrogen, CA, USA) nach einer *Trizol*-basierten Extraktionsmethode gewonnen [Mühlbauer et al., 2004]. Der Erfolg der Extraktion wurde durch photometrische RNA-Konzentrationsbestimmung (Absorption bei 260 nm) und Gelelektrophorese (1,3 % denaturierendes Formaldehyd-Agarose Gel) gesichert. Als Qualitätsmerkmal der RNA wurde die Darstellbarkeit von 28S und 18S rRNA nach Ethidiumbromidfärbung des Gels gewertet. Zur Zerstörung verbliebener DNA-Reste schloss sich ein DNase 1 Verdau an (DNA-free™, Ambion Inc., TX, USA). Die Gesamt-RNA in einer Menge von 1 µg wurde einer Reverse-Transkriptase-Reaktion unterzogen (Promega Reverse Transcription Kit, Promega Inc., Madison, WI, USA). Von der entstandenen cDNA wurden je 40 ng der real-time RT-PCR zugeführt.

Die verwendeten Primer und Sequenzen sind in Tabelle 1 aufgeführt. Die Primersequenzen wurden mit einer Freeware-Software [Steve et al., 2000] für die real-time RT-PCR gewählt. Jedes Reaktionsgefäß von 20 µl enthielt 4 µl cDNA (Template), 10 µl Reaktionsgemisch (Promega Inc., Madison, WI, USA), je 0,5 µl Vorwärts- und Rückwärtsprimer (25 pmol/µl), 0,5 µl Sybr Green I in 1000-facher Verdünnung (Biozym Diagnostic GmbH, Hessisch-Oldendorf, Germany) und 4,5 µl H₂O. Die RT-PCR wurde in einem Rotor-Cycler (Rotor-Gene 2000, Corbett Research Inc., Mortlake, NSW, Australia) durchgeführt. Um die Sensitivität der RT-PCR zu erhöhen wurde ein *touchdown* Thermoprofil eingesetzt: Initiale Denaturierung bei 95 °C für 120 s, 40 Zyklen mit 30 s Denaturierung bei 94 °C, 30 s Annealing-Phase bei 59 °C (*touchdown* von 64 °C mit einer Verringerung von 1 °C pro Zyklus), 30 s

Elongationsphase bei 72 °C. Am Ende jedes Elongationsschrittes wurde bei 80 °C 15 s lang die Fluoreszenz bestimmt.

Tabelle 1: Sequenzen der in der RT-PCR benutzten Primer-Paare für die spezifische Amplifikation der cDNA der IP₃-Rezeptor Isoformen IP₃R-1, IP₃R-2, und IP₃R-3, sowie von β-Aktin der Ratte.

Name	Primer Sequenz	Primer Ort	Produkt Länge (bp)	Zitation	GenBank Acc. No.
IP ₃ R-1	vorw. 5'-TGACAGCAGTGGAGCATCG-3'	2786-2804	393	Zanner et al., 2002	J05510
	rückw. 5'-GCAGCAGCCATAGGAGTCA-3'	3161-3179			
IP ₃ R-2	vorw. 5'-ACTGTGTTTGCACGCTTGAG-3'	8483-8502	204	diese Arbeit	AF329470
	rückw. 5'-ACGATGGACACTGCAGTCAG-3'	8667-8686			
IP ₃ R-3	vorw. 5'-CGCTCCATCCTGCTAACT-3'	7230-7247	317	diese Arbeit	L06096
	rückw. 5'-TTCCTCAGTCCGTGGTTCA-3'	7528-7546			
β-actin	vorw. 5'-ACTCCTACGTGGGCGACGAGG-3'	152-172	389	Mühlbauer et al., 2004	NM031144
	rückw. 5'-CAGGTCCAGACGCAGGATGGC-3'	520-540			

Zur qualitativen Amplikon-Analyse wurde nach jedem Lauf ein thermales Denaturierungsprofil erstellt. Die RT-PCR-Produkte wurden weiter analysiert durch Separation auf einem Tris-Acetat-Ethylendiamintetraacetat (TAE)-gepuffertem 3 % Agarose Gel (pH 8,0) und folgender Ethidiumbromid Fluoreszenzfärbung mit Fotodokumentation. Die quantitative Analyse geschah unter Verwendung der Corbett Research Software und einem Vergleich der Fluoreszenz-Intensitäten bei einem Schwellenwert (C_T -Wert) innerhalb des logarithmischen Bereichs der Amplifikationskurve. Die β-Aktin Expression wurde zur Standardisierung der Proben herangezogen, gefolgt von einer Kalkulation der Expressionsstärke nach der $\Delta\Delta C_T$ -Methode [Schmittgen et al., 2000]. Kontrollen mit H₂O an Stelle des Templates wurden in jedem Lauf mitgeführt.

2.4 Insulin-Bestimmung

2.4.1 Batch-Kultur

Bei den Batch-Experimenten fanden 25 cm² große Zellkulturflaschen Verwendung. INS1-Zellen wuchsen nach Passage in diesen Behältnissen sieben Tage lang. Im Ergebnis lagen im Mittel etwa 5 Millionen Zellen pro Flasche vor. Die Zellzucht wurde so angelegt, dass für jedes Experiment die benötigte Anzahl an bewachsenen 25 cm² großen Zellkulturflaschen vorlag.

Nach Entnahme der Batch-Ansätze aus dem Brutschrank wurde unverzüglich das Zellkulturmedium (6 ml) verworfen und frisches Medium mit der Endkonzentration der gewünschten Stimulationssubstanz zugegeben. Die Zellkulturflaschen wurden danach wieder in den Brutschrank verbracht. Nach Verstreichen der Inkubationszeit von 15 Minuten wurden jeweils 500 µl des Insulin-haltigen Mediums jedes Batch-Ansatzes zur Insulinbestimmung asserviert. Die Lagerung bis zur Messung im Insulin-Radioimmunoassay erfolgte bei -80 °C.

2.4.2 Superfusion

Superfusion bezeichnet die permanente Umspülung von Zellen mit frischem Medium. Stoffwechsel- und Sekretionsprodukte können im gewonnenen Superfusat bestimmt werden.

Die Superfusion wird als dynamisches *in vitro* System der statischen Batch-Kultur gegenübergestellt [Peschke et al., 1997; 2002a]. Die Methode besitzt den Vorteil, eine unerwünschte Anreicherung von Stoffwechselproduktion in der Mikroumgebung der Zellen zu vermeiden. Die Sekretion von Insulin ins Superfusat kann in guter zeitlicher Auflösung dargestellt werden. Die Methode bot eine höchstmögliche funktionelle Standardisierung, da Freisetzungs-, Synthese-, Vitalitäts- und Kapazitätsgrenzen der Zellen in jedem Experiment überprüft werden konnten (s.u).

IP₃-Moleküle bleiben streng intrazellulär und sind mit der Superfusion nicht erfassbar. Das eingesetzte System (Abb. 4) ist eine Weiterentwicklung [Peschke et al., 1997] der von Csernus und Schally beschriebenen Anlage [Csernus et al., 1991]. In eine Glasröhre (Durchmesser 6,6 mm) wurden 30-40 Millionen INS1-Zellen mit Sephadex

G-10 geschichtet. Die Dextranskugeln (Durchmesser 40-120 μm) dienten den adherent wachsenden INS1-Zellen als Oberfläche.

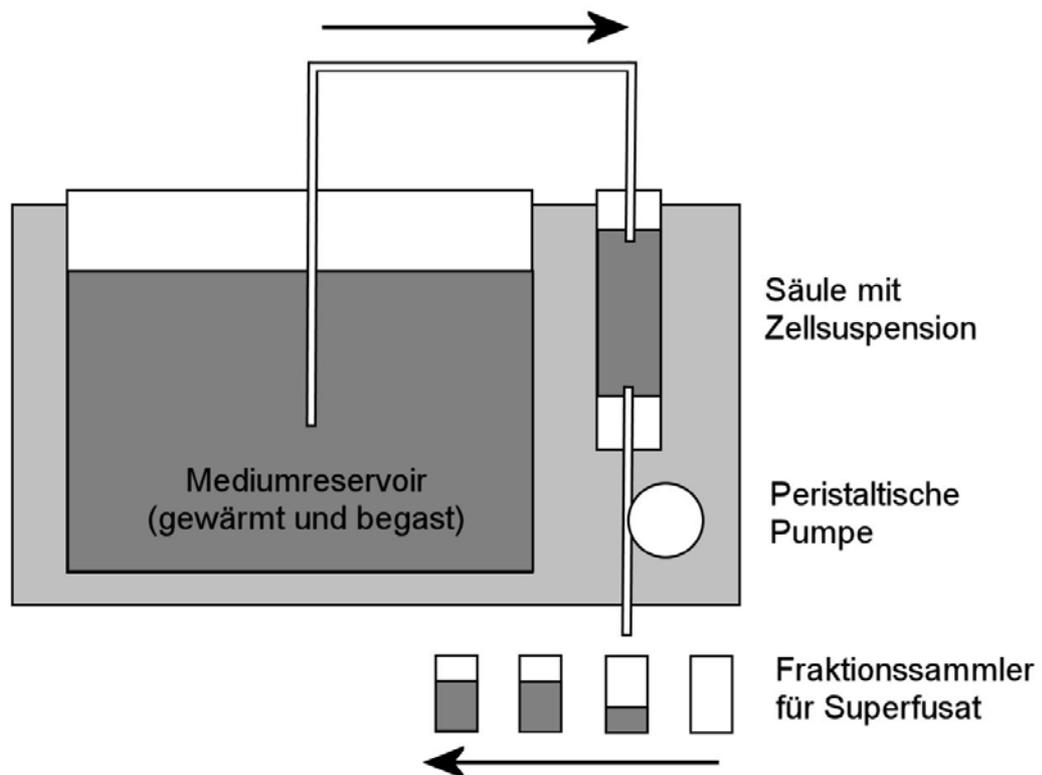


Abb. 4: Stark vereinfachtes Schema des eingesetzten Superfusionssystems.

Als Superfusionsmedium wurde in Anlehnung an frühere Versuche [Csernus et al., 1991; Peschke et al., 1997] Medium-199 mit 2,22 g/l Natriumbicarbonat, 1,75 g/l BSA und 80 mg/l Gentamycin verwendet. Die Flussgeschwindigkeit, mit der die Zellen umspült wurden, betrug 1 ml/3 Minuten. Die Temperatur des Superfusionsmediums wurde auf 37 °C equilibriert bei einer Begasung von 95 % Luft und 5 % CO₂. Zum Auffangen des Superfusats für die Insulinbestimmung dienten Borosilikatröhrchen, die 25 μl des Proteinase-Inhibitors Aprotinin (Trasylo[®]) enthielten, um einen Abbau des Insulins zu vermeiden. Nach Schockfrieren in einem Ethanol-CO₂-Gemisch wurden die Superfusat-Proben bei -80 °C gelagert. Das ganze Superfusionssystem lag in vierfacher Ausfertigung vor, so dass vier Experimente parallel durchgeführt werden konnten.

Nach Beladen der Glasröhre mit Zellen und nach einer 6-stündigen Erholungsperiode wurden 1 ml (3 Minuten) Proben aus dem Superfusat aufgefangen.

Die Testsubstanzen wurden unmittelbar vor Zugabe mit Superfusionsmedium gemischt und zur 3-minütigen Stimulation der Zellen über einen Vier-Wege-Hahn in das System geleitet. Das Totraumvolumen der Anlage war auf 1 ml geeicht worden, so dass in der Auswertung zeitlich exakt der Stimulation der Zellen ihre Sekretionsantwort gegenüber gestellt werden konnte.

Zu Beginn und am Ende jedes Experiments wurden die Freisetzungs- und Synthesekriterien des System durch eine dreiminütige Stimulation mit dem bekanntlich unspezifischen Stimulus 15 mmol/l KCl bestimmt. Weiterhin wurde am Ende jedes Experimentes der Gesamtgehalt zellulär vorhandenen Insulins (Kapazitätskriterium) bestimmt, indem die Zellen mit 10 mmol/l HCl aufgeschlossen wurden. Die durchgehend erfasste Basislinie der Insulinsekretion diente der Beurteilung der Vitalität. Darüber hinaus erwies sich der Median der Basislinie als geeigneter Standardisierungsfaktor und wurde in diesem Sinne in der Auswertung der Superfusionen herangezogen.

2.4.3 Insulin-Radioimmunoassay

Es wurde ein kommerziell erhältlicher Radioimmunoassay verwendet ("Coat-A-Count kit"; DPC Biermann GmbH, Bad Nauheim, Deutschland). Das Vorgehen folgte den Anweisungen des Herstellers. ¹²⁵J-markiertes Insulin diente als Tracer. Proben und Standards wurden in einem γ -Counter (DPC Biermann GmbH, Bad Nauheim, Deutschland) in Doppelbestimmung jeweils eine Minute lang ausgemessen. Die Insulin-Konzentration in den Proben wurde mittels einer im selben Lauf angefertigten Standardkurve errechnet. Die Proben lagen im Messbereich von 1 bis 100 ng/ml Insulin.

2.5 Statistische Auswertung

Der Test auf Signifikanz erfolgte mit dem Whitney-Mann U-Test für nicht standard-normalverteilte Varianzen. Als Signifikanzniveau wurde eine Irrtumswahrscheinlichkeit $*p < 0,05$ akzeptiert. Nicht signifikante Gruppe wurden bei besonderer Bedeutung mit „n.s.“ gekennzeichnet. Die Anzahl durchgeführter Experimente wurde angegeben.

3. Ergebnisse

3.1 IP_3 -Befunde

3.1.1 Wirkung verschiedener Carbacholkonzentrationen

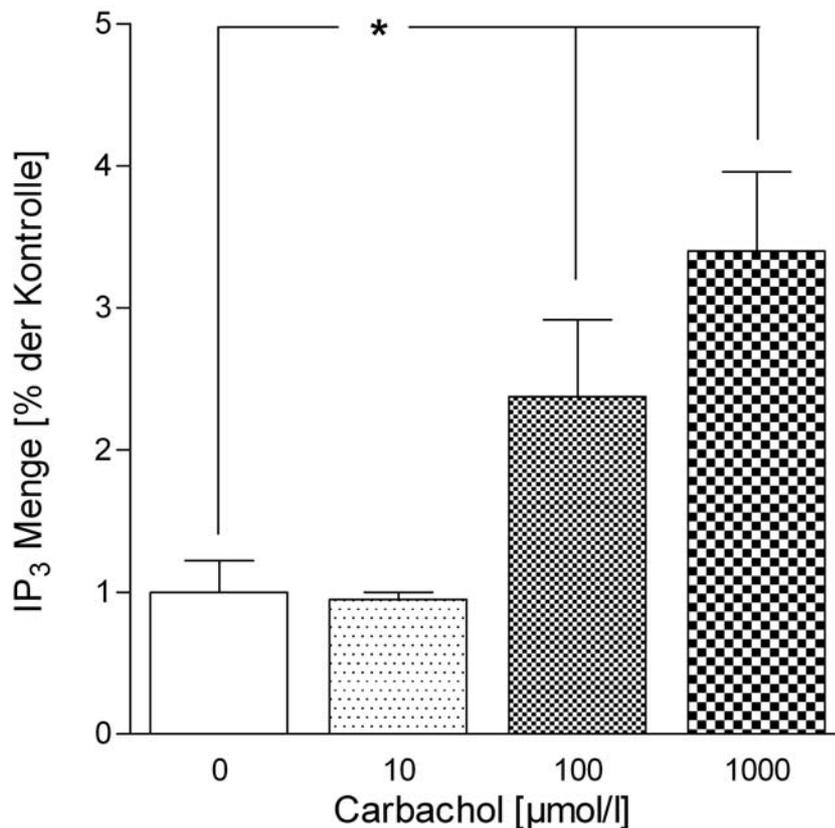


Abb. 5: Mittelwerte \pm SEM der auf die unstimulierte Kontrollgruppe bezogenen intrazellulären IP_3 -Spiegel von INS1-Zellen nach 15-minütiger Stimulation mit Carbachol in den Konzentrationen von 10 bis 1000 $\mu\text{mol/l}$ ($n = 6$).

Das Parasympathomimetikum Carbachol ist eine bekannte, wohl definierte Substanz zur Stimulation der IP_3 -Signalkaskade. Es diente in den durchgeführten Untersuchungen als Positivkontrolle zur Validierung sowohl der Stimulierbarkeit der IP_3 -Signalkaskade der INS1-Zelle als auch der Verlässlichkeit der IP_3 -Detektion.

Batch-Ansätze wurden für 15 Minuten mit Carbachol in Konzentrationen von 10 bis 1000 $\mu\text{mol/l}$ inkubiert.

Die Ergebnisse demonstrieren eine dosisabhängige Stimulation der IP₃-Freisetzung der INS1-Zellen durch Carbachol. In der Kontrollgruppe (Abb. 5, Carbachol in einer Konzentration von 0 µmol/l) erfolgte die Stimulation lediglich mit Medium. Die Konzentration von 10 µmol/l Carbachol liegt offensichtlich unterhalb der Aktivierungsschwelle. Carbacholkonzentrationen von bis zu 1 mmol/l steigern die IP₃-Spiegel signifikant auf das 3,5-fache der Spiegel von unstimulierten Zellen (Abb. 5). Ähnliche Resultate lassen sich mit dem bekannten IP₃-Stimulator Cholezystokinin erzielen (Daten nicht gezeigt).

Eine Abschätzung der Zeitverlaufs der Carbachol-getriggerten IP₃-Bildung in INS1-Zellen zeigt einen raschen Anstieg der IP₃-Spiegel innerhalb der ersten Minuten und ein darauf folgendes, langsames Absinken über mindestens 30 Minuten (Daten nicht gezeigt). Im Folgenden wurde eine Stimulationsdauer von 15 Minuten gewählt, da zu diesem Zeitpunkt genügend große Unterschiede zur Kontrollgruppe sichtbar waren. Eine kürzere Inkubationszeit führte zu höheren IP₃-Spiegeln aber auch zu einer größeren Schwankungsbreite der gemessenen Werte.

3.1.2 Wirkung von Melatonin

3.1.2.1 Wirkung verschiedener Melatoninkonzentrationen

Melatonin und seine unbekannte Wirkung auf die IP₃-Signalkaskade pankreatischer β-Zellen stand im Mittelpunkt der Untersuchungen.

Batch-Ansätze wurden 15 Minuten lang mit Melatonin in den Konzentrationen von 0,1 bis 100 nmol/l inkubiert. In der Kontrollgruppe (Abb. 6, Melatonin in einer Konzentration von 0 nmol/l) erfolgte die Stimulation lediglich mit Medium.

Es zeigt sich eine dosisabhängige Stimulation der IP₃-Freisetzung. Bereits eine nahezu physiologische Melatoninkonzentration von 1 nmol/l ist zur Triggerung der IP₃-Signalkaskade befähigt. Bei einer Konzentration von 100 nmol/l Melatonin erhöht sich der IP₃-Spiegel signifikant auf das 2,5-fache des Spiegels unstimulierter Zellen (Abb. 6). Höhere, unphysiologische Konzentrationen von Melatonin führen zu noch höheren IP₃-Spiegeln (Daten nicht gezeigt).

Der zeitliche Verlauf der Melatonin-getriggerten IP₃-Bildung zeigt einen schnellen Gipfel innerhalb der ersten Minuten und ein langsames Absinken in den folgenden 30 Minuten (Daten nicht gezeigt).

