

Institut für Agrar- und Ernährungswissenschaften
der Naturwissenschaftlichen Fakultät III
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

angefertigt am Institut für Anatomie und Zellbiologie
der Medizinischen Fakultät
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

**„Untersuchungen zur Bedeutung des second messenger cGMP für
Rezeptor-medierte Melatonin-Effekte auf die Insulinsekretion der
pankreatischen β -Zelle“**

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Trophologie (Dr. troph.)

vorgelegt von
Diplom-Ernährungswissenschaftlerin Ina Stumpf
geb. am 23.09.1982 in Schkeuditz

Gutachter: Prof. Dr. habil.E. Peschke
Prof. Dr. habil. G. Stangl
Prof. Dr. habil. S. Reuss

Verteidigung am: 13.07.2009

Halle (Saale) 2009

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	III
1 Einleitung	
1.1 Übersicht zur cGMP-vermittelten Signaltransduktion	1
1.2 Regulation der Insulinfreisetzung in der pankreatischen β -Zelle	3
1.3 Chronobiologische Aspekte	
1.3.1 Circadiane Rhythmik	5
1.3.2 Das Pinealhorn Melatonin	6
1.3.3 Melatoninrezeptor-medierte Signaltransduktionsmechanismen	7
1.3.4 Zum Einfluss von Melatonin auf die Insulinsekretion pankreatischer β -Zellen	10
2 Zielstellungen	11
3 Material	
3.1 Zelllinie	12
3.2 Rattenmodelle	12
3.3 Mausmodelle	12
3.4 Humane Zellen und Gewebeprobe.....	13
3.5 Chemikalien und Reagenzien	13
3.6 Zubehör und Geräte	15
3.7 Puffer und Lösungen	16
3.8 Verwendete Kits	16
3.9 Verwendete Analysensoftware	16
4 Methoden	
4.1 Zellkultur	16
4.2 Gewinnung von LANGERHANSschen Inseln aus Pankreata von Ratte und Maus	17
4.3 Inkubationsversuche für Insulin-Bestimmungen	17
4.4 Bestimmungen von cGMP-Konzentrationen	18
4.5 Quantitative NO-Bestimmungen	19
4.6 Molekularbiologische Untersuchungen	
4.6.1 Zellstimulation für Expressionsuntersuchungen	20
4.6.2 RNA-Extraktion und RNA-Gelelektrophorese	20
4.6.3 Synthese der cDNA	21
4.6.4 <i>Real-time</i> RT-PCR	22
4.6.5 DNA-Gelelektrophorese	24
4.6.6 Restriktionsanalysen	24
4.7 Statistische Auswertungen	24

5 Ergebnisse

5.1 Untersuchungen zur Bedeutung des MT ₂ -Rezeptors für die Insulinsekretion	26
5.2 Effekte von Melatonin auf die cGMP-Konzentration in INS1-Zellen	
5.2.1 Melatoninwirkung auf die cGMP-Konzentration in Abhängigkeit von Dosis und Inkubationszeit	28
5.2.2 Nachweis der Rezeptor-medierten Wirkung von Melatonin auf cGMP	30
5.3 Charakterisierung der pankreatischen Insel und INS1-Zelle hinsichtlich cGMP- Signalkaskaden-Komponenten	31
5.4 Die Wirkung von Melatonin auf die lösliche Guanylatzyklase.....	35
5.5 Zum Einfluss von Melatonin auf die NO-Synthase	41
5.6 Expression der löslichen Guanylatzyklase im Tiermodell	
5.6.1 Untersuchungen an Pankreata und Inseln von Melatoninrezeptor- <i>knockout</i> -Tieren	44
5.6.2 Expressionsvergleich bei Inseln stoffwechselunauffälliger und Typ2-diabetischer Ratten	47
5.6.3 Untersuchungen zur sGC-Expression in Rattenpankreata nach Melatoningabe über das Trinkwasser	49
5.7 Vergleich der sGC-Expression in Pankreata stoffwechselunauffälliger und Typ2-diabetischer Patienten	50
5.8 Zur Bedeutung der cGMP-Signalkaskade für die Insulinsekretion	
5.8.1 Wirkung von 8-Br-cGMP auf die Insulinfreisetzung.....	52
5.8.2 Beteiligung der Proteinkinase G an der Insulinsekretionskaskade.....	53
5.8.3 Ergebnisse zur Bedeutung von CNG(<i>cyclic nucleotide-gated</i>)-Kanälen in pankreatischen β -Zellen	55
6 Diskussion	58
6.1 Die INS1-Zelle, Tiermodelle und Patientenmaterial	58
6.2 Zur Bedeutung des MT ₂ -Rezeptors in pankreatischen β -Zellen.....	60
6.3 Melatoninwirkung auf die cGMP-Signalkaskade in Pankreata, LANGERHANSschen Inseln und β -Zellen	
6.3.1 Einfluss von Melatonin auf die cGMP-Konzentration in INS1-Zellen.....	63
6.3.2 Komponenten der cGMP-Kaskade in der INS1-Zelle	64
6.3.3 Zur Wirkung von Melatonin auf die lösliche Guanylatzyklase und NO-Synthase	65
6.3.4 Untersuchungen an Pankreata von Tier und Mensch.....	67
6.4 Zur Bedeutung des cGMP für die Insulinsekretion.....	71
6.5 Vorstellungen über die Signalwege des Melatonins in der pankreatischen β -Zelle	72
7 Zusammenfassung	76
8 Summary	79
9 Literaturverzeichnis	82
9.1 Eigene wissenschaftliche Beiträge	93
Lebenslauf	VI
Erklärung	VII
Danksagung	VIII

Abkürzungsverzeichnis

AANAT	Arylkylamin-N-acetyltransferase
Abb.	Abbildung
ANP	<i>atrial natriuretic peptide</i>
ATP	Adenosintriphosphat
BNP	<i>brain natriuretic peptide</i>
bp	Basenpaare
8-Br-cGMP	8-Bromo-cGMP
BSA	<i>bovine serum albumin</i>
C-Peptid	<i>connecting peptide</i>
CaM	Calmodulin
cAMP	zyklisches 3`-5`-Adenosinmonophosphat
cGMP	zyklisches 3`-5`-Guanosinmonophosphat
cDNA	<i>complementary desoxyribose nucleic acid</i>
cPLA ₂	zytosolische Phospholipase A ₂
CIM	<i>Columna intermediolateralis</i>
CNG	<i>cyclic nucleotide-gated</i>
CNP	<i>c-type natriuretic peptide</i>
CREB	<i>cyclic AMP response element binding protein</i>
Ct	<i>cycle time</i>
DAG	Diazylglyzerol
dATP	Desoxyadenosin-5`-triphosphat
dCTP	Desoxycytidin-5`-triphosphat
dGTP	Desoxyguanosin-5`-triphosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>desoxyribose nucleic acid</i>
DPBS	<i>Dulbecco's phosphate buffered saline</i>
dTTP	Desoxythymidin-5`-triphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
eNOS	endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase
ERK	extrazellulär Signal-regulierte Kinase
et al.	et alii
FKS	fetales Kälberserum
GC	Guanylatzyklase
GCS	<i>Ganglion cervicale superius</i>
GDP	Guanosindiphosphat
GIP	<i>gastric inhibitory polypeptide</i>
GK	Goto-Kakizaki
GLP	<i>glukagon-like peptide</i>
GLUT2	Glukosetransporter 2
GMP	Guanosinmonophosphat
G-Protein	Guaninnukleotid-bindendes Protein
GPR50	<i>G protein-coupled receptor 50</i>
GTP	Guanosintriphosphat
HEK	<i>human embryonic kidney</i>
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HIOMT	Hydroxyindol-O-methyltransferase
IBMX	3-Isobutyl-1-methylxanthin
iddm	<i>insulin-dependent diabetes mellitus</i>
IGF	<i>insulin-like growth factor</i>
iNOS	induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase
INS1	Glukose-responsive, Insulin-produzierende Ratten-Insulinomazelle
IP ₃	Inositol-1,4,5-triphosphat
JNK	c-Jun N-terminale Kinase
K _{Ca}	Kalzium-abhängige Kalium-Kanäle
KG	Körpergewicht
KIR	einwärts-gleichrichtender K ⁺ -Kanal

Kontr.	Kontrolle
L	Molekulargewichtsstandard
L:D	Licht zu Dunkel-Verhältnis
LCD	L- <i>cis</i> -Diltiazem
L-NMMA	N ^G -monomethyl-L-arginin
LOX	Lipoxygenase
LT	Leukotriene
MAP	<i>mitogen-activated protein</i>
MEK	Mitogen-aktivierte Protein-Kinase-Kinase
mGC	membranständige Form der Guanylatzyklase
Mitarb.	Mitarbeiter
MOPS	Morpholinopropan-Sulfonsäure
mRNA	<i>messenger ribonucleic acid</i>
MRP	<i>multidrug resistance-associated-protein</i>
MT _{1/2}	Melatoninrezeptortyp _{1/2}
MT ₁ ^{-/-}	MT ₁ -Rezeptor- <i>knockout</i>
MT ₂ ^{-/-}	MT ₂ -Rezeptor- <i>knockout</i>
MT _{1/2} ^{-/-}	MT _{1/2} -Rezeptor-Doppel- <i>knockout</i>
MW	Mittelwert
n	Stichprobenumfang
NA	Noradrenalin
NADH	Nikotinamidadenindinukleotid
NED	Naphthylethylendiamin
nNOS	neuronale Stickstoffmonoxid-Synthase
NO	Stickstoffmonoxid
NOS	Stickstoffmonoxid-Synthase
NS2028	4H-8-bromo-1,2,4-oxadiazolo-(3,4d)-benz-(b)(1,4)-oxazin-1-on
NSY	<i>Nagoya-Shibita-Yasuda</i>
NZO	<i>New-Zealand-Obese</i>
ODQ	1H-(1,2,4)-oxadiazolo-(4,3- α)-quinoxalin-1-on
OLETF	<i>Otsuka-Long-Evans-Tokushima-fatty</i>
p	Irrtumswahrscheinlichkeit
PACAP	<i>pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PDE	Phosphodiesterase
per	<i>period</i>
PI ₃	Phosphatidylinositol-3
PIN	Pinealorgan
PIP ₂	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PKA/C/G	Proteinkinase A/C/G
PL	Phospholipide
PLC	Phospholipase C
PP	Pankreatisches Polypeptid
4P-PDOT	4-Phenyl-2-propionamidotetralin
PTX	Pertussistoxin
PVN	<i>Nucleus paraventricularis</i>
QR ₂	Quinonreduktase 2
RET	Retina
RIA	<i>radioimmunoassay</i>
RHT	<i>Retinohypothalamischer</i> Trakt
RNA	<i>ribonucleic acid</i>
ROR	Retinoid-Orphan-Rezeptoren
Rp-8-pCPT-cGMPS	Rp-8-(4-Chlorophenylthio)-guanosine-3',5`-cyclic monophosphorothioate)
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
RT	Reverse Transkriptase
RT-PCR	<i>reverse-transcription polymerase chain reaction</i>
RZR	Retinoid-Z-Rezeptoren
SCN	<i>Nucleus suprachiasmaticus</i>
SEM	<i>standard error of mean</i> , Standardfehler

sGC	lösliche (<i>soluble</i>) Form der Guanylatzyklase
SNAP	S-Nitroso-N-acetyl-DL-penicillamin
SNP	Natrium-Nitroprussid
SNPs	<i>single nucleotide polymorphisms</i>
STa	hitze stabile Enterotoxine
TAE	Acetat-Ethylendiamin
Tab.	Tabelle
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
UV	ultraviolett
VIP	<i>vasoactive intestinal polypeptide</i>
WR	Wistar
WT	Wildtyp
ZDF	<i>Zucker-diabetic-fatty</i>

Fremdsprachige Begriffe und Bezeichnungen von Genen sind *kursiv* gedruckt.

Die Angaben der Hersteller sind vollständig aufgeführt; bei Materialien von Firmen mit Sitz in der Bundesrepublik Deutschland wurde auf die Länderbezeichnung verzichtet.

1 Einleitung

1.1 Übersicht zur cGMP-vermittelten Signaltransduktion

Zyklisches 3`-5`-Guanosinmonophosphat spielt als *second messenger* neben cAMP (zyklisches 3`-5`-Adenosinmonophosphat) eine zentrale Rolle in der Regulation des Zellstoffwechsels. Neben der Beteiligung bei der Übertragung von Lichtreizen in der Retina ist cGMP an der Relaxation der Gefäßmuskulatur, Hemmung der Thrombozytenaggregation, Wachstum und Differenzierung von Epithelzellen sowie an der Natrium- und Wasserresorption in Niere und Dünndarm beteiligt.

Katalysiert durch Guanylatzyklasen (GC) wird cGMP aus Guanosin-5`-triphosphat (GTP) unter Abspaltung von Pyrophosphat generiert (Abb. 1). Guanylatzyklasen können als membranständige und zytosolische Enzyme vorliegen. Von der membranständigen Form (mGC) wurden bisher sieben verschiedene Isoformen beschrieben (mGC A bis G). Liganden der mGC A sind ANP (*atrial natriuretic peptide*) und BNP (*brain natriuretic peptide*), welche über die mGC A endokrine Effekte auf den Flüssigkeitshaushalt vermitteln. Die mGC B wird durch Bindung des CNP (*c-type natriuretic peptide*) aktiviert und beeinflusst die vaskuläre Regeneration sowie die enchondrale Ossifikation. Die mGC C stellt einen Rezeptor dar, der vor allem im Magen-Darm-Trakt von Bedeutung ist. Seine ligandenbindende Stelle ist spezifisch für die Peptide Guanylin und Uroguanylin sowie für hitzestabile Enterotoxine (STa), die von Enterobakterien sezerniert werden. Für die mGC D, E, F und G sind bisher keine endogenen Liganden bekannt; sie gelten deshalb als klassische *Orphan*-Rezeptoren [1]. Die Aktivierung der zytosolischen, löslichen Guanylatzyklase (*soluble guanylate cyclase*, sGC) wird vor allem durch das membrangängige Stickstoffmonoxid (NO) ausgelöst, welches durch NO-Synthasen (NOS) bei der Umwandlung von L-Arginin in L-Citrullin freigesetzt wird. Die sGC besteht aus einem Heterodimer mit einer α - und einer β -Untereinheit und ist nur bei Ko-Expression einer α - und β -Untereinheit funktionell aktiv [2].

Der Abbau des cGMP wird durch Phosphodiesterasen (PDE) katalysiert, welche die Phosphodiesterbindung zwischen der 3`-OH-Gruppe der Ribose und der Phosphatgruppe hydrolysieren; es entsteht das biologisch inaktive Guanosinmonophosphat (GMP). Bisher sind elf Familien der Phosphodiesterasen bekannt, die sich hinsichtlich ihrer Substrat- und Inhibitorspezifität, Regulation, zellulären Lokalisation und Gewebeverteilung unterscheiden. Die Familien PDE 5, 6 und 9 weisen eine hohe Spezifität für cGMP gegenüber zyklischem 3`-5`-Adenosinmonophosphat (cAMP) auf. Hingegen bauen die PDE 4, 7 und 8 mit relativ hoher Spezifität cAMP, nicht aber cGMP, ab. Die PDE 1, 2, 3, 10 und 11 weisen eine ähnliche Affinität für cAMP und cGMP an der katalytischen Domäne auf [3]. Des Weiteren ist bekannt, dass durch Bindung von cGMP an die PDE 3 der Abbau von cAMP gehemmt wird, wodurch eine Verknüpfung vom cAMP- mit dem cGMP-Signalweg entsteht [4]. Neben der Spaltung durch Phosphodiesterasen wird die cGMP-Wirkung auch durch seine Elimination aus der Zelle über spezifische Transportsysteme begrenzt. Für einige Mitglieder der MRP (*multidrug resistance-associated protein*)-Familie als Transporter für amphiphile Anionen konnte gezeigt werden, dass sie zyklische Nukleotide aus der Zelle transportieren können. Die MRP 4, 5 und 8 transportieren sowohl cAMP als auch cGMP, wobei MRP 5 eine deutlich höhere Affinität zu cGMP aufweist [5-7]. Es ist somit davon auszugehen, dass die intrazelluläre cGMP-Konzentration sowohl von der Guanylatzyklase- und Phosphodiesterase-

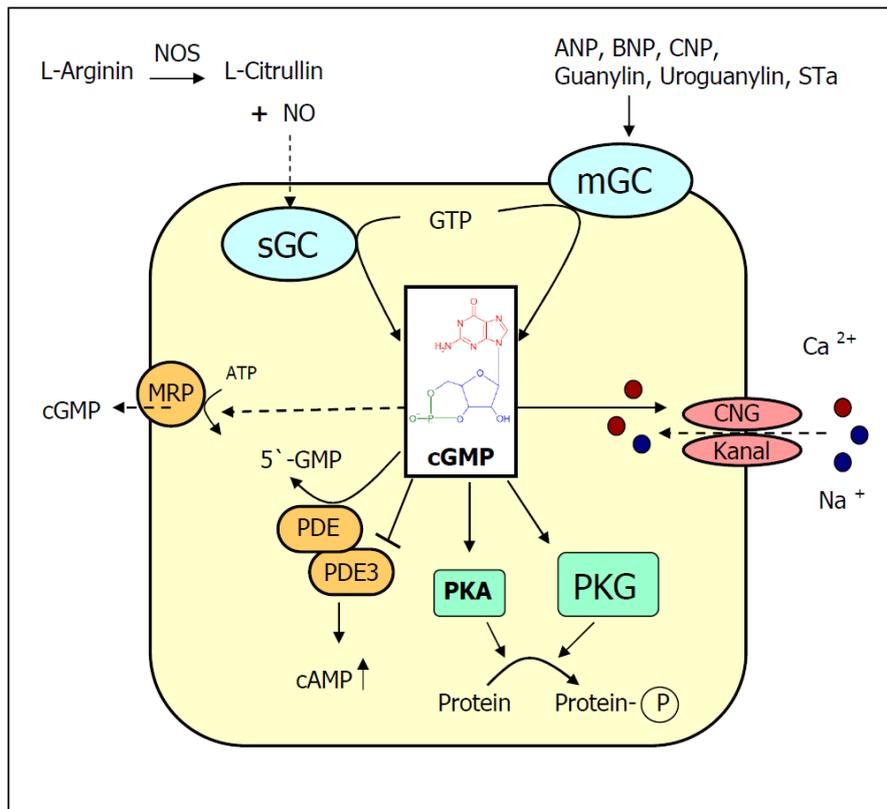


Abb. 1: Schematische Darstellung der NO/cGMP-Signaltransduktionskaskade. ANP, atrial natriuretic peptide; ATP, Adenosintriphosphat; BNP, brain natriuretic peptide; cAMP, zyklisches 3'-5'-Adenosinmonophosphat; cGMP, zyklisches 3'-5'-Guanosinmonophosphat; CNG, cyclic nucleotide-gated; CNP, c-type natriuretic peptide; GTP, Guanosintriphosphat; mGC, membranständige Guanylatzyklase; MRP, multidrug resistance-associated protein; NO, Stickstoffmonoxid; NOS, Stickstoffmonoxid-Synthase; PDE, Phosphodiesterase; PKA, Proteinkinase A; PKG, Proteinkinase G; sGC, lösliche Guanylatzyklase; STa, hitzestabiles Enterotoxin.

Aktivität als auch von der Elimination durch MRP abhängig ist.

Die zellulären und physiologischen Auswirkungen veränderter cGMP-Konzentrationen werden durch verschiedene Effektorproteine vermittelt. Neben der bereits erwähnten Wirkung auf die cAMP-Signal-kaskade durch Hemmung der PDE 3 moduliert cGMP die Aktivität der cGMP-spezifischen Proteinkinase G (PKG) sowie cGMP-abhängige Ionenkanäle.

Die cGMP-abhängigen Proteinkinasen gehören zur Familie der Serin/Threonin-Kinasen und werden durch Bindung von cGMP aktiviert. Bisher konnten in Säugetieren zwei Formen der PKG identifiziert werden, die zytosolisch (PKG 1) und membrangebunden PKG (PKG 2) vorkommen [8]. Sie konnten bereits in einer Vielzahl von Geweben und Zelltypen nachgewiesen werden. Ebenso kann durch cGMP die Proteinkinase A (PKA) aktiviert werden - ein weiterer Hinweis für die enge Verknüpfung des cAMP- und cGMP-Signalweges [9]. Durch Proteinphosphorylierung der PKA wird dementsprechend die Aktivität von Enzymen, Kanälen oder Transkriptionsfaktoren reguliert. Weiterhin können durch das zyklische Nukleotid nichtselektive, ligandengesteuerte Kationenkanäle, sogenannte CNG(cyclic nucleotide-gated)-Kanäle, beeinflusst werden. CNG-Kanäle sind sowohl für monovalente als auch für divalente Kationen permeabel, wobei divalente gegenüber monovalenten Ionen bevorzugt werden [10]. So können intrazelluläre Natrium- und Kalzium-Konzentrationen in Abhängigkeit von der aktuellen cGMP-Konzentration in der Zelle moduliert werden [11,12].

1.2 Regulation der Insulinfreisetzung in der pankreatischen β -Zelle

Insulin, das bedeutende Hormon zur Regulation des Glukosestoffwechsels, wird in den β -Zellen der LANGERHANSschen Inseln des Pankreas gebildet. Neben der Senkung der Blutglukosekonzentration durch Beschleunigung der Glukoseaufnahme in Muskel- und Fettzellen wirkt Insulin anabol durch Stimulation der Protein-, Glykogen- und Triglyzeridsynthese und antikatabol durch Hemmung von Lipolyse, Proteolyse und Glukoneogenese. Durch Aktivierung von Genen, die für die Kontrolle und den Ablauf des Zellzyklus von Bedeutung sind, reguliert das Hormon zusätzlich Zellwachstum und -proliferation.

Die Sekretion von Insulin aus pankreatischen β -Zellen wird hauptsächlich durch Glukose stimuliert, allerdings können ebenso andere Nährstoffe wie Amino- und Fettsäuren die Insulinfreisetzung regulieren. Das Ausmaß der sekretorischen Antwort auf den Glukosereiz wird beeinflusst durch die Wirkung verschiedener Neurotransmitter wie Noradrenalin, Acetylcholin und VIP (*vasoactive intestinal peptide*) sowie von Hormonen wie Glukagon, GLP1 (*glucagon-like peptide 1*), Somatostatin oder GIP (*gastric inhibitory polypeptide*). Dabei werden extrazelluläre Signale über die Modulation der *second messenger* cAMP, Diazylglyzerol (DAG), Inositol-1,4,5-triphosphat (IP_3) sowie Kalzium-Ionen in Stoffwechselveränderungen der Zelle umgesetzt und beeinflussen dadurch die Insulinbildung und -sekretion.

Glukose gelangt über den insulinunabhängigen Glukosetransporter GLUT2 durch erleichterte Diffusion in die β -Zelle. Intrazellulär wird Glukose durch die Glukokinase zu Glukose-6-phosphat phosphoryliert und durchläuft die hintereinander geschalteten Reaktionsketten Glykolyse, Zitratzyklus und oxidative Phosphorylierung. Dies führt zu einem Anstieg der NADH-, Pyruvat- und ATP-Konzentrationen. Durch stärkere Bindung des ATP an ATP-sensitive Kaliumkanäle der Zellmembran kommt es zur Hemmung der Offenwahrscheinlichkeit der Kanäle, wodurch der Ausstrom von Kalium-Ionen behindert und die Zellmembran depolarisiert wird. Es resultiert eine Aktivierung spannungsabhängiger Kalziumkanäle, verbunden mit dem Einstrom von Kalzium in die Zelle. Infolge dessen wird die exozytotische Sekretion von Insulin initiiert; die insulinhaltigen Granula verschmelzen mit der Plasmamembran und geben ihren Inhalt in den Extrazellulärraum ab.

Eine Verstärkung der Nährstoff-induzierten Insulinfreisetzung kann über die Aktivierung der cAMP-Signalkaskade hervorgerufen werden. Durch Bindung von Agonisten, wie Glukagon, ATP oder GLP1 an ihre Rezeptoren wird die Adenylatzyklase über G-Proteine stimuliert. Der dadurch hervorgerufene cAMP-Anstieg aktiviert die PKA, wodurch sowohl die Transkription und Biosynthese des Vorläufermoleküls Präproinsulin als auch direkt die Insulinsekretion gesteigert werden. Die verstärkte Insulinfreisetzung resultiert unter anderem aus einem Anstieg der zytosolischen Kalziumkonzentration als Folge der Wirkungen der PKA auf spannungsabhängige Kalziumkanäle der Plasmamembran und auf Membranen intrazellulärer Speicher.

Bei der Phospholipase-vermittelten Stimulation der β -Zell-Funktion greifen die Agonisten an G-Protein gekoppelte Membranrezeptoren an und aktivieren die Phospholipase C, welche das Phospholipid Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP_2) in DAG und IP_3 spaltet. Die Steigerung der Transkription des Präproinsulins sowie die Biosynthese und Sekretion von Insulin wird einerseits durch die Aktivierung der Proteinkinase C (PKC) infolge der dadurch erhöhten DAG-Konzentration erreicht. Anderer-

seits führt die IP_3 -induzierte Abgabe von Kalzium aus dem glatten Endoplasmatischen Retikulum und damit ein Anstieg der zytosolischen Kalziumkonzentration zu den genannten Effekten.

Durch die Wirkung von Neurotransmittern sympathischer Nervenfasern der LANGERHANSschen Inseln (Noradrenalin, Galanin und *neuropeptide Y*) oder den Hormonen Adrenalin, Somatostatin und Prostaglandin E_2 kann die Biosynthese und Sekretion von Insulin gehemmt werden. Aus der Bindung dieser Substanzen an Rezeptoren der Plasmamembran resultiert durch Vermittlung über inhibitorische G-Proteine (G_i/G_o) die direkte und indirekte Hemmung der spannungsabhängigen Kalziumkanäle sowie der Adenylatzyklase, verbunden mit einer Senkung der zytosolischen Kalzium- und cAMP-Konzentrationen. Dadurch wird nicht nur die Sekretion akut gehemmt, sondern auch die Transkription des Präproinsulins und die Insulinsynthese [13].

Bisherige Untersuchungen zur Beteiligung der NO/cGMP-Signalkaskade in der Regulation der Insulinsekretion kamen zu unterschiedlichen und widersprüchlichen Resultaten. Die Mehrzahl der Daten deuten auf einen Insulin-steigernden Effekt durch erhöhte cGMP-Konzentrationen hin [14-16]. Dagegen haben andere Studien gezeigt, dass cGMP die Insulinfreisetzung hemmt [17] oder die Insulinsekretion nicht beeinflusst [18,19]. Ebenso gegensätzlich sind Ergebnisse zur Wirkung erhöhter NO-Konzentrationen: Inkubationen von LANGERHANSschen Inseln oder pankreatischen β -Zellen mit verschiedenen NO-Donatoren resultierten einerseits in einer Senkung der Insulinsekretion [20-22], andererseits in einer verstärkten Insulinfreisetzung [23,24]. Neueste Arbeiten konnten eine Abhängigkeit des Effektes von der Dosis des verwendeten NO-Donators nachweisen [16,25]. Die Frage zur Wirkung von NO und cGMP auf Insulinsekretionsmechanismen konnte demnach bislang nicht eindeutig geklärt werden.

Die Aufrechterhaltung der Glukosehomöostase im Blut ist eine lebenswichtige Grundfunktion des Organismus. Vor allem aus der Glukoseabhängigkeit des zentralen Nervensystems, aber auch der Erythrozyten und des Nierenmarks, erwächst die Notwendigkeit, die Blutglukosekonzentration auf einen konstanten Bereich um 5,5 mM zu regulieren. Das endokrine Pankreas ist als Synthese- und Speicherorgan Blutzucker-regulierender Hormone maßgeblich an der Steuerung und Regulation der Glukosehomöostase beteiligt. Eine besondere Rolle spielt dabei das Blutzucker-senkende Hormon Insulin. Störungen in der Insulinsekretion oder -wirkung führen zu diabetischen Stoffwechselsituationen. Der Diabetes mellitus ist eine chronische Erkrankung gekennzeichnet durch Hyperglykämie als Folge eines absoluten oder relativen Insulinmangels, verbunden mit Störungen des Kohlenhydrat-, Protein- und Lipidstoffwechsels. Die Ursache des Typ1-Diabetes besteht in einer defekten oder völlig fehlenden Sekretionsleistung des endokrinen Pankreas, verursacht durch eine immunologisch vermittelte Zerstörung der Insulin-produzierenden β -Zellen. Beim Typ2-Diabetes und Formen des sekundären Diabetes hingegen liegt eine Insulinresistenz der Zielorgane vor, die zunächst durch eine vermehrte Insulinsekretion des Pankreas kompensiert wird und im Rahmen des relativen Sekretionsversagens zur klinischen Manifestation der Erkrankung führt. Akute metabolische Komplikationen der Erkrankung sind oft lebensbedrohliche Stoffwechsellentgleisungen wie Ketoazidose, hyperglykämisch-hyperosmolares Dehydratationssyndrom, hyperglykämischer Schock und Laktatazidose. Bei lange bestehender Erkrankung oder ungenügender Stoffwechseleinstellung führen Mikro- und Makroangiopathien zu Spät-

schäden wie Nephropathie, Polyneuropathie, Dermatosen, gesteigerter Infektanfälligkeit, Retinopathie und Arteriosklerose mit konsekutiv erhöhtem Risiko für Myokardinfarkt und cerebralem Apoplex.

1.3 Chronobiologische Aspekte

1.3.1 Circadiane Rhythmik

Circadiane Rhythmen (lat. *circa*, ungefähr, lat. *dies*, der Tag) begegnen uns in unterschiedlichsten Lebensvorgängen und lassen sich bei fast allen Organismen nachweisen. Sie sind Ausdruck der Anpassung eines Organismus an die regelmäßigen geophysikalischen Veränderungen der Umwelt. Circadiane Rhythmen gehören zu den endogen generierten Rhythmen, die in Anpassung an den Tag-Nacht-Wechsel im Laufe der Evolution entstanden sind. Sie sind dadurch definiert, dass sie unter konstanten Umweltbedingungen, d.h. ohne tageszeitliche Information, erhalten bleiben und dann beim Menschen eine Periodenlänge von etwas weniger als 25 Stunden aufweisen, also nur circa-dian verlaufen und damit von der 24h-Periodik der Umwelt abweichen. Diese Periodenlänge ist genetisch determiniert; so genannte Uhrengene sind in die Generierung des endogenen Rhythmus involviert. Unter natürlichen Umweltbedingungen wird der endogene Rhythmus durch externe Reize aus der Umwelt (Zeitgeber) auf die 24-Stunden-Periodik synchronisiert. Der wichtigste natürliche Zeitgeber ist dabei der Hell-Dunkel-Wechsel. Das endogene Rhythmus-gebende Schrittmacherzentrum, die „innere Uhr“, befindet sich oberhalb der Kreuzung der Sehnerven im paarig angelegten *Nucleus suprachiasmaticus* (SCN) im Hypothalamus. Der SCN erhält Lichtinformationen aus der Netzhaut, in der Licht wahrgenommen und in neuronale Signale umgewandelt wird. Die Axone spezifischer retinaler Ganglienzellen projizieren direkt über eine spezialisierte Untereinheit des *Nervus opticus* - den Retinohypothalamischen Trakt (RHT) - in den *Nucleus suprachiasmaticus*. Die retinalen Ganglienzellen verwenden die Neurotransmitter Glutamat und das Neuropeptid *pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide* (PACAP) zur Übermittlung der Information über Helligkeit und Dunkelheit an den SCN [26]. Die neuronalen Signale des SCN werden an verschiedene benachbarte Kerngebiete des Hypothalamus übertragen. Besonders bedeutungsvoll ist der paraventriculäre Kern des Hypothalamus (PVN), von dem die Informationen aus dem SCN an Grenzstrangganglien weitergeleitet werden, im *Ganglion cervicale superius* von prä- auf postganglionär umgeschaltet werden und schließlich als *Nervus conarii* das Pinealorgan (*Epiphysis cerebri*) erreichen (Abb. 2).

Über efferente Projektion steuert der SCN so eine Vielzahl rhythmischer Körper- und Gehirnfunktionen wie circadiane Hormonsekretions-, Kerntemperatur-, Schlaf-Wach-Rhythmen, die Nahrungsaufnahme sowie auch unbewusstes Verhalten.

Neben der zentralen Uhr im Gehirn existieren auch periphere Oszillatoren in einigen Organen, wie z.B. in Herz, Niere, Leber, Eileiter, Skelettmuskel und hypophysärer *Pars tuberalis* [28]. Auch im Pankreas konnte durch Perfusionsexperimente der Nachweis für eine circadiane Rhythmik der Insulinfreisetzung an isolierten Inseln der Ratte erbracht werden [29]. Molekularbiologische Untersuchungen zur rhythmischen Expression von Uhrengenen im Pankreas der Ratte [30] unterstützen die Hypothese zum Vorkommen peripherer Oszillatoren in der Bauchspeicheldrüse.

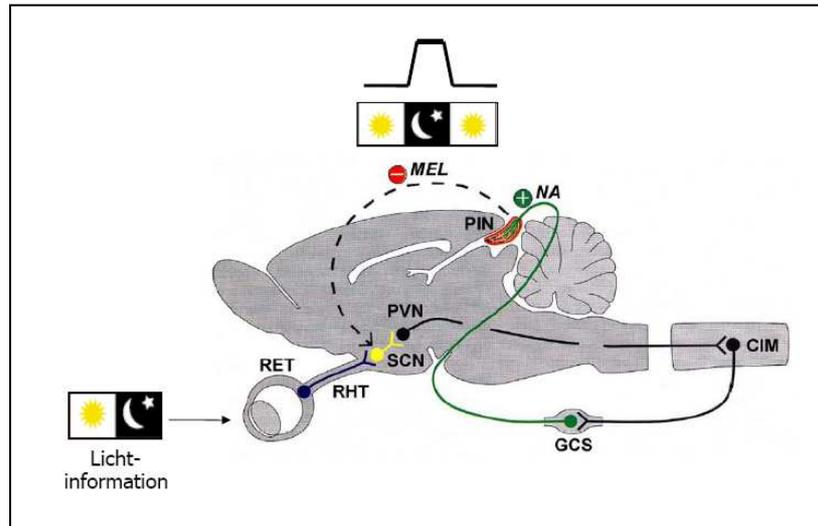


Abb. 2: Schematische Darstellung des photoneuroendokrinen Systems bei Säugetieren im mediosagittalen Schnitt (verändert nach [27]). Die Retina (RET) empfängt Informationen zur aktuellen Photoperiode und leitet diese über den Retinohypothalamischen Trakt (RHT) zum endogenen Oszillator im *Nucleus suprachiasmaticus* weiter. Von dort erfolgt u. a. die efferente Projektion zum *Nucleus paraventricularis* (PVN). Zwischen PVN und *Ganglion cervicale superius* (GCS) verläuft über die *Columna intermedia-lateralis* (CIM) eine bisynaptische Verbindung. Vom GCS ziehen schließlich sympathische postganglionäre Nervenfasern zum Pinealorgan (PIN), das nach Ausschüttung des Neurotransmitters Noradrenalin (NA) Melatonin produziert. Melatonin hemmt die neuronale Aktivität des SCN und bildet somit eine Rückkopplungsschleife aus.