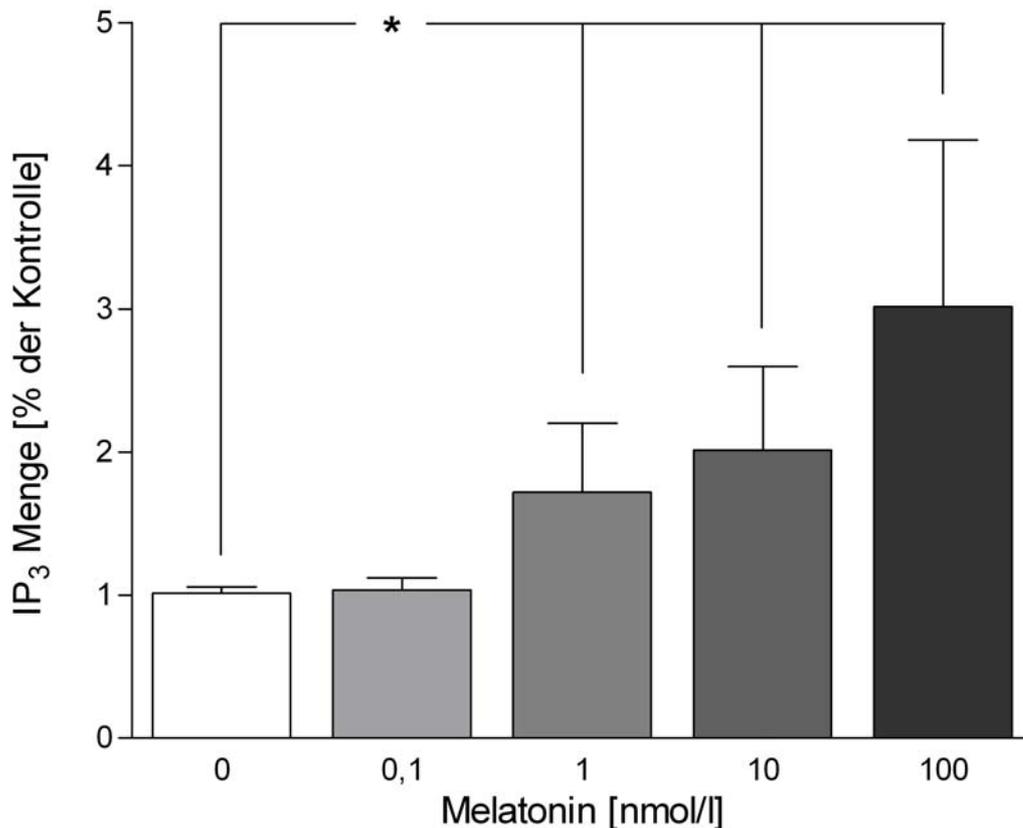


Abb. 6: Mittelwerte \pm SEM der auf die unstimulierte Kontrollgruppe bezogenen intrazellulären IP₃-Spiegel von INS1-Zellen nach 15-minütiger Stimulation mit Melatonin in den Konzentrationen von 0,1 bis 100 nmol/l (n = 6).

3.1.2.2 Wirkung des Melatoninrezeptor Blockers Luzindol

Um die Spezifität der Melatoninwirkung zu validieren, wurde der etablierte, unspezifische Antagonist des MT₁-Rezeptors Luzindol (s. Diskussion) eingesetzt.

In der Kontrollgruppe (Abb. 7, Kontrolle) erfolgte die Stimulation lediglich mit Medium, in der Melatoningruppe (Abb. 7, Melatonin) wurde mit 100 nmol/l Melatonin inkubiert. Batch-Ansätze mit Ko-Stimulation (Abb. 7, Melatonin plus Luzindol) wurden 3 Minuten lang mit Luzindol in einer zur vollständigen Rezeptorblockade suffizienten Konzentration von 30 μ mol/l vorbehandelt. Unter fortbestehender Luzindolapplikation schloss sich eine 15-minütige Inkubation mit 100 nmol/l Melatonin an.

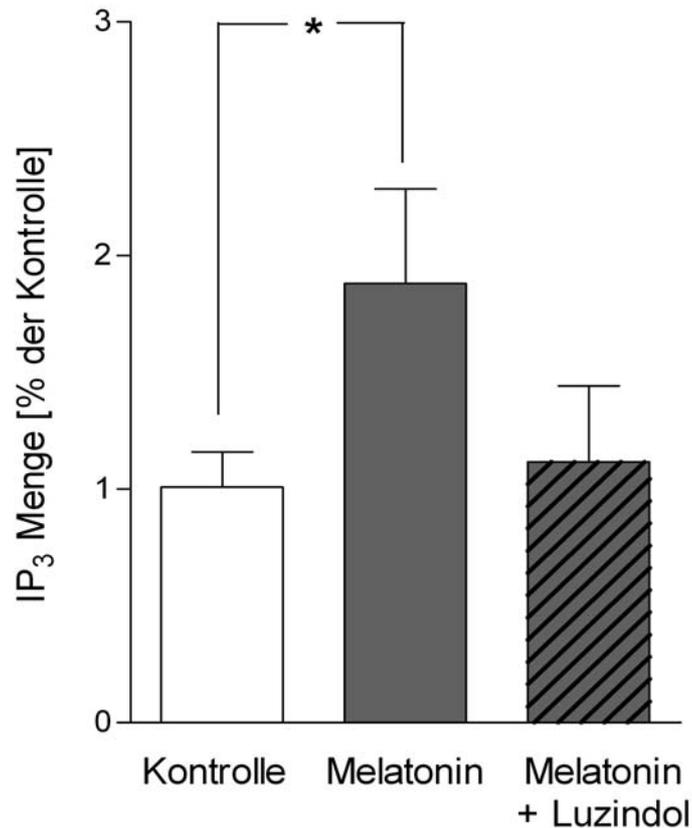


Abb. 7: Mittelwerte \pm SEM der auf die unstimulierte Kontrollgruppe bezogenen intrazellulären IP₃-Spiegel von INS1-Zellen nach 15-minütiger Stimulation mit 100 nmol/l Melatonin und einer Ko-Stimulation mit 100 nmol/l Melatonin plus 30 μ mol/l Luzindol (n = 6).

Die aus den Vorexperimenten bekannte Stimulationswirkung von 100 nmol/l Melatonin auf die IP₃-Signalkaskade der INS1-Zelle bestätigt sich. Unter dem Blocker Luzindol zeigt sich eine fast vollständige Aufhebung der IP₃-stimulierenden Effekte von Melatonin (Abb. 3). Die erhobenen Befunde sind ein überzeugender Hinweis für eine spezifische, rezeptorvermittelte Melatoninwirkung auf die IP₃-Signalkaskade.

3.1.3 Wirkung von Melatonin plus Carbachol

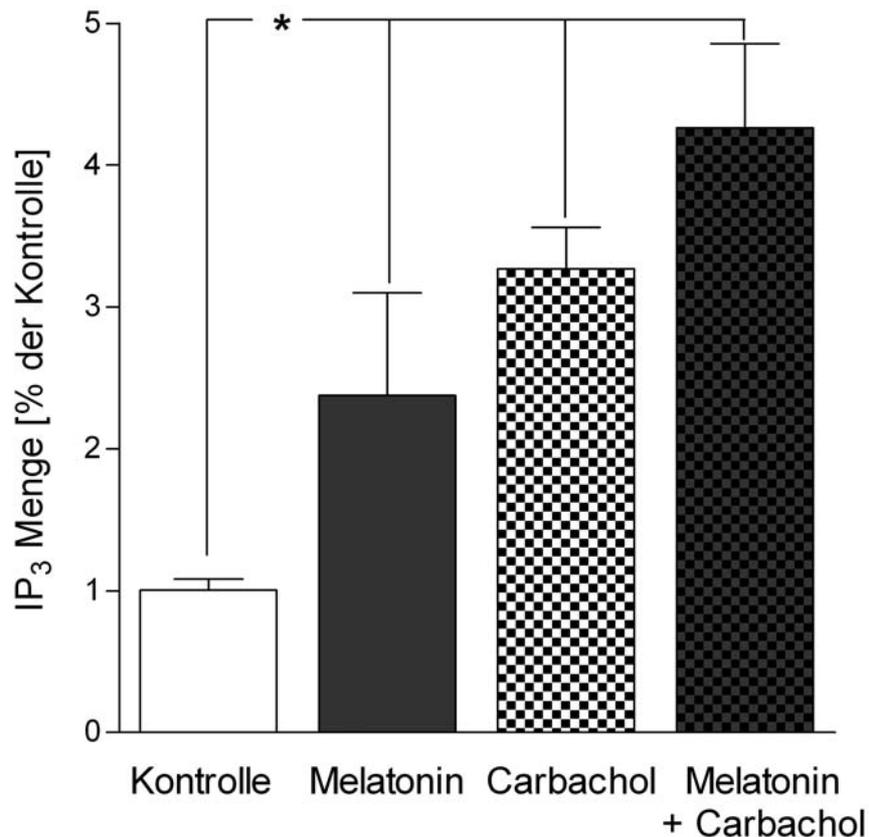


Abb. 8: Mittelwerte \pm SEM der auf die unstimulierte Kontrollgruppe bezogenen intrazellulären IP₃-Spiegel von INS1-Zellen nach 15-minütiger Stimulation mit 100 nmol/l Melatonin, 1 mmol/l Carbachol und einer Ko-Stimulation mit beiden Substanzen (n = 10).

Um die untersuchten Effekte von Melatonin und Carbachol auf die IP₃-Signalkaskade direkt miteinander zu vergleichen, wurden beide Substanzen in einem Experiment nebeneinander und in Ko-Stimulation eingesetzt.

Batch-Ansätze wurden für 15 Minuten entweder mit Medium, mit 100 nmol/l Melatonin, mit 1 mmol/l Carbachol, oder mit Melatonin plus Carbachol in den angegebenen Konzentrationen inkubiert.

Melatonin und Carbachol allein verursachen eine 2,5- bzw. 3,5-fache Steigerung der IP₃-Spiegel in INS1-Zellen. Bei gleichzeitiger Gabe beider Substanzen zeigt sich ein fast additives Verhalten mit einer Steigerung der IP₃-Spiegel auf das 4,5-fache (Abb. 8).

3.2 Molekularbiologische Untersuchungen

3.2.1 Qualitative Analyse der IP₃-Rezeptor Isoformen

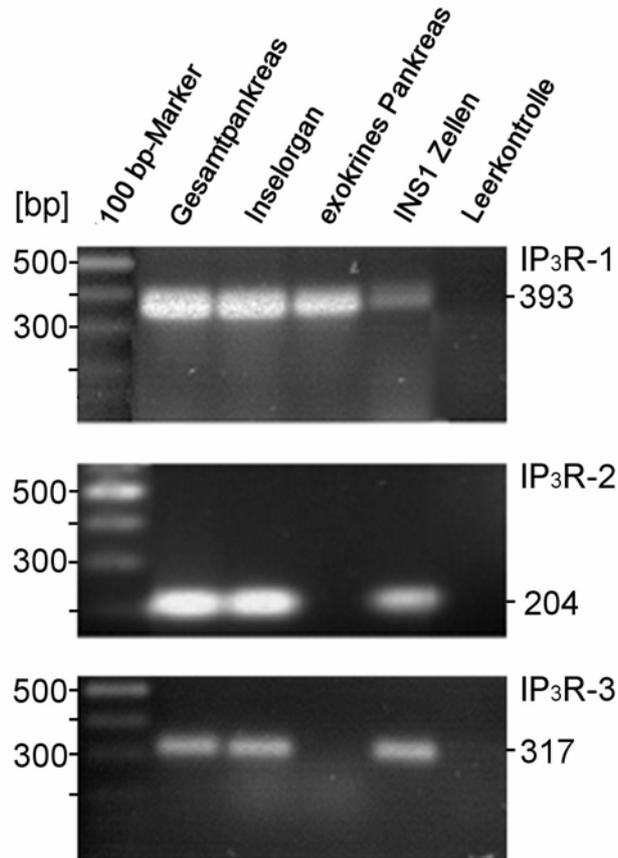


Abb. 9: Expressionsmuster der mRNA der IP₃-Rezeptor Isoformen IP₃R-1, IP₃R-2 und IP₃R-3 im Gesamtpankreas, im endokrinen Pankreas (Langerhans'sche Inseln), im exokrinen Pankreas und in INS1-Zellen. H₂O diente als *non-template* Leertkontrolle. Die Molekulargrößen der entsprechenden spezifischen RT-PCR Produkte im Vergleich zu einem Molekulargrößen-Standard (100-bp-ladder) sind bezeichnet.

Die qualitative Auswertung zeigt für alle drei untersuchten Isoformen des IP₃-Rezeptors ein spezifisches Amplifikationsprodukt der erwarteten Größe (s. Tabelle 1). INS1-Zellen, Langerhans'sche Inseln und das Gesamtpankreas verfügen über alle drei Isoformen des IP₃-Rezeptors. Allein im exokrinen Pankreas konnten die Isoformen IP₃R-2 und IP₃R-3 nicht nachgewiesen werden.

3.2.2 Quantitative Analyse der IP₃-Rezeptor Isoformen

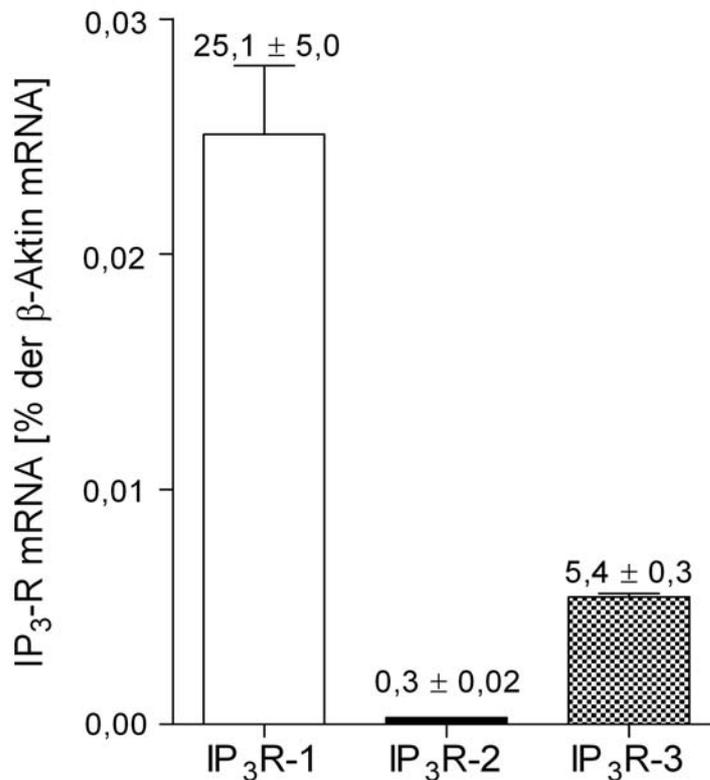


Abb. 10: Mittelwert \pm SEM der relativen, auf β -Aktin skalierten Expressionsstärke der mRNA der drei IP₃-Rezeptor Isoformen in der INS1-Zelle. Zur Berechnung wurde die $\Delta\Delta C_T$ -Methode herangezogen. Zahlenangaben über den Säulen beziehen sich auf 1/1000 β -Aktin (n = 4).

Zur Abschätzung der Bedeutung unterschiedlicher IP₃-Rezeptor Isoformen erfolgte eine Quantifizierung der Expressionsstärke ihrer mRNA mittels real-time RT-PCR. Als Vergleichsmaß diente das konstitutiv exprimierte β -Aktin-Transkript (*house-keeping Gen*).

Die mRNA der IP₃-Rezeptor Isoform 1 (IP₃R-1) dominiert in der INS1-Zelle, gefolgt von der etwa fünf mal schwächer exprimierten mRNA der IP₃-Rezeptor Isoform 3 (IP₃R-3). Die mRNA der IP₃-Rezeptor Isoform 2 (IP₃R-2) ist nur marginal exprimiert.

3.3 Insulin-Befunde in Batch-Kulturen

Aufgrund der sauren IP₃-Extraktion ist eine Bestimmung von Insulin und IP₃-Molekülen im selben Batch-Ansatz nicht möglich. Die hier vorgestellten Insulindaten und die oben beschriebenen IP₃-Befunde stammen daher aus jeweils unterschiedlichen Ansätzen.

3.3.1 Wirkung verschiedener Carbacholkonzentrationen

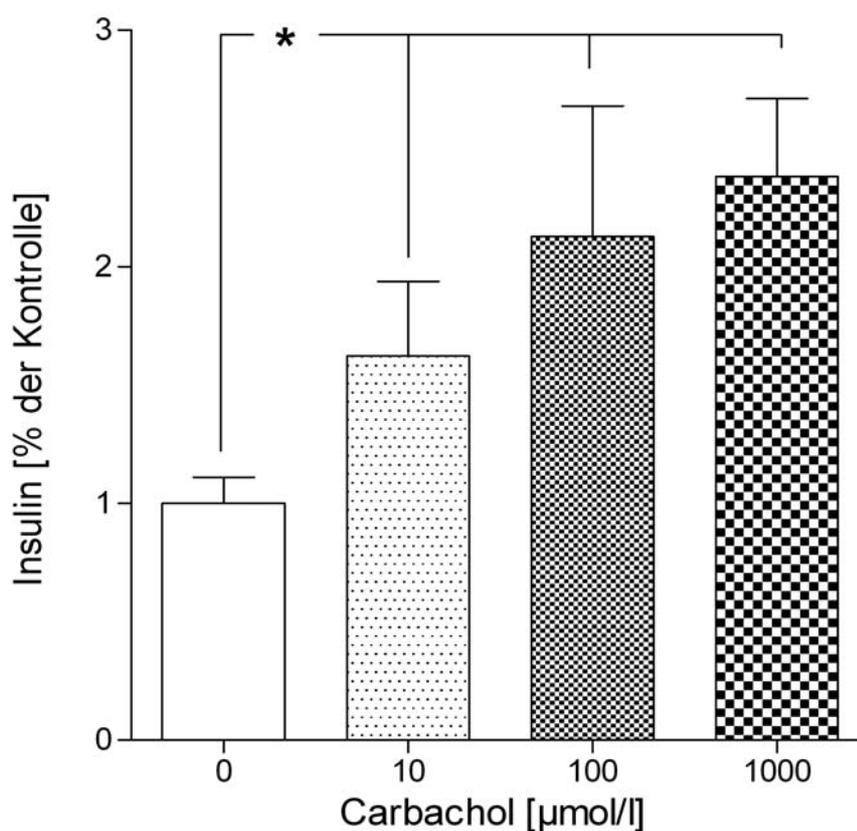


Abb. 11: Mittelwerte \pm SEM der auf die unstimulierte Kontrollgruppe bezogenen Insulinsekretion von INS1-Zellen nach 15-minütiger Stimulation mit Carbachol in den Konzentrationen von 10 bis 1000 $\mu\text{mol/l}$ ($n = 6$).

Das Parasympathomimetikum Carbachol ist für seine Insulin-stimulierende Wirkung bekannt. Batch-Ansätze wurden für 15 Minuten mit Carbachol in den Konzentrationen von 10 bis 1000 $\mu\text{mol/l}$ inkubiert.

Es zeigt sich eine dosisabhängige Stimulation der Insulinsekretion durch Carbachol auf das bis zu 2,5-fache der unstimulierten Kontrolle (Abb. 11). Gleichzeitig im Medium gemessenes cAMP weist gegenüber der Kontrolle keine veränderten Spiegel auf (Daten nicht gezeigt). Carbachol erhöht IP₃-vermittelt, cAMP-unabhängig die Insulinsekretion.

3.3.2 Wirkung von Melatonin

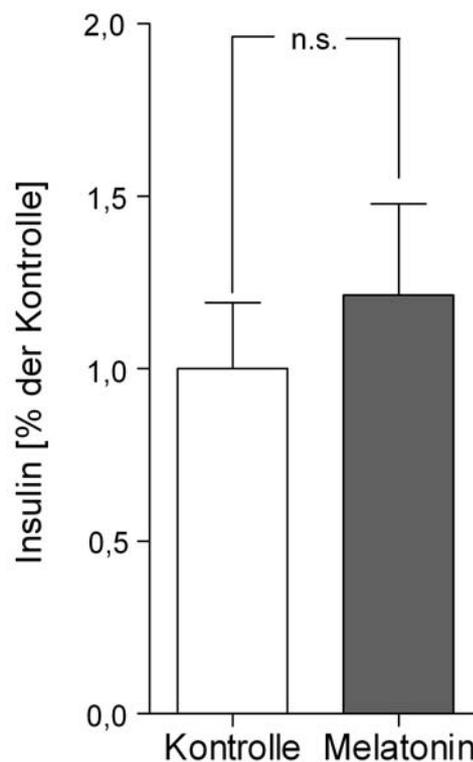


Abb. 12: Mittelwerte \pm SEM der auf die unstimulierte Kontrollgruppe bezogenen Insulinsekretion von INS1-Zellen nach 15-minütiger Stimulation mit 100 nmol/l Melatonin (n = 10).

Von besonderem Interesse war die Wirkung des Hormons Melatonin auf die Insulinsekretion. Batch-Ansätze wurden für 15 Minuten mit einer Konzentration von 100 nmol/l Melatonin inkubiert. In der Kontrollgruppe erfolgte die Stimulation lediglich mit Medium.

Es zeigt sich kein signifikanter Einfluss einer alleinigen Gabe von Melatonin auf die Insulinsekretion (Abb. 12). Eine der IP_3 -Stimulation konsekutiv folgende Insulinsekretion, wie etwa bei Carbachol, kann nicht festgestellt werden.

3.3.3 Wirkung von Melatonin plus Carbachol

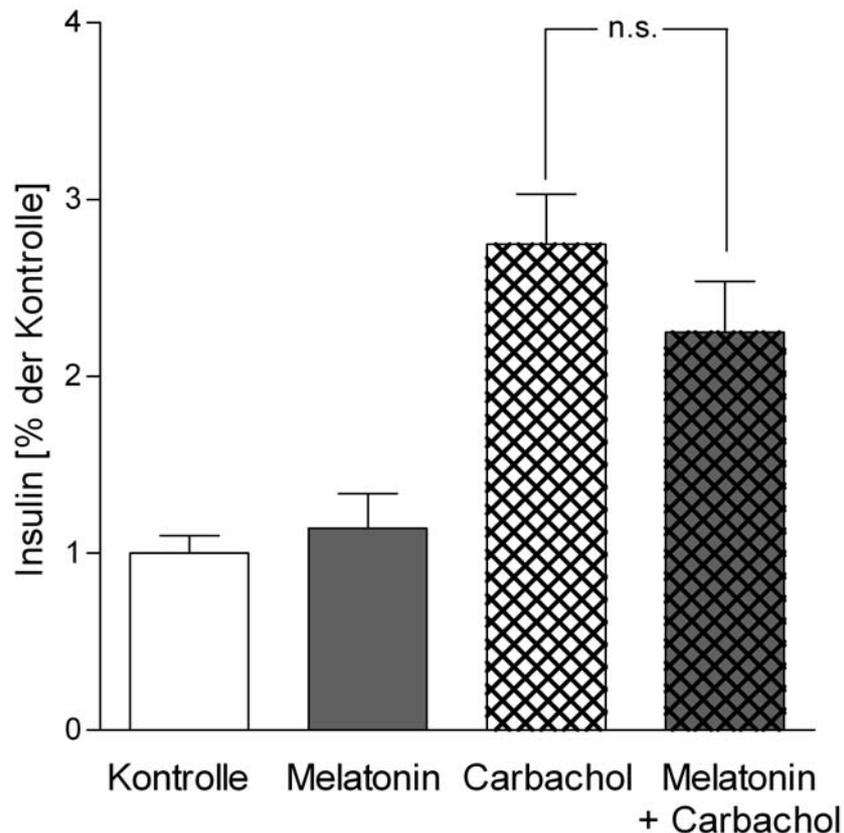


Abb. 13: Mittelwerte \pm SEM der auf die unstimulierte Kontrollgruppe bezogenen Insulinsekretion von INS1-Zellen nach 15-minütiger Stimulation mit 100 nmol/l Melatonin, 1 mmol/l Carbachol und einer Ko-Stimulation mit beiden Substanzen (n = 6).

Melatonin ist dafür bekannt, die Wirkung anderer Substanzen zu modulieren. Insbesondere Carbachol als eingesetzte Modellsubstanz für die IP_3 -getriggerte Insulinsekretion war von Interesse. Daher wurden beide Substanzen in einem Experiment nebeneinander und in Ko-Stimulation eingesetzt.

Batch-Ansätze wurden für 15 Minuten entweder mit Medium, mit 100 nmol/l Melatonin, mit 1 mmol/l Carbachol, oder mit Melatonin plus Carbachol in den angegebenen Konzentrationen inkubiert.

In Bestätigung der vorangegangenen Untersuchungen verursacht Melatonin allein keine Erhöhung der Insulinausschüttung gegenüber der Kontrolle, während Carbachol die Insulinsekretion stimuliert. Die Kombination beider Substanzen führt zu einer diskreten Dämpfung der Carbachol-induzierten Insulinsekretion (Abb. 13). Zur Klärung dieses Phänomens muss auf die Superfusionsuntersuchungen und die Diskussion verwiesen werden.

3.4 Insulin-Befunde in Superfusionen

Zur Untermauerung und Erweiterung der Insulin-Befunde an Batch-Kulturen wurde die Superfusionstechnik herangezogen. In das Medium sezerniertes Insulin konnte mit einer zeitlichen Auflösung von drei Minuten gemessen werden. Die Technik erlaubte neben einer quantitativen Aussage zur Sekretionsleistung auch eine Beurteilung der Sekretionskinetik. Da die Zellen hier anderen, der *in vivo* Situation eher entsprechenden, Bedingungen als im Batch-Ansatz ausgesetzt waren, wurden andere Stimulationszeiten und -konzentrationen gewählt.

Die Darstellungen der Ergebnisse (Abb. 14, 16-18) begrenzen sich auf die gemessene Insulinsekretion bei Stimulation der Zellen sowie unmittelbar davor und danach. Die einzelnen Stimulationen erfolgten in einem Abstand von jeweils mindestens 45 Minuten (15 Fraktionen zu je drei Minuten), welcher in den Abbildungen nicht gezeigt ist.

3.4.1 Wirkung verschiedener Carbacholkonzentrationen

Carbachol diente in den durchgeführten Untersuchungen als Modellsubstanz der IP₃-getriggerten Insulinausschüttung.

In Superfusionen führt eine 3-minütige Stimulation mit Carbachol in den Konzentrationen von 10 µmol/l bis 300 µmol/l zu einer dosisabhängigen Stimulation der Insulinausschüttung. Die Insulinsekretion zeigt einen distinkten Gipfel und ist zeitlich eng an die Stimulation mit Carbachol gebunden (Abb. 14).

Die beschriebenen Veränderungen sind maßgeblich IP₃-vermittelt, da erwartungsgemäß keine Veränderung der cAMP-Spiegel auftritt (Daten nicht gezeigt).

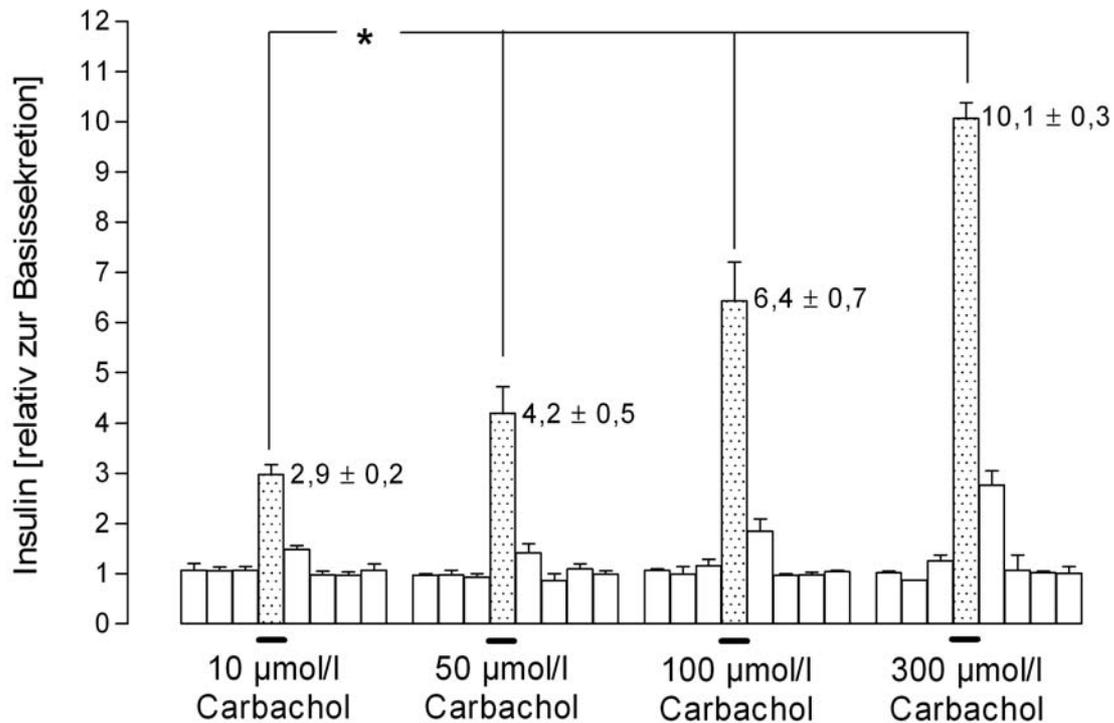


Abb. 14: Mittelwerte ± SEM der auf die Basislinie bezogenen Insulinsekretion von INS1-Zellen in Superfusion nach dreiminütiger Stimulation mit Carbachol in den Konzentrationen von 10 bis 300 µmol/l (zusammengefasste Ergebnisse aus n = 4 Superfusionen).

3.4.2 Wirkung von Melatonin

3.4.2.1 Wirkung von Melatonin

Von besonderem Interesse war die Wirkung des Hormons Melatonin auf die Insulinsekretion.

Melatonin moduliert die Wirkung zahlreicher Substanzen auf die Insulinsekretion. In alleiniger Gabe kann allerdings kein stimulierender Effekt von Melatonin auf die Insulinsekretion pankreatischer β-Zellen nachgewiesen werden. Selbst pharmakologische Konzentrationen von bis zu 1 mmol/l bleiben in dieser Hinsicht wirkungslos.

Stundenlange Inkubationen mit Melatonin verursachen ebenfalls keine Insulinsekretion.

3.4.2.2 Wirkung von Melatonin unter PTX

Für Melatonin ist eine Hemmung der cAMP-Signalkaskade und damit konsekutiv der Insulinsekretion beschrieben. Um eine mutmaßliche, dadurch verdeckte Stimulation der Insulinsekretion zu demaskieren, wurde die cAMP-Signalkaskade durch 48-stündige Vorinkubation der Zellen mit 250 ng/ml PTX blockiert.

Zum Nachweis der Wirksamkeit von PTX wurde für die Superfusion ein spezielles Stimulationsschema entwickelt (Abb. 15).

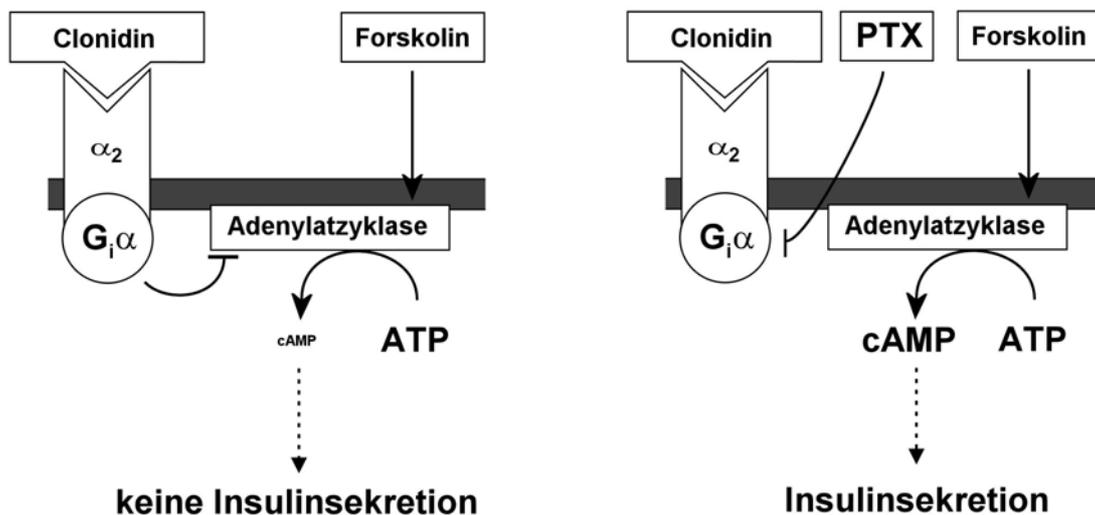


Abb. 15: Prinzip des Tests einer erfolgreichen Blockade des G_iα-Proteins mit PTX.

Der α₂-adrenerge Signalstoff Clonidin hemmt über das PTX-sensible G_iα-Protein die Adenylatzyklase vermittelte cAMP-Bildung. Forskolin stimuliert direkt und PTX-unabhängig die Adenylatzyklase. Im unveränderten Zellsystem hebt Clonidin die Forskolin stimulierte cAMP-Produktion fast völlig auf, die Ko-Stimulation mit beiden Substanzen führt daher zu nur minimalen Veränderungen des Insulinsignals. Unter Hemmung des G_iα-Proteins mittels PTX ist Clonidin in seiner Wirkung blockiert. Ko-Stimulation mit Clonidin plus Forskolin führt bei PTX-blockierten Zellen folglich zu einem Anstieg der Insulinsekretion (Abb. 16).

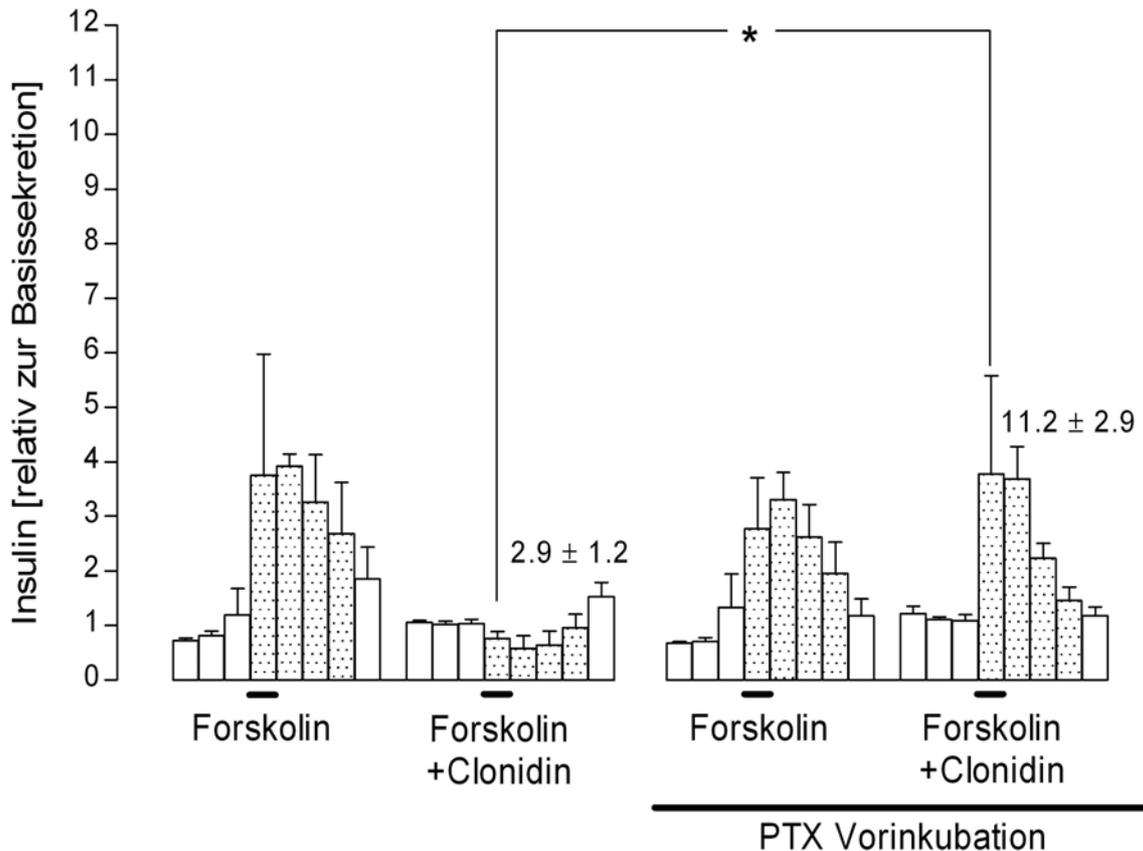


Abb. 16: Mittelwerte \pm SEM der auf die Basislinie bezogenen Insulinsekretion von INS1-Zellen in zwei Superfusionsgruppen. Die Zellen der zweiten Gruppe (rechts) erhielten eine Vorinkubation mit PTX (s. Text). In beiden Gruppen erfolgte eine 3-minütige Stimulation mit 2 $\mu\text{mol/l}$ Forskolin und eine 3-minütige Ko-Stimulation mit 2 $\mu\text{mol/l}$ Forskolin plus 1 $\mu\text{mol/l}$ Clonidin (zusammengefasste Ergebnisse aus $n = 4$ Superfusionen).

Die Modulationswirkung von Melatonin auf verschiedene insulinstimulierende Substanzen wird durch PTX-Behandlung verändert. Die alleinige Gabe von Melatonin bleibt allerdings trotz nachweislich wirksamer PTX-Blockade ohne stimulierenden Effekt auf die Insulinsekretion pankreatischer β -Zellen.

3.4.3 Wirkung von Melatonin plus Carbachol

3.4.3.1 Wirkung von Melatonin plus Carbachol

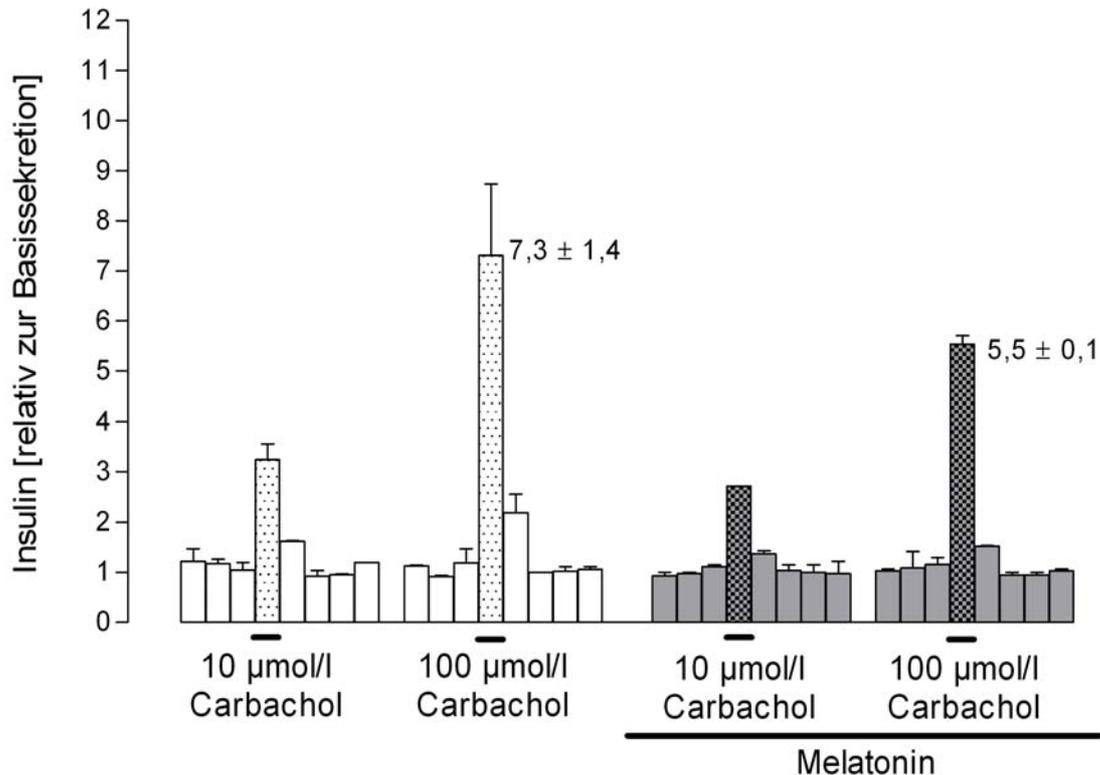


Abb. 17: Mittelwerte \pm SEM der auf die Basislinie bezogenen Insulinsekretion von INS1-Zellen in zwei Superfusionsgruppen. In beiden Gruppen erfolgte eine 3-minütige Stimulation mit Carbachol in den Konzentrationen von 10 und 100 $\mu\text{mol/l}$. Die Zellen der zweiten Gruppe (dunkle Balken) erhielten beginnend sechs Stunden vor der ersten Carbacholstimulation einen Mediumzusatz von 100 nmol/l Melatonin (zusammengefasste Ergebnisse aus $n = 4$ Superfusionen).

Carbachol diente in den durchgeführten Untersuchungen als Modellsubstanz der IP_3 -getriggerten Insulinausschüttung. Für Melatonin ist eine Inhibition der Wirkung Insulin-stimulierender Substanzen nach einer mehrstündigen Inkubationszeit beschrieben. Es wurden zwei Gruppen von Superfusionen aufgestellt. Beide Gruppe erhielten eine 3-minütige Stimulation mit 10 und 100 $\mu\text{mol/l}$ Carbachol. Die zweite Gruppe wurde sechs Stunden vor der ersten Carbacholstimulation auf ein Medium mit Melatonin in einer Konzentration von 100 nmol/l umgestellt.