1.3.2 Das Pinealhormon Melatonin

Unter der Kontrolle noradrenerger sympathischer Nervenfasern wird in der Epiphyse das Hormon Melatonin (N-Acetyl-5-methoxytryptamin) freigesetzt. Die vom zentralen Oszillator gesteuerte Freisetzung von Noradrenalin stellt den entscheidenden Reiz zur nächtlichen Aktivierung der Melatoninbiosynthese dar. Dem circadianen Rhythmus der neuronalen Aktivität des SCN folgend, unterliegt die Melatoninsekretion tagesperiodischen Schwankungen mit niedrigen Werten am Tag und sehr hohen in der Nacht bei Dunkelheit. Dieser Rhythmus ist unabhängig vom Aktivitätszustand, da sowohl tag- als auch nachtaktive Tiere ein solches Sekretionsmuster aufweisen.

Melatonin entsteht aus der essentiellen Aminosäure Tryptophan, welche durch aktiven Transport aus dem Blut in die Pinealozyten aufgenommen und durch Hydroxilierung und Decarboxylierung zu Serotonin (5-Hydroxytryptamin) umgewandelt wird. In zwei weiteren Syntheseschritten entsteht aus Serotonin durch N-Acetylierung mittels des Enzyms Arylalkylamin-N-acetyltransferase (AANAT) sowie O-Methylierung durch die Hydroxyindol-O-methyltransferase (HIOMT) das Indolamin Melatonin. Nach Aktivierung β_1 -adrenerger Rezeptoren durch Noradrenalin kommt es nach Aktivierung von G_s -Proteinen und der Adenylatzyklase zu einer deutlichen Erhöhung intrazellulärer cAMP-Konzentrationen, zur Aktivierung der pinealen PKA und folglich zur Phosphorylierung und Aktivierung des Transkriptionsfaktors CREB (*cyclic AMP response element binding protein*). Phospho-CREB bewirkt nach Bildung von Homodimeren und der Bindung an Phospho-CREB-Bindungsstellen im Promotor verschiedener Gene die Aktivierung der Transkription dieser Gene. Neben den Uhrengenen weist auch das *Aanat*-Gen einen Promotor mit Bindungsstellen für phosphoryliertes CREB auf [31]. Durch dessen Bindung kommt es zur Aktivierung der Genexpression des Schlüsselenzyms der Melatoninsynthese, der AANAT. Die

Reizung α_1 -adrenerger Rezeptoren an Pinealozyten führt zur Stimulation der IP₃-Signalkaskade, zu einer weiteren Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration und damit zu einer verstärkten Melatoninbiosynthese. Die transkriptionelle Steuerung wird posttranskriptional durch proteosomale Proteolyse und Protein-Protein-Interaktionen ergänzt [25].

Melatonin ist ein Indolamin, dessen zwei funktionelle Gruppen (eine O-Methyl- und eine N-Acetylgruppe) nicht nur für die spezifische Bindung an Rezeptoren von Bedeutung sind, sondern ebenso für seine amphiphilen Eigenschaften (Abb. 4, [32]). Die Struktureigenschaft ermöglicht dem Hormon, aus der Zirkulation in alle Organe einzutreten und durch subzelluläre Kompartimente zu permeieren [33].

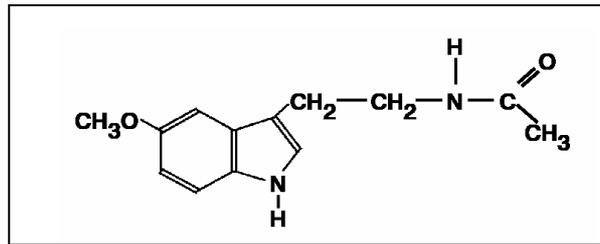


Abb. 4: Strukturformel von Melatonin (N-Acetyl-5-methoxytryptamin).

Die zentrale Funktion von Melatonin liegt vor allem in der Vermittlung der Informationen des äußeren Tages- und Jahresrhythmus an das endokrine System [34]. Außerdem beeinflusst Melatonin sowohl zentral als auch lokal das Reproduktionsverhalten [35], die Insulinsekretion [36] und die Regulation der Nierenfunktion [37]. Therapeutische Ansätze werden in seiner Wirkung als effektiver Radikalfänger [38] und indirektes Antioxidanz durch Stimulierung antioxidativer Enzyme [39], antikanzerogenes Agens [40], als Regulator der Vasoaktivität [41,42] und des spezifischen und unspezifischen Immunsystems [43] gesehen.

1.3.3 Melatonin-medierte Signaltransduktionsmechanismen

Bisher konnten im Säugetierorganismus zwei Melatoninrezeptor-Isoformen identifiziert werden: Der MT₁-Rezeptor (Mel_{1a}, [44]) und der MT₂-Rezeptor (Mel_{1b}, [45]) sind G-Protein-gekoppelte Rezeptoren, deren Aktivierung die Konzentration intrazellulärer *second messenger* beeinflusst. Sie vermitteln vor allem die saisonalen (reproduktiven) und circadianen Effekte des Hormons. Den Hauptanteil der Melatoninrezeptoren stellt der MT₁-Rezeptor dar, während der MT₂-Rezeptor meist nur in geringer Rezeptordichte nachweisbar ist. Über den MT₂-Rezeptor ist bekannt, dass er in der Modulation der Sensitivität von Photorezeptoren in der Retina [38] und des Immunsystems [46] von Bedeutung ist. Auch die synchronisierende Wirkung von Melatonin wird offenbar hauptsächlich über den MT₂-Rezeptor realisiert [47-50], wobei auch widersprüchliche Ergebnisse bekannt sind [51-53]. Zusätzlich nimmt Melatonin über den MT₂-Rezeptor Einfluss auf die synaptische Plastizität und Langzeitpotenzierung im Hippocampus [54,55].

Der Nachweis der Expression beider Melatoninrezeptoren beim Menschen konnte im Zentralnervensystem, in Zellen des Myometriums, der Retina und der Niere, an Adipozyten, an Zellen des kardio-

vaskulären Systems, im Pankreas sowie speziell in den LANGERHANSschen Inseln [56] erbracht werden. An Prostata, Gallenblase, Haut- und Brustgewebe und Zellen des Immunsystems konnte lediglich der MT_1 -Rezeptor, an duodenalen Enterozyten ausschließlich der MT_2 -Rezeptor nachgewiesen werden [57]. Eine dritte Melatonin-Bindungsstelle (MT_3 -Rezeptor, Mel_{1c}) mit geringer Affinität zu Melatonin wurde in niederen Vertebraten, nicht jedoch in Säugetieren, nachgewiesen. Dieses Protein ist dem menschlichen, detoxifizierenden Enzym Chinon-Reduktase 2 zu 95 % homolog [58]. Schließlich wurde in Gehirnstrukturen und peripheren Organen von Säugetieren ein Melatonin-verwandter Rezeptor (*G protein-coupled receptor 50*, GPR50) identifiziert, welcher jedoch unfähig ist, Melatonin zu binden [59,60]. Neueste Untersuchungen konnten belegen, dass der GPR50 in Säugern ortholog zum MT_3 -Rezeptor ist [61].

Wie in Abbildung 5 dargestellt, geschieht die Vermittlung der Rezeptor-medierten Effekte von Melatonin über die Regulierung der Konzentrationen verschiedener *second messenger* wie cAMP, cGMP, DAG, Kalzium-Ionen, IP_3 und Arachidonsäure. In den meisten Fällen hat Melatonin einen inhibitorischen Effekt und wirkt nach vorhergehender Aktivierung der Zelle durch ein stimulierendes Agens. Die am umfangreichsten untersuchte Wirkung des Hormons auf intrazellulärer Ebene ist die Hemmung der Adenylatzyklase über ein Pertussistoxin(PTX)-sensitives G-Protein. Es führt auf diesem Weg durch Hemmung der Adenylatzyklase zu einer Dosis-abhängigen Senkung der cAMP-Konzentration [62]. Andererseits kann Melatonin über verschiedene Mechanismen die PKC aktivieren, damit zur Phosphorylierung und folglich zur Aktivierung der Adenylatzyklase führen [63]. Ein weiterer Effekt auf *second messenger*-Systeme ist die Aktivierung der Phospholipase C und folglich die Spaltung von Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat in IP_3 und Diacylglycerol [64,65]. Diacylglycerol aktiviert wiederum die PKC, und IP_3 mobilisiert Kalzium-Ionen aus intrazellulären Speichern [66,67]. Über die Aktivierung der PKC beeinflusst Melatonin auch die Freisetzung der Arachidonsäure. Das Indolamin erhöht die Arachidonsäure-Konzentration nach Aktivierung der Phospholipase A [67], Hemmung des Arachidonsäure-Metabolismus durch Inhibition der Cyclooxygenase [68] oder der Lipoxygenase [69].

Demgegenüber weisen die Ergebnisse anderer Studien auf eine Senkung der Hormon-induzierten Arachidonsäure-Akkumulation hin [70,71]. Nachfolgende Effekte der Melatoninwirkung auf die Konzentration der *second messenger* können die Modulation von Genen und Transkriptionsfaktoren, wie *CREB*, *c-fos*, *junB* und *per1*, die Beeinflussung von Proliferation und Differenzierung in Zellen durch Einflussnahme auf den MAP(*mitogen-activated protein*)-Kinase-Signalweg sowie die Regulierung von Ionenkanälen sein [63]. Ergebnisse der Untersuchungen von Vanecsek und Klein [72,73] bezüglich des Einflusses auf die Freisetzung von Kalzium-Ionen zeigten, dass Melatonin die Mobilisierung von Kalzium aus intrazellulären Speichern und den Einstrom über spannungsabhängige Kanäle durch Hyperpolarisierung der Membran hemmt. Außerdem kann das Hormon Einfluss auf die Permeabilität spannungsregulierter Kalzium-Kanäle durch Inhibieren der Phosphorylierung dieser Kanäle über eine cAMP-abhängige Kinase nehmen [53]. Untersuchungen zum Einfluss auf Kalium-Kanäle weisen darauf hin, dass Melatonin die Aktivität von Kalzium-abhängigen Kalium-Kanälen (K_{Ca}) sowie einwärts-gleichrichtende Kalium-Kanäle (K_{ir}) beeinflusst [63].

Widersprüchlich sind Ergebnisse zur Untersuchung des Einflusses von Melatonin auf intrazelluläre cGMP-Konzentrationen. Versuche von Lopez-Gonzalez und Mitarb. [74] sowie Faillace und Mitarb. [75]

belegen eine Erhöhung des cGMP-Gehaltes nach Inkubation mit Melatonin. Demgegenüber weisen andere Studien auf eine Dosis-abhängige Verringerung der cGMP-Konzentration nach Applikation physiologischer Melatoninkonzentrationen hin [76-80]. Dieser Effekt ist spezifisch für den MT₂-Rezeptor und tritt neben der Hemmung der cAMP-Signaltransduktionskaskade über diesen Rezeptortyp auf [79]. Untersuchungen zur Wirkung von Melatonin auf weitere Parameter der cGMP-Signalkaskade an verschiedenen Geweben und Zellen geben Hinweise für den Einfluss des Hormons auf den cGMP-Transduktionsweg: Melatonin moduliert die NO-Konzentration [81,82], senkt die Aktivität der NOS [83-85], erhöht die Aktivität der GC [75,86] und inhibiert die Aktivität cGMP-abhängiger Phosphodiesterasen [78,87]. Zusammenfassend deutet die Mehrzahl an Untersuchungen auf einen hemmenden Effekt von Melatonin auf die cGMP-Signalkaskade hin; eindeutige Aussagen konnten jedoch bislang nicht getroffen werden. Zudem wurde gezeigt, dass die Aktivität der GC einen 24-Stunden-Rhythmus aufweist [75,88]. Dies spricht für eine circadian-rhythmische Regulation der Enzymaktivität. Neben den Membranrezeptoren MT₁ und MT₂ werden verschiedene nukleäre Orphan-Rezeptoren wie ROR α , RZR β , ROR γ als putative Kernrezeptoren für Melatonin diskutiert [56,89-91]. Der Einfluss von Melatonin auf nukleäre Rezeptoren ist bisher unklar; wenn auch nachgewiesen werden konnte, dass das Hormon auch auf nukleärer Ebene durch transkriptionelle Regulation von funktioneller Bedeutung sein könnte. Des Weiteren haben Studien gezeigt, dass Melatonin durch Interaktion mit Kalzium-bindenden Proteinen im Zytoplasma zelluläre Effekte vermitteln kann [92].

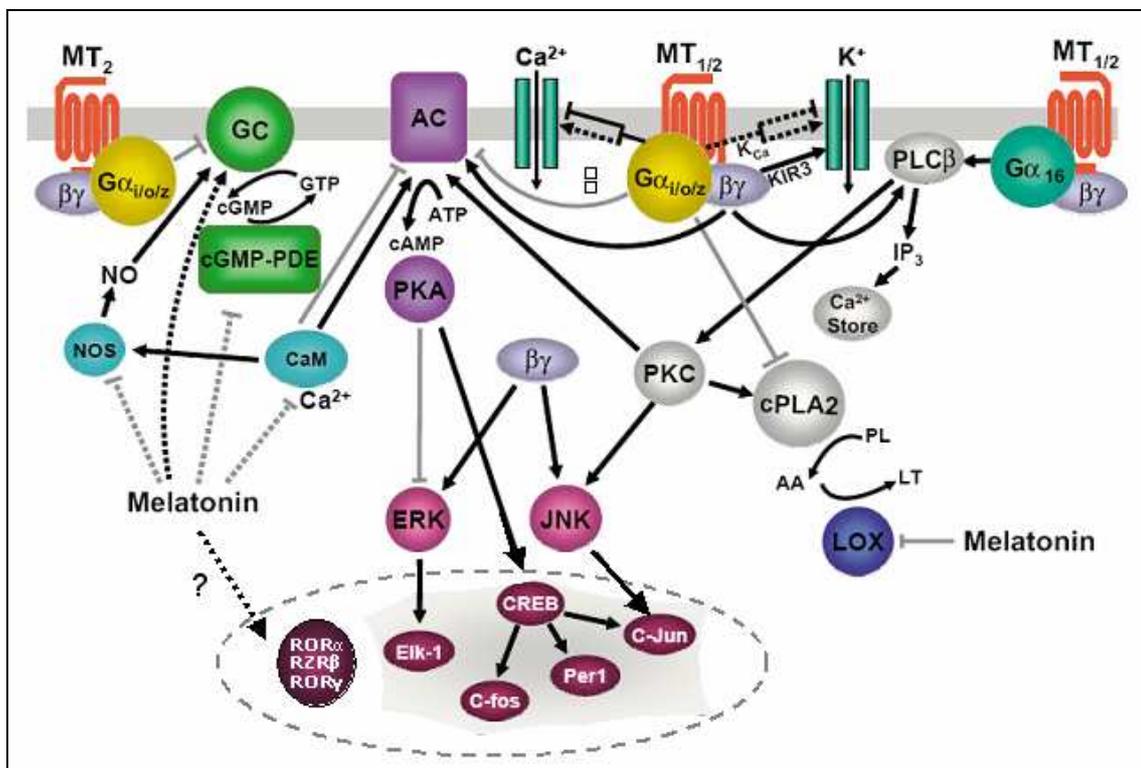


Abb. 5: Darstellung Rezeptor-mediierter Effekte von Melatonin auf intrazelluläre Signaltransduktionsmechanismen. AA, Arachidonsäure; AC, Adenylatzyklase; CaM, Calmodulin; CREB, cAMP-responsive element-binding protein; cGMP, zyklisches Guanosinmonophosphat; cPLA₂, zytosolische Phospholipase A₂; ERK, extrazellulär Signal-regulierte Kinase; GC, Guanylatzyklase; JNK, c-Jun N-terminale Kinase; K_{Ca}, Kalzium-abhängiger K⁺-Kanal; KIR3, einwärts-gleichrichtender K⁺-Kanal; LOX, Lipoxygenase; LT, Leukotriene; NO, Stickstoffmonoxid; PDE, Phosphodiesterase; PKA, Proteinkinase A; PL, Phospholipide; PLC, Phospholipase C; QR₂, Quinonreduktase 2; ROR, Retinoid-Orphan-Rezeptoren; RZR, Retinoid-Z-Rezeptoren (verändert nach [63]).

1.3.4 Zum Einfluss von Melatonin auf die Insulinsekretion pankreatischer β -Zellen

Peri- und Superfusionsuntersuchungen haben zweifelsfrei den Nachweis erbracht, dass Melatonin die Insulinsekretion in den pankreatischen Inseln neonater Ratten sowohl in pharmakologischen als auch in physiologischen Konzentrationen in Abhängigkeit von der Dosis hemmt [93-96]. Tierexperimentelle Untersuchungen an Typ2-diabetischen Goto-Kakizaki-Ratten (GK-Ratten) und klinische Patientendaten zu Melatonin-, Insulin- und Glukose-Tagesprofilen im Plasma sowie die Charakterisierung der Melatoninrezeptoren stoffwechselunauffälliger und Typ2-diabetischer Patienten konnten bei hohen Insulin-Plasmawerten eine Senkung des Melatonins im Zuge der Genese des Diabetes mellitus belegen [56,96]. Im Gegensatz dazu koinzidieren niedrige Insulinspiegel bei Streptozotizin-induziertem Typ1-Diabetes mit erhöhten Melatonin-Plasmakonzentrationen [98]. Des Weiteren weisen pinealektomierte Ratten sowohl eine reduzierte Dichte der LANGERHANSschen Inseln im Pankreas als auch verstärkte degenerative, pathologische Veränderungen des Gewebes, wie Nekrose und/oder Apoptose, Entzündungen, vergrößerte interstitielle Spalträume sowie Abweichungen in Zelldifferenzierung und -wachstum auf [99]. Melatonin ist damit von zunehmend anerkannter Bedeutung für die Regulation und Steuerung der Insulinfreisetzung der pankreatischen β -Zelle und der Diabetogenese.

Funktionelle, autoradiographische und molekularbiologische Untersuchungen sowie Bindungsstudien zeigen, dass die Insulin-senkenden Effekte von Melatonin Rezeptor-mediert sind [100]. Es konnte eindeutig der MT_1 -Rezeptor identifiziert werden; RT-PCR-Nachweise zur Detektion des MT_2 -Rezeptor-Transkripts scheiterten in der Vergangenheit [13,100,101]. Versuche zur Melatoninrezeptor-medierten Signaltransduktion der pankreatischen β -Zelle ergaben, dass die Hemmung der Adenylatzyklase und damit Senkung der cAMP-Konzentration die entscheidende Kaskade für die konsekutive Senkung der Insulinsekretion darstellt [95,101]. Darüber hinaus konnte eine Dosis-abhängige Stimulation der IP_3 -Freisetzung über die Aktivierung der Phospholipase C in Zusammenhang mit erhöhter Kalziumkonzentration nachgewiesen werden, was mit einer Steigerung der Insulinsekretion einhergeht [102]. Die Stimulierung der IP_3 - und die Hemmung der cAMP-Sekretion finden parallel statt und stellen gegensätzliche Signale für die Insulinfreisetzung dar. Die Melatoninwirkung über das cAMP-System und damit die Hemmung der Insulinsekretion überwiegen jedoch [13,103].

Unter Verwendung des sensitiveren, DNA-markierenden Fluoreszenzfarbstoffes *Eva Green* sowie angepasster *Primer* konnte jüngst erstmals die Expression des MT_2 -Rezeptors sowohl in Gesamtpankreata und Inseln von Ratte und Mensch als auch direkt in Glukose-responsiven, Insulin-produzierenden Ratten-Insulinomazellen (INS1) nachgewiesen werden. Restriktionsanalysen zur Bestätigung der Identität der amplifizierten Sequenz wurden durchgeführt [56,104,105]. Immunfluoreszenzmarkierungen an humanen Gesamtpankreata und Inseln unter Verwendung spezifischer Antikörper belegen, dass der MT_2 -Rezeptor als Protein membranständig ist und hauptsächlich in β -Zellen lokalisiert ist.

Die Entdeckung des MT_2 -Rezeptors wirft die Fragen auf, welche physiologische Bedeutung dieser Rezeptortyp für die Vermittlung des Melatoninsignals hat und ob über den MT_2 -Rezeptor die cGMP-Signalkaskade in pankreatischen β -Zellen beeinflusst wird.

2 Zielstellungen

Ziel der Promotionsarbeit zum Thema „Untersuchungen zur Bedeutung des *second messenger* cGMP für Rezeptor-medierte Melatonin-Effekte auf die Insulinsekretion der pankreatischen β -Zelle“ war es, folgende Fragestellungen zu beantworten:

1. Welchen Einfluss hat Melatonin auf die cGMP-Konzentration in der pankreatischen β -Zelle? Wie verläuft die Signaltransduktionskaskade? Wie und über welchen Mechanismus wirken sich Veränderungen der cGMP-Konzentrationen auf die Insulinsekretion aus?
2. Welche an der cGMP-Signalkaskade beteiligten Proteine (Guanylatzyklase, Proteinkinase G, Phosphodiesterase, CNG-Kanal, MRP-Transporter) können in der pankreatischen Insel und der INS1-Zelle nachgewiesen werden? Welche Isoformen kommen vor? Können Unterschiede in der mRNA-Expression in Abhängigkeit von Tageszeit, Glukosestoffwechsel, bei Melatoninrezeptor-*knockout* oder nach Melatoninbehandlung festgestellt werden?
3. Welche Bedeutung hat der MT₂-Rezeptor in der Übermittlung des Melatoninsignals auf die Insulinsekretion und die cGMP-Kaskade in der pankreatischen β -Zelle?

Die im Rahmen dieser Promotion durchgeführten Untersuchungen sollen bisherige Ergebnisse zur Melatonin-medierten Wirkung auf die Insulinsekretion erweitern. Sie sind für die Ergänzung der Kenntnisse zu Signaltransduktionsmechanismen von Melatonin in der pankreatischen β -Zelle bedeutungsvoll.

3 Material

3.1 Zelllinie

Zur Durchführung der Versuche wurde die Insulin-produzierende Ratten-Insulinoma-Zelllinie INS1 genutzt, welche freundlicherweise von Prof. Dr. Wollheim von der Universität Genf zur Verfügung gestellt wurde [106]. Die Zelllinie wurde aus β -Zellen eines durch Röntgenstrahlen induzierten Ratteninsulinoms entwickelt. Sie wächst adhärenz als *Monolayer*-Kultur; ihre Verdopplungszeit beträgt 100 h. Unter Zusatz von β -Mercapthoethanol zur Erhaltung des Differenzierungsgrades, bleiben die strukturellen und funktionellen Eigenschaften der INS1-Zellen etwa bis zur 80. Passage unverändert.

3.2 Rattenmodelle

Für molekularbiologische Untersuchungen wurden Leber, Gehirn, Epiphyse und Pankreas von erwachsenen, metabolisch unauffälligen, männlichen Wistar(WR)-Ratten (Auszucht Han:Wist; Tierzucht Schönwalde GmbH, Schönwalde) und Typ2-diabetischen Goto-Kakizaki(GK)-Ratten (Inzucht; Taconic M & B, Ry, Dänemark) gewonnen. Die Tiere waren einem Lichtregime von L:D = 12:12; Licht an: 6.30 Uhr, ausgesetzt; Futter und Wasser standen *ad libitum* zur Verfügung. Die Organentnahme erfolgte nach Dekapitation oder Herzventrikelpunktion. Die Organproben wurden in RNA*later* aufbewahrt und bis zur Aufarbeitung bei -20 °C gelagert.

Zur Testung enteraler Melatoninapplikation an männlichen WR- und GK-Ratten wurde Melatonin für 64 bis 68 Nächte ins Trinkwasser gegeben. Es kam dabei zur mittleren Melatoninaufnahme von 2,505 mg/kg KG bei GK-Tieren und 2,857 mg/kg KG bei WR-Ratten. Die Organentnahme erfolgte nach Ventrikelpunktion zur Blutgewinnung um 24 Uhr (Durchführung der Versuche siehe Danksagung).

3.3 Mausmodelle

Für Untersuchungen mit Melatoninrezeptor-*knockout*-Tieren standen die Linien mit MT_1 -Rezeptor-*knockout* ($MT_1^{-/-}$, [60]), MT_2 -Rezeptor-*knockout* ($MT_2^{-/-}$, [57]) und $MT_{1/2}$ -Rezeptor-Doppel-*knockout* ($MT_{1/2}^{-/-}$, [57]) sowie dem Wildtyp (WT) ohne Melatoninrezeptor-*knockout* zur Verfügung. Es handelt sich um eine Rückkreuzung der Linie 129/sv \times C57BL/6, bei denen der Melatonin-profiziente Stamm C3H/He den genetischen Hintergrund bildet. Die Tiere wurden freundlicherweise von Prof. Dr. Stehle von der Universität Frankfurt am Main zur Verfügung gestellt und stammen aus einem eigenen Auszuchtstamm. Sie erhielten Futter und Wasser *ad libitum* und waren einem Lichtregime von L:D = 12:12 ausgesetzt.

Für Untersuchungen zu Veränderungen in Abhängigkeit von der Tageszeit wurden die Organe von Ratten und Mäusen zum einen um Mitternacht unter Rotlicht gewonnen; diese werden im Folgenden als „Nachttiere“ bezeichnet. Die Organgewinnung von „Tagtieren“ fand am Mittag, etwa um 12 Uhr, unter standardisierten Lichtbedingungen statt.

3.4 Humane Zellen und Gewebeproben

Das für diese Untersuchungen verwendete humane Pankreasgewebe stammte von in der Universitätsklinik für Allgemein-, Viszeral- und Gefäßchirurgie Halle-Wittenberg operierten Patienten. Es handelt sich um Operationsmaterial der histologischen Befunderhebung durch das Institut für Pathologie an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg. Die Gewebestücke wurden nach der Resektion durch den Chirurgen umgehend konserviert und asserviert. Eine Genehmigung der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg lag vor. Angaben zu Geschlecht, Alter, Diagnose, Glukosestoffwechselsituation und Morphologie des Gewebes waren anhand der Patientenakten ersichtlich. 12 der Gewebeproben stammten von Patienten weiblichen und 16 von Patienten männlichen Geschlechts; das mittlere Alter der Patienten betrug 58 Jahre. Alle Daten wurden anonymisiert behandelt.

Zur Standardisierung der Patientenproben bei molekularbiologischen Arbeiten diente isolierte, DNase-behandelte RNA, extrahiert aus humanem Pankreasgesamtgewebe, verfügbar von der Firma Ambion (Austin, Texas, USA). Für Nachweise direkt an LANGERHANSschen Inseln des Menschen wurde isolierte Gesamt-RNA aus Inselzellen eines menschlichen Pankreas für die Untersuchungen herangezogen. Diese wurde durch die Firma System Biosciences (Mountain View, Kalifornien, USA) nach Isolierung mittels Guanidin-Thiocyanat-Methode und DNase-Behandlung bereitgestellt. Als positive Vergleichsprobe zu Pankreasgesamtgewebe und LANGERHANSschen Inseln stand RNA einer humanen Neuroblastomzelllinie zur Verfügung. Es handelt sich hierbei um SH-SY5Y-Zellen, welche ursprünglich aus der Zelllinie SK-N-SH subkloniert wurden [107].

3.5 Chemikalien und Reagenzien

Agarose	peqLab Biotechnologie, Erlangen
8-Br-cGMP (8-Bromo-cGMP)	Biolog, Life Science Institute, Bremen
Bromphenolblau	Sigma Aldrich Chemie, Taufkirchen
BSA (<i>bovine serum albumin</i>)	Serva, Heidelberg
Chloroform	Sigma Aldrich Chemie, Taufkirchen
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Sigma Aldrich Chemie, Taufkirchen
DPBS (<i>Dulbecco's phosphate buffered saline</i>)	Lonza, Köln
Ethanol 99,5 %	Carl Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Sigma Aldrich Chemie, Taufkirchen
FKS (fetales Kälberserum)	Biochrom, Berlin
Fluoreszenzfarbstoff <i>Eva Green</i>	Biotum, Hayward, USA
Formaldehyd	Carl Roth, Karlsruhe
Formamid	Promega, Mannheim
Forskolin	Sigma Aldrich Chemie, Taufkirchen
Glukose	Merck, Darmstadt
Glyzerin	Sigma Aldrich Chemie, Taufkirchen
Hanks-Puffer	Sigma Aldrich Chemie, Taufkirchen

HEPES(2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure)-Puffer	Biochrom, Berlin
IBMX (3-Isobutyl-1-methylxanthin)	Sigma Aldrich Chemie, Taufkirchen
Kollagenase (NB 8)	Serva, Heidelberg
LCD (L- <i>cis</i> -Diltiazem)	Biomol, Hamburg
L-Glutamin	Biochrom, Berlin
L-NMMA (N ^G -monomethyl-L-arginin)	Tocris Bioscience, Ellisville, Michigan, USA
Luzindol	Sigma Aldrich Chemie, Taufkirchen
Medium 199	Sigma Aldrich Chemie, Taufkirchen
Melatonin	Sigma Aldrich Chemie, Taufkirchen
β-Mercaptoethanol	Sigma Aldrich Chemie, Taufkirchen
Molekulargewichts-Standard (<i>GeneRuler</i>)	Fermentas, St.-Leon-Rot
Natriumacetat	Sigma Aldrich Chemie, Taufkirchen
Natriumhydroxid	Sigma Aldrich Chemie, Taufkirchen
Natriumpyruvat	Biochrom, Berlin
Neubauer-Hämozytometer	Labor-Brand, Gießen
NS2028 (4H-8-bromo-1,2,4-oxadiazolo-(3,4d)-benz-(b)(1,4)-oxazin-1-on)	Alexis Biochemicals, Axxora, Lörrach
ODQ (1H-(1,2,4)-oxadiazolo-(4,3-α)-quinoxalin-1-on)	Cayman Chemical, Ann Arbor, Michigan, USA
Penizillin	Biochrom, Berlin
PCR-Mastermix	Promega, Mannheim
<i>Primer</i>	TipMolBiol, Berlin
4P-PDOT (4-Phenyl-2-propionamidotetralin)	Tocris Bioscience, Ellisville, MI, USA
Restriktionsenzyme (BsrI, PvuII)	Promega, Mannheim
Restriktionsenzyme (ApaI, AvaI, AvaII, BfiI, Eco57I, Eco31I, EcoRII, LweI)	Fermentas, St.-Leon-Rot
RNA/ <i>later</i>	Ambion, Austin, Texas, USA
RNase-freies Wasser	Promega, Mannheim
Rp-8-pCPT-cGMPS (Rp-8-(4-Chlorophenylthio)-guanosin-3',5'-cyclic monophosphorothioat)	Biolog Life Science Institute, Bremen
RPMI-Medium	Biochrom, Berlin
RT- Master-Mix	Promega, Mannheim
Schwefelsäure	Sigma Aldrich Chemie, Taufkirchen
SNAP (S-Nitroso-N-acetyl-DL-penicillamin)	Cayman Chemical, Ann Arbor, Michigan, USA
Streptomycin	Biochrom, Berlin
Tris	Sigma Aldrich Chemie, Taufkirchen
Trizol-Reagenz	Invitrogene, Karlsruhe
Trypsin	Biochrom, Berlin

3.6 Zubehör und Geräte

Abzug (2-412-NL)	Köttermann, Uetze/Hänigsen
Analysenwaage (Analytical Plus)	Ohaus, Pine Brook, New Jersey, USA
Elektrophoresekammern (Agagel Mini/Maxi)	Biometra, Göttingen
<i>ELISA</i> -Plattenreader (Spectra II)	SLT Labinstruments, Crailsheim
γ -Strahlendetektor (<i>γ-Counter</i>)	DPC Biermann, Bad Nauheim
Brutschrank (HERAcell 150)	Heraeus Instruments, Hanau
Lichtmikroskop (Olympus CK 2)	Olypus Optical CO, Tokio, Japan
Magnetrührer (Variomag Monotherm)	H+P Labortechnik, Oberschleißheim
pH-Meter (765 Calimatic)	Knick, Berlin
Reinstwassersystem (EASYpureRF)	Barnstead, Iowa, USA
Schüttler (KS 15A)	Edmund Bühler, Hechingen
Spannungsgerät (Standard Power Pack P25)	Biometra, Göttingen
Spektrophotometer (SPECORD S100)	Analytik Jena, Jena
Stereomikroskop Stemi SV6	Zeiss, Oberkochen
<i>Thermocycler</i> (Rotor-Gene 6000)	Corbett-Research, Mortlake, Australien
Thermomixer (comfort 5355)	Eppendorf-Netheler-Hinz, Hamburg
Ultra-Turrax (T25 basic)	IKA Werke, Staufen
UV-Fotodokumentationseinrichtung (CN 2000W)	LTF Labortechnik, Wasserburg
Vortexer (IKA-VIBRO-FIX VF 2)	IKA Labortechnik, Staufen
Wasserbad	GFL Labortechnik, Burgwedel
Zellkulturflaschen	Dr. Schubert, Laborfachhandel, Halle
Zellkulturplatten	Dr. Schubert, Laborfachhandel, Halle
Zellkultur-Sterilbank (HERAsafe HS12)	Heraeus Instruments, Hanau
Zentrifuge (Biofuge 15)	Heraeus Instruments, Hanau

Die Stammlösungen von L-*cis*-Diltiazem (50 mM), Rp-8-pCPT-cGMPS (50 mM) und 8-Br-cGMP (50 mM) wurden mit destilliertem Wasser hergestellt. Melatonin wurde in absolutem Ethanol angelöst, mit destilliertem Wasser auf eine Konzentration von 5 mM verdünnt und lichtgeschützt aufbewahrt. Die Lösung von Luzindol (5 mM), 4P-PDOT (5 mM), NS2028 (50 mM), ODQ (5 mM) und IBMX (100 mM) erfolgte in DMSO. Um die gewünschten Endkonzentrationen zu erreichen, wurden die Stammlösungen mit destilliertem Wasser verdünnt und bis zum Zeitpunkt des Versuchs lichtgeschützt bei -20 °C gelagert. Die Stammlösungen von SNAP (50 mM) und L-NMMA (50 mM) wurden am Versuchstag durch Lösung in destilliertem Wasser frisch hergestellt. Unbehandelte Kontrollproben wurden bei allen Versuchen mit der gleichen Menge des jeweiligen Lösungsmittels behandelt.