Erwartungsgemäß führt eine 3-minütige Stimulation mit Carbachol in den Konzentrationen von 10 $\mu\text{mol/l}$ und 100 $\mu\text{mol/l}$ zu einer Stimulation der Insulinausschüttung. Die Insulinsekretion zeigt einen distinkten Gipfel und ist zeitlich eng an die Stimulation mit Carbachol gebunden. In den Melatonin-inkubierten Superfusionen zeichnet sich eine Dämpfung der Carbachol-induzierten Insulinsekretion ab (Abb. 17).

3.4.3.2 Wirkung von Melatonin plus Carbachol unter PTX

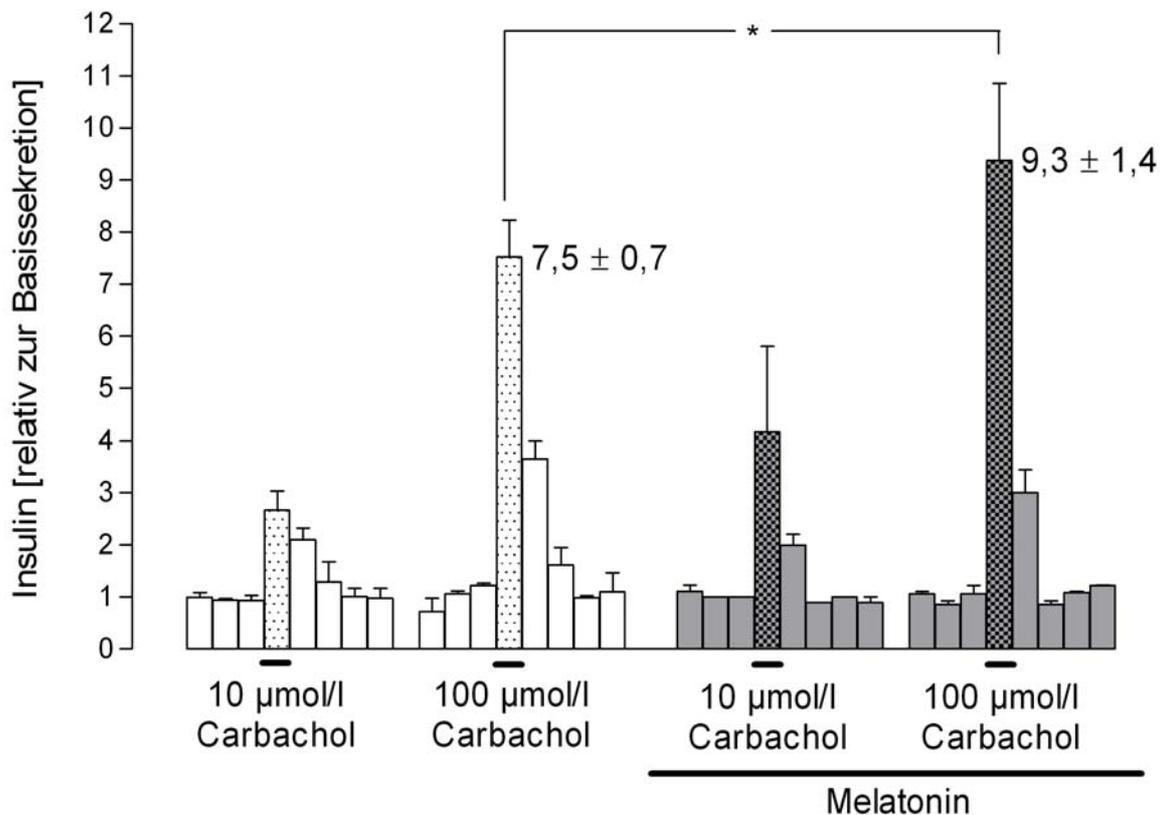


Abb. 18: Mittelwerte \pm SEM der auf die Basislinie bezogenen Insulinsekretion von INS1-Zellen in zwei Superfusionsgruppen. Beide Gruppen waren PTX-behandelt und in beiden Gruppen erfolgte eine 3-minütige Stimulation mit Carbachol in den Konzentrationen von 10 und 100 $\mu\text{mol/l}$. Die Zellen der zweiten Gruppe (dunkle Balken) erhielten beginnend sechs Stunden vor der ersten Carbacholstimulation einen Mediumzusatz von 100 nmol/l Melatonin (zusammengefasste Ergebnisse aus $n = 4$ Superfusionen).

Der Aufbau der Untersuchungen entspricht den unter 3.4.3.1 beschriebenen Superfusionen. Allerdings wurden die eingesetzten Zellen beider Gruppen zusätzlich einer 24-stündigen Vorinkubation mit 250 ng/ml PTX unterzogen. Der Nachweis einer suffizienten Blockade der $G_i\alpha$ -Proteine erfolgte mit dem unter 3.4.2.2 beschriebenen Stimulationsschema.

Unter diesen Bedingungen tritt bei zusätzlicher Melatoninapplikation eine Verstärkung der Carbachol-induzierten Insulinsekretion auf (Abb. 18).

4. Diskussion

4.1 Die INS1-Zelllinie als Modellsystem

In den durchgeführten Studien wurde die INS1 Ratten-Insulinomazelllinie verwendet, um die IP₃-Signalkaskade pankreatischer β -Zellen zu untersuchen. Im Folgenden soll dargelegt werden, warum dieses Modellsystem gewählt wurde.

Die pankreatische β -Zelle liegt, wie in der Einleitung beschrieben, mit anderen Zelltypen zusammen in den Langerhans'schen Inseln. Je nach Spezies bilden Hunderte bis Tausende dieser Inseln den endokrinen Teil des Pankreas.

Die Gewinnung Langerhans'scher Inseln aus Ratten [Lacy et al., 1967] oder Schweinen [Ricordi et al., 1990] und die anschließende Isolation nativer β -Zellen aus den Inseln [Van de Winkel et al., 1983] führt zu Primärzellkulturen, die nur relativ kurz vital bleiben [Kaiser et al., 1991]. Demgegenüber besitzen immortalisierte, endokrin aktive β -Zellen ein nahezu unbegrenztes Teilungspotential und bieten sich daher für *in vitro* Untersuchungen als leicht verfügbares und repräsentatives Modellsystem an. Die durchgeführten, auf hohen Zellanzahlen basierenden Untersuchungen verlangten den Einsatz eines solchen Modellsystems.

Ein ideales Modellsystem der primären pankreatischen β -Zelle erfüllt folgende Kriterien: Induzierbare Insulinsekretion durch verschiedene Stimuli physiologischer Konzentration mit nativer Sekretionskinetik durch nahezu unverändertem Metabolismus und der Konservierung physiologischer Signalkaskaden, Stabilität über viele Teilungszyklen und Immortalität. Es ist ersichtlich, dass ein hoher Differenzierungsgrad und eine gute Wachstumspotenz gleichermaßen gefordert sind, was sich zellbiologisch nahezu ausschließt [Wollheim et al., 1990]. Dies mag erklären, dass nur wenige Zelllinien den geforderten Kriterien entsprechen.

Zu den gegenwärtig etablierten Zelllinien zählen die Maus-Insulinomalinie MIN6, die Hamster-Insulinoma Linie HIT, sowie die Ratten-Insulinoma Linien RIN und β TC. Aus einer Hybridkultur von Lymphozyten und der RIN-Linie wiederum ist die INS1-Zelllinie hervorgegangen. In unterschiedlich starker Ausprägung besitzen alle Insulinomazelllinien Besonderheiten, die sie von nativen pankreatischen β -Zellen unterscheiden, und die berücksichtigt werden müssen.

So ist für Zellen der β TC-6-Linie [Poitout et al., 1995] und der HIT-T15-Linie [Kendall et al., 1995] neben der Produktion von Insulin die Synthese von Glucagon und

Somatostatin beschrieben. Diese Substanzen sind im normalen Inselorgan Sekretionsprodukte der α - und δ -Zelltypen. Eine derartige Ko-Synthese aller drei Substanzen in einer Zelle kann in Progenitorzellen während der Pankreasentwicklung beobachtet werden [Poitout et al., 1996]. Das Auftreten dieses Phänomens in β -Zellen gilt als Zeichen der Entdifferenzierung [Alpert et al., 1988; Hashimoto et al., 1988]. Weiterhin wird beispielsweise in RIN- oder HIT-Zellen ein, verglichen mit nativen pankreatischen β -Zellen, bis zu 1000-fach verringerter Insulingehalt beobachtet [Santerre et al., 1981; Praz et al., 1983; Asfari et al., 1992]. Keine der Tumorzelllinien sezerniert Insulin auf einen Glukosereiz in dem gleichen Muster, wie es von nativen pankreatischen β -Zellen bekannt ist. Einige Zelllinien reagieren bereits auf geringe Glukosemengen mit ihrer maximalen Ausschüttung [Poitout et al., 1996]. Andere, wie die INS1-Zelllinie, reagieren zwar auf den physiologischen Bereich von 5 bis 15 mmol/l Glukose mit einer Insulinsekretion [Asfari et al., 1992], diese ist aber gegenüber der Basalsekretion weniger stark erhöht als in nativen β -Zellen. In jüngerer Zeit wurde mit unterschiedlichem Erfolg versucht, das Problem mangelnder Insulinausschüttung durch artifizielle Verstärkung der zellulären Glukokinase- und/oder GLUT2-Aktivität zu beheben [McClenaghan et al., 1999].

Unter den verfügbaren Zelllinien erfüllt die 1992 von Asfari und Mitarbeitern beschriebene INS1 Ratten-Insulinomazelllinie die oben geforderten Kriterien vergleichsweise gut. Der Insulingehalt liegt bei etwa 20 % des Wertes nativer β -Zellen und die Glukoseresponsivität entspricht dem physiologischen Bereich. Darüber hinaus detektierten Immunfluoreszenzuntersuchungen ausschließlich Insulin in INS1-Zellen. Glucagon, Somatostatin oder das Pankreatische Polypeptid konnten nicht nachgewiesen werden [Asfari et al., 1992]. Dies belegt den erhaltenen, hohen Differenzierungsgrad. Weiterhin blieb die Proliferation der INS1-Zelllinie über zwei Jahre hinweg stabil ohne Veränderung ihrer Merkmale [Asfari et al., 1992].

Die aus einer Hybridkultur von RIN-Zellen und Lymphozyten entstandene Zelllinie hat aus ihrer Abstammung eine bemerkenswerte Besonderheit konserviert. Zum Überleben benötigen die Zellen 2-Mercaptoethanol in einer Konzentration von 50 μ mol/l im Medium. Die wachstums- und differenzierungsvermittelnde Bedeutung von 2-Mercaptoethanol für verschiedene Lymphom-Zelllinien ist gut beschrieben [Chen et al., 1972]. Ursächlich soll die Stimulation der Cystinaufnahme durch 2-Mercaptoethanol zu einem erhöhten Glutathion-Spiegel führen [Ishii et al., 1981;

Noelle et al., 1981; Ishii et al., 1987; Pruett et al., 1989]. Tatsächlich konnte eine 15-fache Erhöhung des zellulären Glutathions unter 2-Mercaptoethanol bei INS1-Zellen nachgewiesen werden [Asfari et al., 1992]. Die genauen Mechanismen der Wirkung von 2-Mercaptoethanol sind allerdings unbekannt.

Bisherige Arbeiten der Arbeitsgruppe Peschke haben die Wirkung von Melatonin auf die cAMP-Signalkaskade der INS1-Zelllinie charakterisiert. In Fortführung dieser Untersuchungen und in Anbetracht der beschriebenen Vorteilen der INS1-Zelllinie, wurden INS1-Zellen als experimentelles Modellsystem zur Untersuchung der IP₃-Signalkaskade pankreatischer β -Zellen eingesetzt.

4.2 Auswahl der IP₃-Detektionsmethode

Zu Beginn der Untersuchungen stand die Frage nach einer geeigneten Methode zur Quantifizierung intrazellulärer IP₃-Mengen. In der Literatur sind eine Reihe von Methoden und Techniken beschrieben [Maslanski et al., 1990; Palmer et al., 1990; Balla, 1997; Challiss, 1997; Shears, 1997]. Jede Vorgehensweise erfordert die saure Extraktion zellulärer Inositolphosphate. Im Anschluss gibt es eine Vielzahl von Möglichkeiten, sowohl zur Selektion, als auch zur Quantifizierung der gesuchten Inositolphosphate.

Die Selektion geschieht üblicherweise durch eine Form der Chromatographie. Mittels *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC) ist sogar eine Quantifizierung möglich, doch das Verfahren ist sehr aufwendig.

Die Quantifizierung schließt sich an die Selektion des gesuchten Inositolphosphats an. Eine Möglichkeit besteht in einer enzymatisch gekoppelten Reaktion unter Verbrauch des gesuchten Inositolphosphats und Bildung eines fluoreszierenden Produktes [Balla, 1997].

Ein anderes, sehr weit verbreitetes Verfahren beruht auf einem Markierungsprinzip [Challiss, 1997]. Dem Zellmedium wird ³H-markiertes Inositol beigegeben. ³H ist ein β -Strahler mit einer physikalischen Halbwertszeit von 12,3 Jahren [Smith et al., 2003]. Bei ausreichender Inkubationszeit stellt sich ein Gleichgewicht zwischen unmarkierten und ³H-markierten Phosphatidylinositiden in den Zellen ein. Dieses Gleichgewicht ist zwingende Voraussetzung für die Bestimmungsmethode. Die Dauer der nötigen Inkubationszeit hängt von Zellart, Wachstumsgeschwindigkeit und

dem Angebot an nicht-radioaktivem Inositol ab. Unmittelbar vor dem Experiment erfolgt ein Wechsel auf nicht-radioaktives Medium. Nach der gewünschten Stimulation der Zellen im Experiment erfolgt eine saure Extraktion aller Inositolphosphate. Es schließt sich die Selektion nach den oben beschriebenen Verfahren an. Inositolphosphatmengen können dann mit Hilfe eines β -Counters quantifiziert werden.

Der Vorteil des Verfahrens ist, dass neben IP_3 -Molekülen andere Inositolphosphate und Phosphatidylinositide untersucht werden können. Der Nachteil ist die Notwendigkeit des Einsatzes radioaktiver Nuklide in der Zellzucht. Es können Aussagen zu den relativen Verhältnissen einzelner Inositolspeicher untereinander gemacht werden, die absolute, zelluläre IP_3 -Menge ist sehr schwer ableitbar.

Eine Methode, welche Selektion und Quantifizierung von IP_3 -Molekülen in einem Schritt vereint, ist der IP_3 -Radiorezeptorassay (IP_3 -RRA). Das Prinzip der IP_3 -Bestimmung ähnelt einem Radioimmunoassay und beruht auf der Konkurrenz einer bekannten Konzentration 3H -markierter IP_3 -Moleküle (Tracer) und einer unbekannt Konzentration unmarkierter IP_3 -Moleküle der Probe um eine begrenzte, definierte Anzahl hochspezifischer IP_3 -Bindungsproteine. Die Quantifizierung geschieht mittels einer Eichkurve. Das hochspezifisch IP_3 -bindende Protein ist der IP_3 -Rezeptor selbst. Hohe Konzentrationen dieses Rezeptors können aus Gehirn und Nebenniere extrahiert werden. Die Methode ist spezifisch für IP_3 -Moleküle, da andere Inositolphosphate praktisch nicht gebunden werden. Die Vorteile sind eine hohe Spezifität und Selektivität bei akzeptablem technischen Aufwand. Der Nachteil sind die relativ hohen Kosten.

Unter den betrachteten Methoden erschien die IP_3 -Quantifizierung mit dem IP_3 -Radiorezeptorassay für die zu untersuchende Fragestellung am besten geeignet.

4.3 Transduktion des Melatoninsignals in pankreatischen β -Zellen

Im Folgenden soll unter Diskussion der erhobenen Befunde der hypothetische Weg des Melatoninsignals über die IP_3 -Signalkaskade dargestellt werden. Dieser Weg beginnt mit der Bindung von Melatonin an den MT_1 -Rezeptor, es folgen die Aktivierung der Phospholipase $C\beta$, die Spaltung von Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat zu Diazylglyzerol und IP_3 , die Ca^{2+} -Freisetzung aus dem Endoplasmati-

schen Retikulum durch IP₃-Moleküle und schließlich die Insulinsekretion. Carbachol nutzt diesen Weg, wie Angaben aus der Literatur [Wollheim et al., 1986; Zawalich et al., 1996; Gasa et al., 1999; Dyachok et al., 2004] und die eigenen Befunde [Bach et al., 2005] deutlich belegen. Melatonin bedient sich ebenfalls der IP₃-Signalkaskade. In der Endstrecke kommt es jedoch nur unter besonderen Bedingungen zur Aktivierung der Insulinsekretion.

4.3.1 IP₃-Liberalisierung durch Melatonin

In der Literatur sind unterschiedliche Wirkungen von Melatonin auf die IP₃-Signalkaskade beschrieben. Verschiedenen Autoren schlagen unterschiedliche Mechanismen vor [Popova et al., 1995; Godson et al., 1997; Brydon et al., 1999; Zemkova et al., 2000; Blumenau et al., 2001; Lai et al., 2001, 2002; MacKenzie et al., 2002; Balik et al., 2004; Girouard et al., 2004; Markowska et al., 2004]. Stimulierende oder sogar inhibierende Effekte von Melatonin auf die IP₃-Freisetzung sind von Zelltyp, Subtyp des Melatoninrezeptors, Bestand an G-Proteinen und anderen Signalkaskadenproteinen abhängig.

In einigen Zelltypen oder Geweben besitzt Melatonin einen hemmenden Einfluss auf die IP₃-Signalkaskade, nachweislich bei gonadotrophen Hypophysenzellen neonater Ratten [Zemkova et al., 2000; Balik et al., 2004] oder in isolierten Mesenterialarterien von hypertensiven Ratten [Girouard et al., 2004]. Der verantwortliche Mechanismus ist unklar.

In Hühner-Splenozyten soll Melatonin entweder aktivierend oder hemmend auf die IP₃-Freisetzung wirken, abhängig vom Ausmaß der Zellstimulation. Dieses Verhalten soll durch die beiden Melatoninrezeptor-Subtypen MT₂ und Mel_{1c} vermittelt sein [Markowska et al., 2004].

Um eindeutig beantworten zu können, ob Melatonin stimulierend oder hemmend auf die IP₃-Signalkaskade der pankreatischen β -Zelle wirkt, wurden die Zellen mit Melatonin und Carbachol ko-stimuliert (Abb. 8).

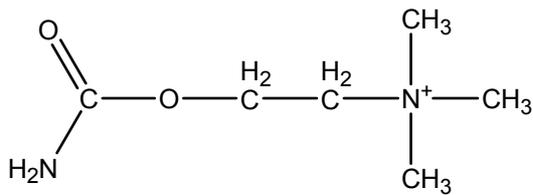


Abb. 19: Carbachol

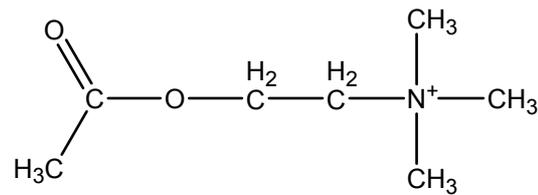


Abb. 20: Acetylcholin

Carbachol (Abb. 19) bzw. sein physiologisches Äquivalent Acetylcholin (Abb. 20) sind gut charakterisierte Substanzen, welche Signale des parasymphatischen Nervensystems übermitteln. Es ist wohl bekannt und durch die erhobenen Befunde bestätigt, dass Carbachol die Insulinausschüttung pankreatischer β -Zellen stimuliert [Wollheim et al., 1986; Zawalich et al., 1996; Gasa et al., 1999; Dyachok et al., 2004; Peschke et al., 2005] (Abb. 11, 14).

Ein denkbarer hemmender Effekt von Melatonin auf die IP_3 -Signalkaskade würde durch die gleichzeitige Stimulation mit Carbachol sichtbar werden: Melatonin würde den Carbachol-Effekt auf die IP_3 -Signalkaskade dämpfen. Dies ist jedoch nicht der Fall. Im Gegenteil, sowohl Melatonin allein als auch Carbachol allein erhöhen den IP_3 -Spiegel. Die Ko-Stimulation führt zu einem nahezu summativen Effekt auf die IP_3 -Signalkaskade (Abb. 8).

Die IP_3 -steigernde Wirkung von Melatonin ist in weiteren Experimenten bestätigt. Evidenz für die Spezifität des Phänomens ist die beobachtete Dosisabhängigkeit der IP_3 -Erhöhung durch Melatoninstimulation in den Konzentrationen von 1 bis 100 nmol/l (Abb. 6). Eine ähnliche Stimulation der IP_3 -Signalkaskade durch Melatonin ist in Hirnschnitten von Hühnern [Popova et al., 1995] oder in kultivierten Ovarialzellen des Chinesischen Hamsters [MacKenzie et al., 2002] beschrieben.

Die im Blut von Säugetieren physiologischen Melatoninkonzentrationen erreichen Höchstwerte von bis zu 1 nmol/l [Hardeland et al., 1997]. Dennoch wurden experimentell höhere Konzentrationen eingesetzt, da die Sensibilität der IP_3 -Detektionsmethode ebenso wie die Responsivität des Modellsystems unklar waren. Des Weiteren wird in zahlreichen Publikationen auf die Möglichkeit einer lokalen Melatoninanreicherung in einzelnen Organen hingewiesen [Hardeland et al., 1997]. Bei einzelligen Organismen wie dem Dinoflagellaten *Gonyaulax polyedra* kann Melatonin Konzentrationen von bis zu 1 mmol/l erreichen [Hardeland et al., 1997].

Der zeitliche Verlauf der Melatonin-getriggerten IP_3 -Entstehung zeigt typischerweise einen Gipfel innerhalb der ersten Minuten nach Stimulationsbeginn und pegelt sich in

den folgenden 30 Minuten auf ein langsam abfallendes Plateau ein. Dieser Verlauf der IP_3 -Freisetzung ist typisch für pankreatische Inseln [Zawalich et al., 1996] aber auch für andere Systeme [Popova et al., 1995]. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Aktivierung der IP_3 -Signalkaskade durch Melatonin schnell und unmittelbar erfolgt.

Dies ist ein großer Unterschied zum Einfluss von Melatonin auf die cAMP-Signalkaskade der β -Zelle. Dort benötigt die Inhibition der Adenylatzyklase eine 6- bis 8-stündige Vorinkubationszeit mit Melatonin [Peschke et al., 1997; 2000; 2002b; Kemp et al., 2002].

4.3.2 Der MT_1 -Rezeptor und die IP_3 -Signalkaskade

Luzindol (Abb. 22) gilt als Blocker von Melatoninrezeptoren. Die Substanz besitzt eine etwa 10 bis 20 mal höhere Affinität zum MT_2 -Rezeptor als zum MT_1 -Rezeptor [Audinot et al., 2003]. Da auf INS1-Zellen nur MT_1 - und keine MT_2 -Rezeptoren nachweisbar sind [Peschke et al., 2000; 2002a; 2002b; Kemp et al., 2002], ist dieser Umstand in der vorliegenden Untersuchung jedoch irrelevant. Weiterhin ist Luzindol im Gegensatz zu neuartigen MT_1 -selektiven Blockern wie S26131 kommerziell gut verfügbar und blockt Melatoninrezeptoren mit hoher Wirksamkeit [Audinot et al., 2003].

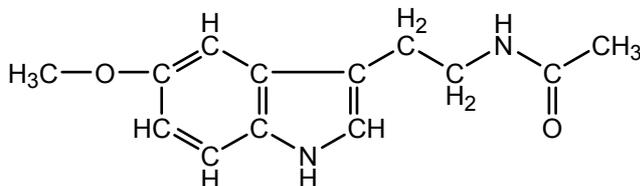


Abb. 21: Melatonin

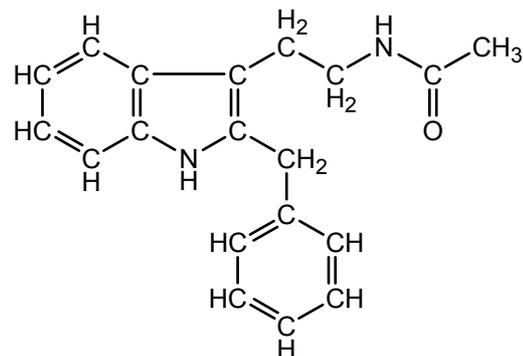


Abb. 22: Luzindol

Der stimulierende Effekt von Melatonin (Abb. 21) auf die IP_3 -Freisetzung wird spezifisch über den membranständigen MT_1 -Rezeptor vermittelt. Luzindol (30 $\mu\text{mol/l}$) kann die IP_3 -freisetzenden Effekte von Melatonin komplett unterbinden (Abb. 7).

4.3.3 G-Proteine in der IP₃-Signalkaskade

Das an den MT₁-Rezeptor gekoppelte G-Protein und die Phospholipase C β stimulierende Untereinheit des G-Proteins muss nach den zuvor beschriebenen Untersuchungen spekulativ bleiben, da ein bestimmter Rezeptor in unterschiedlichen Zellen an unterschiedliche G-Proteine koppeln kann [Blumenau et al., 2001].

In der pankreatischen β -Zelle sind G-Proteine mit den Untereinheiten G_{i1} α , G_{i2} α , G_{i3} α als Adenylatzyklase hemmende Komponenten und G_{o1} α , G_{o2} α sowie G_{q/11} α als Phospholipase C β stimulierende Komponenten beschrieben [Peschke et al., 1997].

Eine Reihe von Beispielen legt nahe, dass der MT₁-Rezeptor an G_q α -Proteine bindet. Carbachol-aktivierte, muskarinerge Rezeptoren stimulieren die Phospholipase C β über eine Vermittlung von G_q α -Proteinen. Analog besitzen auch klonierte Melatoninrezeptoren (MT₁, MT₂ und Mel_{1c}) in unterschiedlicher Ausprägung die Fähigkeit, Phospholipase C β mittels G_q α -Proteinen zu aktivieren. In der humanen embryonalen Nierenzelllinie HEK293 konnte gezeigt werden, dass MT₁-Rezeptoren dosisabhängig an G_q α -Proteine binden [Brydon et al., 1999].

Es gibt allerdings ernstzunehmende Alternativen zu dem oben beschriebenen Weg über G_q α -Proteine. In der Maus-Fibroblastenzelllinie NIH/3T3, die den menschlichen MT₁-Rezeptor exprimieren, erhöhte Melatonin den IP₃-freisetzenden Effekt von PGF_{2 α} mittels der G $\beta\gamma$ -Untereinheit [Godson et al., 1997]. Bei MT₁-Rezeptor transfizierten Krallenfrosch (*Xenopus laevis*)-Eiern wird sogar der Weg über G_i α - oder G_s α -Proteine diskutiert [Blumenau et al., 2001].

Eigene Untersuchungen zeigen, dass der IP₃-stimulierende Effekt des Melatonins nach Blockade von G_i α -Proteinen mit PTX erhalten bleibt (Daten nicht gezeigt). Dies macht die ohnehin als atypisch zu bezeichnende, hypothetische Beteiligung eines PTX-sensiblen G-Proteins wie G_i α - oder G_s α an der IP₃-Signalkaskade unwahrscheinlich.

4.3.4 IP₃-Rezeptoren

Der weitere Signalweg führt über die Phospholipase C β medierte Spaltung von Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate zu den intrazellulären Botenstoffen Diazylglyzerol und IP₃. IP₃-Moleküle mobilisieren intrazelluläre Ca²⁺-Ionen nach Bindung an IP₃-Rezeptoren. Diese sind Liganden-aktivierte Ca²⁺-Kanäle [Putney et al., 2000],

welche durch IP₃-Moleküle und Ca²⁺-Ionen selbst reguliert werden [Mikoshiba et al., 2000].

IP₃-Rezeptoren befinden sich hauptsächlich auf dem Endoplasmatischem Retikulum, aber auch auf Membranen des Zellkerns und verschiedener Granula, unter anderem auch auf Insulin-Granula [Blondel et al., 1994]. Die Aufgabe der IP₃-Rezeptoren auf distinkten Vesikeln ist unklar.

Fünf IP₃-Rezeptor Isoformen sind molekularbiologisch charakterisiert. Vollständige cDNA-Sequenzen sind für die IP₃-Rezeptor Isoformen IP₃R-1 [Mignery et al., 1990], IP₃R-2 [Sudhof et al., 1991] und IP₃R-3 [Blondel et al., 1993] beschrieben.

Unterschiedliche Expressionsmuster der IP₃-Rezeptor Isoformen in verschiedenen Zelltypen und Organen könnten ein Indiz für unterschiedliche Aufgaben der in Struktur, Regulation und zellulärer Verteilung unterschiedlichen Isoformen sein [Blondel et al., 1993]. Das für INS1-Zellen unbekanntes Expressionsmuster der IP₃-Rezeptor Isoformen war daher im Rahmen der Untersuchungen von Interesse.

Es zeigt sich, dass alle drei Isoformen in INS1-Zellen exprimiert werden (Abb. 9). Im Gegensatz zu pankreatischen Inseln (Ratte), Insulinoma RINm5F Zellen (Ratte) und Insulinoma β HC9 Zellen (Maus), in denen die Isoform IP₃R-3 am stärksten exprimiert wurde [Blondel et al., 1993], ist in INS1-Zellen die IP₃R-1 Isoform vorherrschend (Abb. 10).

Die IP₃R-3 Isoform, in INS1-Zellen am zweitstärksten exprimiert, steht im Mittelpunkt vieler Untersuchungen. Die Expression ausschließlich dieser Isoform soll in β HC9 Zellen durch Glukose sowohl zeit- als auch dosisabhängig stimulierbar sein [Blondel et al., 1994].

In den durchgeführten Experimenten wurde stets eine Glukosekonzentration von 5,6 mmol/l eingesetzt, so dass der Einfluss dieser Randbedingung vergleichbar blieb. Die Regulation der IP₃R-3 Isoform durch Glukose könnte ein Adaptationsmechanismus der β -Zelle sein [Blondel et al., 1994].

Unter den Zelltypen der Langerhans'schen Insel ist die IP₃R-3 Isoform nicht in Glucagon (α)- oder Pankreatisches-Polypeptid (PP)-sezernierenden Zellen, sondern ausschließlich in Insulin (β)- und Somatostatin (δ)- ausschüttenden Zellen zu finden [Blondel et al., 1994; Lee et al., 1998].

Die Bedeutung der für die INS1-Zelle charakteristischen IP₃-Rezeptor Ausstattung ist unklar. Unstrittig ist jedoch, dass die Langerhans'schen Inseln unterschiedlicher

Spezies im Detail unterschiedlich auf Insulinsekretionsreize reagieren [Blondel et al., 1994; Lee et al., 1998; Zawalich et al., 2001]. Dabei könnte die unterschiedliche Ausstattung mit IP₃-Rezeptor Isoformen eine Rolle spielen.

Alle IP₃-Rezeptor Isoformen zeichnen sich durch eine ähnliche Ca²⁺-Freisetzungsrates aus [Hagar et al., 1998; Dyer et al., 2001]. Weiterhin besitzen alle Isoformen eine vom Ca²⁺-Spiegel abhängige Affinität für IP₃-Moleküle. Der Affinitätsverlauf der Isoformen ist jedoch unterschiedlich. Die IP₃R-1 Isoform erreicht Maximalbindung für IP₃ bei einer intrazellulären Ca²⁺-Konzentration von 1 µmol/l [Hagar et al., 1998; Dyer et al., 2001]. Höhere Ca²⁺-Konzentrationen hemmen die weitere Ca²⁺-Mobilisierung aus dem Endoplasmatischen Retikulum. Dies wird als glockenförmige Affinitätskurve bezeichnet. Im Gegensatz dazu nimmt die Offenheitswahrscheinlichkeit der IP₃R-3 Isoform unter erhöhten Ca²⁺-Konzentrationen stetig zu [Hagar et al., 1998]. Die IP₃R-3 Isoform ist zur Initiation eines Ca²⁺-Signals geeignet, während die in INS1-Zellen vorherrschende IP₃R-1 Isoform ideal zur Unterstützung von Ca²⁺-Oszillationen ist.

4.3.5 Intrazelluläre Ca²⁺-Ionen in der IP₃-Signalkaskade

Die intrazelluläre Ca²⁺-Konzentration ist distinkt reguliert und bei vielen Zellen stellt eine Ca²⁺-Erhöhung ein wichtiges zelluläres Signal dar. Die Wirkung intrazellulärer Ca²⁺-Ionen ist vielfältig. Ca²⁺-Ionen stimulieren direkt die Phospholipase C δ , Proteinkinase C, Phospholipase A₂ und interagieren als Ca²⁺-Calmodulin Komplex mit einer Vielzahl regulatorischer Enzyme [Champney et al., 1983; Berridge et al., 1989; Berggren et al., 1994; Rorsman et al., 1994; Li et al., 1998; Barker et al., 2002]. In der pankreatischen β -Zelle sind Ca²⁺-Ionen das Schlüsselsignal zur Insulinsekretion und stehen relativ weit am Ende vieler Signalkaskaden [Efendic et al., 1991; Berggren et al., 1994]. Die Exozytose von Insulin wird durch einen Anstieg der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration von 100 nmol/l auf 1 µmol/l vermittelt [Rorsman et al., 1994]. Die Herkunft der Ca²⁺-Ionen sind der extrazelluläre Raum (2,5 mmol/l, davon 50 % als freie Ionen) und intrazelluläre Ca²⁺-Speicher (100 µmol/l) [Rorsman et al., 1994].

Den wichtigsten Zugang zum Ca²⁺-Reservoir des extrazellulären Raumes bietet der spannungsabhängige Ca²⁺-Kanal (L-Typ) [Berggren et al., 1994]. Dieser Kanal wird zum einen über die cAMP-Signalkaskade und die Proteinkinase A moduliert. Zum anderen öffnet er sich bei Depolarisation der Zellmembran. Die Membranpolarisation

wiederum wird maßgeblich vom ATP-abhängigen K^+ -Kanal aufrechterhalten. Bei Aufnahme von Glukose und der konsekutiven Bildung von ATP schließt sich der hyperpolarisierende K^+ -Kanal. In der Folge depolarisiert die Zellmembran, der spannungsabhängige Ca^{2+} -Kanal (L-Typ) öffnet sich und Ca^{2+} -Ionen strömen aus dem Extrazellulärraum in die Zelle ein [Berggren et al., 1994].

Eine Freisetzung von Ca^{2+} -Ionen aus intrazellulären Speichern ist durch verschiedene Signalstoffe initiiert, wozu IP_3 , Arachidonsäure, Metabolite des Glukosestoffwechsels und Ca^{2+} -Ionen selbst gehören [Berggren et al., 1994]. Über diesen Mechanismus führt die IP_3 -Signalkaskade zu einer Erhöhung des intrazellulären Ca^{2+} -Spiegels.

Carbachol führt bekanntermaßen zu einem Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration in pankreatischen β -Zellen [Wollheim et al., 1986; Zawalich et al., 1996; Gasa et al., 1999; Dyachok et al., 2004]. Durch konfokalmikroskopische Untersuchungen der Arbeitsgruppe Peschke konnte diese Wirkung von Carbachol jüngst in INS1-Zellen bestätigt werden [Bach et al., 2005]. Eine Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration nach Stimulation mit Carbachol war selbst in Ca^{2+} -freiem Medium nachweisbar. Die Ca^{2+} -Ionen mussten folglich aus intrazellulären Speichern stammen.

Interessanterweise konnte ein analoger, wenn auch schwächer ausgeprägter stimulativer Einfluss auf die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration auch durch Melatonin nachgewiesen werden [Bach et al., 2005]. Diese Befunde ergänzen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit und zeichnen einen Signalweg von der Melatonin-initiierten IP_3 -Erhöhung bis zur intrazellulären Ca^{2+} -Freisetzung. Analoge Beobachtungen wurden an MT_1 -Rezeptor tragenden Zellen der Hypophyse (Pars tuberalis) und an MT_1 -transfizierten Zellen der humanen embryonalen Nierenzell-Linie HEK293 gemacht [Brydon et al., 1999].

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass mehrere Prozesse zur Erhöhung des intrazellulären Ca^{2+} -Spiegels führen, wobei die Ca^{2+} -Freisetzung aus intrazellulären Speichern bei der Reaktion der pankreatischen β -Zelle auf Melatoninstimulation im Vordergrund steht.

Die Mechanismen bei der Freisetzung von Insulin auf einen Ca^{2+} -Reiz hin sind komplex. Die Ca^{2+} -Konzentration ist nicht einfach erhöht, sondern sie oszilliert vielmehr zwischen weniger stark erhöhten Konzentrationen und Spitzenwerten,

welche konsekutiv zur Exozytose von Insulin führen [Efendic et al., 1991; Berggren et al., 1994; Rorsman et al., 1994].

Die schnellen Oszillationen der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentrationen laufen synchron mit Schwankungen des Zellmembranpotentials [Berggren et al., 1994]. Bei Depolarisation kommt es zu einem Ca^{2+} -Einstrom aus dem Extrazellularraum durch den spannungsabhängigen Ca^{2+} -Kanal (L-Typ). Die freien, intrazellulären Ca^{2+} -Ionen binden an Ryanodinrezeptoren des Endoplasmatischen Retikulums, wodurch weitere Ca^{2+} -Ionen mobilisiert werden. Dieser Mechanismus wird als Ca^{2+} -vermittelte Ca^{2+} -Freisetzung (*Ca^{2+} -induced- Ca^{2+} -release, CICR*) bezeichnet [Berggren et al., 1994; Mikoshiba et al., 2000; Dyachok et al., 2004]. Die weitere Erhöhung der Ca^{2+} -Konzentration aktiviert einen zellmembranständigen Ca^{2+} -abhängigen K^+ -Kanal, welcher die Zellmembran repolarisiert. Die spannungsabhängigen Ca^{2+} -Kanäle (L-Typ) schließen. Durch Pufferung sinkt der intrazelluläre Ca^{2+} -Spiegel rasch wieder ab. In der Folge schließt auch der Ca^{2+} -abhängige K^+ -Kanal und die Zelle depolarisiert erneut, eine neue Oszillation beginnt [Berggren et al., 1994].

Erhöhte IP_3 -Spiegel steigern die Oszillationsfrequenz und damit die Sekretion, da sie die Ca^{2+} -Mobilisation über zwei Mechanismen erhöhen [Dunne et al., 1994]. Zum einen kommt es zur Ca^{2+} -Freisetzung aus intrazellulären Speichern. Die in der INS1-Zelle vorherrschende $\text{IP}_3\text{R-1}$ Isoform unterstützt mit ihrer glockenförmigen Affinitätskurve zum IP_3 die Ca^{2+} -Oszillationen. Zum anderen ist ein zusätzlicher Ca^{2+} -Einstrom aus dem Extrazellularraum möglich. Dieser sogenannte kapazitative Ca^{2+} -Einstrom ist über Speicher-regulierte (*store-operated*) Ca^{2+} -Kanäle vermittelt, wobei die Regulation durch direkte Bindung aktivierter IP_3 -Rezeptoren an die *store-operated* Ca^{2+} -Kanäle stattfindet [Mikoshiba et al., 2000; Dyachok et al., 2004].

4.3.6 IP_3 -vermittelte Insulinsekretion

Carbachol als IP_3 -Stimulator besitzt einen dosisabhängig stimulierenden Effekt auf die Insulinfreisetzung sowohl in pankreatischen β -Zellen [Wollheim et al., 1986; Zawalich et al., 1996; Gasa et al., 1999; Dyachok et al., 2004] als auch, wie in dieser Untersuchung gezeigt, in INS1-Zellen (Abb. 5).

Der Einfluss von Carbachol und Melatonin auf die IP_3 -Spiegel und auf die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration ist jeweils stimulatив. Dennoch unterscheiden sich beide Substanzen deutlich in ihrer Wirkung auf die Insulinsekretion. Wie gezeigt, besitzt

Carbachol einen stimulierenden Effekt auf die Insulinsekretion (Abb. 11, 13, 14, 17, 18), Melatonin allein jedoch nicht (Abb. 12, 13).

Die Bedeutung der IP_3 -Signalkaskade für die Sekretionsaktivierung pankreatischer β -Zellen wird als weniger bedeutsam im Vergleich mit anderen Mechanismen eingeschätzt. Beispielsweise konnte an INS1-Zellen und pankreatischen β -Zellen gezeigt werden, dass eine Überexpression bestimmter Phospholipase C Isoformen und des $G_{q/11}\alpha$ -Proteins zwar zu einer leichten Erhöhung des IP_3 -Spiegels führt, jedoch keine Erhöhung der Insulinsekretion folgte [Gasa et al., 1999].

Im vorliegenden Fall ist jedoch bedeutsamer, dass Melatonin gleichzeitig auf dem bekannten Weg der cAMP-Signalkaskade die cAMP-vermittelte Insulinfreisetzung hemmt [Peschke et al., 1997; 2000; 2002b; Kemp et al., 2002] (Abb. 13, 17). Der cAMP- und damit Insulin-hemmende Einfluss von Melatonin ist offenbar stärker als sein IP_3 - bzw. Insulin-steigernder Einfluss.