3.7 Verwendete Kits

cGMP- <i>ELISA</i> -Kit (Biotrak RPN 225)	GE Healthcare Life Science, München
DNase-Kit (DNA- <i>free</i>)	Ambion, Austin, Texas, USA
<i>Griess Reagent System</i>	Promega, Mannheim
Insulin- <i>RIA</i> -Kit (<i>Coat-A-Count</i>)	DPC Biermann, Bad Nauheim
Reverse-Transkriptase-Kit	Promega, Mannheim

3.8 Verwendete Analysensoftware

Bio1D	Vilber Lourmat, Frankreich
Easy WIN fitting	Tecan Deutschland, Crailsheim
Rotorgene V. 6.0	Corbett Research, Mortlake, Australien
Statistiksoftware GraphPad Prism 4.0	GraphPad Software, Kalifornien, USA

3.9 Puffer und Lösungen

MOPS-Puffer:	0,2 M MOPS 3 M Natriumacetat 0,5 mM EDTA 40 M NaOH pH 7,0
TAE-Puffer:	50 mM Tris 50 mM Natriumacetat 2 mM EDTA pH 8,0
<i>Blue juice</i> :	87 % Glycerin 0,05 % Bromphenolblau 0,25 M EDTA

4 Methoden

4.1 Zellkultur

INS1-Ratten-Insulinoma-Zellen wurden im Brutschrank bei 37 °C, 95 % Luftfeuchtigkeit und 5 % CO₂ in 25 cm² großen Zellkulturflaschen mit je 7 ml Medium kultiviert. Als Zellmedium wurde RPMI 1640 unter Zusatz von 10 % fetalem Kälberserum, 1 mM HEPES-Puffer, 2 mM L-Glutamin, 1 mM Natriumpyruvat, 50 µM β-Mercaptoethanol, 1 % Penizillin/Streptomycin eingesetzt; alle drei Tage wurde Mediumwechsel durchgeführt. Nach sieben Tage wurden die Zellen passagiert. Dazu wurde das Medium abgesaugt, mit je 10 ml DPBS gewaschen und für 3 min 1 ml 37 °C warmes Trypsin zugegeben. Nach Ablösen adhärenter Zellen wurde die Trypsinreaktion durch Zugabe von 7 ml Medium abgestoppt. Die Zellsuspension wurde in zwei Polyethylen-Röhrchen aufgeteilt und 10 min bei 1500 x g zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand verworfen, das Zellpellet in je 7 ml Medium resuspendiert und erneut in 25 cm² großen Zellkulturflaschen bzw. für Stimulationsversuche in 24- oder 96-*well*-Zellkulturplatten ausplattiert. Die Bestimmung der Zellanzahl erfolgte mikroskopisch unter Verwendung einer

Neubauer-Zählkammer. Für Inkubationsversuche und Nachweise im Rahmen dieser Arbeit wurden INS1-Zellen in der 5. bis 30. Passage verwendet.

4.2 Gewinnung von LANGERHANSschen Inseln aus Pankreata von Ratte und Maus

Pankreatische Inseln wurden aus neonaten, 8 bis 12 Tage alten WR- und GK-Ratten bzw. Melatoninrezeptor-*knockout*-Mäusen gewonnen. Nach Dekapitation und Entnahme des Pankreas wurde das Organ in eiskalten Hanks-Puffer überführt und in drei bis fünf Stücke zerteilt. Anschließend wurde das Gewebe durch Inkubation und Schütteln in einer Kollagenase-Lösung (1 mg/ml) verdaut. Die Zugabe von gekühltem Hanks-Puffer mit BSA-Zusatz (2 mg/ml) nach 4 bis 5 min führte zum Abstoppen der Reaktion. Nach dem Sedimentieren für 10 min wurde dreifach mit kalter BSA/Hanks-Lösung gewaschen. Mittels Stereomikroskop und einer Kaltlichtquelle wurden die einzelnen Inseln mit einer silikonisierten Pasteurpipette abgesaugt und in eine Petrischale überführt. Es folgte eine mehrmalige Übertragung in Petrischalen mit BSA/Hanks-Lösung, um die Kollagenase und exokrine Anteile vollständig zu entfernen. Die Ratteninseln wurden in Eppendorf-Gefäße mit je 1,5 ml BSA/Hanks-Lösung aufgenommen und für 10 min bei 150 x g zentrifugiert. Nach Entfernung des Überstandes wurde je 1 ml DBPS zugegeben und die RNA aus den Inseln direkt im Anschluss gewonnen oder bis zur Aufarbeitung bei -80 °C gelagert (siehe Abschnitt 4.6.2).

Die Gewinnung von pankreatischen Inseln aus neonaten Mäusen erfolgte entsprechend der Vorschrift zur Inselseparation aus Rattenpankreatata. Im Anschluss an die Separation wurden die Inseln in einer 12-*well*-Zellkultur-Platte (je 80 bis 100 Inseln pro *well*) in Medium 199 kultiviert. Nach 20 h wurden die Inseln in ein Reaktionsgefäß aufgenommen und bei 500 x g 10 min zentrifugiert. Nach Abnahme des Überstandes wurde mit je 1 ml DPBS gewaschen und erneut zentrifugiert.

4.3 Inkubationsversuche für Insulin-Bestimmungen

Für Versuche zur Messung von Einflüssen auf die Insulinsekretion wurden INS1-Zellen in 24-*well*-Zellkulturplatten (5×10^5 Zellen pro *well*) ausgesät. Nach 4 Tagen wurden die konfluenten Zellen vor der Zugabe der Testsubstanzen mit frischem Medium gewaschen.

Für Untersuchungen zur Bedeutung des MT₂-Rezeptors für die Melatonin-medierte Senkung der Insulinsekretion wurden INS1-Zellen für 6 h mit Forskolin (5 µM) mit oder ohne Zugabe von Melatonin (100 nM) bei einem Glukosegehalt von 11,6 mM im Medium inkubiert. Der Einfluss von Rezeptorantagonisten wurde durch 30-minütige Vorinkubation mit Luzindol (10 µM) oder 4P-PDOT (100 nM) untersucht. Am Ende der Stimulationszeit wurde der Überstand abgenommen und bis zur Messung des Insulingehaltes bei -80 °C gelagert.

Zur Bestimmung der Wirkung von cGMP auf die Insulinsekretion wurden die INS1-Zellen für 1, 4 oder 8 h mit verschiedenen Konzentrationen des membrangängigen cGMP-Analogons 8-Br-cGMP (10 µM bis 2 mM) inkubiert. Die Glukosekonzentration betrug 5,6 mM entsprechend des Glukosegehaltes im Stammmedium oder wurde durch Zugabe von Glukose auf 8,6 bzw. 11,6 mM erhöht. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde der Überstand eingefroren und bis zur Insulinbestimmung bei -80 °C gelagert.

Die quantitative Bestimmung der Insulinkonzentration in den Zellüberständen erfolgte mittels Festphasen-*Radioimmunoassay* (RIA) unter Verwendung eines kommerziellen Testkits. Dazu wurden je

50 µl der Proben mit 150 µl Medium verdünnt in Teströhrchen gegeben, die mit spezifischen Insulin-Antikörpern beschichtet waren. Nach Zugabe von je 1 ml ^{125}I -markierten Insulins ($< 1,11 \text{ kBq/ml}$) wurden die Proben 18 bis 24 h inkubiert, wobei das radioaktiv markierte Insulin mit dem Insulin in der Probe um die Antikörper-Bindungsstellen auf der Innenwand des Teströhrchens konkurrierte. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde der Überstand abgegossen und die Zerfallszahl der in den Röhrchen gebundenen radioaktiven Komponente in einem γ -Counter gemessen. Dabei waren die ermittelten *Counts* indirekt proportional zur Insulinkonzentration in den Proben. Bei jeder Messreihe wurde eine Reihe von unter gleichen Bedingungen behandelten Standards mitgeführt, so dass eine Eichkurve erstellt und die Insulinkonzentration in den Proben bestimmt werden konnte. Die Messung erfolgte jeweils in Doppelbestimmung. Der Messbereich des Insulin-RIAs liegt zwischen 36 pM und 5,3 nM; die analytische Sensitivität beträgt 8,7 pM. Das verwendete Antiserum ist hochspezifisch für Insulin und weist besonders niedrige Kreuzreaktivitäten zu anderen Substanzen, wie dem C-Peptid (*connecting peptide*) oder Glukagon, auf. Die realen Werte der Insulinbestimmungen lagen in einem Bereich zwischen 360 pM und 4 nM pro *well*.

4.4 Bestimmungen von cGMP-Konzentrationen

Für cGMP-Bestimmungen wurden INS1-Zellen (3×10^5 Zellen pro *well*) in 96-*well*-Zellkulturplatten mit je 100 µl Zellsuspension und 100 µl Medium pro *well* ausgesät und über Nacht im Brutschrank inkubiert, um das Absetzen und Anheften am Boden zu ermöglichen. Zur Verhinderung des cGMP-Abbaus durch Phosphodiesterasen wurde vor einer Inkubation und während der Stimulationsversuche der unspezifische PDE-Hemmer IBMX zugesetzt. Für die Untersuchung des Einflusses von Melatonin auf die cGMP-Konzentration wurden die Zellen mit Melatonin in einer Konzentration von 10 nM, 100 nM oder 1 µM für 15, 30 oder 1 min inkubiert. Die Melatoninrezeptor-Antagonisten 4P-PDOT (100 nM) und Luzindol (1 µM), die Inhibitoren der sGC, ODQ (10 µM) und NS2028 (10 µM), bzw. der NOS-Inhibitor L-NMMA (0,1 mM, 1 mM) wurden jeweils 30 min vorinkubiert. Bei Versuchen mit dem NO-Donator SNAP (100 µM) wurde die Substanz mit Melatonin ko-inkubiert.

Die quantitative Messung der cGMP-Konzentrationen erfolgte direkt nach der Stimulation unter Nutzung eines cGMP-spezifischen *ELISA*-Kits. Das Prinzip beruht auf der konkurrierenden Bindung von cGMP in den Proben und einer definierten Menge Enzym-gekoppeltem cGMP an cGMP-spezifische Antikörper. Nach Zugabe einer Enzym-Substrat-Lösung kommt es zu einer Farbreaktion. Diese kann photometrisch qualitativ gemessen werden; die Farbintensität ist indirekt proportional zum cGMP-Gehalt in den Proben. Es wurde die Methode zur Bestimmung des gesamten cGMP-Gehaltes (intrazellulär und im Überstand) verwendet.

Nach Ende der Stimulationszeit wurden die Zellen durch Zugabe von je 20 µl Lysisreagenz (5 % Dodecyl-Trimethyl-Ammoniumbromid) in jedes *well* der Zellkulturplatte und Schütteln für 10 min lysiert. Anschließend erfolgte die Inkubation mit je 20 µl Acetylierungsreagenz für 5 min zur Stabilisierung des cGMP. In einer mit Antikörpern beschichteten 96-*well-ELISA*-Platte wurden je 100 µl Antiserum und 50 µl der Proben nach kurzem Mischen für genau 2 h auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von je 100 µl Konjugat und erneuter Inkubation für 1 h wurde 4-mal mit Waschpuffer gewaschen, je 200 µl des Enzymsubstrates zugegeben und für 30 min bei Raumtemperatur geschüttelt. Durch Zu-

gabe von je 100 μl 1 M Schwefelsäure kam es zum Farbumschlag von blau nach gelb und die Farbintensität konnte bei 450 nm in einem *ELISA-Reader* photometrisch gemessen werden. Das Mitführen einer Standardreihe ermöglichte das Erstellen einer Eichkurve und die Bestimmung der cGMP-Konzentration in den Proben. Die Messung erfolgte jeweils in Doppelbestimmung. Der Messbereich des cGMP-*ELISAs* liegt zwischen 2 und 512 fmol pro *well*; die analytische Sensitivität beträgt 2 fmol pro *well* (14 pg/ml). Der Nachweis von cGMP ist hochspezifisch; die Kreuzreaktivität zu cAMP, AMP, ADP, ATP, GMP, GDP und GTP liegt unter 0,0005 %. Die realen Werte der cGMP-Messungen dieser Versuche lagen im Bereich zwischen 20 fmol pro *well* und 100 fmol pro *well*.

4.5 Quantitative NO-Bestimmungen

INS1-Zellen (3×10^5 Zellen pro *well*) wurden in 96-*well*-Zellkulturplatten mit je 100 μl Zellsuspension und 100 μl Medium pro *well* ausgesät und über Nacht im Brutschrank inkubiert. Am Folgetag wurden die Zellen für 1, 4 oder 8 h mit Melatonin (1 nM bis 10 μM) inkubiert. Bei Einsatz von Melatoninrezeptor-Antagonisten 4P-PDOT (100 nM) und Luzindol (1 μM) oder dem NOS-Inhibitor L-NMMA (10 μM) wurden die Zellen mit diesen Substanzen für 30 min vorinkubiert.

Die Messung der NO-Gehalte in den Zellkulturüberständen wurde direkt nach Ablauf der Inkubationszeit mittels GRIESS-Reaktion (*GRIESS Reagent System*) durchgeführt. Das gebildete NO diffundiert leicht aus den Zellen heraus. Es ist sehr instabil und kurzlebig und wird durch Oxidation in seine Folgeprodukte Nitrit und Nitrat umgesetzt. Das stabile Nitrit kann in der GRIESS-Reaktion quantitativ nachgewiesen werden. Das Prinzip beruht auf der Reaktion von Nitrit mit Sulfanilamid, einem primären aromatischen Amin, zu einem Diazonium-Ion, welches in einer Kopplungsreaktion mit einer weiteren aromatischen Komponente (Naphthylethylendiamin, NED) zu einem rot-violetten Azofarbstoff umgesetzt wird, dessen Extinktion photometrisch gemessen werden kann (Abb. 6).

Zur Quantifizierung wurden die GRIESS-Reagenzien I (Sulfanilamid) und II (Naphthylethylendiamin) zu gleichen Teilen gemischt. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden je 50 μl des Zellkulturüberstandes

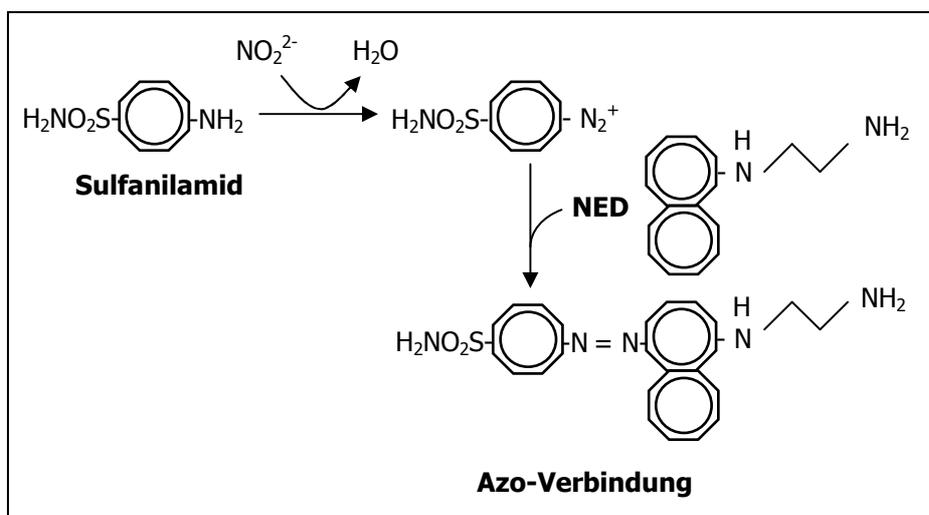


Abb. 6: Schematische Darstellung der GRIESS-Reaktion. NED, Naphthylethylendiamin.

und 100 µl des GRIESS-Reagenzes in eine 96-*well*-Kulturplatte gegeben und 10 min lichtgeschützt bei Raumtemperatur inkubiert. Die Messung der Extinktion erfolgte mit einem *ELISA*-Plattenreader bei einer Wellenlänge von 492 nm. Das Mitführen einer Standardreihe, erstellt durch serielle Verdünnung einer NO-haltigen Lösung bekannter Konzentrationen mit Kulturmedium, ermöglichte die Bestimmung der NO-Konzentration in den Zellüberständen. Der Messbereich dieser GRIESS-Reagenz-Methode liegt zwischen 0 und 100 µM; die tatsächlich ermittelten Werte der Messung lagen im Bereich von 0 bis 30 µM Nitrit. Die Messmethode konnte durch den Anstieg von Nitrit nach Gabe des NO-Donors SNAP in den Konzentration 10 µM bis 100 µM verifiziert werden (siehe Abschnitt 5.4).

4.6 Molekularbiologische Untersuchungen

4.6.1 Zellstimulation für Expressionsuntersuchungen

Für Versuche zur Bestimmung von Unterschieden in der Genexpression wurden INS1-Zellen in 24-*well*-Zellkulturplatten (5×10^5 Zellen pro *well*) ausgesät. Nach 4 Tagen wurde den konfluenten Zellen frisches Medium, versetzt mit verschiedenen Konzentrationen Melatonin (1 pM bis 10 µM), zugegeben. Nach Ablauf der Inkubationszeit von 12 oder 24 h konnten die Zellen mit je 300 µl Trypsinlösung pro *well* vom Boden der Zellkulturplatten gelöst werden. Die Reaktion wurde durch Zugabe von je 1 ml frischem Medium abgestoppt, die Zellen in Eppendorf-Gefäße überführt und bei 2000 x g für 10 min zentrifugiert. Nach dem Waschen des Überstandes mit je 1 ml DPBS folgte ein zweiter Zentrifugationsschritt. Der Überstand wurde schließlich abgenommen und bei -80 °C bis zur RNA-Extraktion gelagert.

4.6.2 RNA-Extraktion und RNA-Gelelektrophorese

Die Isolierung der Gesamt-DNA aus INS1-Zellen, frisch separierten Inseln bzw. in RNA-*later* aufbewahrten Organproben erfolgte durch Zugabe von 1 ml Trizol-Reagenz pro 100 mg des Gewebes bzw. 1×10^6 Zellen und Homogenisieren mittels Pipette oder Ultra-Turrax. Nach 5-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurden den Proben 0,2 ml Chloroform pro 1 ml Trizol zugegeben, um die Abtrennung der übrigen Gewebsbestandteile von der RNA zu ermöglichen. Anschließend wurden die Proben bei 10 000 x g und 2 bis 8 °C für 15 min zentrifugiert, um eine Phasentrennung zu erreichen, wobei sich Proteine und DNA in einer Zwischenphase anreicherten und die obere, wässrige Phase die RNA enthielt. Unter Zugabe von 0,5 ml Isopropanol pro 1 ml Trizol auf die zuvor abgenommene wässrige Phase konnte die RNA präzipitiert werden. Nach wiederholter Inkubation bei Raumtemperatur für 10 min und Zentrifugation bei 10 000 x g und 4 bis 8 °C für 15 min wurde der Überstand dekantiert und das RNA-Pellet mit 1 ml 70%igem Alkohol pro 1 ml Trizol gewaschen. Die Proben wurden erneut zentrifugiert, dekantiert und bei Raumluft getrocknet. Die RNA-Pellets wurden anschließend über Nacht in RNase-freiem Wasser gelöst.

Die Absorption der Proben wurde photometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt. Daraus ließ sich die Konzentration der enthaltenen Gesamt-RNA nach folgender Formel berechnen:

$$\mu\text{g RNA/ml} = \text{Absorption } 260 \times 40 \times \text{Verdünnungsfaktor}$$

Zusätzlich wurde zur Kontrolle der Reinheit der RNA die Absorption bei einer Wellenlänge von 280 nm gemessen und der Quotient der Werte bei 260 nm und 280 nm gebildet. Ein Ergebnis $< 1,5$ ist ein Indiz für eine eventuelle Verunreinigung durch Proteine. Die Quotienten der hier untersuchten Proben lagen zwischen 1,9 und 2,1, so dass nicht von einer Verunreinigung auszugehen war. Die Lagerung der RNA erfolgte bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Zur Kontrolle der Qualität der RNA erfolgte die gelelektrophoretische Auftrennung der Proben. Dazu wurden 0,6 g Agarose mit 33 ml destilliertem Wasser versetzt und auf dem Magnetprüher unter Hitze gelöst. Nach dem Abkühlen und Zugabe von 4,6 ml MOPS-Puffer sowie 1,3 ml Formaldehyd zur Hemmung der Ausbildung von Sekundärstrukturen konnte das Gel blasenfrei in einen Gelträger gegossen werden. Als Laufpuffer wurde nach dem Erstarren 300 ml 1:10-verdünnter MOPS-Puffer in die Kammer gegeben. Die Probenvorbereitung vor dem Pipettieren in die Geltaschen erfolgte durch Zugabe von je 2,5 μl MOPS-Puffer, 12 μl Formamid und 4 μl Formaldehyd zu je 6 μl der Proben, Denaturierung bei $55\text{ }^{\circ}\text{C}$ für 15 min, Abkühlen auf Eis sowie Zugabe von je 4 μl *Blue juice*. Bei einer Spannung von 40 V wanderten die Proben etwa 90 min. Das Gel wurde 10 min in einer Ethidiumbromid-Lösung gefärbt und anschließend in Wasser entfärbt; nach etwa 24 h war die Detektion mittels einer UV-Fotoeinrichtung möglich.

4.6.3 Synthese der cDNA

Vor der Synthese der komplementären Einzelstrang-DNA zur vorliegenden mRNA durch eine Reverse-Transkriptase(RT)-Reaktion führte ein DNase-Verdau mittels DNase-Kit zur vollständigen Elimination verbleibender DNA in den Proben.

Für das Umschreiben der mRNA in cDNA wurde ein RT-Kit unter Nutzung von *random primers* verwendet, wodurch die Transkription der gesamten RNA gewährleistet war. Dazu wurde je 1 μg der Proben-RNA mit RNase-freiem Wasser auf ein Volumen von 9,5 μl aufgefüllt und nach 10-minütiger Inkubation bei $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ zur thermischen Denaturierung und Abkühlen auf Eis mit je 11,5 μl RT-Mastermix (Tab. 1) versetzt. Zum Ablauf der reversen Transkription wurde der Reaktionsansatz bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ für 60 min inkubiert. Die Reaktion wurde durch Erhitzen für 5 min auf $99\text{ }^{\circ}\text{C}$ und Abkühlen auf Eis abgestoppt. Anschließend wurden die Proben mit je 80 μl Nuklease-freiem Wasser auf ein Volumen von 100 μl aufgefüllt und bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ aufbewahrt.

Tab. 1: Zusammensetzung des Mastermix für die RT-Reaktion.

Reagenz	Menge
MgCl ₂ , 25 mM	4 μl
Reverse Transkriptase, 10x Puffer	2 μl
dNTP Mix, 10 mM	2 μl
Recombinant RNasin Ribonuklease-Inhibitor	0,5 μl
<i>Random Primer</i>	1 μl
Reverse Transkriptase	0,5 μl
RNAse-freies Wasser	0,5 μl

4.6.4 Real-time RT-PCR

Für die quantitative Erfassung von Expressionsunterschieden wurde die Methode der *real-time* RT-PCR genutzt. Die exponentielle Vermehrung der cDNA wird dabei im Wesentlichen durch eine zyklische Wiederholung von drei Reaktionsschritten erreicht: Zunächst kommt es durch Erhitzen zur Denaturierung und somit zur Trennung der komplementären DNA-Doppelstränge. Im zweiten Schritt wird durch Abkühlung die Bindung zweier *Primer* ermöglicht, deren Basensequenz komplementär zu derjenigen der Einzelstränge ist und die mit jeweils einem der Stränge auf beiden Seiten des zu amplifizierenden DNA-Abschnittes hybridisieren. Ausgehend vom freien 3`OH-Ende der beiden *Primer* synthetisiert die thermostabile Taq-Polymerase in der Elongationsphase bei 72 °C die gewünschte DNA-Sequenz entlang der Matrize. Der Zusatz eines Doppelstrang-DNA-spezifischen Fluorophors ermöglicht die zeitliche Verfolgung der Akkumulation von PCR-Produkten während der zyklisch ablaufenden Amplifikationsreaktion. Dabei ist die Fluoreszenzintensität proportional zur Menge der DNA im Reaktionsansatz.

Die PCR wurde unter folgenden Reaktionsbedingungen durchgeführt (Tab. 2):

Tab. 2: Reaktionsbedingungen der *real-time* RT-PCR.

Reaktionsschritt		Temperatur	Dauer
1.	Initiale Denaturierung	95 °C	2 min
2.	Amplifikation (40 - 45 Zyklen)		
	a) Denaturierung	94 °C	30 s
	b) <i>Primer</i> -Anlagerung	64 °C	30 s
	c) Elongation	72 °C	30 - 40 s
	d) Messung des Fluoreszenzsignals	80 - 85 °C	15 s
3.	1. Halt (Abkühlung)	40 °C	2 min
4.	2. Halt (Erwärmung)	50 °C	1 min
5.	Schrittweise Denaturierung und Messung	von 50 auf 99 °C	1 min/°C

Relationsverschiebungen der Menge der mRNA verursacht durch Zellbehandlung, Alter oder Liniendifferenzen wurden durch den Vergleich der zu analysierenden Gene mit dem konstitutiv exprimierten Kontroll-Gen (*housekeeping*-Gen) β -Aktin standardisiert.

Jeder PCR-Reaktionsansatz mit einem Volumen von 20 μ l enthielt 4 μ l der entsprechenden cDNA, 4,75 μ l Nuklease-freies Wasser, 0,25 μ l des Fluoreszenzfarbstoffs *Eva Green*, je 0,5 μ l der *Primer* sowie 10 μ l eines PCR-Mastermixes, welcher das Enzym Taq-Polymerase (50 *units/ml*), MgCl₂ (3 mM) und die Basen dATP, dGTP, dTTP und dCTP (je 400 μ M) enthält. Die Sequenzen der hier verwendeten *Primer* sind Tabelle 3 zu entnehmen. Die Amplifikation wurde unter Verwendung eines computergesteuerten *Thermocyclers* durchgeführt.

Für die Quantifizierung wurde eine Doppelbestimmung der jeweiligen Proben durchgeführt, woraus die Mittelwerte ermittelt werden konnten. Die Auswertung der Amplifikationskurven erfolgte mit Hilfe einer Analysesoftware über die Betrachtung des *Cycle-threshold*(Ct)-Wertes. Dieser Wert beschreibt die Zunahme der zyklusabhängigen Fluoreszenzzunahme bis zum Erreichen eines definierten Schwellen-

Tab. 3: Sequenzen der Gen-spezifischen *Primer* für RT-PCR-Untersuchungen.

Gen	Molekulargewicht	Genbank-Nummer	<i>Primer</i> -Sequenz vor	<i>Primer</i> -Sequenz rück
β-Aktin	389 bp	NM031144	5`-ACTCCTACGTGGGCGACGAGG-3'	5`-CAGGTCCAGACGCAGGATGGC-3'
sGC α1	176 bp	AB096020	5`-GTGAAGAGCACCAAGCCTTC-3`	5`-TTCCCTTGAAGTCCCTCTT-3`
sGC α2	217 bp	AF109963	5`-GAGAATGAGCGAGTCCTTCG-3`	5`-CCTTGATCATTCCCAGCATT-3`
sGC β1	173 bp	AB098025	5`-TAGCAAGCATGCATCTGGAG-3`	5`-TTGACCAGCAATTTCCATCA-3`
sGC β1 (Maus)	226 bp	AF297083	5`-TAGCAAGCATGCATCTGGAG-3`	5`-TGATGGAAATTGTGGTCAA-3`
sGC β2	227 bp	AB109450	5`-CCAGCTTGCTTGACCCTTAG-3`	5`-GGAACACTCCTTCGGATGAA-3`
mGC A	162 bp	S80456	5`-CAGAGCCACCTGGAGGAAC-3`	5`-ATACTGCTCCATGCGTGACA-3`
mGC B	234 bp	NM053838	5`-AATGTCGTTGCCATCAAACA-3`	5`-GAGCGAGTAGCGAAACATCC-3`
mGC C	222 bp	M55636	5`-CACATGCTGCAGACGTTTCT-3`	5`-CACAGGGATCGTTTGGTTTT-3`
mGC D	152 bp	L37203	5`-ACTCTGAGACCCATGGAACG-3`	5`-TCCTTCACCATTTGTGTCCA-3`
mGC E	206 bp	L36029	5`-TCACAACACACCTGCTGGAT-3`	5`-CAGGAAGGCTCCAGTCAGTC-3`
mGC F	156 bp	L36030	5`-TGATGGTCTGCTTTGCTTG-3`	5`-TGCCAAAGTGGGGGTTAATA-3`
mGC G	164 bp	AF024622	5`-CAGGTGAGCCCTTACTCTGC-3`	5`-AGCACAGGACCAGTGATTCC-3`
PKG 1	159 bp	NM001105731	5`-ATCATAAGGCAGGGTGCAAG-3`	5`-TACATCTCCCCCTGCAA-3`
PKG 2	163 bp	NM_013012	5`-CCCACCTCCAAATTCTGTGT-3`	5`-GCCCAGAGCCAATCTTCTTA-3`
CNG A1	219 bp	NM053497	5`-TTGCAAGAGCATGTTTTGATG-3`	5`-CGGTCCGGTACTACTGACAGA-3`
CNG A2	188 bp	NM012928	5`-ACAGTCTGTGGCAGCTGATG-3`	5`-CACGGAAACGCTCTAGGAAG-3`
CNG A3	238 bp	NM053495	5`-GACCCCTCCAGCAACATCTA-3`	5`-TCCACAGCCTTTGGTATCC-3`
CNG A4	214 bp	NM053496	5`-GGTACGCTTCCACACAGGAT-3`	5`-ACGATCAAAAGCCTCGAAGA-3`
CNG B1	223 bp	NM031809	5`-GTTGAGCTGGTTCTGGAAGG-3`	5`-CTCAAGCCACCTGAGTAGCC-3`
CNG B3	183 bp	AY564232	5`-CTCTGATGAGCAGGACACCA-3`	5`-TAATGCTGGCTGGCTTTTCT-3`
PDE 1	160 bp	M25347	5`-CTCCTGGCTGACCTCAAGAC-3`	5`-ACTGGCGGTAGAGGGGTAGT-3`
PDE 2	192 bp	NM031079	5`-AATTGACTGCCCAACTCTGG-3`	5`-ATTTCTGCATGTGTCACGA-3`
PDE 3A	202 bp	NM017337	5`-GAGCCACTGAGGAAAGCATC-3`	5`-CCGTATTCTGAGCCAGGTGT-3`
PDE 3B	154 bp	NM017229	5`-CGATCACCCGTAGGATTTTC-3`	5`-GTAGCAGCTGTGTGGACACCAA-3`
PDE 5	227 bp	NM133584	5`-GACTGCCCTGACTCGTTCTC-3`	5`-AACACGCACTGCATCAGAAG-3`
PDE 9	229 bp	AF372654	5`-TACAGCATGGTCTGGCTCTG-3`	5`-GACCCGAGTGAAACATCT-3`
PDE 10	247 bp	NM022236	5`-TTGGGCTCCGTAGCAATAC-3`	5`-CTTCTCTCCCAATGTCAA-3`
PDE 11	184 bp	NM080893	5`-GAGCTGGGGATGGTACAGAA-3`	5`-TTTCCACCTCGTCCAGAAATC-3`
MRP 4	203 bp	NM133411	5`-ACCAGGATGCCGACATCTAC-3`	5`-TGTTGCAGAAGGGGACTTAC-3`
MRP 5	151 bp	NM053924	5`-CCCAACAGGAAGGATTCTCA-3`	5`-TCTTCCCATGGTTCTTGTG-3`

wertes, der im linearen Bereich der sigmoidalen Amplifikationskurve liegen sollte. Zur Berechnung der relativen mRNA-Konzentrationen wurde die $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode [108] angewendet.

4.6.5 DNA-Gelelektrophorese

Zur Auftrennung der DNA-Fragmente entsprechend ihrer Größe und damit zur eindeutigen Identifizierung des amplifizierten PCR-Produktes wurde eine DNA-Gelelektrophorese durchgeführt. Dazu wurde Agarose in verdünntem TAE-Puffer unter ständigem Rühren gelöst und gekocht. Je nach erwarteter Anzahl der Basenpaare des DNA-Abschnittes kann der Anteil der Agarose variiert werden. Nach kurzem Abkühlen wurde die Flüssigkeit in eine horizontale Gelkammer gegossen. Nach dem Erstarren des Gels wurde die Kammer mit einer TAE-Pufferlösung als Laufpuffer gefüllt, so dass das Gel vollständig bedeckt war. Jeweils 10 μl des PCR-Produkts bzw. 5 μl eines Längenstandards wurden mit 5 μl *Blue-juice* versetzt und in die Kavitäten des Gels pipettiert. Bei einer Spannung von 80 V wanderten die DNA-Fragmente entsprechend ihrer Länge 3 bis 5 h. Die Detektion der DNA-Banden erfolgte mittels einer UV-Fotoeinrichtung nach Auftrennung der PCR-Produkte und Ethidiumbromid-Fluoreszenzfärbung. Zur Bestimmung der Größe der im Gel sichtbaren PCR-Produkte wurde mit Hilfe der Software Bio1D die jeweilige Bande der Probe mit dem Molekulargewichtsstandard verglichen.

4.6.6 Restriktionsanalysen

Zur Bestätigung der Identität amplifizierter Sequenzen wurden Restriktionsanalysen durchgeführt. Restriktionsenzyme schneiden das amplifizierte PCR-Produkt an einer charakteristischen Stelle der DNA-Sequenz; es entstehen zwei Fragmente mit spezifischem Molekulargewicht. In einem Ansatz aus je 10 μl des zu analysierenden PCR-Produktes, 6 μl RNase-freies Wasser, 2 μl des Restriktionsenzym und 2 μl des zugehörigen Puffers erfolgte die Inkubation der Proben im Wasserbad entsprechend den Angaben der Hersteller. Die spezifischen Enzyme, Größe der Amplifikationsprodukte sowie die erwarteten Molekulargewichte der Fragmente der Sequenzen sind Tabelle 4 zu entnehmen. Durch Auftrennung mittels DNA-Gelelektrophorese ließen sich die Fragmente in Relation zu den nicht geschnittenen PCR-Produkten bzw. einem Molekulargewichtsstandard identifizieren.

4.7 Statistische Auswertungen

Die statistische Auswertung der Ergebnisse und Durchführung von Signifikanztests erfolgten mit dem Statistikprogramm GraphPad unter Nutzung des Mann-Whitney-U-Tests für Nicht-Standard-normalverteilte Varianzen. Die Daten wurden als Mittelwerte mit Standardfehler (*standard error of mean*, SEM) angegeben. Bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit (p) kleiner als 5 % ($p < 0,05$) wurden die Ergebnisse als statistisch signifikant angesehen. Die Stern-Symbolik kennzeichnet die Signifikanzen wie folgt:

* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ und *** $p < 0,001$.

Tab. 4: Restriktionsanalyse: Enzyme und Reaktionsbedingungen sowie Molekulargewichte der Ausgangs- und Restriktionsprodukte.

Gen	Restriktions- enzym	Inkubations- Temperatur	Inkubations- dauer	Amplikon	Restriktions- fragmente
sGC α 2	Eco57I	37 °C	5 h	217 bp	53 + 164 bp
sGC β 1	AvaII	37 °C	2 h	173 bp	38 + 42 + 93 bp
sGC β 1 (Maus)	AvaII	37 °C	4 h	226 bp	46 + 180 bp
mGC A	Ava II	37 °C	2 h	162 bp	51 + 111 bp
mGC B	AvaI	37 °C	5 h	234 bp	70 + 164 bp
mGC C	ApaI	37 °C	4 h	222 bp	98 + 124 bp
PKG 1	BsrI	65 °C	5 h	159 bp	68 + 91 bp
CNG A1	BsrI	65 °C	5 h	219 bp	193 + 26 bp
CNG A2	BsrI	65 °C	5 h	188 bp	128 + 60 bp
CNG B1	Eco31I	37 °C	5 h	223 bp	132 + 91 bp
CNG B3	BfiI	37 °C	5 h	183 bp	113 + 70 bp
PDE 1	Eco31I	37 °C	5 h	160 bp	138 + 22 bp
PDE 2	AvaI	37 °C	5 h	192 bp	143 + 49 bp
PDE 3A	LweI	37 °C	5 h	202 bp	177 + 49 bp
PDE 3B	PvuII	37 °C	5 h	154 bp	141 + 13 bp
PDE 5	LweI	37 °C	5 h	227 bp	152 + 75 bp
PDE 9	AvaI	37 °C	5 h	229 bp	214 + 15 bp
PDE 10	Eco31I	37 °C	5 h	247 bp	200 + 47 bp
PDE 11	PvuII	37 °C	5 h	184 bp	126 + 58 bp
MRP 4	PvuII	37 °C	5 h	203 bp	77 + 126 bp
MRP 5	EcoRII	37 °C	5 h	151 bp	30 + 55 + 66 bp
MRP 8	AvaI	37 °C	5 h	169 bp	76 + 93 bp

5 Ergebnisse

5.1 Untersuchungen zur Bedeutung des MT₂-Rezeptors für die Insulinsekretion

In Anlehnung an neueste Erkenntnisse zum Vorhandensein des MT₂-Rezeptors im Pankreas der Ratte und des Menschen wurde zu Beginn der Arbeit untersucht, ob dieser Rezeptortyp an der Melatoninwirkung in pankreatischen β -Zellen beteiligt ist.

Sowohl an Inseln der Ratte als auch an humanem Pankreasgesamtgewebe konnte nachgewiesen werden, dass die Expression des MT₂-Rezeptors um ein Vielfaches geringer ist als die MT₁-Rezeptor-Expression. Es stellte sich die Frage, in wie weit der MT₂-Rezeptor von physiologischer Relevanz ist. Um Aussagen darüber treffen zu können, wurde im Rahmen dieser Arbeit zunächst ein quantitativer Vergleich der mRNA-Expression von Melatoninrezeptoren in der pankreatischen β -Zelllinie INS1 vorgenommen. Für diesen Versuch wurden INS1-Zellen entsprechend den Angaben unter Abschnitt 4.3 in 24-*well*-Zellkulturplatten kultiviert und anschließend für molekularbiologische Untersuchungen aufgearbeitet. Die Quantifizierung der Melatoninrezeptor-Transkripte mittels *real-time* RT-PCR konnte zeigen, dass der MT₁-Rezeptor in der INS1-Zelle signifikant stärker exprimiert ist als der MT₂-Rezeptor (Abb. 7, Tab. 5). Das Transkript des MT₁-Rezeptors ist gegenüber der MT₂-Rezeptor-mRNA um das 10,5-fache stärker exprimiert.

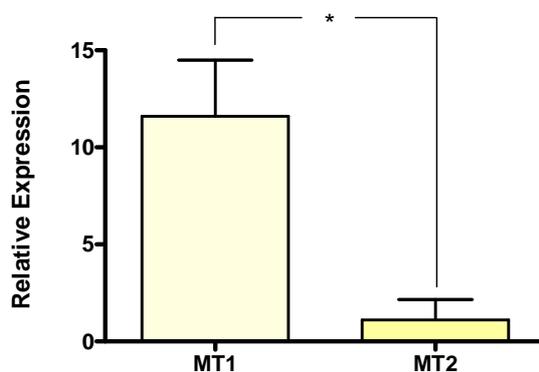


Abb. 7.: Quantitativer Vergleich der Melatoninrezeptor-mRNA an pankreatischen β -Zellen. Unter Verwendung von MT₁- und MT₂-Rezeptor-spezifischen *Primern* und β -Aktin als Referenzgen wurde eine *real-time* RT-PCR-Analyse an INS1-Zellen durchgeführt (Mittelwert \pm SEM mit je n = 5 bis 7 *batches*).

Tab. 5: Mittelwerte, Stichprobenumfänge und Standardfehler bei PCR-Untersuchungen zur Melatoninrezeptor-mRNA-Expression in INS1-Zellen.

MT ₁ -Rezeptor			MT ₂ -Rezeptor		
MW	SEM	n	MW	SEM	n
11,59	2,90	7	1,10	1,05	5

Im zweiten Schritt wurde untersucht, welche Bedeutung dem MT_2 -Rezeptortyp in der Melatoninwirkung auf die Insulinfreisetzung zukommt. Die zellphysiologischen Untersuchungen bestätigten den bereits aus Superfusionsexperimenten bekannten Effekt: Melatonin (100 nM) senkte bei INS1-Zellen die Forskolin-stimulierte Insulinsekretion nach 6 h Inkubationszeit signifikant (Abb. 8A, Tab. 6). Forskolin (5 μ M) erhöhte die Insulinfreisetzung um mehr als das Doppelte gegenüber der unstimulierten Kontrolle; die gleichzeitige Melatoningabe führte zur Senkung der Forskolin-stimulierten Insulinsekretion um 25 %.

Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die 30-minütige Vorinkubation mit dem etablierten, unspezifischen Melatoninrezeptor-Antagonisten Luzindol (10 μ M) eine teilweise Senkung des Melatonineffektes bewirkte. Hingegen hob die Präinkubation mit dem spezifischen MT_2 -Rezeptor-Antagonisten 4-Phenyl-2-propionamidotetralin (4P-PDOT, 100 nM) die Insulin-senkende Melatoninwirkung nahezu vollständig auf; die Insulinsekretion erreichte mit 95,5 % annähernd die Ausgangswerte der Forskolin-stimulierten Proben. Um einen möglichen Eigeneffekt auf die Insulinkonzentration festzustellen,

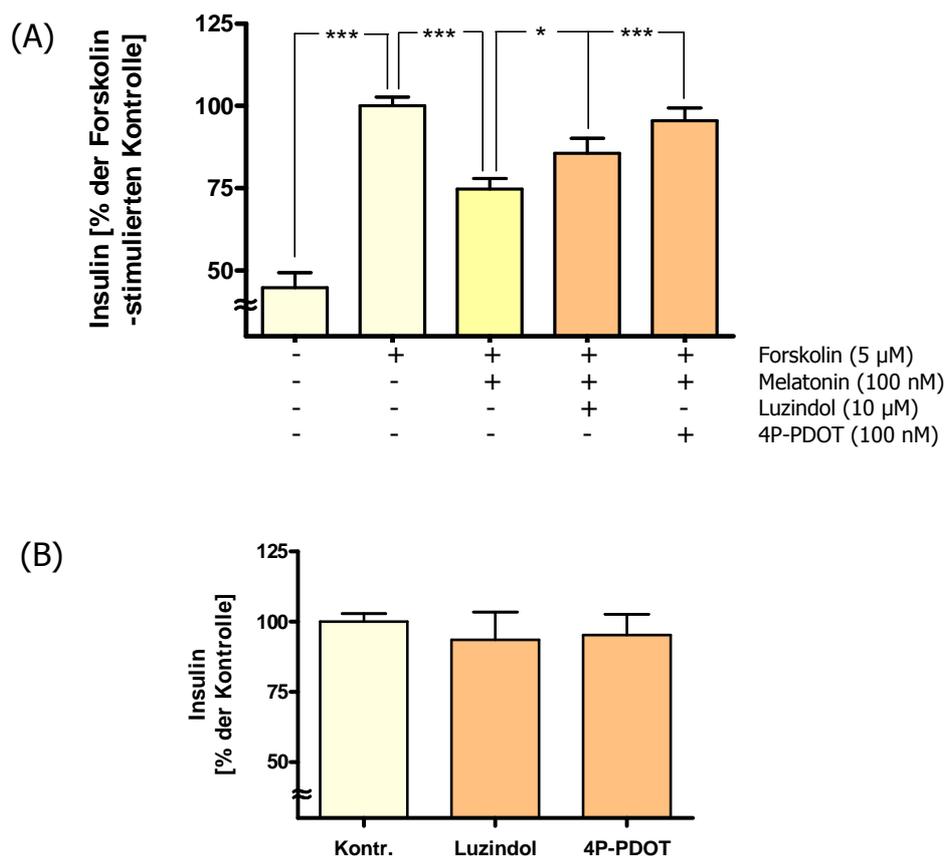


Abb. 8: (A) Untersuchungen zur Wirkung von Melatonin und Melatoninrezeptor-Antagonisten auf die Insulinsekretion. INS1-Zellen wurden für 6 h mit Forskolin (5 μ M) oder Forskolin und Melatonin (100 nM) bei einem Glukosegehalt von 11,6 mM im Medium stimuliert. Luzindol (10 μ M) oder 4P-PDOT (100 nM) wurden für 30 min vorinkubiert. Die Daten repräsentieren den Mittelwert \pm SEM aus 3 voneinander unabhängigen Versuchen mit je $n = 8$ batches [108]. (B) Eigenwirkung der Melatoninrezeptor-Antagonisten auf die Insulinsekretion. INS1-Zellen wurden für 6,5 h mit Luzindol (10 μ M) oder 4P-PDOT (100 nM) bei 11,6 mM Glukosegehalt im Medium inkubiert ($n = 7$ bis 9 batches).

Tab. 6: Mittelwerte (angegeben in Prozent relativ zur 100 %-gesetzten Forskolin-behandelten Kontrolle) Standardfehler und Stichprobenumfänge von Inkubationsuntersuchungen an INS1-Zellen zur Insulinbestimmung unter Einsatz von Forskolin (5 μM), Melatonin (100 nM), Luzindol (10 μM) und 4P-PDOT (100 nM).

Stimulationsansatz	MW	SEM	n
Kontrolle (A)	44,76	4,50	24
Forskolin (5 μM)	100,00	2,70	40
Forskolin + Melatonin (100 nM)	74,69	3,27	39
Forskolin + Melatonin + Luzindol (10 μM)	85,65	4,45	40
Forskolin + Melatonin + 4P-PDOT (100 nM)	95,49	3,87	36
Kontrolle (B)	100,00	2,95	9
Luzindol (10 μM)	93,58	9,91	7
4P-PDOT (100 nM)	95,28	7,38	9

wurde zusätzlich der Effekt der Rezeptor-Antagonisten ohne gleichzeitige Melatoningabe untersucht. Die Daten zeigen, dass Luzindol und 4P-PDOT zu einer leichten, jedoch nicht signifikanten Senkung der Insulinsekretion führen (Abb. 8B, Tab. 6). Die Daten belegen, dass der MT_2 -Rezeptor an der Vermittlung des Melatonineffektes auf die Insulinfreisetzung beteiligt ist.

5.2 Effekte von Melatonin auf die cGMP-Konzentration in INS1-Zellen

5.2.1 Melatoninwirkung auf die cGMP-Konzentration in Abhängigkeit von Dosis und Inkubationszeit

Im Folgenden wurde der zentralen Fragestellung nachgegangen, ob Melatonin die cGMP-Konzentration in der pankreatischen β -Zelle beeinflusst. Die Inkubation von INS1-Zellen mit dem unspezifischen Phosphodiesterase-Hemmer IBMX (1 mM) erhöhte die cGMP-Konzentration signifikant (Abb. 9A), was auf die Verhinderung des cGMP-Abbaus zurückzuführen ist. Die Zugabe von Melatonin führte zu einer signifikanten, Dosis-abhängigen Senkung der cGMP-Konzentration. Nach 1 h Inkubationszeit bewirkten Melatoningaben von 10 nM eine Senkung des IBMX-stimulierten cGMP-Gehaltes um 7 %, von 100 nM um 13 % und von 1 μM um 21 %. In Abbildung 9B ist der Melatonineffekt in Abhängigkeit von der Inkubationszeit dargestellt. Bereits nach 15-minütiger Melatoninapplikation konnte in diesem Versuch eine signifikante Reduzierung der IBMX-stimulierten cGMP-Konzentration um 25 % nachgewiesen werden. Der cGMP-senkende Effekt von Melatonin erhöhte sich mit steigender Inkubationsdauer; nach 60 min waren der cGMP-Gehalt in INS1-Zellen um die Hälfte reduziert.

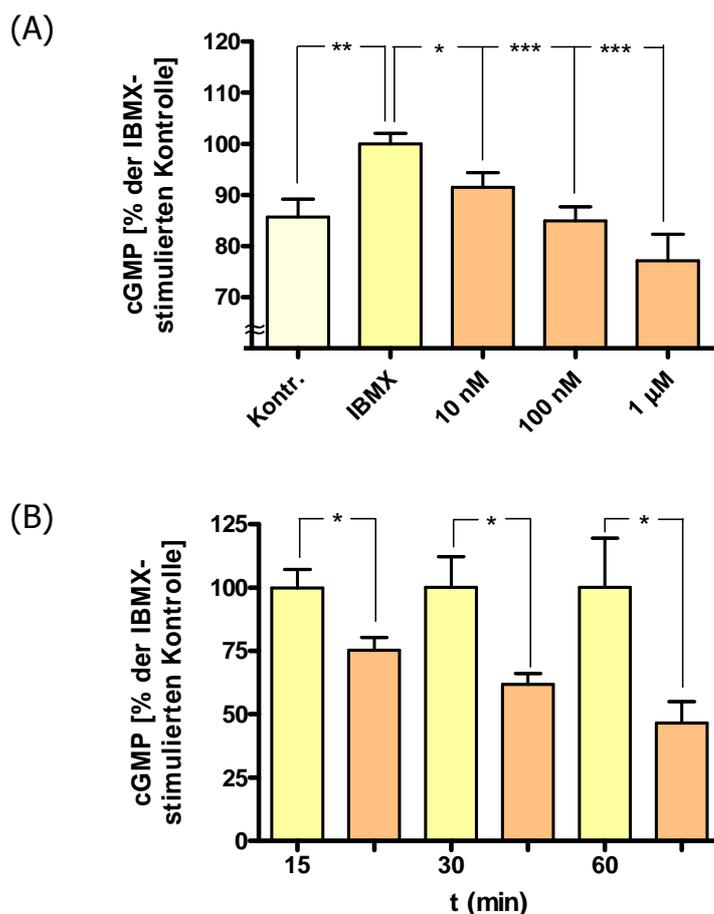


Abb. 9: Bestimmung der cGMP-Konzentration in INS1-Zellen nach Melatoningabe unter Hemmung von Phosphodiesterasen in Abhängigkeit von Dosis und Inkubationszeit. (A) Inkubation von INS1-Zellen mit Melatonin (10 nM, 100 nM, 1 µM) für 1 h nach Vorinkubation mit dem Phosphodiesterase-Hemmer IBMX (1 mM). Die Daten repräsentieren den Mittelwert \pm SEM aus mindestens 3 voneinander unabhängigen Versuchen mit je $n = 3$ *batches* [108]. (B) Inkubation IBMX-vorbehandelter INS1-Zellen mit Melatonin (100 nM) für 15, 30 oder 60 min. Die Daten repräsentieren den Mittelwert \pm SEM mit $n = 4$ *batches*. Die Melatonin-behandelten Proben (dunkle Balken) sind in Prozent relativ zur 100 %-gesetzten IBMX-behandelten Kontrolle (helle Balken) dargestellt.

Tab. 7: Mittelwerte (angegeben in Prozent relativ zur 100 %-gesetzten IBMX-behandelten Kontrolle) Standardfehler und Stichprobenumfänge bei Inkubationsversuchen mit INS1-Zellen zur Untersuchung der Wirkung von IBMX (1 mM) und Melatonin auf die cGMP-Konzentration.

Stimulationsansatz	Zeit	MW	SEM	n
Kontrolle	60 min	87,73	3,49	8
IBMX (1 mM)	60 min	100,00	2,05	11
IBMX + Melatonin (10 nM)	60 min	91,48	2,87	10
IBMX + Melatonin (100 nM)	60 min	84,98	2,71	13
IBMX + Melatonin (1 µM)	60 min	77,18	5,16	17
IBMX (1 mM)	15 min	100,00	7,21	4
IBMX + Melatonin (100 nM)	15 min	75,24	5,09	4
IBMX (1 mM)	30 min	100,20	12,11	4
IBMX + Melatonin (100 nM)	30 min	61,81	4,29	4
IBMX (1 mM)	60 min	100,20	19,40	4
IBMX + Melatonin (100 nM)	60 min	46,65	8,39	4

5.2.2 Nachweis der Rezeptor-medierten Wirkung von Melatonin auf cGMP

Um zu untersuchen, ob der cGMP-senkende Effekt von Melatonin Rezeptor-mediert ist, wurde der unspezifische Melatoninrezeptor-Antagonist Luzindol sowie der spezifische MT_2 -Rezeptor-Antagonist 4P-PDOT eingesetzt. In Abbildung 10A und Tabelle 8 ist die bereits beschriebene Wirkung von IBMX (1 mM) und Melatonin (100 nM) auf die cGMP-Konzentration bei INS1-Zellen dargestellt. Die 30-minütige Vorinkubation mit Luzindol (100 nM) oder 4P-PDOT (100 nM) hebt diesen Melatonineffekt nahezu vollständig auf: Bei der Behandlung mit Luzindol werden 99 % und mit 4P-PDOT 97 % der IBMX-stimulierten Ausgangswerte erreicht.

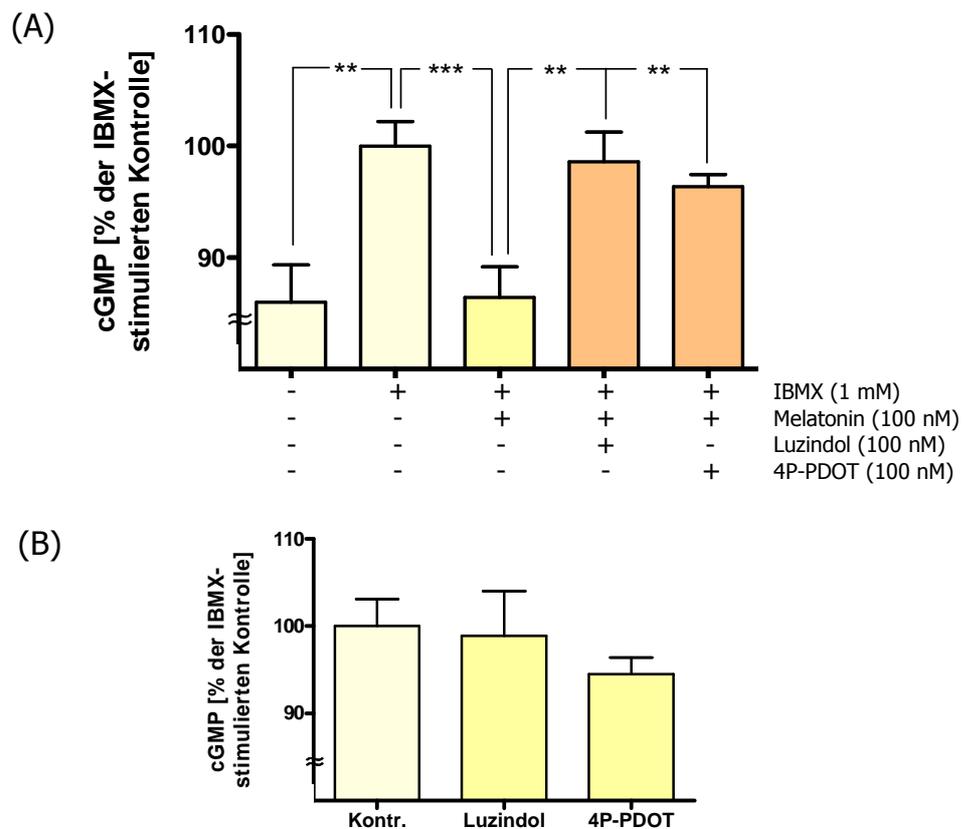


Abb. 10: (A) Bestimmung der cGMP-Konzentration bei INS1-Zellen nach Melatoninstimulation unter Einsatz von Melatoninrezeptor-Antagonisten. Der Einsatz des Phosphodiesterase-Hemmers IBMX (1 mM) diente zur Hemmung des cGMP-Abbaus. Der MT_2 -spezifische Rezeptorblocker 4P-PDOT (100 nM) und der unspezifische Melatoninrezeptor-Blocker Luzindol (100 nM) wurden 30 min vor der 1-stündigen Melatoninangabe (100 nM) vorinkubiert. Die Daten repräsentieren den Mittelwert \pm SEM aus mindestens 3 unabhängigen Versuchen mit je $n = 4$ batches [108]. (B) Eigenwirkung der Melatoninrezeptor-Antagonisten auf die cGMP-Gehalte. INS1-Zellen wurden für 1,5 h mit Luzindol (100 nM) und 4P-PDOT (100 nM) inkubiert ($n = 7$ bis 8 batches).

Daraus kann gefolgert werden, dass die cGMP-reduzierende Wirkung von Melatonin in pankreatischen β -Zellen Rezeptor-mediert ist und dabei mit großer Wahrscheinlichkeit der MT_2 -Rezeptortyp von Bedeutung ist. Zusätzlich wurden Untersuchungen zu einem möglichen Eigeneffekt der Melatoninrezeptor-Antagonisten auf die cGMP-Konzentration durchgeführt. Sowohl Luzindol als auch 4P-PDOT führten bei Inkubation in den angegebenen Konzentrationen zu einer moderaten, jedoch nicht signifikanten Senkung der cGMP-Werte im Vergleich zur IBMX-behandelten Kontrolle (Abb. 10B, Tab. 8).

Tab. 8: Mittelwerte (angegeben in Prozent relativ zur 100 %-gesetzten IBMX-behandelten Kontrolle), Standardfehler und Stichprobenumfänge bei Inkubationsversuchen an INS1-Zellen unter Verwendung von IBMX (1 mM), Melatonin (100 nM), 4P-PDOT (100 nM) und Luzindol (100 nM).

Stimulationsansatz	MW	SEM	n
Kontrolle	85,99	3,36	9
IBMX (1 mM)	100,00	2,21	11
IBMX + Melatonin (100 nM)	86,44	2,75	13
IBMX + Melatonin + Luzindol (100 nM)	98,59	2,66	10
IBMX + Melatonin + 4P-PDOT (100 nM)	96,36	1,08	11
IBMX (1 mM)	100,00	3,09	7
IBMX + Luzindol (100 nM)	98,89	5,11	8
IBMX + 4P-PDOT (100 nM)	94,51	1,89	8

5.3 Charakterisierung der pankreatischen Insel und INS1-Zelle hinsichtlich cGMP-Signalkaskaden-Komponenten

Eine Melatonin-vermittelte Wirkung auf die intrazelluläre cGMP-Konzentration und mögliche damit verbundene Veränderungen in der Insulinsekretion setzen die Existenz der an der cGMP-Signalkaskade beteiligten Proteine in der pankreatischen β -Zelle voraus. Um Aussagen treffen zu können, über welchen Mechanismus Melatonin zur Veränderung der cGMP-Konzentration führt, wurde untersucht, welche Komponenten der cGMP-Signalkaskade in der INS1-Zelle exprimiert werden. Der Nachweis von Isoformen der NOS und der Proteinkinase G in der LANGERHANSschen Insel und der pankreatischen β -Zelle ist in der Literatur bereits beschrieben, der Nachweis der PKG in der INS1-Zelle konnte bislang jedoch nicht erbracht werden. Über das Vorkommen verschiedener Isoformen der Guanylatzyklen, cGMP-spezifischer Phosphodiesterasen, CNG-Kanäle oder MRP-Transporter sind, speziell pankreatische β -Zellen betreffend, bisher keine Untersuchungen bekannt. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die INS1-Zelle deshalb mittels RT-PCR, DNA-Gelelektrophorese und Restriktionsanalyse hinsichtlich des Vorkommens dieser Komponenten charakterisiert.

Es wurden sowohl das Pankreasgesamtgewebe als auch speziell der exokrine Gewebeanteil, die LANGERHANSschen Inseln und INS1-Zellen untersucht. Zum Vergleich dienten Proben aus Gehirn, Leber und Epiphyse der Ratte. Um eine unspezifische DNA-Verschleppung auszuschließen, wurde eine Wasserkontrolle ohne Einsatz von cDNA mitgeführt. Die Ergebnisse sind exemplarisch für die α 2- und β 1-Untereinheiten der löslichen Guanylatzyklase (sGC α 2 und sGC β 1) in Abbildung 11 (A und C) und als Gesamtübersicht in Tabelle 9 dargestellt.

Abbildung 12 zeigt die mRNA-Expression der untersuchten Komponenten der cGMP-Signalkaskade speziell bei INS1-Zellen, zusammengefasst als Gelelektrophorese-Darstellung. Bei der Untersuchung zur Expression der löslichen Form der Guanylatzyklase (sGC) konnten sowohl die mRNA der α 2- als auch der β 1-Untereinheit nachgewiesen werden, was darauf hindeutet, dass in der pankreatischen β -Zelle eine funktionelle Isoform der sGC existiert. Von den sieben bekannten Formen der membranständigen Guanylatzyklen (mGC) wurde der mRNA-Nachweis der Isoformen mGC A, B und C in der INS1-Zelle erbracht (Abb. 12A). Weiterhin zeigen die RT-PCR- und Gelelektrophorese-Untersuchungen,

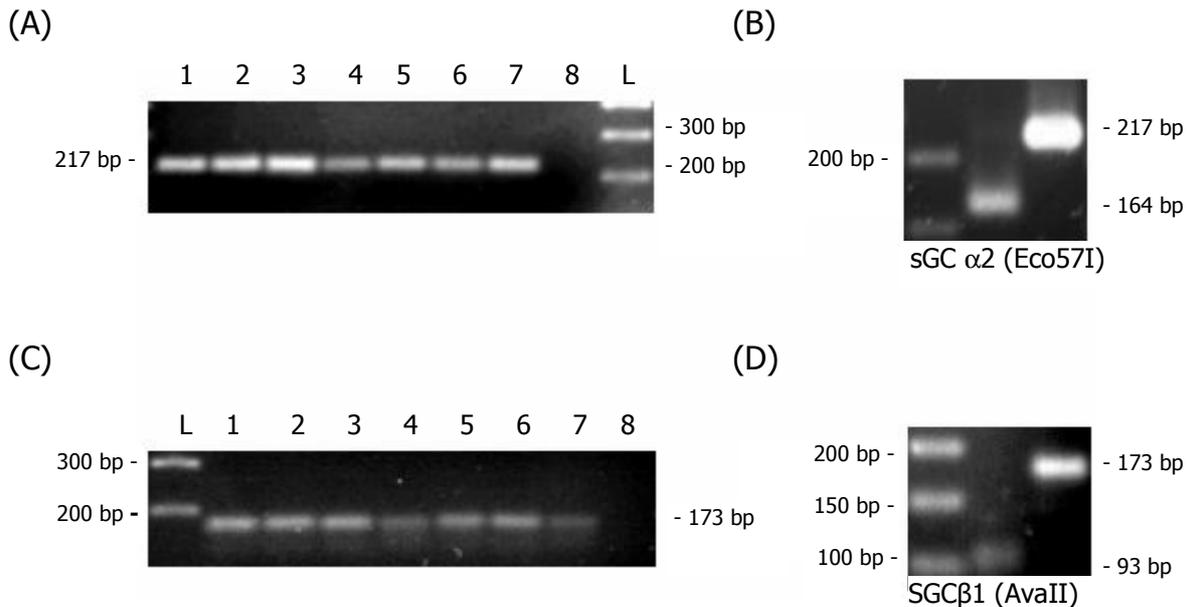


Abb. 11: Nachweis der Genexpression der $\alpha 2$ - und $\beta 1$ -Untereinheiten der löslichen Guanylatzyklase in Gehirn (1), Leber (2), Epiphyse (3), Gesamtpankreas(4), exokrinem Pankreasgewebe (5), LANGERHANSschen Inseln (6) und INS1-Zellen (7) der Ratte. Die spezifischen PCR-Produkte mit einem Molekulargewicht von 217 bp für die sGC $\alpha 2$ -Untereinheit (A) und 173 bp für die sGC $\beta 1$ -Untereinheit (C) konnten in allen Proben nachgewiesen werden. Zur Bestätigung der Identität der amplifizierten PCR-Produkte wurde eine Restriktionsanalyse mit den Restriktionsenzymen Eco57I für sGC $\alpha 2$ (B) bzw. AvaII für sGC $\beta 1$ (D) durchgeführt. Es konnten die erwarteten Fragmente von 53 und 164 bp für das sGC $\alpha 2$ -spezifische Produkt sowie die spezifischen Produkte von 38, 42 und 93 bp für die sGC $\beta 1$ -spezifische Sequenz detektiert werden. (8) Wasserkontrolle; L, 100-bp-Molekulargewichtsstandard.

dass in der INS1-Zelle die PKG-Isoform PKG 1 exprimiert wird. Von den Isoformen der cGMP-abbauenden Phosphodiesterasen konnten die Transkripte der PDE 1, 2, 5, 9, 10 und 11 detektiert werden. Ferner wurde die mRNA beider Isoformen der cAMP-spezifischen PDE 3 (PDE 3A und PDE 3B) in INS1-Zellen nachgewiesen (Abb. 12B). Erstmals führten PCR-Untersuchungen an INS1-Zellen zum Nachweis der mRNA der CNG-Kanal-Untereinheiten CNG A1, CNG A2, CNG B1 und CNG B3 (Abb. 12C). Des Weiteren konnten die Transkripte von MRP 4, 5 und 8 detektiert werden (Abb. 12D).

Zur Bestätigung der Identität erfolgreich amplifizierter PCR-Produkte bei INS1-Zellen erfolgte zusätzlich eine Restriktionsanalyse. Die verwendeten Restriktionsenzyme, Dauer der Reaktion, Inkubationstemperatur sowie erwartete Molekulargewichte der entstehenden Restriktionsfragmente sind Tabelle 4 (siehe Abschnitt 4.6.6) zu entnehmen. Bei allen, in INS1-Zellen nachgewiesenen, Transkripten für Komponenten der cGMP-Signalkaskade war die Reaktion erfolgreich. In den Abbildungen 11B und 11D ist die Restriktionsanalyse für die $\alpha 2$ - und $\beta 1$ -Untereinheiten der sGC exemplarisch dargestellt. Durch das Auftreten niedermolekularer Nebenprodukte waren kürzere Restriktionsfragmente zum Teil maskiert und lediglich größere Restriktionsprodukte im Gel deutlich erkennbar.

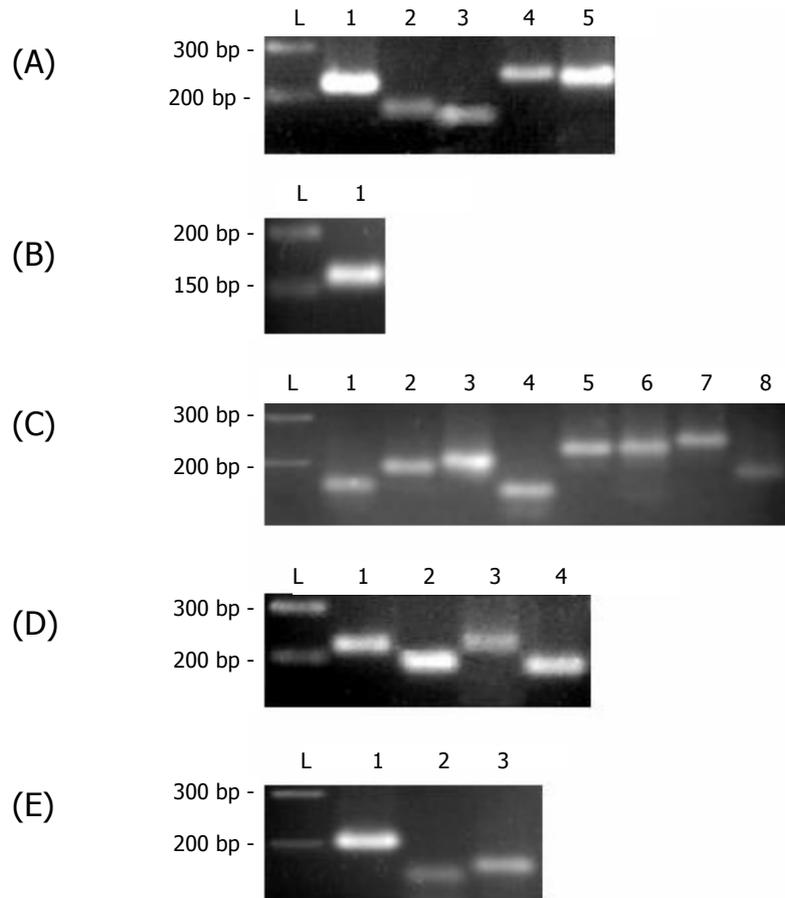


Abb. 12: Expression der Guanylatzyklasen, Proteinkinase, cGMP-spezifischen Phosphodiesterasen (PDE), CNG-Kanälen und MRP-Transportern in INS1-Zellen. (A) Analyse der Genexpression der löslichen Guanylatzyklase (sGC) mittels reverser Transkriptions-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR). Die Untereinheiten sGC $\alpha 2$ (1, 217 bp) und sGC $\beta 1$ (2, 173 bp) sowie die Isoformen der membranständigen Guanylatzyklase (mGC) mGC A (3, 162 bp), mGC B (4, 234 bp) und mGC C (5, 222 bp) konnten nachgewiesen werden. (B) Expression der Proteinkinase PKG 1 (1, 159 bp). (C) Detektion der Amplifikationsprodukte der cGMP-spezifischen PDE 1 (1, 160 bp), PDE 2 (2, 192 bp), PDE 5 (3, 227 bp), PDE 9 (6, 229 bp), PDE 10 (7, 247 bp) und PDE 11 (8, 184 bp) in INS1-Zellen. Darüber hinaus sind beide Isoformen der cAMP-spezifischen Phosphodiesterase 3, PDE 3A (3, 202 bp) und PDE 3B (4, 154 bp), exprimiert. (D) RT-PCR-Analyse der Genexpression von CNG-Kanal-Untereinheiten CNGA 1 (1, 219 bp), CNG A2 (2, 188 bp), CNG B1 (3, 223 bp) und CNG B3 (4, 183 bp). (E) Nachweis der mRNA der MRP-Transporter-Isoformen MRP 4 (1, 203 bp), MRP 5 (2, 151 bp) und MRP 8 (3, 169 bp). L: 50/100-bp-Molekulargewichtsstandard [108].