Die unter Ko-Stimulation mit Carbachol aufgetretenen, nahezu additiven Wirkungen auf die intrazellulären IP_3 -Spiegel schlagen sich nicht in einer ebenso gesteigerten Insulinsekretion nieder. Erst unter Blockade der dominierenden, $G_i\alpha$ -Protein vermittelten Hemmung der cAMP-Signalkaskade mittels PTX, zeigt sich ein leicht stimulierender Effekt von Melatonin in Ko-Stimulation mit Carbachol auf die Insulinsekretion (Abb. 18).

4.3.7 Modell der Wirkung von Melatonin auf die pankreatische β -Zelle

Aufgrund eigener Befunde [Bach et al., 2005] und in Anlehnung an andere Arbeiten [Peschke et al., 2002a, b] soll die folgende Darstellung (Abb. 23) den mit dieser Untersuchung erreichten Kenntnisstand über die Signalwege des Melatonin in der pankreatischen β -Zelle und den Einfluss des Hormons auf die Insulinsekretion in einem Modell schematisch zusammenfassen.

Der in der Abbildung zentral dargestellte MT_1 -Rezeptor vermittelt den modulatorische Einfluss des Melatonin sowohl auf die IP_3 - als auch auf die cAMP-Signalkaskade.

Der MT_1 -Rezeptor koppelt an ein $G_i\alpha$ -Protein, welches einen inhibitorischen Einfluss auf die Adenylatzyklase und damit die cAMP-Signalkaskade besitzt. Die Vermittlung eines stimulierenden Einflusses von Melatonin auf die IP_3 -Signalkaskade geschieht durch Kopplung des MT_1 -Rezeptors an ein $G_q\alpha$ -Protein oder möglicherweise ein

Gβγ-Protein [Godson et al., 1997] mit konsekutiver Stimulation der Phospholipase Cβ.

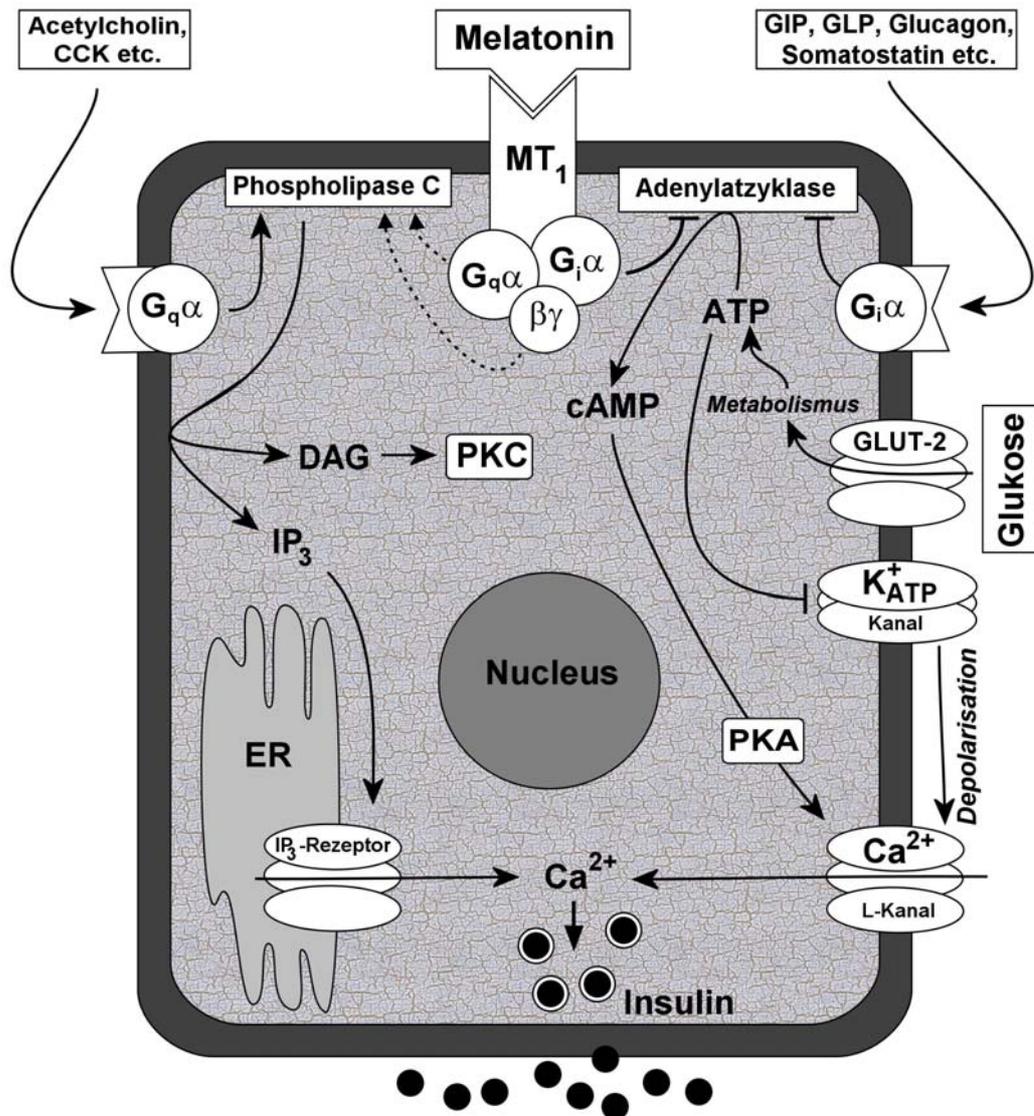


Abb. 23: Modell der Wirkung von Melatonin auf die pankreatische β-Zelle

Über Beeinflussung dieser beiden Signalkaskaden könnte Melatonin die Wirkung diverser gastrointestinaler und systemischer Signalstoffe auf die pankreatische β-Zelle modulieren.

Die IP₃- und die cAMP-Signalkaskade sind in ihrer Wirkung bis zur Insulinsekretion dargestellt, ebenso wie der wichtige Mechanismus der Insulinsekretion auf einen Glukosereiz hin.

4.4 Melatonin im physiologischen Kontext

Die Vielzahl der beschriebenen Melatoninwirkungen beim Säugetier lassen sich nach dem Wirkmechanismus am Zielort in drei Gruppen einordnen.

Zum ersten stimuliert Melatonin zellmembranständige, G-Protein gekoppelte MT₁- und MT₂-Rezeptoren. Diese befinden sich bei Säugetieren in den primären und sekundären Geschlechtsorganen [Dubocovich, 1995; Frungieri et al., 2005], im Verdauungstrakt [Lee et al., 1993], in Milz [Markowska et al., 2004], Niere [Song et al., 1997], Lunge [Hardeland, 1997], Retina (hier insbesondere MT₂-Rezeptoren) [Dubocovich, 1995; Nash et al., 1995; Peschke, 2002a], einigen Blutgefäßen [Dubocovich, 1995] und in Zellen des Immunsystems [Hardeland, 1997].

Zum zweiten werden zytosolische und nukleäre Bindungsstellen für Melatonin diskutiert [Dubocovich, 1995]. Melatonin soll einen direkten Einfluss auf den Ca²⁺-Calmodulin Haushalt [Dubocovich, 1995; Soto-Vega et al., 2004], die Phosphodiesterase, verschiedene Proteinkinasen und Zytoskelettproteine haben [Dubocovich, 1995]. Über diese Mechanismen und über eine Bindung an nukleäre Rezeptoren der Orphan-Familie soll Melatonin Einfluss auf die Genregulation nehmen [Becker-Andre et al., 1994].

Und zum dritten hat Melatonin im Säugetier seine möglicherweise ursprüngliche Aufgabe als Radikal-Scavenger bewahrt. Neben seiner direkt antioxidativen Wirkung, in pharmakologischen Konzentrationen insbesondere gegen Hydroxylradikale [Ebelt et al., 2000; Brömme et al., 1999; 2000; 2002], induziert Melatonin antioxidative Enzyme wie Superoxid-Dismutase, Katalase und Glutathion-Peroxidase [Reiter et al., 2000; Dziegiel et al., 2003; Rodriguez et al., 2004;].

Gegenüber dieser großen Anzahl an Zielorten für das Hormon, stellen sich ebenso mehrere Bildungsorte. Melatonin kann sowohl epiphysär als auch lokal in verschiedenen Organen, beispielsweise im Gastrointestinaltrakt [Hong et al., 1995; Jaworek et al., 2003; Leja-Szpak et al., 2004; Jaworek et al., 2005], gebildet werden.

Von rahmengebendem Interesse für die Frage der physiologischen Bedeutung von Melatonin in der pankreatischen β -Zelle, ist seine Wirkung im Verdauungstrakt. Es existieren nahezu im gesamten Verdauungstrakt aller Säugetiere, einschließlich des Menschen, Melatoninrezeptoren [Bubenik et al., 1997; 1999; Messner et al., 2001]. Die Gesamtmenge an Melatonin im Verdauungstrakt kann bis zu 400 mal größer sein

als das in der Epiphyse vorkommende Melatonin [Huether et al., 1992; Hardeland, 1997; Leja-Szpak et al., 2004]. Besonders hohe Konzentrationen wurden in der Gallenflüssigkeit nachgewiesen [Tan et al., 1999; Messner et al., 2001]. Die Schlüsselenzyme der Melatoninbiosynthese sind in Darm und Pankreas nachweisbar [Hong et al., 1995; Jaworek et al., 2003; Leja-Szpak et al., 2004]. Dies könnte erklären, warum selbst nach Entfernung der Epiphyse Melatonin im Verdauungstrakt nachweisbar bleibt [Jaworek et al., 2005]. Zu dieser lokalen Melatoninproduktion, welche mutmaßlich in den enterochromaffinen Zellen des Gastrointestinaltraktes stattfindet [Jaworek et al., 2005], gesellt sich die Aufnahme des Stoffes und seines Vorläufers Tryptophan mit der Nahrung. Melatonin, welches aus dem Magen in das Duodenallumen eintritt, soll ein potenter Reiz zur Bikarbonatsekretion sein [Sjoblom et al., 2003]. Weitere Untersuchungen dokumentieren eine Beschleunigung der Darmpassage [Drago et al., 2002] oder der Aktivität des exokrinen Pankreas [Leja-Szpak et al., 2004] durch Melatonin. Diese Beobachtungen haben Melatonin jüngst eine Bedeutung als Vermittler hepato-gastrointestinaler Kommunikation eingetragen [Leja-Szpak et al., 2004; Jaworek et al., 2005].

Bei der Betrachtung der pankreatischen β -Zelle sind daher sowohl eine circadiane als auch eine postprandiale Modulation durch Melatonin in Erwägung zu ziehen. Die Beeinflussung des Glukosestoffwechsel steht mit beiden Aufgaben in Beziehung.

Die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchungen demonstrieren einen IP_3 -stimulierenden Effekt von Melatonin, der in Hinblick auf die Insulinsekretion von der cAMP- und damit konsekutiv Insulin-hemmenden Wirkung des Hormons überlagert wird. Im Hinblick auf die Insulinsekretion aktiviert Melatonin in der pankreatischen β -Zelle somit zwei Signalwege in antagonistischer Weise.

Dieses Phänomen ist für Hormone keineswegs ungewöhnlich. Beispielsweise senkt Insulin den cAMP-Spiegel durch Aktivierung von Phosphodiesterasen und erhöht den IP_3 -Spiegel durch Aktivierung der Phospholipase $C\gamma$.

Bei der Wirkung von Melatonin ist die zeitlich unterschiedliche Ausprägung der Signalwege zu berücksichtigen. Die hemmende Wirkung auf die cAMP-Signalkaskade tritt erst nach längerer Melatonininkubation auf, ist dann aber dominierend. Die stimulierende Wirkung auf die IP_3 -Spiegel geschieht dagegen sofort, ist allerdings deutlich schwächer. Vergleichbare Wirkungen pinealer Hormonfraktionen auf die

Insulinsekretion sind beschrieben: zunächst eine deutliche Zunahme, konsekutiv jedoch eine Abnahme der Insulinsekretion [Neacsu, 1988].

Da sehr viele Faktoren einen Einfluss auf die Spiegel von Insulin und Glukose haben, ist es schwierig, die Stärke der modulatorischen Wirkung von Melatonin zu verifizieren. Unstrittig ist jedoch, dass bei Säugetieren Blutglukosekonzentration, Insulinsekretion und -wirkung einem circadianem Rhythmus unterliegen [Peschke et al., 1998, Zawalich et al., 2001; Picinato et al., 2002; La Fleur, 2003]. Menschen und Ratten zeigen gleichermaßen eine circadian unterschiedlich ausgeprägte Reaktion auf den oralen und intravenösen Glukosetoleranztest [Ben-Dyke, 1971; Gibson et al., 1975]. In bisherigen Studien wurden zur Erklärung dieser Phänomene der Einfluss des SCN auf die Insulinresponsivität der Gewebe [Bizot-Espiard et al., 1998; La Fleur, 2003] und die Nahrungsaufnahme [Schibler et al., 2003] hervorgehoben. Möglicherweise spielt jedoch auch die direkte Melatonwirkung auf die pankreatische β -Zelle eine Rolle. Im Gegenzug besitzt der SCN Insulinrezeptoren [Bruning et al., 2000]. Insulin und Glukose beeinflussen den zentralen Rhythmusgenerator und modulieren die Biosynthese von Melatonin [Lynch et al., 1973; 1977; Champney et al., 1985; 1986; Tannenbaum et al., 1987].

In den beschriebenen Rahmen der Verbindung des Glukosestoffwechsels mit der Melatoninsekretion fügen sich Befunde, welche bei diabetischen Ratten und Hamstern [Champney et al., 1983; 1986, Conti et al., 1998] eine gestörte Melatoninsekretion feststellen.

5. Zusammenfassung

Das im Rahmen der Untersuchungen entwickelte Protokoll zur IP_3 -Bestimmung ist zur Quantifizierung intrazellulärer IP_3 -Mengen in INS1-Zellen geeignet. Voraussetzung für die Konservierung intrazellulärer IP_3 -Moleküle ist die konsequente Probenbehandlung im Eisbad, die Verwendung antistatischer Aufbewahrungsgefäße und die beschriebene Technik zur schnellen, volumensparenden Neutralisierung des sauren IP_3 -Zellextraktes. Die ursprüngliche IP_3 -Menge im Batch-Ansatz kann durch die Protokollierung der Probenverdünnung bei der Neutralisierung berechnet werden. Die in Batch-Kultur durchgeführten Experimente zeigen eine dosisabhängige Stimulation der IP_3 -Entstehung in INS1-Zellen durch Carbachol in den

Konzentrationen von 10 bis 1000 $\mu\text{mol/l}$. Die eingesetzte Höchstkonzentration von 1000 $\mu\text{mol/l}$ steigert nach 15-minütiger Inkubation den intrazellulären IP_3 -Spiegel von INS1-Zellen signifikant auf das 3,5-fache der unstimulierten Kontrolle. Durch Melatonin in den Konzentrationen von 1 bis 100 nmol/l ist eine ähnliche Stimulation der IP_3 -Entstehung in INS1-Zellen nachweisbar. Bereits eine physiologische Konzentration von 1 nmol/l Melatonin ist zur Triggerung der IP_3 -Signalkaskade befähigt. Die eingesetzte Höchstkonzentration von 100 nmol/l steigert nach 15-minütiger Inkubation den intrazellulären IP_3 -Spiegel von INS1-Zellen signifikant auf das 2,5-fache der unstimulierten Kontrolle. Die Wirkung von Melatonin auf die IP_3 -Signalkaskade ist unmittelbar und bedarf keiner längeren Inkubation. Eine Ko-Stimulation von INS1-Zellen mit Melatonin plus Carbachol führt zu einer IP_3 -Bildung die stärker ist als unter Stimulation mit den jeweiligen Substanzen allein.

Eine Inkubation von INS1-Zellen in Batch-Kultur mit dem Melatoninrezeptor-Blocker Luzindol (30 $\mu\text{mol/l}$) verhindert eine IP_3 -Entstehung trotz gleichzeitiger, 15-minütiger Stimulation mit 100 nmol/l Melatonin. Dies spricht für eine Beteiligung des MT_1 -Rezeptors am Einfluss von Melatonin auf die IP_3 -Signalkaskade der INS1-Zelle. Der MT_2 -Rezeptor ist in INS1-Zellen nicht nachweisbar, wie bisherige Untersuchungen gezeigt haben. Zusammen mit der dosisabhängigen Stimulation der IP_3 -Signalkaskade durch Melatonin sprechen diese Befunde für eine spezifische Wirkung von Melatonin.

Die Stimulation der IP_3 -Signalkaskade mündet in der Aktivierung zellulärer IP_3 -Rezeptoren. Es gibt drei Isoformen von IP_3 -Rezeptoren mit unterschiedlichen Eigenschaften. Zur Charakterisierung der IP_3 -Signalkaskade der INS1-Zelle wurde das Expressionsmuster der Isoformen untersucht. Es kommen alle drei Isoformen des IP_3 -Rezeptors in der INS1-Zelle vor. Die Isoform $\text{IP}_3\text{R-1}$ ist etwa 5-mal stärker als die Isoform $\text{IP}_3\text{R-3}$ exprimiert. Die Isoform $\text{IP}_3\text{R-2}$ ist in der INS1-Zelle nur marginal exprimiert.

Der IP_3 -getriggerten Ca^{2+} -Freisetzung folgt konsekutiv eine Ausschüttung von Insulin. Carbachol in den Konzentrationen von 10 bis 1000 $\mu\text{mol/l}$ stimuliert dosisabhängig die Insulinfreisetzung von INS1-Zellen in Batch-Kultur. Die eingesetzte Höchstkonzentration von 1000 $\mu\text{mol/l}$ steigert nach 15-minütiger Inkubation die Insulinfreisetzung von INS1-Zellen signifikant auf das 2,5-fache der unstimulierten Kontrolle. In Bestätigung dieser Ergebnisse stimuliert Carbachol in den

Konzentrationen von 10 bis 300 $\mu\text{mol/l}$ die Insulinfreisetzung von superfundierten INS1-Zellen in dosisabhängiger Weise. Die eingesetzte Höchstkonzentration von 300 $\mu\text{mol/l}$ steigert nach 3-minütiger Inkubation die Insulinfreisetzung von INS1-Zellen signifikant auf das 10-fache der unstimulierten Kontrolle. Der intrazelluläre Botenstoff cAMP bleibt während einer Stimulation mit Carbachol auf konstant niedrigen Spiegeln. Die Untersuchungen demonstrieren eine IP_3 -vermittelte Insulinfreisetzung durch das Parasympathomimetikum Carbachol in INS1-Zellen.

Der Effekt von Melatonin auf die Insulinausschüttung von INS1-Zellen ist indirekter Natur. Alleinige Gabe von Melatonin ohne Ko-Stimulation mit anderen Substanzen hat keinen messbaren Effekt auf die Insulinfreisetzung von INS1-Zellen. Bei Stimulation von INS1-Zellen mit Melatonin plus Carbachol wird die Insulin-freisetzende Wirkung von Carbachol diskret gedämpft. Die gleichzeitige Hemmung der cAMP-Signalkaskade und die Aktivierung der IP_3 -Signalkaskade durch Melatonin könnte zu einer gegenseitigen Aufhebung der Wirkungen auf die Insulinsekretion führen. Unter Blockade der cAMP-Signalkaskade von superfundierten INS1-Zellen mit PTX zeigt sich unter Ko-Stimulation von Carbachol plus Melatonin eine Verstärkung der Insulinausschüttung gegenüber einer Stimulation mit Carbachol allein. Die IP_3 - und die cAMP-Signalkaskade werden beide durch Melatonin beeinflusst, wobei die Hemmung der cAMP-Signalkaskade stärker ausgeprägt ist als die Aktivierung der IP_3 -Signalkaskade.

Wenn auch die seit über 60 Jahren geführte Diskussion über den Einfluss von Melatonin auf die Insulinsekretion noch lange nicht klärend beendet ist, und die Bedeutung des Hormons beim Diabetes mellitus ebensowenig erschöpfend aufgedeckt wurde, so leistet diese Arbeit doch einen kleinen Beitrag zur Aufhellung der direkten Wirkungen von Melatonin an der pankreatischen β -Zelle.