Tab. 9: Expression von Guanylatzyklasen (GC), cGMP-spezifischer Phosphodiesterasen (PDE), CNG-Kanälen (CNG) und MRP-Transporter (MRP) in Gehirn, Leber, Epiphyse, Gesamtpankreas, exokrinem Pankreasgewebe, LANGERHANSschen Inseln und INS1-Zellen [108].

Name	Molekulargewicht	Gehirn	Leber	Epiphyse	Pankreas	exokrines Pankreas	Inseln	INS1-Zellen
sGC α 1	176 bp	x	x	x	x			
sGC α 2	217 bp	x	x	x	x	x	x	x
sGC β 1	173 bp	x	x	x	x	x	x	x
sGC β 2	227 bp	x	x					
mGC A	162 bp	x	x	x	x	x	x	x
mGC B	234 bp	x	x	x	x	x	x	x
mGC C	222 bp	x	x		x	x	x	x
mGC D	152 bp	x						
mGC E	206 bp	x		x				
mGC F	156 bp							
mGC G	164 bp	x	x	x				
PKG 1	159 bp	x	x	x	x	x	x	x
PKG 2	163 bp	x		x		x		
PDE 1	160 bp	x	x			x		x
PDE 2	192 bp	x	x	x	x		x	x
PDE 3A	202 bp	x	x	x	x	x	x	x
PDE 3B	154 bp	x	x	x	x	x	x	x
PDE 5	227 bp	x	x					x
PDE 9	229 bp	x	x		x	x	x	x
PDE 10	247 bp	x	x	x		x		x
PDE 11	184 bp	x	x					x
CNG A1	219 bp	x		x				x
CNG A2	188 bp							x
CNG A3	238 bp	x		x		x		
CNG A4	214 bp							
CNG B1	223 bp			x				x
CNG B3	183 bp			x				x
MRP 4	203 bp	x	x	x	x	x	x	x
MRP 5	151 bp	x	x	x	x	x	x	x
MRP 8	169 bp	x		x	x	x	x	x

5.4 Die Wirkung von Melatonin auf die lösliche Guanylatzyklase

Nachdem in den zurückliegenden Kapiteln nachgewiesen wurde, dass Melatonin die cGMP-Konzentration in INS1-Zellen Rezeptor-mediert senkt, war es nachfolgend Ziel herauszufinden, über welche Mechanismen das Hormon diesen Effekt vermittelt und welche Komponenten der cGMP-Signalkaskade daran beteiligt sind. Eine Modulation der GC-Funktion als cGMP-synthetisierendes Enzym erschien naheliegend. Folgend sollten deshalb Inkubationsversuche mit einem NO-Donator und spezifischen Inhibitoren des Enzyms sowie Quantifizierungen der GC-mRNA nach Melatoninbehandlung Aufschluss über die Wirkung von Melatonin auf die GC geben.

Die Ergebnisse von *real-time* RT-PCR-Untersuchungen bei INS1-Zellen zeigten, dass die Expression der sGC nach Langzeit-Melatonininkubation (24 h bzw. 48 h) deutlich gesenkt wird. Melatonin (1 pM bis

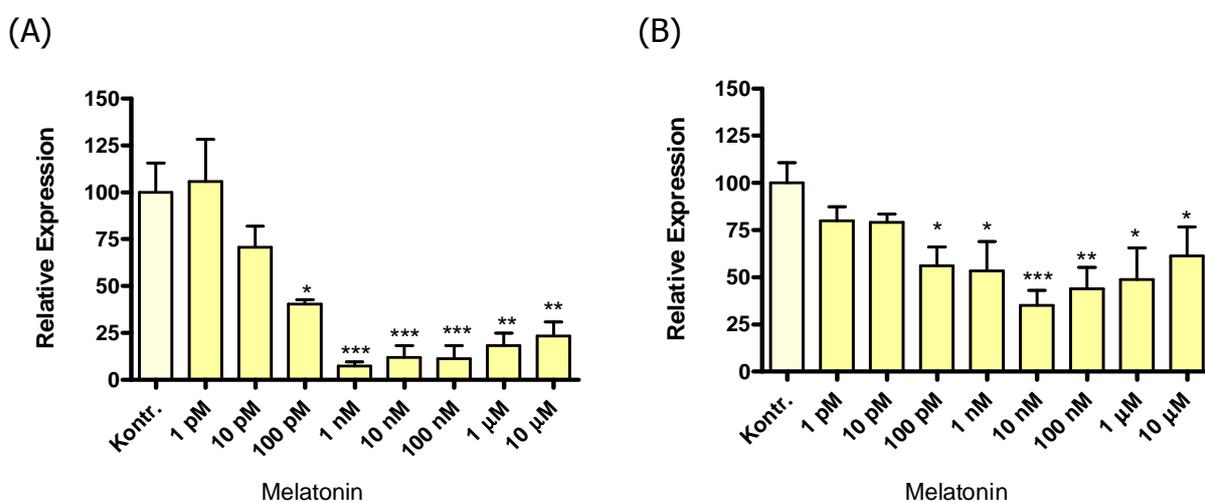


Abb. 13: Expressionsanalyse der löslichen Guanylatzyklase in INS1-Zellen nach Melatineinwirkung. Die Zellen wurden für 24 h (A) oder 48 h (B) mit Melatonin (1 pM bis 10 µM) inkubiert; anschließend konnten mittels *real-time* RT-PCR Unterschiede der sGC-mRNA-Expression ermittelt werden. Die Daten repräsentieren den Mittelwert \pm SEM aus 3 unabhängigen Versuchen mit je $n = 3$ *batches*. Die Melatonin-behandelten Proben sind in Prozent relativ zur 100 %-gesetzten unbehandelten Kontrolle dargestellt [109].

Tab. 10: Mittelwerte (angegeben in Prozent relativ zur 100 %-gesetzten unbehandelten Kontrolle), Standardfehler und Stichprobenumfänge bei PCR-Untersuchungen zur sGC-mRNA bei Melatonin-behandelten INS1-Zellen im 24- und 48-h-Experiment.

Melatonin-konzentration	24 h Inkubation			48 h Inkubation		
	MW	SEM	n	MW	SEM	n
Kontrolle	100,00	15,58	14	100,00	10,48	15
1 pM	105,08	22,52	6	79,88	7,54	7
10 pM	70,69	11,20	7	79,09	4,53	8
100 pM	40,48	2,39	6	56,21	9,90	6
1 nM	7,31	2,29	8	53,48	15,59	8
10 nM	11,93	6,36	8	35,24	7,98	10
100 nM	11,36	6,78	9	53,95	11,33	9
1 µM	18,21	6,76	9	48,81	16,82	9
10 µM	23,39	7,43	9	61,32	15,32	8

10 μM) führte zu einer Dosis-abhängigen Senkung der sGC $\alpha 2$ -mRNA mit signifikanten Ergebnissen bei Einsatz der Konzentrationen von 100 pM bis 10 μM . Die niedrigsten Werte traten in Proben auf, die mit Melatoninkonzentrationen im nanomolaren Bereich behandelt wurden; die relative mRNA-Expression war gegenüber der unstimulierten Kontrolle um 88 bis 93 % gesenkt. Trotz ebenso signifikanter Abnahme der sGC $\alpha 2$ -Expression bei Melatoninstimulation im Bereich von 100 pM bis 10 μM war der senkende Effekt nach 48 h Inkubationszeit schwächer als im 24-h-Experiment: Die mRNA-Expression der unstimulierten Kontrolle wurde höchstens um 65 % gesenkt (Abb. 13, Tab. 10). Möglicherweise ist dies auf Kompensationsmechanismen zurückzuführen. Zur Quantifizierung der sGC-mRNA mittels *real-time* RT-PCR wurde das *Primer*-Paar verwendet, welches spezifisch zur Amplifikation der sGC $\alpha 2$ -Untereinheit und repräsentativ für die sGC-Expression ist. Ferner wurde die Melatoninwirkung auf die Expression der membranständigen Isoformen mGC A, B und C mittels *real-time* PCR untersucht. Wie in Abbildung 14A bis F und Tabelle 11 dargestellt, konnte jedoch bei keiner der genannten Isoformen eine signifikante Veränderung der mRNA-Expression nach Melatonininkubation für 24 h bzw. 48 h in Konzentrationen von 1 nM bis 10 μM festgestellt werden. Lediglich die mRNA der mGC C war im 24-h-Inkubationsexperiment unabhängig von der Melatoninkonzentration geringgradig stärker exprimiert als in den Proben der unbehandelten Kontrolle; signifikante Unterschiede traten allerdings nicht auf. Diese PCR-Ergebnisse deuten in Übereinstimmung mit Resultaten anderer Studien darauf hin, dass Melatonin seine cGMP-senkende Wirkung über die Modulation der sGC mediiert; die Isoformen der membranständigen Guanylatzyklase sind offenbar nicht an der Vermittlung der Melatoninwirkung auf die cGMP-Konzentration beteiligt.

Tab. 11: Mittelwerte (angegeben in Prozent relativ zur 100 %-gesetzten unbehandelten Kontrolle), Standardfehler und Stichprobenumfänge bei Untersuchungen zur mRNA-Expression membranständiger Guanylatzyklasen in der INS1-Zelle nach Melatoninstimulation für 24 h oder 48 h.

mGC-Isoform	Melatonin-konzentration	24 h Inkubation			48 h Inkubation		
		MW	SEM	n	MW	SEM	n
mGC A	Kontrolle	100,00	6,06	9	100,00	13,13	9
	1 nM	93,76	16,91	8	107,10	30,84	8
	10 nM	105,90	16,28	7	87,81	21,84	9
	100 nM	110,80	20,55	8	89,45	25,97	7
	1 μM	85,52	14,35	9	109,60	26,28	9
	10 μM	94,12	11,57	9	78,34	24,73	8
mGC B	Kontrolle	100,00	21,30	10	100,00	17,12	10
	1 nM	86,94	29,61	9	105,90	24,16	9
	10 nM	79,70	21,01	9	75,31	24,36	10
	100 nM	82,62	25,58	9	95,91	17,17	10
	1 μM	78,05	30,70	8	134,50	38,63	10
	10 μM	79,12	31,99	8	98,14	29,56	10
mGC C	Kontrolle	100,00	16,74	7	100,00	12,52	8
	1 nM	147,03	17,91	5	116,90	26,44	6
	10 nM	148,00	33,76	7	86,94	19,22	7
	100 nM	137,23	24,70	7	117,50	21,72	8
	1 μM	153,13	25,15	6	80,28	25,87	6
	10 μM	134,82	23,68	7	69,35	11,31	6

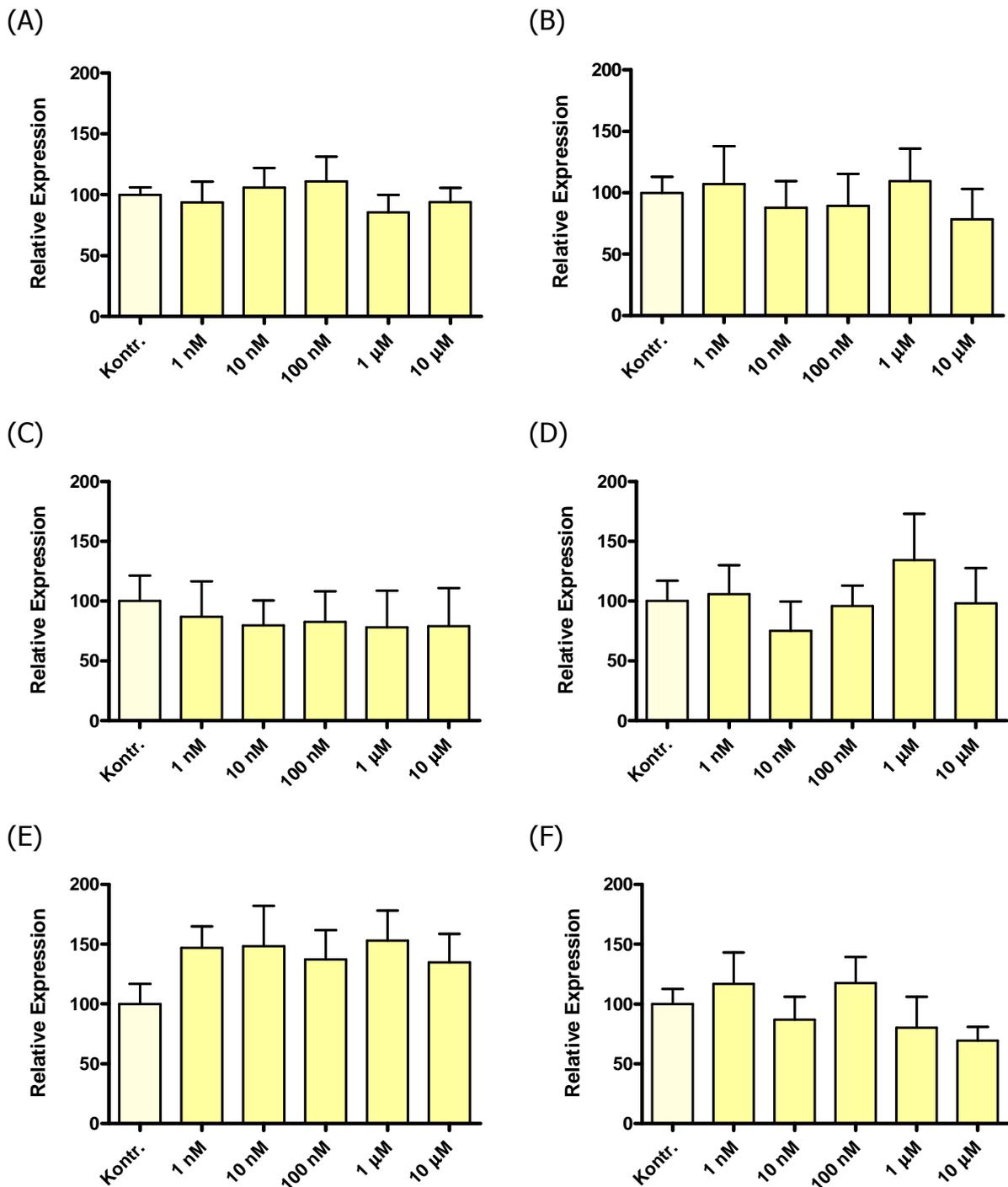


Abb. 14: Real-time RT-PCR-Untersuchungen zur Expression von Isoformen mGC in INS1-Zellen nach Melatoninbehandlung. Die Zellen wurden für 24 h (A, C, E) oder 48 h (B, D, F) mit Melatonin (1 nM bis 10 µM) inkubiert; anschließend konnte die mRNA-Expression der mGC A (A, B), mGC B (C, D) und mGC C (E, F) ermittelt werden. Die Daten repräsentieren den Mittelwert \pm SEM aus mindestens 3 unabhängigen Versuchen mit je $n = 3$ batches.

Um diese Vermutung besser belegen zu können wurden unterstützend zu den molekularbiologischen Analysen Inkubationsversuche unter Einsatz des NO-Donators SNAP (S-Nitroso-N-acetyl-DL-penicillamin) durchgeführt. Dabei sollte zunächst sichergestellt werden, dass in Inkubationsversuchen tatsächlich NO aus der Substanz freigesetzt wird. Für diesen Nachweis wurden INS1-Zellen für 1 h unter Zugabe von 10 µM, 50 µM oder 100 µM SNAP im Medium inkubiert. Mittels GRIESS-Reaktion konnte

erwartungsgemäß gezeigt werden, dass der Nitrit-Gehalt als Messgröße für die NO-Konzentration nach Einwirkung von SNAP Dosis-abhängig steigt. Die SNAP-Applikation von 100 μM bewirkte eine Steigerung des Nitritgehaltes um mehr als das 6-fache des Ausgangswertes der unbehandelten Kontrolle (Abb. 15, Tab. 12).

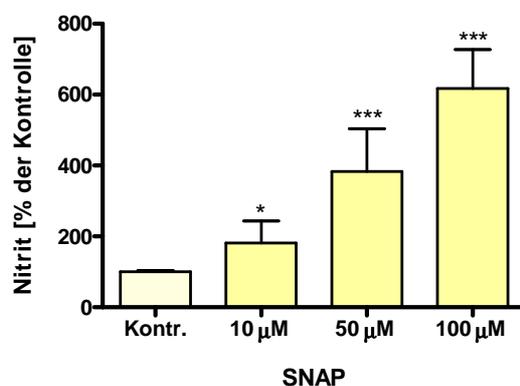


Abb. 15: Freisetzung von Stickstoffmonoxid (NO) in das Inkubationsmedium. INS1-Zellen wurden für 1 h mit dem NO-Donator SNAP (10 μM , 50 μM , 100 μM) inkubiert. Mittels GRIESS-Reaktion wurde der Nitritgehalt im Medium als Messgröße für die NO-Konzentration bestimmt. Die Daten repräsentieren den Mittelwert \pm SEM aus mindestens 2 unabhängigen Versuchen mit je $n = 3$ batches. Die Signifikanztests beziehen sich jeweils auf die 100 %-gesetzte Kontrolle verglichen mit den SNAP-behandelten Proben.

Tab. 12: Mittelwerte (angegeben in Prozent relativ zur 100 %-gesetzten unbehandelten Kontrolle), Standardfehler und Stichprobenumfänge bei Bestimmung der Wirkung von SNAP auf die Nitritkonzentration mittels GRIESS-Reagenz.

Stimulationsansatz	MW	SEM	n
Kontrolle	100,00	4,01	15
SNAP (10 μM)	181,58	62,33	6
SNAP (50 μM)	383,46	120,10	7
SNAP (100 μM)	617,11	110,10	15

Es ist bekannt, dass durch erhöhte NO-Konzentrationen die Aktivität der sGC gesteigert wird und damit die cGMP-Bildung zunimmt. Im Folgenden bestand das Ziel der Untersuchungen darin herauszufinden, ob eine solche NO-induzierte Erhöhung der cGMP-Konzentration durch die Melatoningabe aufgehoben oder vermindert wird. Die Ergebnisse von Inkubationsversuchen mit INS1-Zellen zeigten, dass SNAP (100 μM) über den Weg der NO-Freisetzung nach 1 h Inkubationszeit eine signifikante Steigerung der Aktivität der sGC und folglich die deutliche Erhöhung der cGMP-Gehalte um 20 % bewirkte. Die gleichzeitige Melatoningabe (100 nM) führte zur signifikanten und vollständigen Senkung des SNAP-induzierten Anstiegs der cGMP-Konzentration (Abb. 16, Tab. 13).

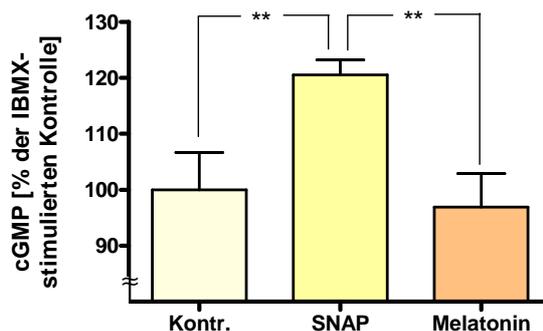


Abb. 16: Effekt des Stickstoffmonoxid-Donators SNAP und Melatonin auf die cGMP-Konzentration in INS1-Zellen. Unter Einsatz von IBMX (1 mM) wurden die Zellen für 1 h mit SNAP (100 μ M) oder SNAP und Melatonin (100 nM) inkubiert. Im Diagramm sind Mittelwerte und Standardfehler von 3 voneinander unabhängig durchgeführten Experimenten mit jeweils n = 4 *batches* dargestellt [109].

Tab. 13: Mittelwerte (angegeben in Prozent relativ zur 100 %-gesetzten IBMX-behandelten Kontrolle), Standardfehler und Stichprobenumfänge bei cGMP-Bestimmungen nach Inkubationsversuchen an INS1-Zellen unter Einsatz von SNAP (100 μ M) und Melatonin (100 nM).

Stimulationsansatz	MW	SEM	n
Kontrolle	100,00	6,67	11
SNAP (100 μ M)	120,50	2,70	24
SNAP + Melatonin (100 nM)	96,89	6,03	20

Um die Annahme zu sichern, dass Melatonin seinen cGMP-senkenden Effekt über eine Modulation der sGC-Aktivität vermittelt, wurden Inkubationsversuche mit INS1-Zellen unter Einsatz der spezifischen sGC-Inhibitoren 1H-(1,2,4)-oxadiazolo-(4,3- α)-quinoxalin-1-on (ODQ) und 4H-8-bromo-1,2,4-oxadiazolo-(3,4d)-benz-(b)(1,4)-oxazin-1-on (NS2028) durchgeführt. Wie bereits gezeigt, führte die Melatoningabe nach 1-stündiger Inkubationszeit zur Inhibierung der IBMX-induzierten Erhöhung der cGMP-Konzentration. Die Präinkubation mit ODQ (10 μ M) oder NS2028 (10 μ M) für 20 min bewirkte eine signifikante Senkung von cGMP mit einer Reduktion um 26 % für ODQ und 23 % für NS2028 gegenüber den Ausgangswerten der allein mit IBMX-stimulierten Kontrolle (Abb. 17, Tab. 14). Die Effekte der Behandlung mit den sGC-Antagonisten und Melatonin sind nicht additiv, was darauf hindeutet, dass Melatonin seine cGMP-senkende Wirkung über die sGC vermittelt.

Tab. 14: Mittelwerte (angegeben in Prozent relativ zur 100 %-gesetzten IBMX-behandelten Kontrolle), Standardfehler und Stichprobenumfänge bei Inkubationsversuchen mit INS1-Zellen unter Einsatz von IBMX (1 mM), Melatonin (100 nM), ODQ (10 μ M) und NS2028 (10 μ M).

Stimulationsansatz	MW	SEM	n
Kontrolle	87,35	78,93	8
IBMX (1 mM)	100,00	96,79	17
IBMX + Melatonin (100 nM)	75,15	65,58	16
IBMX + ODQ (10 μ M)	73,76	66,13	15
IBMX + ODQ + Melatonin	76,40	64,82	13
IBMX + NS2028 (10 μ M)	80,29	77,49	8
IBMX + NS2028 + Melatonin	83,16	76,79	8

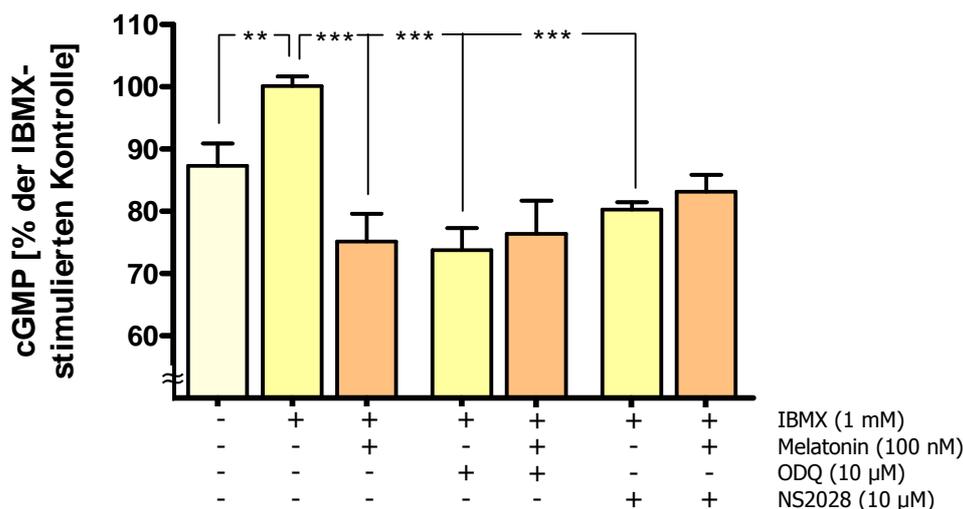


Abb. 17: Einfluss von Melatonin und den spezifischen Inhibitoren der löslichen Guanylatzyklase ODQ und NS2028 auf die cGMP-Konzentration in INS1-Zellen. Der Einsatz des Phosphodiesterase-Hemmers IBMX (1 mM) diente zur Hemmung des cGMP-Abbaus. Die Zellen wurden mit ODQ (10 µM) oder NS2028 (10 µM) für 20 min vorinkubiert; die Melatoninapplikation erfolgte für 1 h. Die Daten repräsentieren den Mittelwert \pm SEM aus mindestens 3 unabhängigen Versuchen mit je $n = 3$ batches [109].

5.5 Zum Einfluss von Melatonin auf die NO-Synthese

Die Aktivierung der sGC wird vor allem durch das membrangängige NO ausgelöst, welches durch die NOS bei der Umwandlung von L-Citrullin in L-Arginin freigesetzt wird. In Kenntnis, dass Melatonin Einfluss auf die NO-Konzentration sowie auf die Aktivität und Expression der NOS nimmt, erhob sich die Frage, ob der Einfluss des Hormons auf die sGC möglicherweise aus veränderten NO-Konzentrationen durch Melatonin resultiert. Zur Klärung dieser Fragestellung wurden zunächst Untersuchungen zur Wirkung von Melatonin auf NO-Konzentrationen in INS1-Zellen durchgeführt. Nach Inkubation mit Melatonin (1 nM bis 10 µM) für 1, 4 oder 24 h konnten mittels GRIESS-Reaktion - durch Messung von Nitrit als stabiles Zerfallsprodukt von NO - Unterschiede in der NO-Konzentration ermittelt werden. Die Ergebnisse zeigen, dass Melatonin nach 1 h Inkubationszeit keine signifikanten Änderungen der NO-Gehalte bewirkte, wohingegen NO nach 4 h und 24 h unabhängig von der Melatoninkonzentration um 7 bis 14 % gegenüber der unstimulierten Kontrolle gesenkt wurde (Abb. 18A, B, C; Tab. 15).

Tab. 15: Mittelwerte (angegeben in Prozent relativ zur 100 %-gesetzten unbehandelten Kontrolle), Standardfehler und Stichprobenumfänge bei Inkubationsversuchen mit INS1-Zellen zur Bestimmung der Nitritkonzentration nach Melatoninbehandlung für 1 h, 4 h oder 24 h.

Melatonin-konzentration	1 h Inkubation			4 h Inkubation			24 h Inkubation		
	MW	SEM	n	MW	SEM	n	MW	SEM	n
Kontrolle	100,00	2,54	12	100,00	1,65	31	100,00	1,69	8
1 nM	101,35	1,24	7	90,18	1,58	15	92,86	1,74	6
10 nM	101,91	1,12	12	91,46	1,28	22	85,73	3,13	5
100 nM	101,49	0,95	12	85,85	1,69	31	85,48	4,75	5
1 µM	100,93	1,66	11	91,00	1,91	15	85,48	0,56	8
10 µM	98,67	2,01	8	93,21	2,22	12	87,08	1,51	7

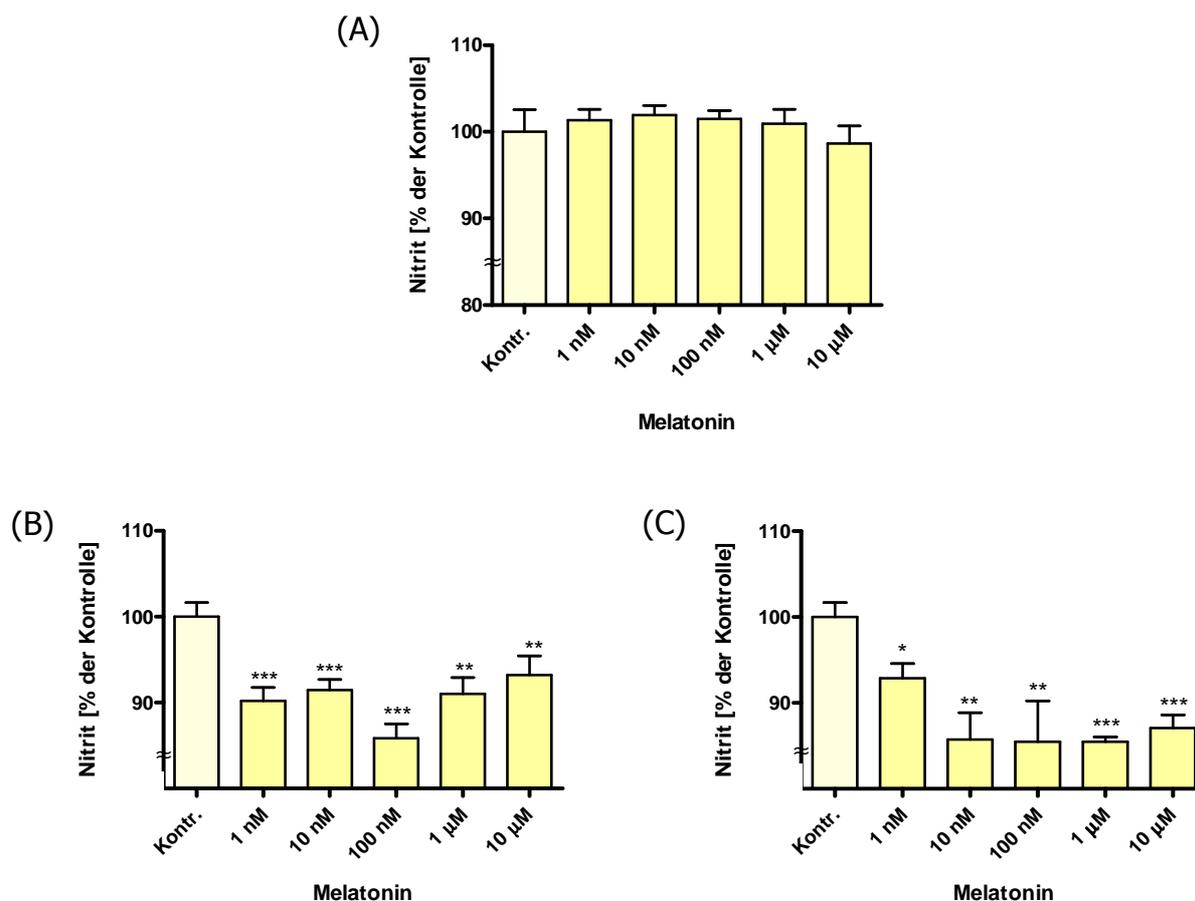


Abb. 18: Einfluss von Melatonin auf die NO-Konzentration. INS1-Zellen wurden für 1 h (A), 4 h (B) oder 24 h (C) mit Melatonin (1 nM bis 10 µM) inkubiert. Mittels GRIESS-Reaktion konnte der Nitritgehalt im Medium als Messgröße für die NO-Konzentration bestimmt werden. Die Daten repräsentieren den Mittelwert \pm SEM aus mindestens 2 unabhängigen Versuchen mit je $n = 3$ batches. Die Signifikanztests beziehen sich jeweils auf die Kontrolle verglichen mit den 100 %-gesetzten Melatonin-behandelten Proben [109].

Zusätzlich wurden Inkubationsversuche zur Ermittlung einer möglichen Beteiligung von Melatoninrezeptoren am NO-senkenden Effekt von Melatonin durchgeführt. Dazu wurden INS1-Zellen mit Luzindol (100 nM, 1 µM) oder 4P-PDOT (10 nM, 100 nM) für 20 min vorbehandelt und anschließend für 4 h mit Melatonin (100 nM) inkubiert. Die Ergebnisse zeigen den bereits in Abbildung 18B dargestellten, NO-senkenden, Effekt von Melatonin. Die Vorinkubation mit den Melatoninrezeptor-Antagonisten war nicht von einer Aufhebung der Melatoninwirkung gefolgt, was dafür spricht, dass die NO-Senkung durch Melatonin nicht über die Melatoninrezeptoren vermittelt wird (Abb. 19A, Tab. 16). Die alleinige Inkubation der Rezeptorantagonisten in den im Experiment verwendeten Konzentrationen führte zu keiner signifikanten Veränderung der NO-Gehalte (Abb. 19B, Tab. 16).

Darüber hinaus wurde ermittelt, ob der NO-senkende Effekt von Melatonin über den Einfluss auf die NOS mediiert wird. Für diese Versuche wurden INS1-Zellen für 20 min mit dem unspezifischen NOS-Inhibitor N^G-monomethyl-L-arginin (L-NMMA, 0,1 mM) vorbehandelt und anschließend für 4 h mit Melatonin in den Konzentrationen 10 nM oder 100 nM inkubiert. Erwartungsgemäß führte die Blockade der NOS mit L-NMMA - ebenso wie die Melatoningabe - zur signifikanten Senkung der NO-Konzentration um 15 % gegenüber der unstimulierten Kontrolle (Abb. 20, Tab. 17). Die NO-senkenden Effekte

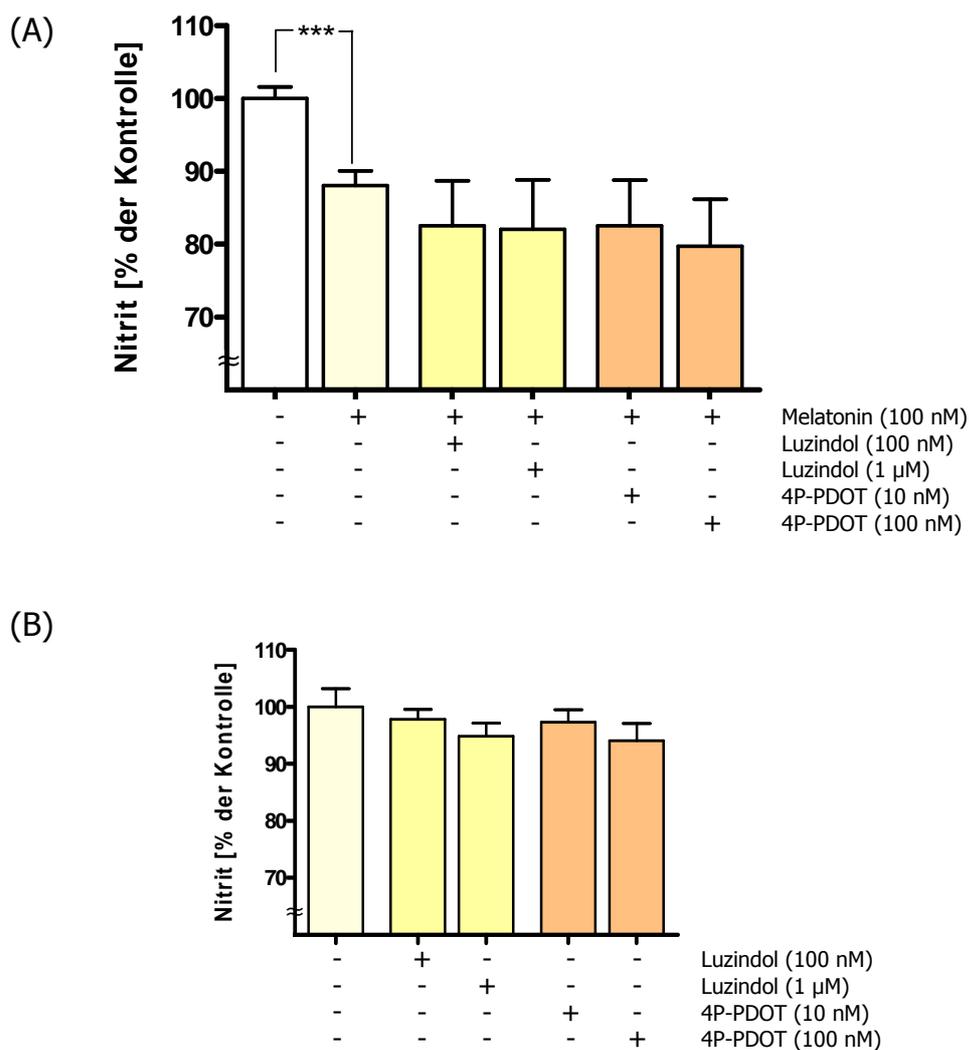


Abb. 19: (A) Wirkung von Melatoninrezeptor-Antagonisten auf den NO-senkenden Effekt von Melatonin. INS1-Zellen wurden mit Luzindol (100 nM, 1 µM) oder 4P-PDOT (10 nM, 100 nM) 20 min vorinkubiert und 4 h mit Melatonin (100 nM) behandelt. Mittels GRIESS-Reaktion wurde der Nitritgehalt im Medium als Messgröße für die NO-Konzentration ermittelt. Im Diagramm sind Mittelwerte und Standardfehler von mindestens 2 voneinander unabhängig durchgeführten Experimenten aufgeführt. (B) Eigenwirkung der Melatoninrezeptor-Antagonisten auf die Insulinsekretion. INS1-Zellen wurden für 4 h mit Luzindol (100 nM, 10 µM) und 4P-PDOT (10 nM, 100 nM) inkubiert (n = 7 bis 12 batches).

Tab. 16: Mittelwerte (angegeben in Prozent relativ zur 100 %-gesetzten unbehandelten Kontrolle), Standardfehler und Stichprobenumfänge bei Inkubationsversuchen mit INS1-Zellen zur Messung der Nitritgehalte unter Einsatz von Melatonin (100 nM), Luzindol (100 nM, 10 µM) und 4P-PDOT (10 nM, 100 nM).

Stimulationsansatz	MW	SEM	n
Kontrolle	100,00	1,56	17
Melatonin (100 nM)	75,15	4,49	16
Melatonin + Luzindol (100 nM)	73,76	3,56	15
Melatonin + Luzindol (1 µM)	76,40	5,31	13
Melatonin + 4P-PDOT (10 nM)	80,29	1,18	8
Melatonin + 4P-PDOT (100 nM)	83,16	2,70	8
Kontrolle	100,00	3,25	12
Luzindol (100 nM)	97,87	1,68	8
Luzindol (1 µM)	94,84	2,32	7
4P-PDOT (10 nM)	97,30	2,24	8
4P-PDOT (100 nM)	94,08	3,04	8

beider Substanzen sind jedoch nicht additiv, so dass vermutet werden kann, dass Melatonin die NO-Konzentration in INS1-Zellen über die Regulation der NOS-Aktivität vermittelt.

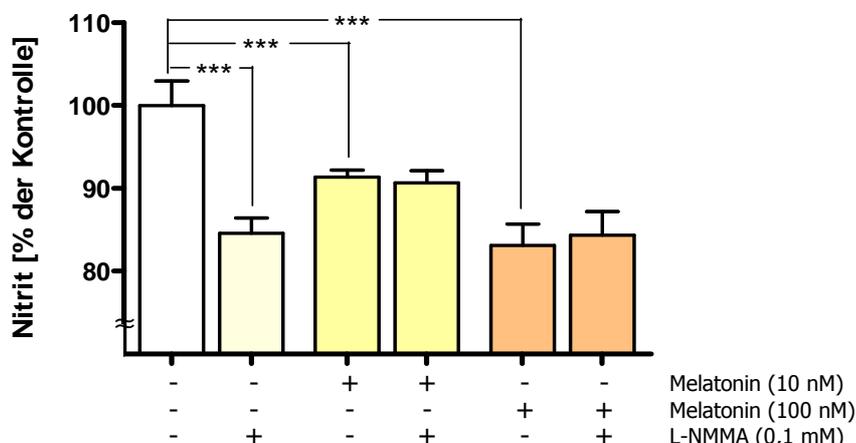


Abb. 20: Einfluss des unspezifischen NOS-Inhibitors L-NMMA auf die NO-senkenden Effekte von Melatonin. Nach Vorinkubation mit L-NMMA (0,1 mM) für 20 min wurden INS1-Zellen 4 h mit Melatonin (10 nM, 100 nM) behandelt. Über die Bestimmung der Nitrit-Konzentration konnten mittels GRIESS-Reaktion indirekt Veränderungen der NO-Gehalte ermittelt werden. Die Daten repräsentieren den Mittelwert \pm SEM aus mindestens 3 unabhängigen Versuchen mit je $n = 4$ batches.

Tab. 17: Mittelwerte (angegeben in Prozent relativ zur 100 %-gesetzten unbehandelten Kontrolle), Standardfehler und Stichprobenumfänge bei Inkubationsversuchen mit INS1-Zellen zur Messung der Nitrit-Konzentration mittels GRIESS-Reaktion nach Behandlung mit Melatonin (10 nM, 100 nM) und L-NMMA (0,1 mM).

Stimulationsansatz	MW	SEM	n
Kontrolle	100,00	2,96	14
L-NMMA (0,1 mM)	84,57	1,83	30
Melatonin (10 nM)	91,34	0,88	32
Melatonin (10 nM) + L-NMMA	90,68	1,45	23
Melatonin (100 nM)	83,11	2,56	14
Melatonin (100 nM) + L-NMMA	84,36	2,85	28

Schließlich wurde die Wirkung von L-NMMA auf die Melatonin-medierte Senkung von cGMP bei INS1-Zellen untersucht. Für diesen Versuch erfolgte die Melatoningabe (100 nM) für 1 h; L-NMMA (0,1 mM, 1 mM) wurde für 20 min vorinkubiert. Die alleinige Gabe des NOS-Inhibitors führte lediglich zu einer leichten Senkung der cGMP-Konzentrationen um 9 % bzw. 11 % gegenüber der unstimulierten Kontrolle. Der cGMP-senkende Effekt von Melatonin konnte durch die unspezifische Hemmung der NOS nicht aufgehoben werden: Auch nach Blockade des Enzyms führte Melatonin zur Senkung der jeweiligen Ausgangswerte nach L-NMMA-Vorinkubation um 76 bzw. 67 % (Abb. 21, Tab. 18).

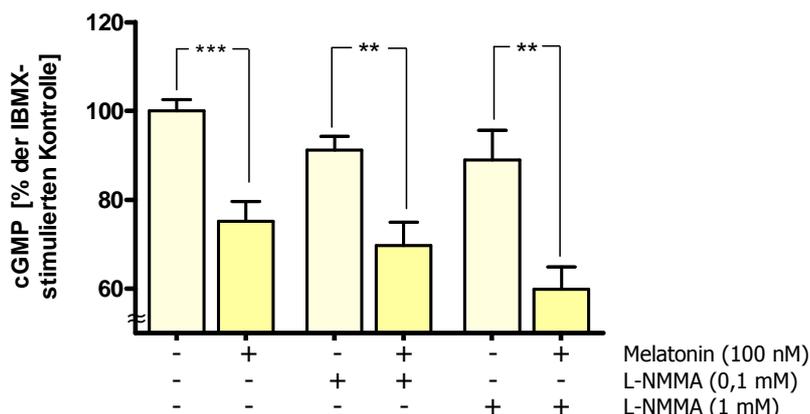


Abb. 21: Bestimmung der cGMP-Konzentration nach Melatoninbehandlung von INS1-Zellen unter Einsatz des unspezifischen Stickstoffmonoxid-Synthase-Inhibitors L-NMMA. Zur Hemmung des cGMP-Abbaus wurde IBMX (1 mM) zugesetzt. INS1-Zellen wurden für 1 h mit Melatonin (100 nM) behandelt; L-NMMA (0,1 mM, 1 mM) wurde für 20 min vorinkubiert. Die Daten repräsentieren den Mittelwert \pm SEM aus mindestens 3 unabhängigen Versuchen mit je $n = 3$ batches [109].

Tab. 18: Mittelwerte (angegeben in Prozent relativ zur 100 %-gesetzten IBMX-behandelten Kontrolle), Standardfehler und Stichprobenumfänge bei Inkubationsversuchen mit INS1-Zellen unter Einsatz von Melatonin (100 nM) und L-NMMA (0,1 mM, 1 mM) zur Bestimmung der cGMP-Konzentration.

Stimulationsansatz	MW	SEM	n
Kontrolle	100,00	2,55	11
Melatonin (100 mM)	75,17	4,49	16
L-NMMA (0,1 mM)	91,19	3,13	11
L-NMMA (0,1 mM) + Melatonin	69,75	5,27	12
L-NMMA (1 mM)	88,98	6,67	7
L-NMMA (1 mM) + Melatonin	59,89	5,00	8

Die Resultate der NO-Messungen zusammenfassend kann festgestellt werden, dass Melatonin in Kurzzeit-Inkubationsexperimenten die cGMP-Konzentration nicht durch Modulation der NO-Konzentration oder der NOS-Aktivität vermittelt; jedoch bei längerer Inkubationsdauer ein NO-senkender Effekt besteht, der nicht über Melatoninrezeptoren, aber offenbar über die NOS mediiert ist.

5.6 Expression der löslichen Guanylatzyklase im Tiermodell

5.6.1 Untersuchungen an Pankreata und Inseln von Melatoninrezeptor-*knockout*-Tieren

Zur Übertragung der Zellversuche auf den tierischen Organismus wurden zusätzlich Untersuchungen zum Einfluss von Melatonin auf die lösliche Guanylatzyklase bei Gesamtpankreata und LANGERHANS-schen Inseln, extrahiert aus Melatoninrezeptor-*knockout*-Mäusen, durchgeführt. Ziel war es herauszufinden, ob Veränderungen in der Expression der löslichen Guanylatzyklase zu unterschiedlichen Tageszeiten bzw. nach Melatoninrezeptor-*knockout* vorliegen. Die Pankreata stammen von tagsüber oder nachts getöteten Tieren (Tag- oder Nachttieren); Inseln standen lediglich von Tagtieren zur Verfügung. Zunächst musste untersucht werden, ob die sGC - in Übereinstimmung zu den Ergebnissen bei der Ratte - auch in Pankreas und Insel der Maus exprimiert ist. Für die $\alpha 2$ -Untereinheit konnte

aufgrund der Sequenzhomologie das gleiche *Primer*-Paar der Ratten-DNA genutzt werden; für die β 1-Untereinheit wurde speziell für die Sequenz der Maus ein *Primer*-Paar synthetisiert. Wie in Abbildung 22 dargestellt, konnten molekularbiologische Untersuchungen zeigen, dass in diesen Geweben die sGC-mRNA auch bei der Maus nachweisbar ist. Sowohl die α 2-Untereinheit mit einer Molekulargröße von 217 bp (Abb. 22A) als auch die β 1-Untereinheit mit 226 bp (Abb. 22C) konnten im Gesamtpankreas und der Insel detektiert werden; Proben von Gehirn und Leber dienten als Referenzen. Eine Restriktionsanalyse bestätigte die Identität der spezifischen PCR-Produkte. Der Einsatz des Restriktionsenzym *Eco*57I führte nach 5 h Inkubation bei 37 °C zur Entstehung von Fragmenten des sGC α 2-Transkriptes mit einer Molekulargröße von 53 und 164 bp (Abb. 22B). Die mRNA der β 1-Untereinheit wurde durch 4-stündige Inkubation mit dem Enzym *Ava*II erwartungsgemäß in Restriktionsfragmente mit 46 und 180 bp geschnitten (Abb. 22D).

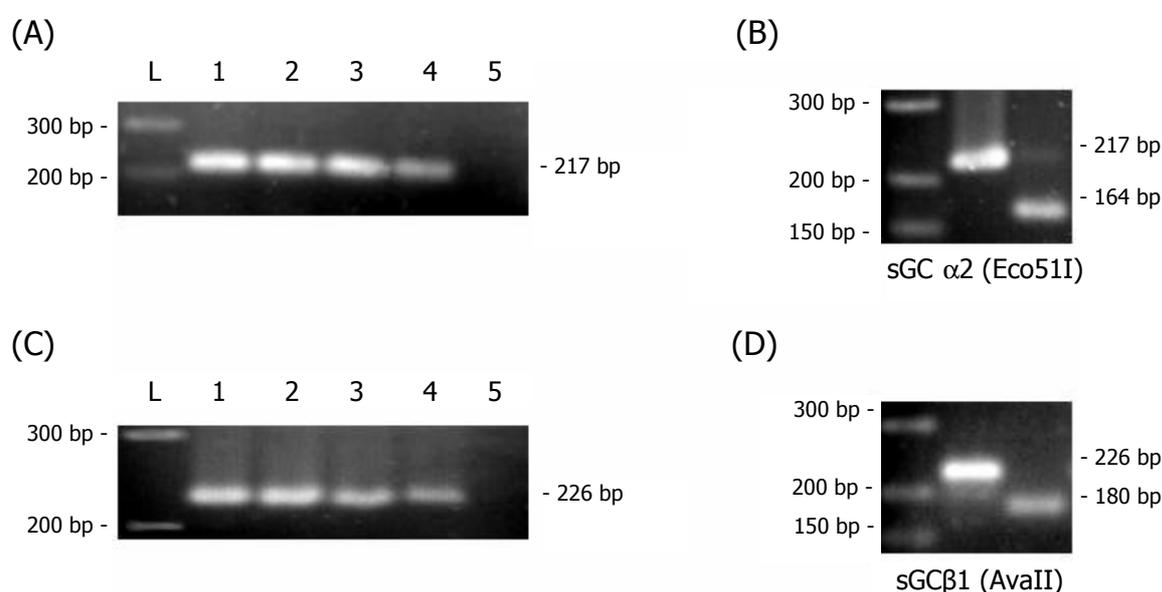


Abb. 22: Nachweis der Genexpression der α 2- und β 1-Untereinheiten der löslichen Guanylatzyklase in Gehirn (1), Leber (2), Gesamtpankreas (3) und LANGERHANSschen Inseln (4) der Maus. Die spezifischen PCR-Produkte mit einem Molekulargewicht von 217 bp für die sGC α 2-Untereinheit (A) und 226 bp für die sGC β 1-Untereinheit (C) konnten in allen Proben nachgewiesen werden. Zur Bestätigung der Identität amplifizierter PCR-Produkte wurde eine Restriktionsanalyse mit den Restriktionsenzymen *Eco*57I für sGC α 2 (B) bzw. *Ava*II für sGC β 1 (D) durchgeführt. Es konnten die erwarteten Fragmente von 53 und 164 bp für das sGC α 2-spezifische Produkt sowie die spezifischen Produkte von 46 und 180 bp für die sGC β 1-spezifische Sequenz detektiert werden. (5) Wasserkontrolle; L, 100-bp-Molekulargewichtsstandard.

Nach dem erfolgreichen Nachweis der sGC-mRNA in Pankreata von Mäusen konnten im Folgenden *real-time* RT-PCR-Untersuchungen zum Expressionsvergleich zwischen Melatoninrezeptor-*knockout*-Tieren und Wildtyp bzw. zwischen Tag- und Nachttieren durchgeführt werden. Die Daten zeigen, dass die sGC α 2-Expression in den Pankreata von Tagtieren bei Vorliegen eines Rezeptor-*knockouts* signifikant erhöht ist. Dieser Effekt ist bei den MT_2 - und Doppel-*knockout*-Tieren besonders deutlich ausgeprägt (Abb. 23A, Tab. 19). In Pankreata von MT_1 -Rezeptor-*knockout*-Mäusen ist die sGC α 2-mRNA um den Faktor 8,6 stärker exprimiert als bei Wildtyp-Mäusen, wohingegen im Vergleich zum Wildtyp die Expression bei $MT_2^{-/-}$ -Tieren um das 33-fache und bei $MT_{1/2}^{-/-}$ -Mäusen um das 36-fache erhöht ist. In

den Pankreata der Nachttiere ist die sGC $\alpha 2$ -Expression ausschließlich bei *knockout* des MT_2 -Rezeptors signifikant erhöht, mit 8-fach höheren Werten als bei den Wildtyp-Mäusen. Bei MT_1 - bzw. Doppel-*knockout*-Tieren konnten lediglich geringgradig - um den Faktor 2 - erhöhte Expressionswerte festgestellt werden (Abb. 23B, Tab. 19). Beim direkten Vergleich der Werte von Tag- und Nachttieren wird deutlich, dass bei Wildtyp-Mäusen kein signifikanter Unterschied in der Expression im Tag-Nacht-Vergleich erkennbar ist und dass die sGC $\alpha 2$ -Expression durch Melatoninrezeptor-*knockout* bei den Tagtieren stärker erhöht wird als bei Nachttieren (Abb. 23A und B, Tab. 19).

Neben Gesamtpankreata von Tag- und Nachttieren wurden separierte LANGERHANSsche Inseln der Melatoninrezeptor-*knockout*-Tiermodelle in die molekularbiologischen Untersuchungen einbezogen. In Übereinstimmung mit den Ergebnissen im gesamten Pankreasgewebe konnte auch direkt bei Inseln von MT_2 - und Doppel-*knockout*-Mäusen eine signifikante Erhöhung der sGC $\alpha 2$ -Expression gegenüber Wildtyp-Tieren festgestellt werden (Abb. 23C, Tab. 19). Dabei ist das sGC $\alpha 2$ -Transkript der Inseln von MT_2 -Rezeptor-*knockout*-Mäusen um das 4,8-fache und bei $MT_{1/2}$ -Tieren um das 2,5-fache stärker exprimiert als bei Inseln von Mäusen ohne Melatoninrezeptor-*knockout*. Da alle Inselseparationen am Tag vorgenommen wurden, war eine Unterscheidung in Tag- und Nachtwerte hier jedoch nicht möglich.

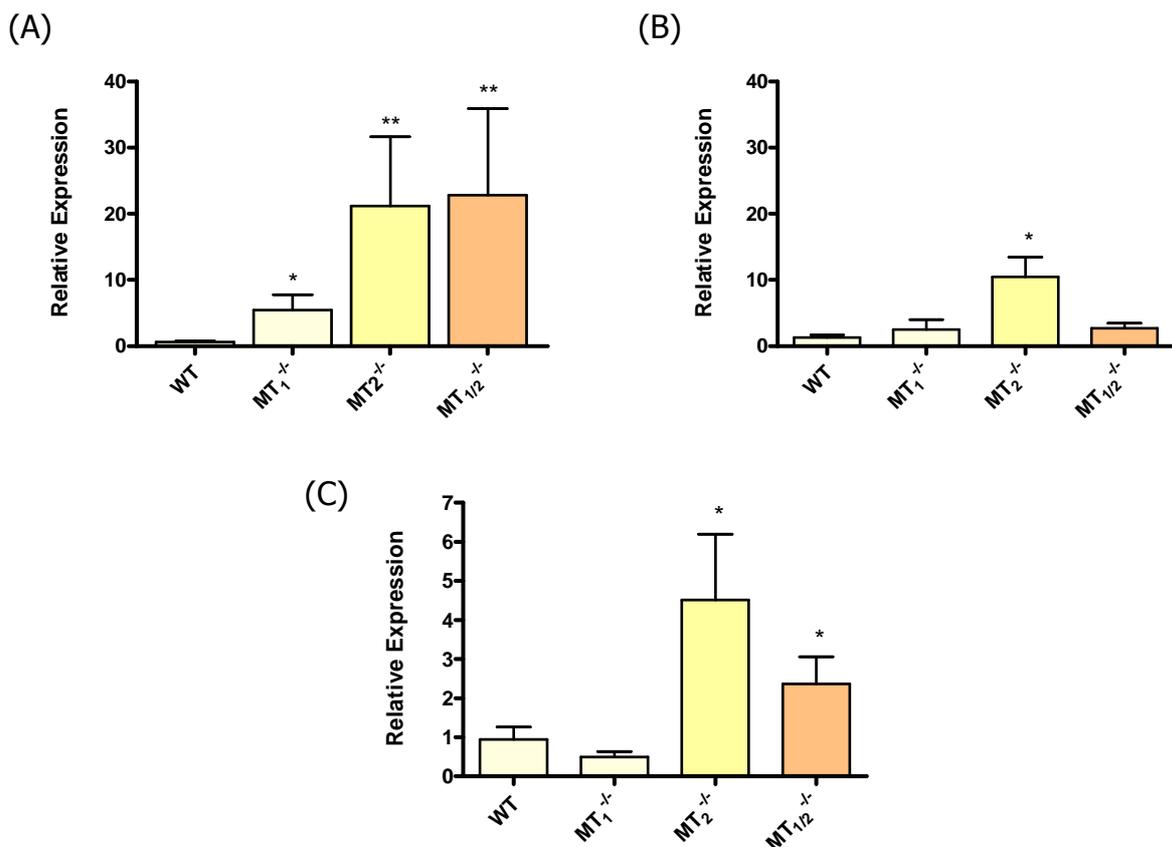


Abb. 23: Expressionsanalyse der löslichen Guanylatzyklase (sGC) in Pankreata und LANGERHANSschen Inseln von Wildtyp- und Melatoninrezeptor-*knockout*-Mäusen. Mittels *real-time* RT-PCR wurde die relative Expression sowohl im gesamten Pankreasgewebe am Tag (A) und in der Nacht (B) als auch in LANGERHANSschen Inseln (C) bei Wildtyp-Mäusen (WT) und Tieren mit MT_1 -Rezeptor-*knockout* ($MT_1^{-/-}$), MT_2 -Rezeptor-*knockout* ($MT_2^{-/-}$) und Doppel-*knockout* ($MT_{1/2}^{-/-}$) bestimmt. Die Daten repräsentieren den Mittelwert \pm SEM mit je $n = 4$ bis 8 bei Untersuchungen der Gesamtpankreata und $n = 9$ bis 15 *batches* für die Expressionsanalyse der Inseln.

Tab. 19: Mittelwerte, Standardfehler und Stichprobenumfänge bei Untersuchungen zur sGC-mRNA-Expression in Gesamtpankreata und LANGERHANSschen Inseln von Wildtyp (WT)- und Melatoninrezeptor-*knockout*-Mäusen.

Tiermodell	Pankreas						Insel		
	Tag			Nacht					
	MW	SEM	n	MW	SEM	n	MW	SEM	n
WT	0,63	0,13	7	1,31	0,39	6	0,94	0,32	12
MT1 ^{-/-}	5,46	2,34	5	2,53	1,45	8	0,49	0,15	15
MT ₂ ^{-/-}	21,20	10,44	5	10,45	3,00	4	4,51	1,69	9
MT _{1/2} ^{-/-}	22,82	13,08	6	2,69	0,76	6	2,36	0,70	11

5.6.2 Expressionsvergleich der löslichen Guanylatzyklase bei Inseln stoffwechselunauffälliger und Typ2-diabetischer Ratten

Der enge Zusammenhang zwischen Melatonin und Insulin, die tagesrhythmische Ausschüttung von Insulin sowie Besonderheiten bei Diabeteserkrankung wurde zurückliegend in zahlreichen Studien belegt. Zudem deuten Ergebnisse einiger Versuche darauf hin, dass der cGMP-Signalweg einer Rhythmizität unterliegt.

Unter Nutzung von pankreatischen Inseln stoffwechselunauffälliger Wistar(WR)-Ratten und Typ2-diabetischer Goto-Kakizaki(GK)-Ratten, extrahiert am Tag oder in der Nacht, wurden mittels *real-time* RT-PCR quantitative Unterschiede der mRNA-Expression von GC-Isoformen bestimmt. Es konnten sowohl bei einem Tag-Nacht-Vergleich als auch bei einer Gegenüberstellung der Werte von WR- und GK-Ratten deutliche und teilweise signifikante Unterschiede festgestellt werden (Abb. 24, Tab. 20). Die mRNA der mGC A (Abb. 24A) war bei beiden Tiermodellen in den nachts gewonnenen Inseln höher exprimiert als bei Inseln von Tagtieren. Dieser Effekt war bei GK-Tieren signifikant mit einer Erhöhung der mRNA-Expression um das 2,4-fache in der Nacht. Beim Vergleich der mRNA-Expression von WR- und GK-Ratten traten keine signifikanten Unterschiede auf.

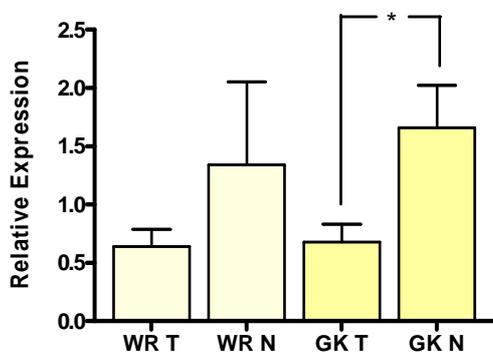
Die mRNA-Expression der mGC B (Abb. 24B), mGC C (Abb. 24C) und sGC α 2 (Abb. 24D) vergleichend, konnten einige Gemeinsamkeiten festgestellt werden: In Inseln der WR-Ratten ist die mRNA am Tag stärker exprimiert als in der Nacht. Bei der sGC α 2-Isoform ist der Unterschied signifikant; die relative Expression ist am Tag 15-fach höher als in der Nacht. Demgegenüber ist bei GK-Tieren die mRNA-Expression nachts deutlich höher als am Tag.

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die mRNA-Expression der mGC C in Inseln von GK-Ratten unabhängig vom Tageszeitpunkt gegenüber den Werten der WR-Ratten deutlich erhöht ist. Das Transkript ist bei den diabetischen Tieren am Tag um das Vierfache stärker exprimiert; in der Nacht zeigt sich eine mehr als 30-fache Erhöhung der mGC C-Expression bei GK-Tieren gegenüber WR-Ratten. Bei der mRNA der mGC B- und sGC α 2-Isoformen tritt dieser Effekt wiederum lediglich beim Vergleich der Nachtwerte auf. Im Gegensatz zur mGC C-mRNA ist bei WR-Ratten das Expressionsniveau der mGC B- und sGC α 2-Isoform am Tag deutlich höher als in der Nacht. So ist bei WR-Ratten die mGC B-mRNA-Expression in der Nacht gegenüber den Tagwerten um 87 % und das Transkript der sGC α 2 um 93 % erniedrigt.

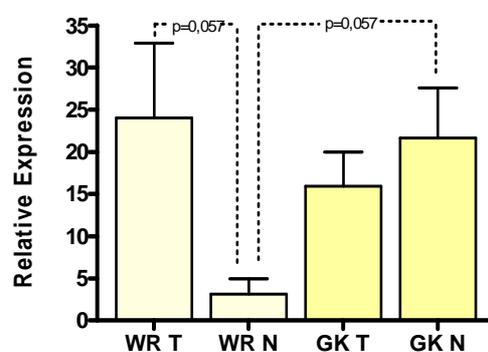
Tab. 20: Mittelwerte, Standardfehler und Stichprobenumfänge der Expressionsuntersuchungen verschiedener Guanylatzyklase-Isoformen bei WR- und GK-Ratten in Abhängigkeit von der Tageszeit.

Guanylatzyklase	WR-Ratten						GK-Ratten					
	Tag			Nacht			Tag			Nacht		
	MW	SEM	n	MW	SEM	n	MW	SEM	n	MW	SEM	n
mGC A	0,64	0,15	4	1,34	0,71	3	0,68	0,16	4	1,66	0,36	4
mGC B	26,06	8,81	4	3,13	1,81	3	15,95	4,02	4	21,63	6,00	4
mGC C	0,06	0,03	4	0,03	0,01	3	0,25	0,08	4	0,83	0,14	4
sGC α 2	47,18	12,56	4	3,08	0,65	3	21,14	3,74	4	41,78	8,30	4

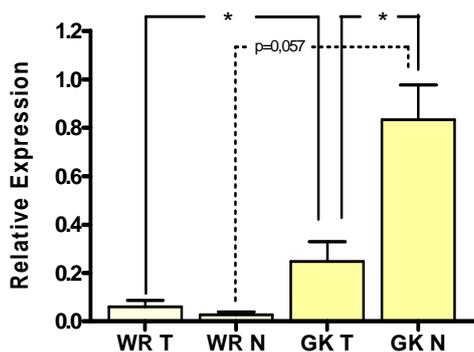
(A) **mGC A**



(B) **mGC B**



(C) **mGC C**



(D) **sGC α 2**

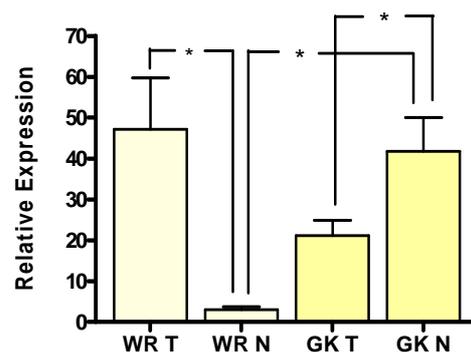


Abb. 24: Quantitative Bestimmung von Tag-Nacht-Unterschieden der Guanylatzyklase(GC)-mRNA in LANGERHANSschen Inseln, isoliert aus WR- und GK-Ratten. Die Daten zeigen signifikante Unterschiede der mRNA- Expression der Isoformen mGC A (A), mGC B (B), mGC C (C) und sGC α 2 (D) im Vergleich von Tag(T)- und Nacht(N)-Werten bzw. WR- und GK-Ratten (n = 4, [108]).

5.6.3 Untersuchungen zur sGC-Expression in Rattenpankrea nach Melatoningabe über das Trinkwasser

Zusätzlich zu den Tag-Nacht-Vergleichen wurden für Expressionsuntersuchungen der sGC-mRNA Pankrea von WR- und GK-Ratten genutzt, welche für neun Wochen über das Trinkwasser erhöhte Mengen Melatonin aufgenommen hatten. Die Melatonin-Plasmawerte waren durch die Substitution bei den behandelten Tieren signifikant erhöht (Daten nicht publiziert). Diese *real-time* RT-PCR-Untersuchungen zeigen Veränderungen der sGC-Expression im Pankreas bei Typ2-Diabetes bzw. nach Melatoningabe (Abb. 25, Tab. 21). Zunächst kann festgestellt werden, dass in Pankrea von GK-Ratten die sGC-Expression gegenüber stoffwechselgesunden WR-Ratten signifikant um 84 % erniedrigt ist. Des Weiteren führt die Melatoningabe bei WR-Ratten über das Trinkwasser zu einer Verringerung der sGC-Expression um 36 %. Dieser Effekt tritt bei GK-Ratten in umgekehrter Weise auf - nach Melatonin-substitution ist die sGC im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe signifikant - um das 3-fache - stärker exprimiert.

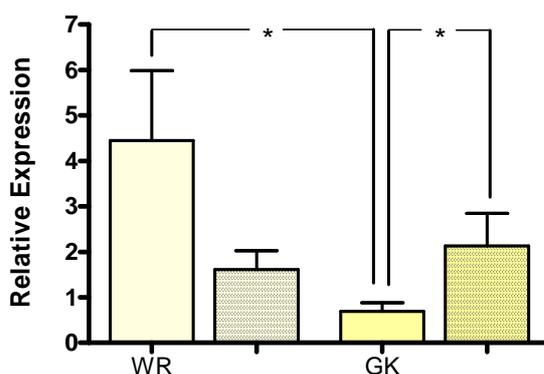


Abb. 25: Relative Expression der sGC-Expression in Pankrea von bei WR- und GK-Ratten nach Melatoninbehandlung (gepunktete Balken) im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe (leere Balken). Die Daten repräsentieren Mittelwerte und Standardfehler mit je n = 4 bis 6 Tieren.

Tab. 21: Mittelwerte, Standardfehler und Stichprobenumfänge beim Expressionsvergleich der sGC-mRNA in Pankrea von WR- und GK-Ratten mit und ohne Melatoninbehandlung.

Tierstamm	Melatoningabe	MW	SEM	n
WR	-	4,45	1,53	4
WR	+	1,61	0,41	5
GK	-	0,69	0,19	6
GK	+	2,13	0,72	5

5.7 Vergleich der sGC-Expression in Pankreata stoffwechselunauffälliger und Typ2-diabetischer Patienten

Im Anschluss an die Untersuchungen der GC-Expression in Inseln von WR- und GK-Ratten wurde die mRNA-Expression der sGC $\alpha 2$ als offenbar bedeutende Isoform im Zusammenhang zwischen Melatonin und dem cGMP-Signalweg in Pankreata stoffwechselunauffälliger und Typ2-diabetischer Patienten quantifiziert. Für diesen Vergleich war es zunächst notwendig zu untersuchen, ob die lösliche Guanylatzyklase in Analogie zu den Spezies Ratte und Maus auch im menschlichen Pankreas-gewebe exprimiert ist. Wie in Abbildung 26 dargestellt, konnte mittels PCR, Gelelektrophorese und Restriktionsanalyse nachgewiesen werden, dass auch im menschlichen Gesamtpankreas sowie speziell in der LANGERHANSschen Insel die Untereinheiten der sGC exprimiert sind. Als Vergleichsprobe diente DNA, welche aus humanen Neuroblastomzellen (SH-SY5Y-Zellen) gewonnen wurde. Die $\alpha 2$ -Untereinheit wurde unter Nutzung der Ratten-*Primer* mit einer Molekulargröße von 217 bp detektiert; der Nachweis der spezifischen Restriktionsfragmente mit 53 und 164 bp nach Inkubation mit dem Enzym Eco57I für 5 h bei 37 °C war ebenfalls erfolgreich (Abb. 26A und B).