6. Literaturverzeichnis

1. Alpert S, Hanahan D, Teitelman G: Hybrid insulin genes reveal a developmental lineage for pancreatic endocrine cells and imply a relationship with neurons. *Cell* 53 (1988) 295-308
2. Asfari M, Janjic D, Meda P, Li G, Halban PA, Wollheim CB: Establishment of 2-mercaptoethanol-dependent differentiated insulin-secreting cell lines. *Endocrinology* 130 (1992) 167-178
3. Audinot V, Mailliet F, Lahaye-Brasseur C, Bonnaud A, LeGall A, Amossé C, Dromaint S, Rodriguez M, Nagel N, Galizzi JP, Malpoux B, Guillaumet G, Lesieur D, Lefoulon F, Renard P, Delagrangé P, Boutin JA: New selective ligands of human cloned melatonin MT1 and MT2 receptors. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 367 (2003) 553-561
4. Balik A, Kretschmannova K, Mazna P, Svobodova I, Zemkova H: Melatonin action in neonatal gonadotrophs. *Physiol Res* 53 (2004) 153-166
5. Balla T: Mass assay of inositol and its use to assay inositol polyphosphates. In: Shears SB (Ed): *Signalling by inositides*. Oxford University Press, Oxford, 1997, S. 53-68
6. Barker CJ, Leibiger IB, Leibiger B, Berggren PO: Phosphorylated inositol compounds in beta-cell stimulus-response coupling. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 283 (2002) 1113-1122
7. Bach AG, Wolgast S, Mühlbauer E, and Peschke E: Melatonin stimulates inositol-1,4,5-trisphosphate and Ca^{2+} release from INS1 insulinoma cells. *J Pineal Res* 39 (2005) 316-323
8. Becker-Andre M, Wiesenberg I, Schaeren-Wiemers N, Andre E, Missbach M, Saurat JH, Carlberg C: Pineal gland hormone melatonin binds and activates an orphan of the nuclear receptor superfamily. *J Biol Chem* 269 (1994) 28531-25834
9. Ben-Dyke R: Diurnal variation of oral glucose tolerance in volunteers and laboratory animals. *Diabetologia* 7 (1971) 156-159
10. Berggren PO, Arkhammar P, Islam MDS, Juntti-Berggren L, Kindmark H, Köhler M, Larsson O, Nilsson T, Szecowka J, Zhang Q: Molecular mechanisms involved in regulating cytoplasmic free Ca^{2+} concentration in

- pancreatic B-cells. In: Flatt PR, Lenzen S (Eds): Insulin secretion and pancreatic B-cell research. Smith-Gordon, London, 1994, S. 201-211
11. Berridge MJ, Irvine RF: Inositol phosphates and cell signalling. *Nature* 341 (1989) 197–205
 12. Biden TJ, Prentki M, Irvine RF, Berridge MJ, Wollheim CB: Inositol 1,4,5-trisphosphate mobilizes intracellular Ca²⁺ from permeabilized insulin-secreting cells. *Biochem J* 223 (1984) 467-473
 13. Binkley S: Structures and molecules involved in generation and regulation of biological rhythms in vertebrates and invertebrates. *Experientia* 49 (1993) 648-653
 14. Bizot-Espiard JG, Double A, Cousin B, Lesieur D, Guardiola-Lemaitre B, Delagrangé P, Ktorza A, Penicaud L: Lack of melatonin effects on insulin action in normal rats. *Horm Metab Res* 30 (1998) 711-716
 15. Bizot-Espiard JG, Double A, Guardiola-Lemaitre B, Delagrangé P, Ktorza A, Penicaud L: Diurnal rhythms in plasma glucose, insulin, growth hormone and melatonin levels in fasted and hyperglycaemic rats. *Diabetes Metab* 24 (1998) 235-240
 16. Blondel O, Takeda J, Janssen H, Seino S, Bell GI: Sequence and functional characterization of a third inositol trisphosphate receptor subtype, IP₃R-3, expressed in pancreatic islets, kidney, gastrointestinal tract, and other tissues. *J Biol Chem* 268 (1993) 11356-11363
 17. Blondel O, Bell GI, Moody M, Miller RJ, Gibbons SJ: Creation of an inositol 1,4,5-trisphosphate-sensitive Ca²⁺ store in secretory granules of insulin-producing cells. *J Biol Chem* 269 (1994) 27167-27170
 18. Blumenau C, Berger E, Fauteck JD, Madeja M, Wittkowski W, Speckmann EJ, Musshoff U: 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 (2001) 139-146
 19. Boden G, Ruiz J, Urbain JL, Chen X: Evidence for a circadian rhythm of insulin secretion. *Am J Physiol* 271 (1996) 246-252
 20. Brömme HJ, Ebel H, Peschke D, Peschke E: Alloxan acts as a prooxidant only under reducing conditions: influence of melatonin. *Cell Mol Life Sci* 55 (1999) 487-493

21. Brömme HJ, Morke W, Peschke D, Ebelt H, Peschke D: Scavenging effect of melatonin on hydroxyl radicals generated by alloxan. *J Pineal Res* 29 (2000) 201-208
22. Bruning JC, Gautam D, Burks DJ, Gillette J, Schubert M, Orban PC, Klein R, Krone W, Muller-Wieland D, Kahn CR: Role of brain insulin receptor in control of body weight and reproduction. *Science* 289 (2000) 2122-2125
23. Brydon L, Roka F, Petit L, de Coppet P, Tissot M, Barrett P, Morgan PJ, Nanoff C, Strosberg AD, Jockers R: Dual signaling of human Mel1a melatonin receptors via G_{i2} , G_{i3} , and $G_{q/11}$ proteins. *Mol Endocrinol* 13 (1999) 2025-2038
24. Bubenik GA, Pang SF: Melatonin levels in the gastrointestinal tissues of fish, amphibians, and a reptile. *Gen Comp Endocrinol* 106 (1997) 415-419
25. Bubenik GA, Hacker RR, Brown GM, Bartos L: Melatonin concentrations in the luminal fluid, mucosa, and muscularis of the bovine and porcine gastrointestinal tract. *J Pineal Res* 26 (1999) 56-63
26. Challiss RAJ: Mass assay of inositol 1,4,5-trisphosphate and phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. In: Shears SB (Ed): *Signalling by inositides*. Oxford University Press, Oxford, 1997, S. 151-164.
27. Champney TH, Brainard GC, Richardson BA, Reiter RJ: Experimentally-induced diabetes reduces nocturnal pineal melatonin content in the Syrian hamster. *Comp Biochem Physiol A* 76 (1983) 199-201
28. Champney TH, Steger RW, Christie DS, Reiter RJ: Alterations in components of the pineal melatonin synthetic pathway by acute insulin stress in the rat and Syrian hamster. *Brain Res* 338 (1985) 25-32
29. Champney TH, Holtorf AP, Craft CM, Reiter RJ: Hormonal modulation of pineal melatonin synthesis in rats and Syrian hamsters: effects of streptozotocin-induced diabetes and insulin injections. *Comp Biochem Physiol A* 83 (1986) 391-395
30. Chen C, Hirsch JG: Restoration of antibody-forming capacity in cultures of nonadherent spleen cells by mercaptoethanol. *Science* 176 (1972) 60-61
31. Conti A, Maestroni GJ: Melatonin rhythms in mice: role in autoimmune and lymphoproliferative diseases. *Ann N Y Acad Sci* 840 (1998) 395-410

32. Csernus V, Schally AV: The dispersed cell superfusion system. In: Greenstein BD (Ed): Neuroendocrine Research Methods. Harwood Academic Publisher, London, 1991, S. 71-109
33. Dean PM, Matthews EK: Electrical activity in pancreatic islet cells. *Nature* 219 (1968) 389-390
34. Drago F, Macaudo S, Salehi S. Small doses of melatonin increase intestinal motility in rats. *Dig Dis Sci* 47 (2002) 1969-1974
35. Dubocovich ML: Melatonin receptors: are there multiple subtypes? *Trends Pharmacol Sci* 16 (1995) 50-56
36. Dunne MJ, Jaggar JH, Harding EA, Squires PE: Protein kinase C and the modulation of ion channel activity in insulin-secreting cells. In: Flatt PR, Lenzen S (Eds): *Insulin secretion and pancreatic B-cell research*. Smith-Gordon, London, 1994, S. 267-276
37. Dyachok O, Tufveson G, Gylfe E: Ca^{2+} -induced Ca^{2+} release by activation of inositol 1,4,5-trisphosphate receptors in primary pancreatic beta-cells. *Cell Calcium* 36 (2004) 1-9
38. Dyer JL, Michelangeli F: Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor isoforms show similar Ca^{2+} release kinetics. *Cell Calcium* 30 (2001) 245-250
39. Dziegiel P, Murawska-Cialowicz E, Jethon Z, Januszewska L, Podhorska-Okolow M, Surowiak P, Zawadzki M, Rabczynski J, Zabel M: Melatonin stimulates the activity of protective antioxidative enzymes in myocardial cells of rats in the course of doxorubicin intoxication. *J Pineal Res* 35 (2003) 183-187
40. Ebel H, Peschke D, Brömme HJ, Morke W, Blume R, Peschke E: Influence of melatonin on free radical-induced changes in rat pancreatic beta-cells in vitro. *J Pineal Res* 28 (2000) 65-72
41. Efendic S, Kindmark H, Berggren PO: Mechanisms involved in the regulation of the insulin secretory process. *J Intern Med Suppl* 735 (1991) 9-22
42. Foster RG. Seeing the light...in a new way. *J Neuroendocrinol* 2 (2004) 179-180.
43. Frungieri MB, Mayerhofer A, Zitta K, Pignataro OP, Calandra RS, Gonzalez-Calvar SI: Direct effect of melatonin on Syrian hamster testes: melatonin subtype 1a receptors, inhibition of androgen production, and interaction with

- the local corticotropin-releasing hormone system. *Endocrinology* 146 (2005) 1541-1552
44. Gasa R, Trinh KY, Yu K, Wilkie TM, Newgard CB: Overexpression of G11alpha and isoforms of phospholipase C in islet beta-cells reveals a lack of correlation between inositol phosphate accumulation and insulin secretion. *Diabetes* 48 (1999) 1035-1044.
 45. Gibson T, Stimmler L, Jarrett RJ, Rutland P, Shiu M: Diurnal variation in the effects of insulin on blood glucose, plasma non-esterified fatty acids and growth hormone. *Diabetologia* 11 (1975) 83-88
 46. Gillison SL, Sharp GWG: Heterotrimeric G-protein function in the pancreatic B-cell. In: Flatt PR, Lenzen S (Eds): *Insulin secretion and pancreatic B-cell research*. Smith-Gordon, London, 1994, S. 287-295
 47. Gilon P, Henquin JC: Mechanisms and physiological significance of the cholinergic control of pancreatic beta-cell function. *Endocr Rev* 22 (2001) 565–604
 48. Girouard H, de Champlain J: Inhibitory effect of melatonin on alpha1-adrenergic-induced vasoconstriction in mesenteric beds of spontaneously hypertensive rats. *Am J Hypertens* 17 (2004) 339-346
 49. Godson C, Reppert SM: The Mel1a melatonin receptor is coupled to parallel signal transduction pathways. *Endocrinology* 138 (1997) 397-404
 50. Hagar RE, Burgstahler AD, Nathanson MH, Ehrlich BE: Type III InsP3 receptor channel stays open in the presence of increased calcium. *Nature* 396(1998) 81-84
 51. Hardeland R: New actions of melatonin and their relevance to biometeorology. *Int J. Biometeorol* 41 (1997) 47-57
 52. Hashimoto T, Kawano H, Daikoku S, Shima K, Taniguchi H, Baba S: Transient coappearance of glucagon and insulin in the progenitor cells of the rat pancreatic islets. *Anat Embryol* 178 (1988) 489-497
 53. Hong GX, Pang SF: N-acetyltransferase activity in the quail (*Coturnix coturnix* jap) duodenum. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 112 (1995) 251-255
 54. Huether G, Poeggeler B, Reimer A, George A: Effect of tryptophan administration on circulating melatonin levels in chicks and rats: evidence for

- stimulation of melatonin synthesis and release in the gastrointestinal tract. *Life Sci* 51 (1992) 945-953
55. Ishii T, Hishinuma I, Bannai S, Sugita Y: Mechanism of growth promotion of mouse lymphoma L1210 cells in vitro by feeder layer or 2-mercaptoethanol. *J Cell Physiol* 107 (1981) 283-293
 56. Ishii T, Sugita Y, Bannai S: Regulation of glutathione levels in mouse spleen lymphocytes by transport of cysteine. *J Cell Physiol* 133 (1987) 330-336
 57. Jaworek J, Leja-Szpak A, Bonior J, Nawrot K, Tomaszewska R, Stachura J, Sendur R, Pawlik W, Brzozowski T, Konturek SJ: Protective effect of melatonin and its precursor L-tryptophan on acute pancreatitis induced by caerulein overstimulation or ischemia/reperfusion. *J Pineal Res* 34 (2003) 40-52
 58. Jaworek J, Brzozowski T, Konturek SJ: Melatonin as an organoprotector in the stomach and the pancreas. *J Pineal Res* 38 (2005) 73-83
 59. John TM, Viswanathan M, George JC, Scanes CG: Influence of chronic melatonin implantation on circulating levels of catecholamines, growth hormone, thyroid hormones, glucose, and free fatty acids in the pigeon. *Gen Comp Endocrinol* 79 (1990) 226-232
 60. Kaiser N, Corcos AP, Sarel I, Cerasi E: Monolayer culture of adult rat pancreatic islets on extracellular matrix: modulation of B-cell function by chronic exposure to high glucose. *Endocrinology* 129 (1991) 2067-2076
 61. Kalsbeek A, Buijs RM: Output pathways of the mammalian suprachiasmatic nucleus: coding circadian time by transmitter selection and specific targeting. *Cell Tissue Res* 309 (2002) 109-118
 62. Kemp DM, Ubeda M, Habener JF: Identification and functional characterization of melatonin Mel1a receptors in pancreatic beta cells: potential role in incretin-mediated cell function by sensitization of cAMP signaling. *Mol Cell Endocrinol* 191 (2002) 157-166
 63. Kendall DM, Poitout V, Olson LK, Sorenson RL, Robertson RP: Somatostatin coordinately regulates glucagon gene expression and exocytosis in HIT-T15 cells. *J Clin Invest* 96 (1995) 2496-2502

64. Klerman EB, Gershengorn HB, Duffy JF, Kronauer RE: Comparisons of the variability of three markers of the human circadian pacemaker. *J Biol Rhythms* 17(2002) 181-193
65. Lacy PE, Kostianovsky M: Method for the isolation of intact islets of Langerhans from the rat pancreas. *Diabetes* 16 (1967) 35-39
66. LaFleur SE: Daily rhythms in glucose metabolism: suprachiasmatic nucleus output to peripheral tissue. *J Neuroendocrinol* 15 (2003) 315-322
67. Lai FP, Mody SM, Yung LY, Pang CS, Pang SF, Wong YH: Chimeric Galphaq subunits can distinguish the long form of the Xenopus Mel1c melatonin receptor from the mammalian MT1 and MT2 melatonin receptors. *J Pineal Res* 30 (2001) 171-179
68. Lai FP, Mody SM, Yung LY, Kam JY, Pang CS, Pang SF, Wong YH: Molecular determinants for the differential coupling of Galpha(16) to the melatonin MT1, MT2 and Xenopus Mel1c receptors. *J Neurochem* 80 (2002) 736-745
69. Lee B, Bradford PG, Laychock SG: Characterization of inositol 1,4,5-trisphosphate receptor isoform mRNA expression and regulation in rat pancreatic islets, RINm5F cells and betaHC9 cells. *J Mol Endocrinol* 21 (1998) 31-39
70. Lee PP, Pang SF: Melatonin and its receptors in the gastrointestinal tract. *Biol Signals* 2 (1993) 181-193
71. Leja-Szpak A, Jaworek J, Nawrot-Porabka K, Palonek M, Mitis-Musiol M, Dembinski A, Konturek SJ, Pawlik WW: Modulation of pancreatic enzyme secretion by melatonin and its precursor: L-tryptophan. Role of CCK and afferent nerves. *J Physiol Pharmacol* 55 (2004) 33-46
72. Li Y, Sternweis PM, Charnecki S, Smith TF, Gilman AG, Neer EJ, Kozasa T: Sites for Galpha binding on the G protein beta subunit overlap with sites for regulation of phospholipase Cbeta and adenylyl cyclase. *J Biol Chem* 273 (1998) 16265-16272
73. Lima LM, dos Reis LC, de Lima MA: Influence of the pineal gland on the physiology, morphometry and morphology of pancreatic islets in rats. *Braz J Biol* 61 (2001) 333-340

74. Lynch HJ, Eng JP, Wurtman RJ: Control of pineal indole biosynthesis by changes in sympathetic tone caused by factors other than environmental lighting. *Proc Natl Acad Sci USA* 70 (1973) 1704-1707
75. Lynch HJ, Ho M, Wurtman RJ: The adrenal medulla may mediate the increase in pineal melatonin synthesis induced by stress, but not that caused by exposure to darkness. *J Neural Transm* 40 (1977) 87-97
76. MacKenzie RS, Melan MA, Passey DK, Witt-Enderby PA: Dual coupling of MT(1) and MT(2) melatonin receptors to cyclic AMP and phosphoinositide signal transduction cascades and their regulation following melatonin exposure. *Biochem Pharmacol* 63 (2002) 587-595
77. Markowska M, Mrozkowiak A, Pawlak J, Skwarlo-Sonta K: Intracellular second messengers involved in melatonin signal transduction in chicken splenocytes in vitro. *J Pineal Res* 37 (2004) 207-212
78. Maslanski JA, Busa WB: A sensitive and specific mass assay for myo-inositol and inositol phosphates. In: Irvine RF (Ed): *Methods in inositide research*. Raven Press, New York, 1990, S. 113-126
79. McClenaghan NH, Flatt PR: Physiological and pharmacological regulation of insulin release: insight offered through exploitation of insulin-secreting cell lines. *Diabetes Obes Metab* 1 (1999) 137-150
80. Messner M, Huether G, Lorf T, Ramadori G, Schworer H: Presence of melatonin in the human hepatobiliary-gastrointestinal tract. *Life Sci* 69 (2001) 543-551
81. Mignery GA, Newton CL, Archer BT 3rd, Sudhof TC: Structure and expression of the rat inositol 1,4,5-trisphosphate receptor. *J Biol Chem* 265 (1990) 12679-12685
82. Mikoshiba K, Hattori M: IP₃ receptor-operated calcium entry. *Sci STKE* (2000) PE1
83. Morgan PJ, Barrett P, Hazlerigg D, Milligan G, Lawson W, MacLean A, Davidson G: Melatonin receptors couple through a cholera toxin-sensitive mechanism to inhibit cyclic AMP in the ovine pituitary. *J Neuroendocrinol* 7 (1995) 361-369
84. Mühlbauer E, Wolgast S, Finckh U, Peschke D, Peschke E: Indication of circadian oscillations in the rat pancreas. *FEBS Lett* 564 (2004) 91-96

85. Nash MS, Osborne NN: Pertussis toxin-sensitive melatonin receptors negatively coupled to adenylate cyclase associated with cultured human and rat retinal pigment epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 36 (1995) 95-102
86. Neacsu C: Pineal-pancreas interaction: pineal hormone E5 action on insulin activity. *Physiologie* 25 (1988) 119-127
87. Nijijima A, Chun SJ, Shima T, Bizot-Espiard JG, Guardiola-Lemaitre B, Nagai K: Effect of intravenous administration of melatonin on the efferent activity of the adrenal nerve. *J Auton Nerv Syst* 71 (1998) 134-138
88. Noelle RJ, Lawrence DA: Modulation of T-cell function. II. Chemical basis for the involvement of cell surface thiol-reactive sites in control of T-cell proliferation. *Cell Immunol* 60 (1981) 453-469
89. Palmer S, Wakelam MJO: Mass measurement of inositol 1,4,5-trisphosphate using a specific binding assay. In: Irvine RF (Ed): *Methods in inositide research*. Raven Press, New York, 1990, S. 127-134.
90. Parhon CI: *Congrès d'Endocrinologie de Bucarest*. 1 (1939) 187
91. Peschke E, Peschke D, Hammer T, Csernus V: Influence of melatonin and serotonin on glucose-stimulated insulin release from perfused rat pancreatic islets in vitro. *J Pineal Res* 23 (1997) 156-163
92. Peschke E, Peschke D: Evidence for a circadian rhythm of insulin release from perfused rat pancreatic islets. *Diabetologia* 41 (1998) 1085-1092
93. Peschke E, Fauteck JD, Musshoff U, Schmidt F, Beckmann A, Peschke D: Evidence for a melatonin receptor within pancreatic islets of neonate rats: functional, autoradiographic, and molecular investigations. *J Pineal Res* 28 (2000) 156-164
94. Peschke E: Zum Einfluss von Melatonin auf Insulinsekretion, Signaltransduktion und Sekretionsrhythmik pankreatischer B-Zellen in vitro. In: Peschke E. (Hrsg): *Endokrinologie, Zeitstrukturen endokriner Systeme*. Verlag Sächs Akad Wiss, Stuttgart, Leipzig, 2002a, S. 89-119
95. Peschke E, Mühlbauer E, Musshoff U, Csernus VJ, Chankiewicz E, Peschke D: Receptor MT(1) mediated influence of melatonin on cAMP concentration and insulin secretion of rat insulinoma cells INS-1. *J Pineal Res* 33 (2002b) 63-71