Wie in Abbildung 26 gezeigt, konnte mit Einsatz der Maus-spezifischen *Primer* weiterhin die $\beta 1$ -Untereinheit mit 226 bp (Abb. 26C) im humanen Gesamtpankreas und der Insel nachgewiesen werden. Auch in diesem Fall konnte unter Nutzung des Restriktionsenzymes AvaII und einer Inkubationszeit

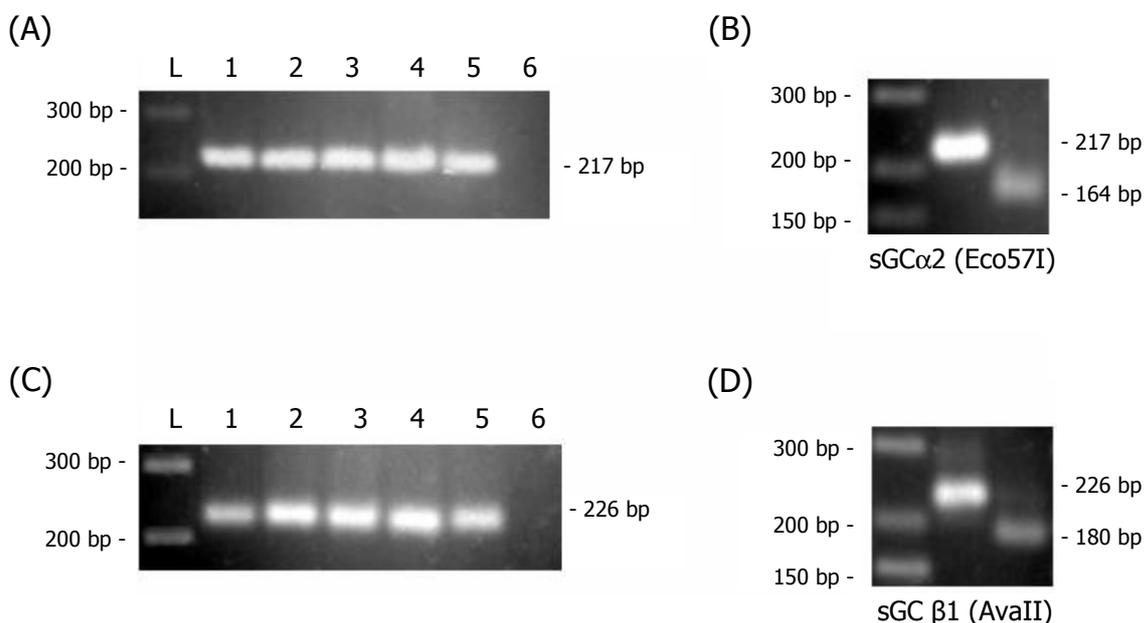


Abb. 26: Nachweis der Genexpression der $\alpha 2$ - und $\beta 1$ -Untereinheiten der löslichen Guanylatzyklase in humanen Neuroblastomzellen (SH-SY5Y, 1), menschlichem Gesamtpankreas (2 bis 4) und LANGERHANSschen Inseln (5). Die Pankreasgewebeprobe stammen von Patienten nach operativer Resektion aufgrund einer Pankreaserkrankung (2, 3) oder einer Standard-Pankreasgewebeprobe (4). Bei allen Proben konnte sowohl die Expression der sGC $\alpha 2$ -Untereinheit (A, 217 bp) als auch der sGC $\beta 1$ -Untereinheit (C, 226 bp) nachgewiesen werden. Die Inkubation mit dem Enzym Eco57I führte zur spezifischen Restriktion des PCR-Produktes für die sGC $\alpha 2$ -Untereinheit in Fragmente mit einer Molekulargröße von 53 und 164 bp. Nach Einsatz des Restriktionsenzymes AvaII konnten die erwarteten Fragmente des sGC $\beta 1$ -spezifischen Produktes von 46 und 180 bp detektiert werden. 6, Wasserkontrolle; L, 100-bp-Molekulargewichtsstandard.

von 4 h bei 37 °C die Identität des spezifischen PCR-Produktes bestätigt werden; die mRNA der β 1-Untereinheit wurde erwartungsgemäß in Restriktionsfragmente von 46 und 180 bp geschnitten (Abb. 26D).

Für den Expressionsvergleich der sGC bei stoffwechselunauffälligen und diabetischen Patienten mittels *real-time* RT-PCR wurden - in Analogie zu den Untersuchungen an INS1-Zellen und Mausproben - die sGC α 2-spezifischen *Primer* verwendet. Als interner Standard zur Normierung der Patientenproben diente die aufbereitete RNA des gesunden Pankreasgewebes (siehe Abschnitt 3.4). Die Ergebnisse konnten keine signifikanten Unterschiede in der sGC α 2-Expression bei stoffwechselunauffälligen und Typ2-diabetischen Patienten erkennen lassen; der Mittelwert betrug den stoffwechselunauffälligen 3,25 und bei Typ2-diabetischen Patienten 3,13 (Abb. 27, Tab. 22). Eine Aufschlüsselung der Ergebnisse in Tag- und Nachtwerte war im Gegensatz zu den Bestimmungen an Inseln der WR- und GK-Ratten beim Patientenmaterial nicht möglich.

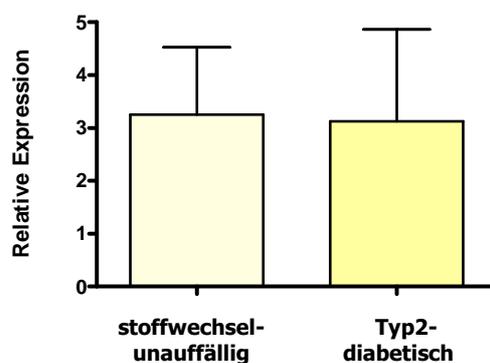


Abb. 27: *Real-time* RT-PCR-Untersuchung zur mRNA-Expression der sGC α 2-Untereinheit der löslichen Guanylatzyklase in Pankreata stoffwechselunauffälliger (n = 11) und Typ2-diabetischer (n = 5) Patienten.

Tab. 22: Mittelwerte, Standardfehler und Stichprobenumfänge im Vergleich der Expression der sGC-mRNA bei stoffwechselunauffälligen und Typ2-diabetischen Patienten.

Stoffwechselunauffällige Patienten			Typ2-diabetische Patienten		
MW	SEM	n	MW	SEM	n
3,25	1,27	11	3,13	1,74	5

5.8 Zur Bedeutung der cGMP-Signalkaskade für die Insulinsekretion

5.8.1 Wirkung von 8-Br-cGMP auf die Insulinfreisetzung

Im nächsten Schritt folgten Untersuchungen zur Klärung der Frage, ob veränderte cGMP-Konzentrationen in der pankreatischen β -Zelle Einfluss auf die Insulinsekretion nehmen. Dafür wurden INS1-Zellen für 1 bzw. 8 h mit dem membrangängigen cGMP-Analogon 8-Br-cGMP (10 μ M bis 2 mM) bei einem Glukosegehalt von 11,6 mM im Medium stimuliert. Die Ergebnisse zeigen, dass 8-Br-cGMP die Insulinsekretion signifikant und in Abhängigkeit von Dosis und Inkubationszeit erhöht (Abb. 28, Tab. 23). Nach 1 h Einwirkung war die Insulinfreisetzung bei einer 8-Br-cGMP-Konzentration von 0,01 mM gegenüber der unbehandelten Kontrolle um 13 % erhöht und nahm bei Einsatz von 2 mM des cGMP-Analogons bis zu 140 % des Ausgangswertes zu. Vermutlich bedingt durch die Akkumulation des *second messengers* konnte nach 8 h Inkubationszeit bereits bei einer Dosis von 0,01 mM 8-Br-cGMP eine signifikante Steigerung der Insulinsekretion um 24 % und bei Einsatz der Konzentrationen von 0,1 mM bis 2 mM eine Erhöhung um etwa 40 % gegenüber dem Basalwert festgestellt werden. Ähnliche Resultate wurden bei Vorversuchen mit niedrigerem Glukosegehalt von 5,6 oder 8,6 mM im Medium ermittelt; die Effekte waren jedoch weniger signifikant als bei höheren Glukosekonzentrationen (Daten nicht gezeigt).

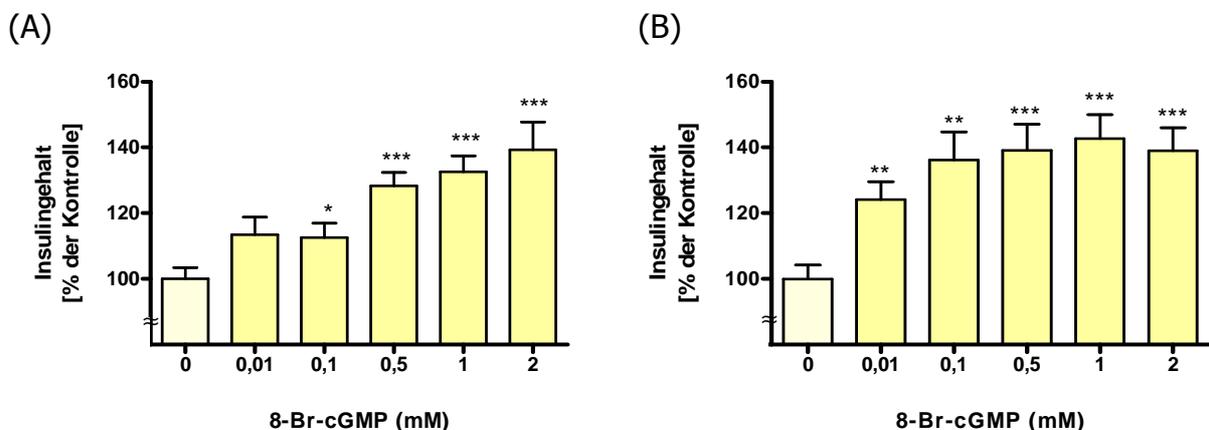


Abb. 28: Untersuchungen zum Einfluss veränderter cGMP-Konzentrationen auf die Insulinsekretion bei INS1-Zellen. Nach Inkubation der Zellen mit dem membrangängigen cGMP-Analogon 8-Br-cGMP (10 μ M bis 2 mM) für 1 h (A) bzw. 8 h (B) wurde die Insulinkonzentration im Überstand mittels *RZA* bestimmt. Der Glukosegehalt im Medium betrug 11,6 mM. Im Diagramm sind Mittelwerte und Standardfehler von 3 voneinander unabhängig durchgeführten Experimenten mit jeweils $n = 4$ *batches* dargestellt. Die Signifikanztests beziehen sich jeweils auf die 100 %-gesetzte Kontrolle verglichen mit den 8-Br-cGMP-behandelten Proben [108].

Tab. 23: Mittelwerte (angegeben in Prozent relativ zur 100 %-gesetzten unbehandelten Kontrolle), Standardfehler und Stichprobenumfänge bei Untersuchungen an INS1-Zellen unter Stimulation mit 8-Br-cGMP für 1 h oder 8 h.

8-Br-cGMP Konzentration	1 h Inkubation			8 h Inkubation		
	MW	SEM	n	MW	SEM	n
Kontrolle	100,00	3,42	11	100,00	4,16	14
0,01 mM	113,41	5,42	12	124,19	5,39	14
0,1 mM	112,59	4,30	12	136,19	8,55	14
0,5 mM	128,32	4,04	12	139,13	7,96	14
1 mM	132,62	4,90	12	142,72	7,33	14
2 mM	139,30	8,46	11	139,06	6,93	14

5.8.2 Beteiligung der Proteinkinase G an der Insulinsekretionskaskade

Die Proteinkinase G (PKG) ist ein bedeutender Bestandteil der cGMP-Signaltransduktionskaskade. Es ist nachgewiesen worden, dass die PKG im Pankreas und auch speziell in pankreatischen β -Zellen existiert; Hinweise für die Bedeutung des Proteins für die Insulinsekretion sind nicht bekannt. Die eigenen Inkubationsversuche sollten Aufschluss über eine mögliche Beteiligung an der Insulinsekretionskaskade geben, um Möglichkeiten der Melatoninwirkung auf die Insulinsekretion durch Senkung der cGMP-Gehalte aufzudecken.

Wie in Abbildung 29 und Tabelle 24 dargestellt, konnte der bereits erwähnte Insulinsekretion-fördernde Effekt des membrangängigen cGMP-Analogons 8-Br-cGMP bei Inkubation in den Konzentrationen von 0,5 mM bzw. 1 mM nachgewiesen werden. Die Daten zeigen, dass die alleinige Blockade der PKG mit dem spezifischen Antagonisten Rp-8-pCPT-cGMPs (10 μ M, 100 μ M) bei 8-stündiger Inkubation zu einer geringfügigen Erhöhung der Insulinfreisetzung führt. Es konnte weiterhin festgestellt werden, dass die Blockade der PKG bei gering erhöhtem cGMP die Insulin-fördernde cGMP-Wirkung nicht beeinflusst; bei höheren cGMP-Konzentrationen die Blockade der PKG jedoch zur Hemmung der Insulinsteigerung durch cGMP führt. Dieser Effekt konnte bereits nach 1 h Inkubationszeit nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt) und erreicht nach einer längeren Inkubationsdauer von 8 h (Abb. 29) signifikante Werte. So wurde nach Gabe von 1 mM 8-Br-cGMP und Hemmung der PKG die basale Insulinsekretion lediglich um 5 bzw. 7 % gesteigert, wohingegen das cGMP-Analogon ohne den Einsatz von Rp-8-pCPT-cGMPs zu einer Erhöhung der Insulinfreisetzung um 17 % führte. Ähnliche Resultate konnten auch bei Versuchen mit niedrigerem Glukosegehalt von 5,6 mM im Medium festgestellt werden (Daten nicht gezeigt); die Effekte waren jedoch bei erhöhter Glukosekonzentration stärker ausgeprägt. Aus diesen Ergebnissen kann gefolgert werden, dass die PKG erst bei höherer cGMP-Konzentration aktiviert wird um konsekutiv die Insulinfreisetzung zu erhöhen.

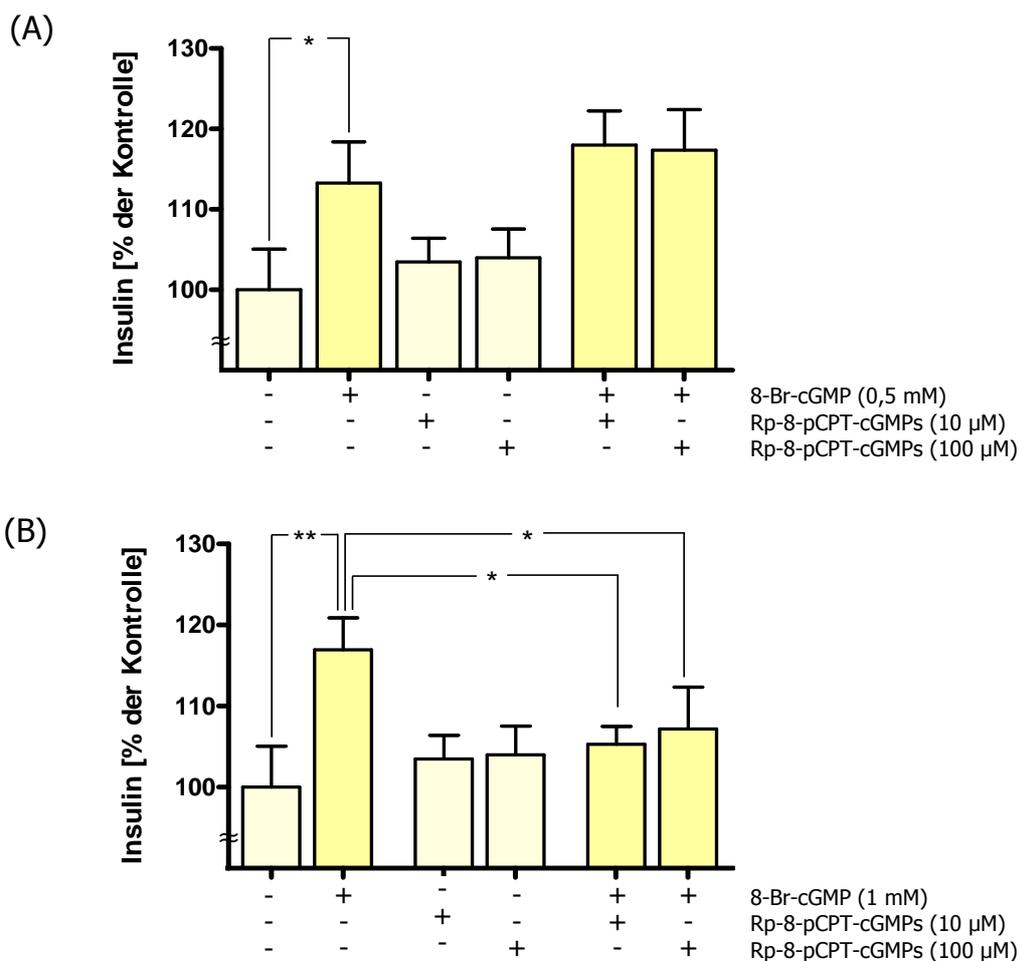


Abb. 29: Wirkung von 8-Br-cGMP und Rp-8-pCPT-cGMPs auf die Insulinsekretion in INS1-Zellen. Die Zellen wurden für 8 h mit 8-Br-cGMP in den Konzentrationen 0,5 mM (A) oder 1 mM (B) behandelt. Der spezifische PKG-Blocker Rp-8-pCPT-cGMPs (10 µM, 100 µM) wurde für 30 min vorinkubiert. Der Glukosegehalt im Medium betrug 11,6 mM. Die Daten repräsentieren den Mittelwert \pm SEM aus 3 voneinander unabhängig durchgeführten Experimenten mit je $n = 4$ batches.

Tab. 24: Mittelwerte (angegeben in Prozent relativ zur 100 %-gesetzten unbehandelten Kontrolle), Standardfehler und Stichprobenumfänge bei Untersuchungen an INS1-Zellen unter Einsatz von 8-Br-cGMP (0,5 mM, 1 mM) und Rp-8-pCPT-cGMPs (10 µM, 100 µM) zur Messung der Insulinkonzentrationen.

Stimulationsansatz	MW	SEM	n
Kontrolle	100,00	5,04	12
Rp-8-pCPT-cGMPs (10 µM)	103,48	2,95	12
Rp-8-pCPT-cGMPs (100 µM)	103,98	3,57	12
8-Br-cGMP (0,5 mM)	113,28	5,09	12
8-Br-cGMP (0,5 mM) + Rp-8-pCPT-cGMPs (10 µM)	118,00	4,24	12
8-Br-cGMP (0,5 mM) + Rp-8-pCPT-cGMPs (100 µM)	117,34	5,08	12
8-Br-cGMP (1 mM)	116,96	3,93	12
8-Br-cGMP (1 mM) + Rp-8-pCPT-cGMPs (10 µM)	105,30	2,21	12
8-Br-cGMP (1 mM) + Rp-8-pCPT-cGMPs (100 µM)	107,19	5,15	12

5.8.3 Ergebnisse zur Bedeutung von CNG(*cyclic nucleotide-gated*)-Kanälen in pankreatischen β -Zellen

Mit dem Nachweis der mRNA von CNG-Kanal-Untereinheiten in der INS1-Zelle (siehe Abschnitt 5.3) stellte sich die Frage, ob CNG-Kanäle als Komponenten des cGMP-Transduktionsweges auch an der Signalkaskade zur Insulinfreisetzung beteiligt sind bzw. ob Melatonin Einfluss auf die Funktion dieser Kationentransporter nimmt. Zur Klärung dieser Fragestellungen wurde zunächst der CNG-Kanal-spezifische Antagonist *L-cis*-Diltiazem (LCD) in die zellphysiologische Untersuchung einbezogen. INS1-Zellen wurden für 1 h mit dem membrangängigen cGMP-Analogon 8-Br-cGMP (0,5 mM, 1 mM) behandelt; LCD (100 μ M, 500 μ M) wurde 30 min vorinkubiert. Es konnte der bereits untersuchte, Insulinsekretion-fördernde Effekt des membrangängigen cGMP-Analogons 8-Br-cGMP (0,5 mM, 1 mM) nachgewiesen werden. Die Blockade der CNG-Kanäle mit LCD führte zur signifikanten Senkung der Insulinfreisetzung um etwa 30 % gegenüber der unstimulierten Kontrolle. Nach Hemmung der CNG-Kanäle hatte 8-Br-cGMP keinen steigernden Effekt mehr auf die Insulinsekretion (Abb. 30, Tab. 25). Daraus kann gefolgert werden, dass CNG-Kanäle bei INS1-Zellen an der Regulation der Insulinsekretionskaskade sowie speziell an der Insulin-steigernden Wirkung von cGMP beteiligt sind.

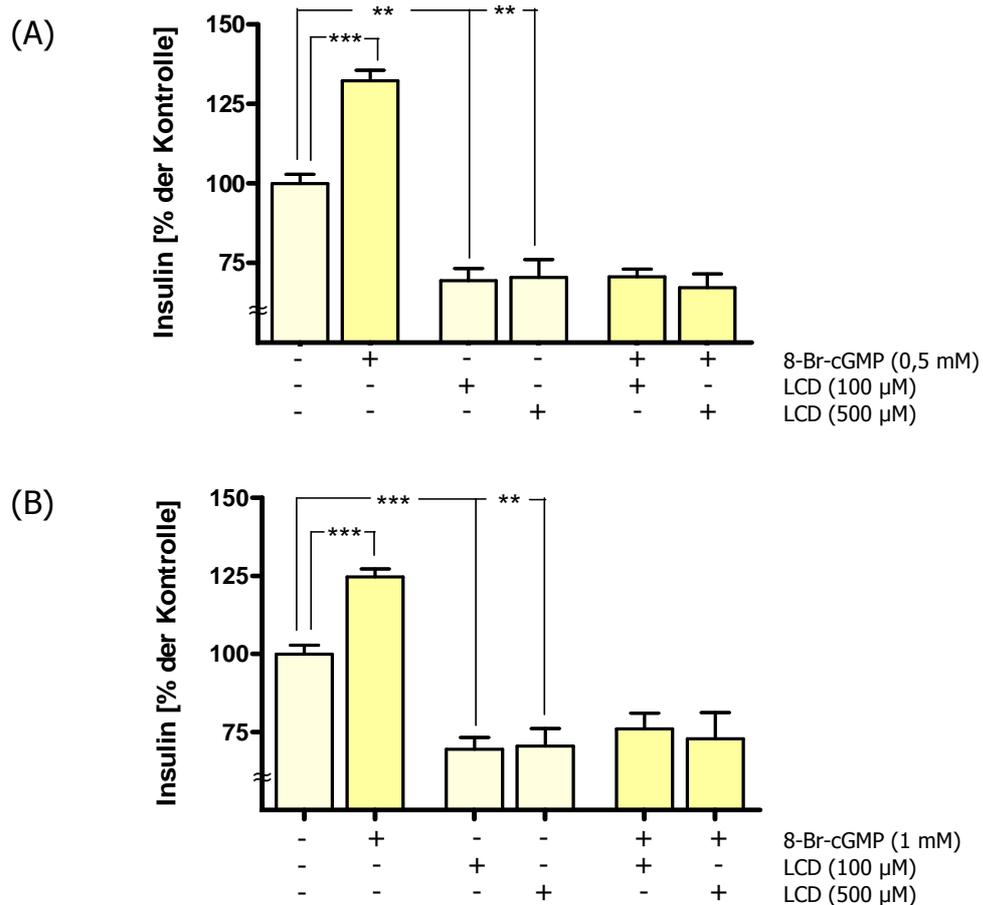


Abb. 30: Beteiligung des CNG-Kanals in der Insulinsekretionskaskade bei INS1-Zellen. Die Zellen wurden für 1 h mit dem 8-Br-cGMP - mit oder ohne 30-minütiger Vorinkubation des spezifischen CNG-Kanal-Antagonisten LCD (100 μ M, 500 μ M) behandelt. 8-Br-cGMP wurde in den Konzentrationen 0,5 mM (A) und 1 mM (B) eingesetzt. Der Glukosegehalt im Medium betrug 5,6 mM. Die Daten repräsentieren den Mittelwert \pm SEM mit je $n = 8$ batches.

Tab. 25: Mittelwerte, Standardfehler und Stichprobenumfänge bei Inkubationsversuchen mit INS1-Zellen zur Bestimmung der Insulinkonzentration nach Behandlung mit 8-Br-cGMP (0,5 mM, 1 mM) und LCD (100 μ M, 500 μ M) für 1 h.

Stimulationsansatz	MW	SEM	n
Kontrolle	100,00	2,87	7
LCD (100 μ M)	69,45	3,88	8
LCD (500 μ M)	70,43	5,70	8
8-Br-cGMP (0,5 mM)	132,23	3,30	7
8-Br-cGMP (0,5 mM) + LCD (100 μ M)	70,70	2,40	8
8-Br-cGMP (0,5 mM) + LCD (500 μ M)	67,33	4,19	8
8-Br-cGMP (1 mM)	124,67	2,66	8
8-Br-cGMP (1 mM) + LCD (100 μ M)	76,03	4,99	8
8-Br-cGMP (1 mM) + LCD (500 μ M)	72,90	8,34	8

Molekularbiologische Untersuchungen zeigten ferner, dass die Melatoninbehandlung Einfluss auf die mRNA-Expression des CNG-Kanals nimmt. Für diesen Versuch wurden INS1-Zellen für 24 bzw. 48 h mit Melatonin in Konzentrationen von 1 pM bis 10 μ M inkubiert; anschließend konnte mittels *real-time* RT-PCR die Expression des CNG-Kanals der Kontrollproben im Vergleich zu den Melatonin-behandelten Zellen quantifiziert werden. Für die Durchführung der PCR wurden die *Primer* zur spezifischen Quantifizierung der CNG A2-Untereinheit verwendet. Die Ergebnisse zeigen, dass nach Langzeit-Melatonininkubation die mRNA-Expression des CNG-Kanals in Abhängigkeit von der Dosis gesenkt wird. Im 24 h-Experiment wurden bei einer Konzentration von 100 pM und Melatoningehalten im nanomolaren Bereich mit einer Senkung auf 13 bis 30 % der relativen Expression der unstimulierten Kontrollen signifikante Ergebnisse erreicht (Abb. 31A, Tab. 26). Bei einer 48-stündigen Inkubation war die CNG-mRNA-Expression nach Melatonininkubation in den Konzentrationen 10 nM, 100 nM und 10 μ M gegenüber den unbehandelten Kontrollen signifikant erniedrigt mit einer Senkung von 68 bis 75 % gegenüber den Kontrollwerten (Abb. 31B, Tab. 26).

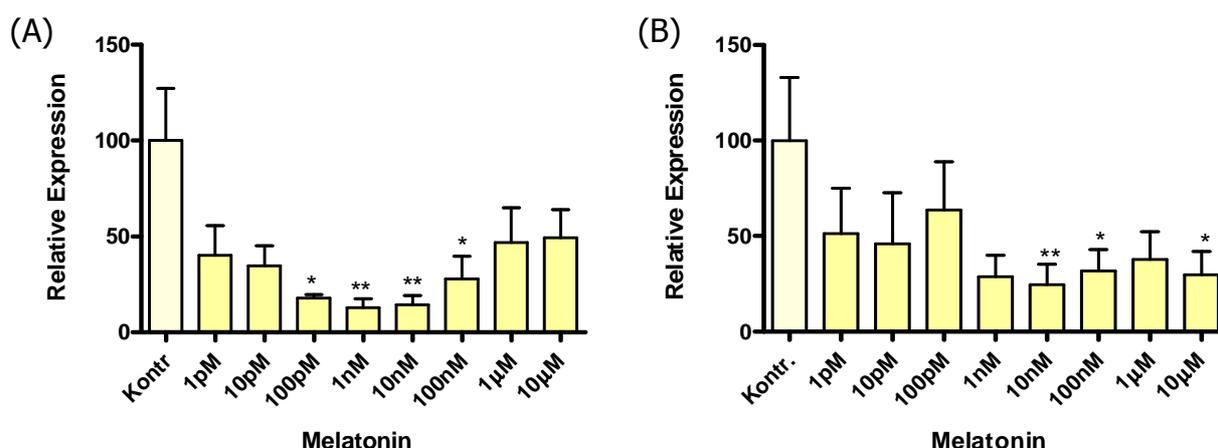


Abb. 31: Vergleich von Expressionsunterschieden des CNG-Kanals in INS1-Zellen nach Melatoninstimulation. Die Zellen wurden für 24 (A) oder 48 (B) h mit verschiedenen Konzentrationen an Melatonin (1 pM bis 10 μ M) inkubiert. Die Quantifizierung erfolgte mittels *real-time* RT-PCR unter Verwendung von *Primern* zur spezifischen Amplifikation der Untereinheit CNG A2. Die Daten repräsentieren den Mittelwert \pm SEM aus mindestens 2 unabhängigen Versuchen mit je n = 3 *batches*. Die Signifikanztests beziehen sich jeweils auf die 100 %-gesetzte Kontrolle verglichen mit den Melatonin-behandelten Proben [109].

Tab. 26: Mittelwerte (angegeben in Prozent relativ zur 100 %-gesetzten unbehandelten Kontrolle), Standardfehler und Stichprobenumfänge bei Expressionsuntersuchungen des CNG-Kanals in INS1-Zellen nach Melatoninbehandlung für 24 oder 48 h.

Melatonin- konzentration	24 h Inkubation			48 h Inkubation		
	MW	SEM	n	MW	SEM	n
Kontrolle	100,00	27,18	10	100,00	33,04	10
1 pM	40,14	15,55	6	51,35	23,68	5
10 pM	34,71	10,53	5	45,97	26,77	7
100 pM	18,00	1,65	6	63,66	25,30	5
1 nM	12,88	4,71	10	28,75	11,20	6
10 nM	14,31	4,93	9	24,75	10,73	8
100 nM	27,97	11,77	9	31,87	11,06	8
1 μ M	46,86	18,06	10	37,72	14,56	8
10 μ M	49,27	14,63	8	29,83	12,14	7

6 Diskussion

Mehr als 6 Millionen Menschen in Deutschland sind an Diabetes mellitus erkrankt; weltweit leiden etwa 246 Millionen an der chronischen Stoffwechselkrankheit. Nach Schätzungen der Weltgesundheitsorganisation wird sich die Gesamtanzahl der Betroffenen bis zum Jahr 2025 nahezu verdoppeln. Bei mehr als 90 % der Patienten handelt es sich um einen Typ2-Diabetes. Ursachen für die steigende Prävalenz der Erkrankung sind genetische Faktoren, aber auch in zunehmendem Maße Über- und Fehlernährung sowie Bewegungsmangel. Die hohen Erkrankungszahlen und die steigende Prävalenz sowie mit der Erkrankung einhergehende schwerwiegende Folgeschäden stellen ein enormes medizinisches, soziales und gesellschaftspolitisches Problem dar. Für eine gezielte Prävention und Behandlung der Volkskrankheit sind eingehende Untersuchungen zum Verständnis des physiologisch-chemischen Hintergrundes der Stoffwechselstörung und der Regulationsmechanismen des Glukosemetabolismus zwingend erforderlich.

Seit mehreren Jahrzehnten werden Studien zur Bedeutung des Pinealorgans auf den Kohlenhydratstoffwechsel durchgeführt. Zahlreiche *in vitro*- und tierexperimentelle Untersuchungen sowie die Einbeziehung von Patientendaten konnten bereits den Nachweis zum Einfluss des epiphysären Indolamins Melatonin auf die Insulinsekretion erbringen. Es wurden umfangreiche Studien zu Glukosestoffwechsel und Mechanismen der Signaltransduktion, zur Funktion der pankreatischen Insel sowie zu Veränderungen bei diabetischer Stoffwechsellage durchgeführt. Den bisherigen Kenntnisstand erweiternd war es Ziel dieser Arbeit, Aussagen zur Bedeutung des cGMP-Signalweges und des MT₂-Rezeptors für die Übermittlung des Melatoninsignals in der pankreatischen β -Zelle treffen zu können sowie das Pankreas hinsichtlich der Existenz von an der cGMP-Signaltransduktionskaskade beteiligten Proteinen zu charakterisieren.

6.1 Die INS1-Zelle, Tiermodelle und Patientenmaterial

Für grundlegende physiologische Studien an Zellen stehen grundsätzlich zwei Zellkultursysteme zur Verfügung: frisch aus tierischem oder humanem Gewebe isolierte Primärzellen oder permanente Zelllinien, welche durch genetische Veränderung immortalisiert wurden. Der bedeutende Vorteil einer Primärzellkultur besteht darin, dass sich die direkt gewonnenen Zellen - zumindest zu Beginn der Kultur - in ihren physiologischen Eigenschaften den entsprechenden Zellen *in vivo* sehr ähnlich sind. Nachteile von Primärzellen für Zelluntersuchungen sind in der begrenzten Teilungsfähigkeit und Lebensdauer, dem vermehrten Arbeitsaufwand für die Gewinnung, teilweise erheblichen interindividuellen Unterschieden und komplexen Ansprüchen der Zellen in der Kultivierung zu sehen. Dagegen sind permanente Zelllinien leicht verfügbar und kultivierbar, sie weisen unbegrenzte Teilungsfähigkeit sowie einheitliche physiologische Grundmerkmale auf.

Als Modell der pankreatischen β -Zelle diente die Insulin-produzierende Ratten-Insulinoma-Zelllinie INS1 für die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Versuche. INS1-Zellen weisen eine für pankreatische β -Zellen typische Morphologie auf. Es kann sowohl die Insulin-Vorstufe Proinsulin als auch eine Immunreaktivität für Insulin nachgewiesen werden, während andere pankreatische Hormone wie Somatostatin, das Pankreatische Polypeptid und Glukagon nicht detektierbar sind. Es handelt sich um

ein geeignetes Modellsystem der pankreatischen β -Zelle mit induzierbarer Insulinsekretion durch verschiedene Stimuli in physiologischen Konzentrationen, mit nativer Sekretionskinetik und Konservierung physiologischer Signalkaskaden. Mit einem Insulingehalt von 20 % des Gehaltes nativer β -Zellen weisen INS1-Zellen einen weitaus höheren Wert auf als andere etablierte permanente β -Zelllinien wie RINm5F, HIT-T15 oder MIN6 [106]. Bereits in früheren molekularbiologischen und zellphysiologischen Arbeiten wurde die INS1-Zelle als Modell der pankreatischen β -Zelle für Untersuchungen zum Einfluss von Melatonin auf die Insulinsekretion erfolgreich eingesetzt [96,101,102,105,108,109]. Allerdings muss bei der Beurteilung der Ergebnisse auch bedacht werden, dass bei Zelllinien zunehmenden Alters der Kultur die Gefahr der Entdifferenzierung oder Ausbildung Krebszell-spezifischer Merkmale besteht. Die sichere Übertragbarkeit der Befunde auf die *in-vivo*-Situation ist stets limitiert.

Als geeignetes Tiermodell zur Untersuchung von Veränderungen bei Vorliegen eines Typ2-Diabetes standen Goto-Kakizaki-Ratten (GK-Ratten) zur Verfügung. Die GK-Ratte ist eines der am besten charakterisierten Tiermodelle für normalgewichtige, Typ2-diabetische Ratten [110]. Der Stamm wurde aus Wistar-Ratten gezüchtet, welche spontan eine gestörte Glukosetoleranz aufwiesen. Nach selektiver Zucht entstand ein Tiermodell mit polygenetisch determiniertem Typ2-Diabetes [111]. Im Gegensatz zu anderen Typ2-diabetischen Tiermodellen wie der *Nagoya-Shibita-Yasuda*(NSY)-Maus oder der *Otsuka-Long-Evans-Tokushima-fatty*(OLETF)-Ratte bilden beide Geschlechter die Erkrankung in gleichem Umfang aus; es besteht also hinsichtlich der Ausbildung des Typ2-Diabetes kein Geschlechtsdimorphismus. Durch Fibrosierung und anschließende Vernarbung der LANGERHANSschen Inseln mit zunehmendem Lebensalter treten bei den Tieren milde Hyperglykämie nach dem Fasten, periphere und hepatische Insulinresistenz, eine verminderte Glukose-induzierte Insulinsekretion sowie eine gestörte Glukosetoleranz auf. Des Weiteren kommt es zu charakteristischen Spätkomplikationen des Diabetes wie Angiopathie, Nephropathie, Neuropathie und Retinopathie. Vorteilhaft für die Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit ist die sehr frühe Genese der Erkrankung. Bereits bei der Geburt haben GK-Ratten eine reduzierte Anzahl an LANGERHANSschen Inseln und spätestens im Alter von zwei Wochen entwickeln die Tiere einen Typ2-Diabetes [112,113]. Im Unterschied zu weiteren etablierten Tiermodellen für Untersuchungen zum Typ2-Diabetes wie der *Zucker-diabetic-fatty*(ZDF)-Ratte oder der *New-Zealand-Obese*(NZO)-Maus entwickeln GK-Ratten im Zuge der Genese der Erkrankung kein Übergewicht. Damit können die Effekte des Typ2-Diabetes auf die untersuchten Parameter eindeutig von Auswirkungen durch Adipositas abgegrenzt werden.