96. Peschke E, Bach AG, and Mühlbauer E. Parallel signaling pathways of melatonin in the pancreatic β -cell. *J Pineal Res* (2005) (eingereicht)
97. Petit L, Lacroix I, de Coppet P, Strosberg AD, Jockers R: Differential signaling of human Mel1a and Mel1b melatonin receptors through the cyclic guanosine 3'-5'-monophosphate pathway. *Biochem Pharmacol* 58 (1999) 633-639
98. Pevet P: Melatonin and biological rhythms. *Biol Signals Recept* 9 (2000) 203-212
99. Picinato MC, Haber EP, Carpinelli AR, Cipolla-Neto J: Daily rhythm of glucose-induced insulin secretion by isolated islets from intact and pinealectomized rat. *J Pineal Res* 33 (2002) 172-177
100. Poitout V, Stout LE, Armstrong MB, Walseth TF, Sorenson RL, Robertson RP: Morphological and functional characterization of beta TC-6 cells - an insulin-secreting cell line derived from transgenic mice. *Diabetes* 44 (1995) 306-313
101. Poitout V, Olson LK, Robertson RP: Insulin-secreting cell-lines: classification, characteristics and potential applications. *Diabetes Metab* 22 (1996) 7-14
102. Popova JS, Dubocovich ML: Melatonin receptor-mediated stimulation of phosphoinositide breakdown in chick brain slices. *J Neurochem* 64 (1995) 130-138
103. Prakash P, Laloraya M, Kumar P: Influence of a melatonin implant on the free radical load in avian thyroid and its relation with thyroid hormonogenesis. *Biochem Mol Biol Int* 46 (1998) 1249-1258
104. Praz GA, Halban PA, Wollheim CB, Blondel B, Strauss AJ, Renold AE: Regulation of immunoreactive-insulin release from a rat cell line (RINm5F). *Biochem J* 210 (1983) 345-352
105. Pruetz SB, Obiri N, Kiel JL: Involvement and relative importance of at least two distinct mechanisms in the effects of 2-mercaptoethanol on murine lymphocytes in culture. *J Cell Physiol* 141 (1989) 40-45
106. Putney Jr JW, Pedrosa Ribeiro CM: Signaling pathways between the plasma membrane and endoplasmic reticulum calcium stores. *Cell Mol Life Sci* 57 (2000) 1272-1286
107. Reiter RJ: The melatonin rhythm: both a clock and a calendar. *Experientia* 49 (1993) 654-664

108. Reiter RJ, Tan DX, Osuna C, Gitto E: Actions of melatonin in the reduction of oxidative stress. A review. *J Biomed Sci* 7 (2000) 444-458
109. Ricordi C, Socci C, Davalli AM, Staudacher C, Baro P, Vertova A, Sassi I, Gavazzi F, Pozza G, Di Carlo V: Isolation of the elusive pig islet. *Surgery* 107(1990) 688-694
110. Rodriguez C, Mayo JC, Sainz RM, Antolin I, Herrera F, Martin V, Reiter RJ: Regulation of antioxidant enzymes: a significant role for melatonin. *J Pineal Res* 36 (2004) 1-9
111. Rorsman P, Bokvist K, Ammala C, Eliasson L: Ca^{2+} -channels, cytoplasmic Ca^{2+} -concentration and exocytosis in pancreatic B-cells. In: Flatt PR, Lenzen S (Eds): *Insulin secretion and pancreatic B-cell research*. Smith-Gordon, London, 1994, S. 187-194
112. Santerre RF, Cook RA, Crisel RM, Sharp JD, Schmidt RJ, Williams DC, Wilson CP: Insulin synthesis in a clonal cell line of simian virus 40-transformed hamster pancreatic beta cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 78 (1981) 4339-4343
113. Schibler U, Ripperger J, Brown SA: Peripheral circadian oscillators in mammals: time and food. *J Biol Rhythms* 18 (2003) 250-260
114. Schmittgen TD, Zakrajsek BA, Mills AG, Gorn V, Singer MJ, Reed MW: Quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction to study mRNA decay: comparison of endpoint and real-time methods. *Anal Biochem* 285 (2000) 194-204
115. Shears SB: Measurement of inositol phosphate turnover in intact cells and cell-free systems. In: Shears SB (Ed): *Signalling by inositides*. Oxford University Press, Oxford, 1997, S. 33-52
116. Shima T, Chun SJ, Nijima A, Bizot-Espiard JG, Guardiola-Lemaitre B, Hosokawa M, Nagai K: Melatonin suppresses hyperglycemia caused by intracerebroventricular injection of 2-deoxy-D-glucose in rats. *Neurosci Lett* 226 (1997) 119-122
117. Shiu SY, Li L, Siu SW, Xi SC, Fong SW, Pang SF: Biological basis and possible physiological implications of melatonin receptor-mediated signaling in the rat epididymis. *Biol Signals Recept* 9 (2000) 172-187
118. Sjoblom M, Flemstrom G: Melatonin in the duodenal lumen is a potent stimulant of mucosal bicarbonate secretion. *J Pineal Res* 34 (2003) 288-293

119. Smith DK, Finnegan DL, Bowen SM: An inventory of long-lived radionuclides residual from underground nuclear testing at the Nevada test site, 1951-1992. *J Environ Radioact* 67 (2003) 35-51
120. Song Y, Pang CS, Ayre EA, Brown GM, Pang SF: Melatonin receptors in the chicken kidney are up-regulated by pinealectomy and linked to adenylate cyclase. *Eur J Endocrinol* 135 (1996) 128-133
121. Song Y, Chan CW, Brown GM, Pang SF, Silverman M: Studies of the renal action of melatonin: evidence that the effects are mediated by 37 kDa receptors of the Mel1a subtype localized primarily to the basolateral membrane of the proximal tubule. *FASEB J* 11 (1997) 93-100
122. Soto-Vega E, Meza I, Ramirez-Rodriguez G, Benitez-King G: Melatonin stimulates calmodulin phosphorylation by protein kinase C. *J Pineal Res* 37 (2004) 98-106
123. Steve R, Helen JS: Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In: Krawetz S, Misener S (Eds): *Bioinformatics methods and protocols: methods in molecular biology*. Humana Press, Totowa, 2000, S. 365-386
124. Sudhof TC, Newton CL, Archer BT 3rd, Ushkaryov YA, Mignery GA: Structure of a novel InsP3 receptor. *Embo J* 10 (1991) 3199-3206
125. Tan D, Manchester LC, Reiter RJ, Qi W, Hanes MA, Farley NJ: High physiological levels of melatonin in the bile of mammals. *Life Sci* 65 (1999) 2523-2529
126. Tannenbaum MG, Reiter RJ, Vaughan MK, Troiani ME, Gonzalez-Brito A: Adrenalectomy prevents changes in rat pineal melatonin content and N-acetyltransferase activity induced by acute insulin stress. *J Pineal Res* 4 (1987) 395-402
127. Toker A: Phosphoinositides and signal transduction. *Cell Mol Life Sci* 59 (2002) 761-779
128. Van Cauter E, Polonsky KS, Scheen AJ: Roles of circadian rhythmicity and sleep in human glucose regulation. *Endocr Rev* 18 (1997) 716-238
129. Van de Winkel M, Pipeleers D: Autofluorescence-activated cell sorting of pancreatic islet cells: purification of insulin-containing B-cells according to

- glucose-induced changes in cellular redox state. *Biochem Biophys Res Commun* 114 (1983) 835-842
130. Vanecek J, Klein DC: Mechanism of melatonin signal transduction in the neonatal rat pituitary. *Neurochem Int* 27 (1995) 273-278
 131. Vanecek J: Cellular mechanisms of melatonin action. *Physiol Rev* 78 (1998) 687-721
 132. Wild S, Roglic G, Green A, Sicree R, King H: Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030. *Diabetes Care* 27 (2004) 1047-1053
 133. Wollheim CB, Biden TJ: Second messenger function of inositol 1,4,5-trisphosphate. Early changes in inositol phosphates, cytosolic Ca^{2+} , and insulin release in carbamylcholine-stimulated RINm5F cells. *J Biol Chem* 261 (1986) 8314-8319
 134. Wollheim CB, Meda P, Halban PA: Establishment and culture of insulin-secreting beta cell lines. *Methods Enzymol* 192 (1990) 223-235
 135. Zanner R, Hapfelmeier G, Gratzl M, Prinz C: Intracellular signal transduction during gastrin-induced histamine secretion in rat gastric ECL cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 282 (2002) 374-382
 136. Zawalich WS, Zawalich KC, Kelley GG: Time-dependent effects of cholinergic stimulation on beta cell responsiveness. *Pflug Arch Eur J Physiol* 432 (1996) 589-596
 137. Zawalich WS, Zawalich KC, Tesz GJ, Sterpka JA, Philbrick WM: Insulin secretion and IP levels in two distant lineages of the genus *Mus*: comparisons with rat islets. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 280 (2001) 720-728
 138. Zemkova H, Vanecek J: Differences in gonadotropin-releasing hormone-induced calcium signaling between melatonin-sensitive and melatonin-insensitive neonatal rat gonadotrophs. *Endocrinology* 141 (2000) 1017-1026

7. Thesen

1. Das zur IP_3 -Bestimmung entwickelte Protokoll ist geeignet zur Quantifizierung intrazellulärer IP_3 -Mengen in INS1-Zellen. Insbesondere die konsequente Probenbehandlung im Eisbad, die Verwendung antistatischer Aufbewahrungsgefäße und die beschriebene Technik zur schnellen, volumensparenden Neutralisierung des sauren IP_3 -Zellextrakt haben erfolgreiche IP_3 -Bestimmung im IP_3 -Radiorezeptorassay ermöglicht. Das Protokoll erlaubt die ursprüngliche IP_3 -Menge im Batch-Ansatz zu berechnen.
2. Carbachol in den Konzentrationen von 10 bis 1000 $\mu\text{mol/l}$ stimuliert dosisabhängig die IP_3 -Entstehung in INS1-Zellen in Batch-Kultur. Die eingesetzte Höchstkonzentration von 1000 $\mu\text{mol/l}$ steigert nach 15-minütiger Inkubation den intrazellulären IP_3 -Spiegel von INS1-Zellen signifikant auf das 3,5-fache der unstimulierten Kontrolle. In den Untersuchungen hat sich Carbachol als Modellsubstanz der IP_3 -Stimulation in INS1-Zellen bewährt.
3. Melatonin in den Konzentrationen von 1 bis 100 nmol/l stimuliert ebenfalls dosisabhängig die IP_3 -Entstehung in INS1-Zellen in Batch-Kultur. Bereits eine physiologische Konzentration von 1 nmol/l Melatonin ist zur Triggerung der IP_3 -Signalkaskade befähigt. Die eingesetzte Höchstkonzentration von 100 nmol/l steigert nach 15-minütiger Inkubation den intrazellulären IP_3 -Spiegel von INS1-Zellen signifikant auf das 2,5-fache der unstimulierten Kontrolle. Melatonin stimuliert die IP_3 -Bildung unmittelbar und ohne Vorinkubation. Eine Zellstimulation mit Melatonin plus Carbachol führt zu einer IP_3 -Bildung, die stärker ist, als unter Stimulation mit Carbachol allein.
4. Inkubation von INS1-Zellen in Batch-Kultur mit dem Melatoninrezeptor-Blocker Luzindol (30 $\mu\text{mol/l}$) verhindert eine IP_3 -Entstehung trotz gleichzeitiger, 15-minütiger Stimulation mit 100 nmol/l Melatonin. Dies spricht für eine Beteiligung des MT_1 -Rezeptors (der MT_2 -Rezeptor ist an INS1-Zellen nicht nachweisbar) an der IP_3 -Signalkaskade der INS1-Zelle. Zusammen mit der dosis-

abhängigen Stimulation der IP_3 -Signalkaskade durch Melatonin sprechen diese Befunde für eine spezifische Wirkung von Melatonin.

5. Es kommen alle drei Isoformen des IP_3 -Rezeptors in der INS1-Zelle vor. Die Isoformen IP_3R-2 und IP_3R-3 werden nicht im exokrinen Pankreas exprimiert. In der INS1-Zelle ist die Isoform IP_3R-1 etwa 5-mal stärker als die Isoform IP_3R-3 exprimiert. Die Isoform IP_3R-2 ist in der INS1-Zelle nur marginal exprimiert.
6. Carbachol in den Konzentrationen von 10 bis 1000 $\mu\text{mol/l}$ stimuliert in dosisabhängiger Weise die Insulinfreisetzung von INS1-Zellen in Batch-Kultur. Die eingesetzte Höchstkonzentration von 1000 $\mu\text{mol/l}$ steigert nach 15-minütiger Inkubation die Insulinfreisetzung von INS1-Zellen signifikant auf das 2,5-fache der unstimulierten Kontrolle. In Bestätigung dieser Ergebnisse stimuliert Carbachol in den Konzentrationen von 10 bis 300 $\mu\text{mol/l}$ die Insulinfreisetzung von superfundierten INS1-Zellen in dosisabhängiger Weise. Die eingesetzte Höchstkonzentration von 300 $\mu\text{mol/l}$ steigert nach 3-minütiger Inkubation die Insulinfreisetzung von INS1-Zellen signifikant auf das 10-fache der unstimulierten Kontrolle. Der intrazelluläre Botenstoff cAMP bleibt während einer Stimulation mit Carbachol auf konstant niedrigen Spiegel. Die Untersuchungen demonstrieren eine IP_3 -vermittelte Insulinfreisetzung durch das Parasympathomimetikum Carbachol bei INS1-Zellen.
7. Melatonin in alleiniger Gabe und ohne Ko-Stimulation mit anderen Substanzen hat keinen messbaren Effekt auf die Insulinfreisetzung von INS1-Zellen. Bei Stimulation von INS1-Zellen mit Melatonin plus Carbachol wird die Insulinfreisetzende Wirkung von Carbachol diskret gedämpft. Die gleichzeitige Hemmung der cAMP-Signalkaskade und die Aktivierung der IP_3 -Signalkaskade durch Melatonin könnte zu einer Aufhebung der unmittelbaren Effekte auf die Insulinfreisetzung führen.
8. Unter Blockade der cAMP-Signalkaskade von superfundierten INS1-Zellen mit PTX zeigt sich unter Ko-Stimulation von Carbachol plus Melatonin eine

Verstärkung der Insulinausschüttung gegenüber einer Stimulation mit Carbachol allein. Die IP_3 - und die cAMP-Signalkaskade werden beide durch Melatonin beeinflusst, wobei die Hemmung der cAMP-Signalkaskade stärker ausgeprägt ist.

Lebenslauf

- 05.03.1980 geboren in Halle
- 1986 - 1991 Grundschule, Halle
- 1991 - 1998 Gymnasium-am-Reileck, Halle
- 1996 - 2001 Entwicklung einer Software zur Vermessung digitaler Röntgenbilder
Auszeichnung der Arbeit im Bundeswettbewerb "Jugend forscht"
- 1998 Abschluss Abitur: Endnote „sehr gut“
- 1998 - 1999 Zivildienst in der Klinik für Orthopädie der Martin-Luther-Universität
Halle-Wittenberg
- 1999 Aufnahme in die Studienstiftung des Deutschen Volkes
- 1999 Beginn des Studiums der Humanmedizin an der Martin-Luther-
Universität Halle-Wittenberg
- 1999 - 2001 Sprachkurse: *medical english, unicert II, bedside teaching*;
Intensivsprachkurs Englisch, Southampton (UK)
- 2001 Physikum: Endnote „gut“
- 2001 Famulatur, Neurochirurgie, SGH Glasgow (UK)
- 2001 Beginn der Forschungsarbeit über den Einfluss von Melatonin auf
die IP₃-Signalkaskade der pankreatischen β -Zelle unter Leitung von
Herr Prof. Dr. Elmar Peschke (Institut für Anatomie und Zellbiologie
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg)
- 2002 1. Staatsexamen: Endnote „gut“
- 2004 2. Staatsexamen: Endnote „gut“
- 2004 - 2005 Praktisches Jahr an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

Andreas Gunter Bach

Selbständigkeitserklärung

Die vorliegende Arbeit wurde von mir ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet.

Ich versichere, dass ich für die inhaltliche Erstellung der vorliegenden Arbeit nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- und Beratungsdiensten (Promotionsberater oder andere Personen) in Anspruch genommen habe. Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Andreas Gunter Bach
Halle/Saale, 20.09.2005

Erklärung über Promotionsversuche

Ich erkläre, dass ich keinerlei frühere Promotionsversuche unternommen habe und dass an keiner anderen Fakultät oder Universität ein Promotionsverfahren anhängig ist.

Andreas Gunter Bach
Halle/Saale, 20.09.2005

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich all denen danken, die zur Realisierung dieser Arbeit beigetragen haben.

Für die Möglichkeit der Anfertigung meiner Dissertation am Institut für Anatomie und Zellbiologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Dr. Bernd Fischer bedanken.

Mein Dank gilt allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Peschke, allen voran Herrn Prof. Elmar Peschke und Frau Prof. Dorothee Peschke für die Überlassung des Themas und der stets umfangreichen persönlichen Unterstützung bei der Bearbeitung der Aufgabenstellungen. Für die geleistete technische Assistenz bei den Versuchsdurchführungen bedanke ich mich bei Frau Uta Engelhardt, Frau Candy Rothgänger und Frau Annika Jordan.

Für hilfreiche Beratung zu radioimmunologischen Nachweisverfahren möchte ich mich bei Frau Dr. Beate Fricke (Institut für Physiologische Chemie des Bereiches Medizin der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg) bedanken.

Insbesondere danke ich ganz herzlich meiner Familie, die mit ihrer Unterstützung diese Arbeit erst ermöglicht hat.

Publikationen von Ergebnissen der Dissertation

Publikationen

Peschke E, Bach AG, and Mühlbauer E. Parallel signaling pathways of melatonin in the pancreatic β -cell. J Pineal Res (2005) (eingereicht)

Bach AG, Wolgast S, Mühlbauer E, and Peschke E: Melatonin stimulates inositol-1,4,5-trisphosphate and Ca^{2+} release from INS1 insulinoma cells. J Pineal Res 39 (2005) 316-323

Kurzpublikationen

Peschke E, Bach AG, and Mühlbauer E. Parallele Signalkaskaden von Melatonin in der pankreatischen β -Zelle. (2005) (in Vorbereitung)

Bach AG, Wolgast S, Mühlbauer E, Bazwinski I, and Peschke E. Receptor (MT1) mediated influence of melatonin on $\text{IP}_3/\text{Ca}^{2+}$ signal transduction cascade of the pancreatic β -cell. Verh Anat Ges 187 (2005) 82

Bach AG, Mühlbauer E, and Peschke E. Melatonineinflüsse auf die cAMP-Signalkaskade der INS-1 Zelle sind nicht durch Expressionsveränderungen der mRNA der Adenylatzyklase oder des MT_1 -Rezeptors verursacht. Verh Anat Ges 187 (2005) 238

Peschke E, Bach AG, Mühlbauer E, and Peschke D. The Janus-like face of melatonin in view of insulin secretion. Verh Anat Ges 186 (2004) 147-148

Peschke E, Bach AG, Mühlbauer E, and Peschke D. Einfluss von Melatonin auf die Insulinsekretion – Phänomenologie, Rezeptoranalytik und Signaltransduktion – Eine Übersicht zum gegenwärtigen Kenntnisstand. Verh Anat Ges 186 (2004) 268-269

Peschke E, Bach AG, Mühlbauer E, and Peschke D: Coupling of the MT₁ melatonin receptor of the pancreatic β -cell to both the cAMP and the IP₃ signal transduction cascade. *Verh Anat Ges* 185 (2003) 302