Für Untersuchungen zur Bedeutung der einzelnen Melatoninrezeptoren im Pankreas eignet sich die Einbeziehung von Melatoninrezeptor-*knockout*-Tieren. Die Mäuse des C3H/He-Stammes als genetischer Hintergrund sind im Gegensatz zu anderen Melatonin-defizienten Mausstämmen wie C57BL [114] Melatonin-profizient und weisen eine tagesrhythmische Melatonin-synthese auf [49]. In früheren Studien zur Vermittlung der Phasenverschiebung durch Melatonin [49,52,115], zur Melatonin-wirkung auf das Immunsystem [46], zur Uhrengenenexpression [116,117] sowie zum Verhalten und zur Gehirnfunktion [118] wurden die Tierstämme bereits erfolgreich eingesetzt um Rezeptor-gekoppelte Effekte des Melatonins nachzuweisen.

Neben der INS1-Zelle und verschiedenen Tiermodellen standen Gewebeproben von humanen Pankreata für die Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit zur Verfügung. Anhand des wertvollen

Materials von Patienten ohne Glukosestoffwechselstörung und Typ2-diabetischen Patienten besteht die Möglichkeit, Ergebnisse aus Zellinkubations- und Tierversuchen auch auf humanes Gewebe zu übertragen. Nachteil des menschlichen Materials gegenüber standardisierten Versuchen an Zelllinien und weitgehend einheitlichen Bedingungen bei Tierexperimenten ist die Heterogenität der Proben. Die Patienten waren unterschiedlichen Alters und Geschlechts, wurden zu verschiedenen Tages- und Jahreszeiten operiert, hatten teilweise Begleiterkrankungen und befanden sich in unterschiedlichen Stadien der Typ2-Diabetes- bzw. Pankreaserkrankung. Die Gewebeproben stammten von verschiedenen Regionen des Pankreas; damit kann die Anzahl, Form und Zusammensetzung der Zelltypen variieren [56,104]. Trotz der Inhomogenität des humanen Gewebes ist die Übertragbarkeit von Ergebnissen aus *in-vitro*- oder Tierversuchen auf den Menschen von größter wissenschaftlicher Bedeutung. So konnte das humane Pankreas bereits hinsichtlich des Vorkommens von Melatoninrezeptoren bzw. Unterschieden in der Rezeptorexpression bei stoffwechselunauffälligen und diabetischen Patienten charakterisiert werden [56,104].

6.2 Zur Bedeutung des MT₂-Rezeptors in pankreatischen β-Zellen

Die Wirkung von Melatonin auf die Insulinsekretion ist in früheren Studien bereits ausführlich untersucht worden [36,93,100,101]. Das Indolamin senkt Rezeptor-mediiert die Forskolin-stimulierte Insulinsekretion über die Hemmung der cAMP-Signalkaskade [95,101,119] und hat eine Insulin-stimulierende Wirkung durch Aktivierung der IP₃-Signalkaskade [102,103]. Zurückliegend wurde wegen fehlenden Nachweises des MT₂-Rezeptors in pankreatischem Gewebe davon ausgegangen, dass die genannten Effekte über MT₁-Rezeptoren mediiert werden. Durch die Detektion des MT₂-Rezeptor-Transkriptes in Inseln der Ratte, der INS1-Zelle [105] sowie in humanem Pankreasgesamtgewebe, LANGERHANSschen Inseln und β-Zellen [56,97,119,120] stellte sich die Frage, ob dieser Rezeptortyp von physiologischer Bedeutung für die pankreatische β-Zelle ist.

Ergebnisse früherer Untersuchungen zur circadianen Rhythmik an MT₁^{-/-}- und MT_{1/2}^{-/-}-*knockout*-Mäusen weisen bereits auf die Bedeutung des MT₂-Rezeptors im Pankreas hin: Die Expression des Uhrengens *Per1* bzw. der Uhren-kontrollierten „Output“-Gene *RevErbα* und *Dbp* weisen veränderte absolute Maxima oder Phasenverschiebungen der maximalen Expression im Tagesrhythmus auf [117]. Gewebeschnitte der Inseln von MT₁- und MT₁/MT₂-Doppel-*knockout*-Mäusen lassen im Vergleich miteinander immunhistochemisch ebenfalls Unterschiede in Intensität und Verteilungsmuster der Insulin- und GLUT2-Immunreaktivität erkennen. Veränderungen tagesrhythmischer Expressionsmuster der Inselhormone Insulin, Glukagon und Somatostatin in Pankreata von Kontroll- und Melatoninrezeptor-*knockout*-Mäusen weisen auf die Einflussnahme beider Rezeptortypen auf die pankreatische Insel hin [117]. Ziel der vorliegenden Arbeit war es zu untersuchen, ob der MT₂-Rezeptor an der Vermittlung der Melatonin-mediierten Senkung der Insulinfreisetzung beteiligt ist. Dazu wurde zunächst die relative Expression beider Melatoninrezeptoren in der INS1-Zelle miteinander verglichen. Die Daten dieser Arbeit zeigen, dass in der INS1-Zelle der MT₁-Rezeptor um ein Vielfaches stärker exprimiert ist als der MT₂-Rezeptor. Ebenso weisen die Ergebnisse früherer immunzytochemischen Untersuchungen als auch die Bestimmung von mRNA-Expressionsunterschieden darauf hin, dass der MT₁-Rezeptor in pankreatischem Gewebe eine deutlich höhere Dichte aufweist als der MT₂-Rezeptor. An humanen Pankreata ist

die mRNA des MT₂-Rezeptors um das 4,15-fache geringer exprimiert als die MT₁-Rezeptor-mRNA; die Immunreaktivität ist unter Einsatz MT₂-Rezeptor-spezifischer Antikörper deutlich schwächer [56,104]. Ein Vergleich der Expression beider Melatoninrezeptoren in Inseln neonater Ratten zeigt einen Konzentrationsunterschied des MT₂-Rezeptor-Transkripts gegenüber der MT₁-Rezeptor-mRNA um das 86-fache [105]. Zusammengenommen führten diese Befunde zu der Frage, ob der MT₂-Melatoninrezeptortyp von funktioneller Bedeutung für den Einfluss von Melatonin auf die pankreatische β -Zelle ist. Wie Zellinkubationsversuche an INS1-Zellen unter Einsatz des unspezifischen Melatoninrezeptor-Blockers Luzindol sowie des spezifischen MT₂-Rezeptor-Blockers 4P-PDOT belegen, wird die Insulin-senkende Wirkung von Melatonin durch Vorinkubation mit diesen Antagonisten aufgehoben. Luzindol ist ein kompetitiver, etablierter Melatoninrezeptor-Antagonist und weist eine 15- bis 25-fach höhere Affinität für den MT₂- als für den MT₁-Rezeptor auf [47,115,121]. Frühere Versuche zur Melatoninrezeptor-Funktion konnten zeigen, dass die Vorinkubation mit Luzindol den Melatonineffekt auf die Insulinsekretion verhindert [101]. Da der MT₂-Rezeptor im Pankreas bis zum Zeitpunkt dieser Untersuchungen nicht nachgewiesen werden konnte, wurde davon ausgegangen, dass das Indolamin seine Wirkung in der β -Zelle hauptsächlich über den MT₁-Rezeptor vermittelt [13,100,101]. Nach der Entdeckung des MT₂-Rezeptors wurde im Rahmen dieser Arbeit nun auch die Funktion dieses zweiten Rezeptortyps als Mediator der Melatonineffekte untersucht. Es kam der spezifische MT₂-Rezeptor-Antagonist 4P-PDOT zum Einsatz, der selektiv mit einer 300- bis 22 000-fach höheren Affinität an den MT₂-Rezeptor als an den MT₁-Rezeptor bindet [47,121]. Die Ergebnisse zeigen, dass die Insulin-senkende Wirkung von Melatonin nicht, wie bisher angenommen, ausschließlich MT₁-Rezeptor-mediert ist, sondern auch über den MT₂-Rezeptor vermittelt wird. Übereinstimmend mit den Befunden dieser Arbeit sind jedoch Ergebnisse zur Insulinsekretion von Melatoninrezeptor-*knockout*-Tieren: In *batch*-Untersuchungen mit pankreatischen Inseln, welche aus Wildtyp- oder Melatoninrezeptor-*knockout*-Tieren gewonnen wurden, konnte nach Melatoninbehandlung nachgewiesen werden, dass die Insulinsekretion bei einem *knockout* der Melatoninrezeptoren gegenüber den Wildtyp-Mäusen signifikant erhöht ist. Dieser Insulin-erhöhende Effekt trat sowohl bei MT₁-Rezeptor-*knockout*-Mäusen als auch bei Tieren mit MT₂-Rezeptor- oder MT_{1/2}-Rezeptor-Doppel-*knockout* auf [117]. Des Weiteren zeigen jüngste Untersuchungen, dass nach 9-wöchiger Melatoningabe über das Trinkwasser der MT₂-Rezeptor im Pankreas von Wistar-Ratten deutlich stärker exprimiert wird als bei unbehandelten Kontrolltieren, während die MT₂-Rezeptor-Expression bei Melatonin-behandelten GK-Ratten gegenüber der Kontrollgruppe stark erniedrigt ist (Daten nicht publiziert). Trotz der nachweisbar niedrigen mRNA-Expression ist dieser zweite Melatoninrezeptor in pankreatischen β -Zellen offenbar von funktioneller Bedeutung. Zudem bestärken frühere Versuche von Kemp und Mitarb. [13] an INS1-Zellen diese Annahme: Trotz PCR-technisch nicht nachweisbarer MT₂-Rezeptor-mRNA wird durch den Einsatz von Luzindol und 4P-PDOT die Melatonin-mediierte cAMP-Senkung antagonisiert.

Auch in anderen Organen kommt der MT₂-Rezeptor in einer so geringen Dichte vor, dass zwar die mRNA nachgewiesen werden konnte, eine Detektion mittels *in situ*-Hybridisierung aufgrund zu geringer Expression jedoch nicht möglich war. Dennoch spielt diese Rezeptor-Isoform in diesen Organen offenbar eine physiologisch bedeutende Rolle in der Vermittlung der Melatoninwirkung [45,122]. So wurde beispielsweise gezeigt, dass die Übermittlung circadianer Rhythmen in neuronalen Zellen des

SCN ausschließlich über den MT₂-Rezeptor vermittelt wird [49,52]. Wenn es auch widersprüchliche Ergebnisse gibt [53], belegen zahlreiche Studien die Beteiligung des MT₂-Rezeptors an Phasen-verschiebenden Effekten des Melatonins [48,50,123]. Möglicherweise gibt es auch Spezies-spezifische Unterschiede der involvierten Melatoninrezeptor-Isoformen in der Übermittlung des Melatoninsignals oder es besteht eine funktionelle Redundanz beider Rezeptortypen. Ergebnisse einiger Untersuchungen zeigen auch, dass das Indolamin in geringen Dosen hauptsächlich über den MT₁-Rezeptor wirkt, seine Wirkung bei höheren Konzentrationen aber über den MT₂-Rezeptor mediiert wird [41,42,49].

Es könnte des Weiteren angenommen werden, dass unterschiedliche Affinitäten der Melatoninrezeptoren MT₁ und MT₂ zu Melatonin für die physiologische Wirkung von Bedeutung sind. Zahlreiche Bindungsstudien unter Verwendung von radioaktiv markiertem Jodmelatonin konnten jedoch belegen, dass beide Rezeptortypen hochaffine Bindungsstellen für Melatonin mit einer Dissoziationskonstante von unter 200 pM aufweisen und dass sich die pharmakologischen Eigenschaften beider Rezeptortypen sehr ähneln [45,47,53,124]. Zudem zeigen - im Gegensatz zu eigenen Untersuchungen an pankreatischem Gewebe von Ratte und Mensch - neueste Befunde von Lyssenko und Mitarb. [119] an humanen Inseln, dass die MT₁- und MT₂-Rezeptoren offenbar gleich stark exprimiert werden. Aufgrund dieser widersprüchlichen Ergebnisse zur Quantifizierung der Melatoninrezeptor-mRNA in humanen Inseln sind für das Verständnis der Rezeptor-mediierten Melatoninwirkung zukünftig weitere Untersuchungen zum Vergleich der Expression des MT₁- und MT₂-Rezeptors notwendig.

Gegenwärtig ist kommerziell kein gängiger, selektiv wirkender MT₁-Rezeptor-Antagonist verfügbar, um die Melatonineffekte über die einzelnen Rezeptortypen genauer spezifizieren zu können. Somit bleibt die Frage teilweise ungeklärt, welche biologische Bedeutung die Ko-Existenz zweier verschiedener Melatoninrezeptortypen mit möglicherweise unterschiedlichen Signalkaskaden in der pankreatischen β -Zelle hat. Möglicherweise spielt der MT₂-Rezeptor vorwiegend in der Regulierung von Kurzzeit-Melatonineffekten und der Rezeptordichte eine Rolle. Gerdin und Mitarb. [125] haben an transfizierten Ovarialzellen des Chinesischen Hamsters gezeigt, dass eine kurzzeitige Melatonininkubation zu einer Internalisierung und Desensibilisierung des MT₂-Rezeptors, verbunden mit einem starken Abfall der cAMP-senkenden Wirkung, führt - ein Effekt, der für den MT₁-Rezeptor nicht nachgewiesen werden konnte. Somit liegt die Vermutung nahe, dass über die Regulierung der Ansprechbarkeit des MT₂-Rezeptors die Effektivität der Melatoninwirkung an den Zielzellen innerhalb kürzester Zeit moduliert werden kann. Jüngst wurden erste Liganden mit MT₁-Rezeptor-Spezifität entdeckt, welche als Antagonisten wirken sollen [126] - möglicherweise kann in naher Zukunft eine präzisere Zuordnung der Funktionalität der einzelnen Melatoninrezeptor-Isoformen realisiert werden.

Weiterhin wird die Möglichkeit der Heterodimerbildung aus MT₁- und MT₂-Rezeptoren in nativem Gewebe in Betracht gezogen [127,128]. Ayoub und Mitarb. [127] konnten belegen, dass die Melatoninrezeptoren in HEK-293-Zellen bevorzugt Heterodimere ausbilden, wenn beide Rezeptortypen ko-exprimiert sind. In zahlreichen Organen, wie Arterien, Fettgewebe, Pankreas, Retina und dem Suprachiasmatischen Nukleus kommen sowohl der MT₁- als auch der MT₂-Rezeptor vor, was auf die Möglichkeit der Heterodimerisierung hindeutet; *in-vivo*-Nachweise fehlen bisher. Zudem ist bekannt, dass Luzindol und 4P-PDOT eine ähnliche oder sogar höhere Affinität für MT₁/MT₂-Heterodimere aufweisen als für Homodimere [128]. Die Fähigkeit der Heterodimerbildung muss bei der Nutzung der Melatonin-

rezeptor-Antagonisten für diese Versuche an INS1-Zellen in Betracht gezogen werden, da auch an diesem Zellmodell beide Rezeptortypen exprimiert sind. Die Ausbildung von Heterodimeren in der Insel bzw. der pankreatischen β -Zelle würde die offenbar maßgebliche Bedeutung des MT_2 -Rezeptors in der Übermittlung der Melatoninwirkung auf die Insulinsekretion trotz geringer Expression erklären. Weiterführende Untersuchungen sind notwendig, um Aussagen zur möglichen MT_1/MT_2 -Heterodimerisierung und der physiologischen Relevanz in INS1-Zellen treffen zu können.

6.3 Melatoninwirkung auf die cGMP-Signalkaskade in Pankreas, LANGERHANSschen Inseln und β -Zellen

6.3.1 Einfluss von Melatonin auf cGMP-Konzentrationen in INS1-Zellen

Versuche an transfizierten HEK293-Zellen konnten belegen, dass Melatonin die cGMP-Konzentrationen senkt. Dieser Effekt trat lediglich bei MT_2 -Rezeptor-transfizierten, nicht jedoch bei MT_1 -Rezeptor-transfizierten Zellen auf, was nahe legt, dass ausschließlich der MT_2 -Rezeptor die Melatoninwirkung auf die cGMP-Signalkaskade vermittelt [79]. Mit dem Nachweis des MT_2 -Rezeptors in pankreatischem Gewebe stellte sich die Frage, ob Melatonin auch in der β -Zelle die cGMP-Konzentrationen beeinflusst. Die Untersuchungen an INS1-Zellen belegen, dass das Indolamin die cGMP-Konzentration in Abhängigkeit von Dosis und Inkubationszeit senkt. Diese Ergebnisse stehen in Übereinstimmung mit zahlreichen Studien an anderen Zellen und Organen: Melatonin in nanomolaren Konzentrationen senkt die cGMP-Konzentrationen in Melanomzellen der Maus [78] und mikrovaskulären Endothelzellen der Ratte [80]. Eine Dosis-abhängige Reduktion der cGMP-Gehalte durch Melatonin konnte im Cerebellum der Ratte [83], in humanen Prostata-Epithelzellen [77] und mikrovaskulären Endothelzellen der Ratte [89] nachgewiesen werden. Widersprüchliche Ergebnisse mit cGMP-erhöhendem Melatonin-Effekt anderer Studien [74,75,129] sind möglicherweise bedingt durch Spezies-, Organ-, Gewebe- oder Zell-spezifische Unterschiede, circadiane Besonderheiten oder abweichende experimentelle Bedingungen.

Weiterhin konnte im Rahmen dieser Untersuchungen nachgewiesen werden, dass in der INS1-Zelle die cGMP-senkenden Effekte von Melatonin durch Vorinkubation mit den Melatoninrezeptor-Antagonisten Luzindol oder 4P-PDOT nahezu vollständig aufgehoben werden können. Das bedeutet, dass Melatonin seine Wirkung über Melatoninrezeptoren an der β -Zelle vermittelt, wobei mit großer Wahrscheinlichkeit vor allem der MT_2 -Rezeptortyp involviert ist. Nicht allein die Untersuchungen an transfizierten HEK293-Zellen [79] bestätigen diese These; auch in humanen PAZ6-Adipozyten wurde bereits der Nachweis erbracht, dass der MT_2 -Rezeptor an der Senkung basaler cGMP-Konzentrationen beteiligt ist [64].

Bei den Untersuchungen mit Luzindol und 4P-PDOT ist auffallend, dass diese Rezeptor-Antagonisten allein sowohl auf die Insulin- als auch auf die cGMP-Konzentration eine reduzierende Wirkung haben, wenn auch keine signifikanten Effekte wie bei einer Melatonininkubation festgestellt werden konnten. Es kann vermutet werden, dass diese Substanzen aufgrund ihrer Strukturverwandtschaft zu Melatonin ähnliche chemische und pharmakologische Eigenschaften aufweisen und somit Effekte analog zur Melatoninwirkung verursachen könnten.

Bei Säugetieren werden physiologische Plasmamelatonin-Konzentrationen von bis zu 40 pM am Tag und bis zu 1 nM in der Nacht erreicht. Bei der Mehrzahl der Inkubationsversuche wurde eine Melatoninkonzentration im nano- oder mikromolaren, und damit im supraphysiologischen, Bereich durchgeführt. Der Einsatz höherer Konzentrationen ist geeignet, um zunächst grundlegende, messbare Melatonineffekte nachzuweisen. Es muss zudem bedacht werden, dass es zu einer Anreicherung des Hormons in verschiedenen Organen kommen kann, so dass lokal auch *in vivo* physiologische Melatoninkonzentrationen über 1 nM erreicht werden können [130].

6.3.2 Komponenten der cGMP-Kaskade in der INS1-Zelle

Nachdem nachgewiesen war, dass Melatonin Rezeptor-mediiert die cGMP-Konzentration in INS1-Zellen senkt, wurde in weiterführenden Experimenten untersucht, über welchen Mechanismus das Hormon diesen Effekt vermittelt und welche Komponenten der cGMP-Signalkaskade daran beteiligt sind. Zunächst wurde die INS1-Zelle, die pankreatische Insel sowie das Gesamtpankreas der Ratte mittels molekularbiologischer Analysen hinsichtlich des Vorkommens von an der cGMP-Signalkaskade beteiligten Proteinen erstmals umfangreich charakterisiert. Dabei wurde auf die Betrachtung der Stickstoffmonoxid-Synthase(NOS)-Expression verzichtet, da das Vorkommen der NOS in der LANGERHANSschen Insel und der β -Zelle bereits hinreichend gut untersucht wurde: Die konstitutive, neuronale nNOS und die Zytokin-induzierbare, Kalzium-unabhängige iNOS wurden eindeutig in der LANGERHANSschen Insel und auch in der INS1-Zelle nachgewiesen [131,132]. Die ebenfalls konstitutiv gebildete endotheliale NOS (eNOS) kommt im endokrinen Gewebe des Pankreas, insbesondere in den β -Zellen vor [133]. Weiterhin konnte in anderen Studien bereits der Nachweis der Proteinkinase G in den β -Zelllinien BRIN-BD11 [134] und MIN6 [135] erbracht werden. Untersuchungen von Ehses und Mitarb. [136] konnten das Protein in der β -TC-3-Zelllinie der Maus detektieren, während der Nachweis in der INS1-Zelle der Ratte scheiterte. Über das Vorkommen verschiedener Isoformen der Guanylatzyklen (GC), cGMP-abhängiger Phosphodiesterasen, CNG-Kanälen und MRP-Transportern im Pankreasgewebe gab es bisher keine Untersuchungen.

Die Funktion der GC wurde in bisherigen Studien hauptsächlich indirekt durch den Einsatz von Hemmstoffen, Aktivatoren oder Enzymaktivitätsmessungen analysiert. Lediglich in der β -Zelle der Maus konnte die Existenz der GC nachgewiesen werden [137], wobei unklar ist, um welche der bekannten Isoformen es sich handelt. Im Rahmen dieser Untersuchungen konnte demnach erstmals der Nachweis erbracht werden, dass sowohl die lösliche Form der GC als auch drei von sieben bekannten Isoformen der membranständigen Guanylatzyklen - mGC A, B und C - in der INS1-Zelle exprimiert werden. Im Gegensatz zu früheren Untersuchungen an der INS1-Zelle [136] zeigten RT-PCR-Versuche weiterhin, dass die mRNA der PKG-Isoform PKG 1 in diesem β -Zellmodell exprimiert ist. Ferner wurde die Expression von cGMP-abbauenden Isoformen der Phosphodiesterasen PDE 1, 2, 5, 9 und 10 in INS1-Zellen nachgewiesen. Die Isoformen PDE 2 und PDE 5 konnten im humanen Pankreasgewebe bereits in früheren Studien detektiert werden [138,139]; Untersuchungen zum Vorkommen der cGMP-spezifischen Phosphodiesterasen direkt in der INS1-Zelle fehlten bislang. Des Weiteren wurde bei diesen Versuchen die Expression der mRNA beider Isoformen der cAMP-spezifischen PDE 3 - PDE 3A und PDE 3B - belegt. Demgegenüber stehen Ergebnisse von Ahmad und Mitarb. [140], welche an der

Mauszelllinie BRIN-BD11 zeigten, dass nur die Isoform PDE 3B in der β -Zelle lokalisiert ist. Es liegt die Vermutung nahe, dass Spezies-spezifische Unterschiede in der Expression bestehen. Auf Untersuchungen der Expression der so genannten Photorezeptor-PDE 6 wurde verzichtet, da diese ausschließlich in den Außensegmenten der Photorezeptoren vorkommt [4].

Bei CNG(*cyclic nucleotide-gated*)-Kanälen handelt es sich um Tetramere, die aus den Untereinheiten CNG A1, CNG A2, CNG A3, CNG A4, CNG B1 und CNG B3 in verschiedenen Kombinationsmöglichkeiten zusammengesetzt sein können. Einige bilden Homomere, die meisten nativen Kanäle dieser Art sind jedoch aus verschiedenen Untereinheiten zusammengesetzt [11]. Bisher gab es keine Studien zum Vorkommen von CNG-Kanälen in pankreatischem Gewebe oder speziell in der β -Zelle. Im Rahmen dieser Versuche konnte nun erstmals der Nachweis zur Expression der Untereinheiten CNG A1, CNG A2, CNG B1 und CNG B3 in der INS1-Zelle erbracht werden, was vermuten lässt, dass funktionelle CNG-Kanäle in pankreatischen β -Zellen existieren.

Zudem wurden in der INS1-Zelle die Transkripte der MRP(*multidrug resistance-associated protein*)-Transporter MRP 4, 5 und 8 detektiert, welche zyklische Nucleotide aus der Zelle transportieren können [5-7]. Zuvor gab es hinsichtlich dieser genannten MRP-Formen lediglich Hinweise für eine MRP 5-Expression [141] bzw. die Existenz des MRP-Transkriptes ohne nähere Isoform-Klassifizierung [142] - Untersuchungen, die jedoch im Pankreasgesamtgewebe durchgeführt wurden und nicht speziell an der LANGERHANSschen Insel oder der β -Zelle. Mit dem Nachweis von MRP 4, 5 und 8 in INS1-Zellen kann auch die Möglichkeit der Regulation intrazellulärer cGMP-Konzentrationen durch den Auswärtstransport über MRP-Transporter in der pankreatischen β -Zelle in Betracht gezogen werden. Für den *second messenger* cAMP konnte dieser Effekt nach unspezifischer Hemmung von MRP-Transportern durch Probenecid in eigens durchgeführten Superfusionsexperimenten bereits nachgewiesen werden [101].

6.3.3 Zur Wirkung von Melatonin auf die lösliche Guanylatzyklase und NO-Synthase

Mit dem Nachweis der cGMP-senkenden Wirkung von Melatonin in pankreatischen β -Zellen und der Charakterisierung der INS1-Zelle hinsichtlich der Komponenten der cGMP-Signalkaskade konnte im Folgenden durch Inkubationsversuche gezeigt werden, dass die lösliche Guanylatzyklase (sGC) an der Vermittlung des Melatoninsignals beteiligt ist. *Real-time* RT-PCR-Untersuchungen belegen zudem, dass nach Langzeit-Melatonininkubation die Expression der sGC signifikant gesenkt wurde, während bei den membranständigen Isoformen des Enzyms keine Veränderungen in der Transkript-Menge auftraten. Zusätzlich zu diesen molekularbiologischen Untersuchungen konnte ferner nachgewiesen werden, dass Melatonin die durch den NO-Donator S-Nitroso-N-acetyl-DL-penicillamin (SNAP) erhöhten cGMP-Gehalte senkt. Gegensätzliche Aussagen wurden nach Versuchen in humanen embryonalen Nierenzellen [79] und im Cerebellum der Ratte [83] getroffen; hier führte Melatonin nicht zu einer Reduzierung der durch den NO-Donator Natrium-Nitroprussid (SNP) induzierten Steigerung der cGMP-Konzentration. Die Widersprüchlichkeit der eigenen Ergebnisse gegenüber Resultaten anderer Studien ist möglicherweise auf Abweichungen in Probenherkunft, appliziertem NO-Donator oder Inkubationszeiten zurückzuführen. Inkubationsversuche unter Einsatz der spezifischen sGC-Inhibitoren ODQ und NS2028 bestätigen jedoch die Vermutung, dass Melatonin seinen cGMP-senkenden Effekt in INS1-Zellen über die Modulation der sGC mediiert.

Neben der sGC könnten auch die membranständigen Guanylatzyklasen (mGC) als Vermittler der Melatoninwirkung in Erwägung gezogen werden. Allerdings konnte mit diesen Versuchen gezeigt werden, dass sich bei der Betrachtung der Isoformen mGC A, mGC B und mGC C keine Veränderungen der mRNA-Expression nach Melatonineinwirkung ergeben. Ebenso kam es nach Blockierung der sGC durch ODQ oder NS2028 nicht mehr zu einer Senkung der cGMP-Konzentration durch Melatonin. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass Melatonin seine Wirkung über die lösliche Guanylatzyklase-Isoform - und nicht über die mGC - vermittelt. Übereinstimmend mit diesen Resultaten hatte die Inkubation mit ANP (*atrial natriuretic peptide*) als Aktivator der mGC keinen Effekt auf zelluläre cGMP-Konzentrationen in humanen embryonalen Nierenzellen [88]. Bis heute gibt es keinerlei Hinweise für die Beteiligung membranständiger Guanylatzyklase-Formen in der Melatonin-medierten Modulation von NO- oder cGMP-Konzentrationen.

Die sGC wird vor allem durch die Bindung von NO aktiviert. Es kann vermutet werden, dass Melatonin die Funktion dieses Enzyms durch Einflussnahme auf die NO-Konzentration oder die NOS-Aktivität moduliert, wie es aus Untersuchungen an einigen anderen Gewebearten oder Zelllinien bekannt ist: Melatonin senkt die NO-Konzentration in Endothelzellen der Ratte [91], in kultivierten Makrophagen der Maus [143], in Neuroblastomzellen [144] und im Nierengewebe [145]. In den meisten Fällen wurden dabei die Effekte auf die NO-Konzentration nach einer Langzeit-Melatoninbehandlung von 3 bis 48 h ermittelt. Gleichermäßen zeigen die Ergebnisse der Versuche dieser Arbeit an INS1-Zellen, dass Melatonin erst nach einer Inkubationszeit von 4 bzw. 24 h den NO-Gehalt senkt. Eine kurzzeitige Melatoningabe von 1 h hatte jedoch keinen Einfluss auf die NO-Konzentration, so dass der verringerte cGMP-Gehalt nicht durch Inhibierung der sGC über Hemmung der NOS erklärt werden kann. Weiterhin deuten die Daten darauf hin, dass die NO-reduzierende Wirkung nach Langzeit-Melatoninwirkung - im Gegensatz zur cGMP-Senkung - nicht Rezeptor-mediert ist. Übereinstimmend führte der Einsatz der Melatoninrezeptor-Antagonisten Luzindol und 4P-PDOT bei Versuchen an mikrovaskulären Endothelzellen ebenso nicht zu einer Aufhebung des NO-reduzierenden Melatonin-Effektes [80,82]. Ein nicht Rezeptor-mediierter Effekt lässt sich durch die beschriebene direkte Interaktion von Melatonin mit NO erklären. Es ist bekannt, dass die Konzentrationen der stabilen Endprodukte des biologisch aktiven, unstabilen Radikals NO - Nitrit und Nitrat - durch Inkubation mit dem Indolamin direkt gesenkt werden [146]. Zudem wurden Nitrosierungsreaktionen und *scavenger*-Wirkungen von Melatonin beschrieben, die eine Reduzierung der freien NO-Konzentrationen nach sich ziehen [147,148]. Ferner zeigen die Ergebnisse der Versuche im Rahmen dieser Arbeit, dass die NO-senkende Wirkung von Melatonin durch Blockade der NOS aufgehoben werden kann, was darauf hindeutet, dass bei längerer Inkubationszeit offensichtlich auch dieses Enzym in der Übermittlung des Melatoninsignals auf die NO-Konzentration beteiligt ist. Zahlreiche Studien bestätigen diesen Befund an anderen Organen, Geweben und Zelllinien [83,85,150-152]. Möglicherweise spielen sowohl die NOS-vermittelte Wirkung als auch die Rezeptor-unabhängige, direkte Reaktion mit NO eine Rolle hinsichtlich des Einflusses von Melatonin auf die cGMP-Kaskade bei Langzeit-Stimulationen.

Im Gegensatz zur Beteiligung der NOS an Langzeit-Melatonin-Effekten auf die NO-Konzentration wurde der Einfluss dieses Enzyms auf die cGMP-senkende Wirkung in Kurzzeit-Experimenten nicht be-

legt. Demgegenüber konnte in anderen Studien auch bei kurzer Inkubationszeit von 10 bis 30 min [83,85,149] oder der Applikation verschiedener Melatoninkonzentrationen über mehrere Stunden [151,152] eine Hemmung der NOS-Aktivität festgestellt werden. Dabei wurde jedoch die Auswirkung der veränderten NOS-Aktivität auf die cGMP-Konzentrationen nicht betrachtet. Die Ergebnisse dieser Versuche an INS1-Zellen belegen, dass Melatonin cGMP über den Einfluss der sGC senkt; ein vorgeschalteter Effekt über die Regulation der NO-Gehalte oder NOS-Aktivität konnte jedoch in Bezug auf die Kurzzeit-Experimente ausgeschlossen werden. Möglicherweise würde eine längere Inkubationszeit mit Melatonin zu einer verstärkten Senkung der cGMP-Konzentrationen in INS1-Zellen führen, indem - durch Inhibieren der NOS verursacht - reduzierte NO-Gehalte den Effekt einer Hemmung der cGMP-Produktion durch den reduzierten Ko-Faktor der sGC intensivieren. Zur Klärung dieser Fragestellung sind Folgeuntersuchungen zur Melatoninwirkung auf die cGMP-Konzentration bei Langzeit-Melatoninstimulation notwendig.

Neben der Bindung von NO an die prosthetische Gruppe der Guanylatzyklase als entscheidendes Stellglied zur Regulierung der Enzymaktivität werden weitere Möglichkeiten zur Steuerung der Guanylatzyklase-Aktivität diskutiert: Die Genexpression des Enzyms kann durch transkriptionelle und posttranskriptionelle Faktoren beeinflusst werden, wie etwa durch Zytokine, Wachstumsfaktoren und *second messenger*-Systeme [153]. Die Phosphorylierung der GC durch die PKA, PKC oder PKG, Protein-Protein-Interaktionen sowie der Einfluss verschiedener Substrate oder Reaktionsprodukte, wie Ca^{2+} , ATP, GTP, cGMP oder Mg^{2+} sind Möglichkeiten der posttranslationalen Regulierung des Enzyms in unterschiedlichen Zelllinien oder Geweben [154]. Zu alternativen Regulationsmechanismen neben der Bindung von NO an die sGC im Pankreas gibt es bisher keine Studien. Diese Untersuchungen an der INS1-Zelle konnten bei 1-stündiger Inkubationszeit den Einfluss der sGC, nicht jedoch der NO-Konzentration oder NOS-Aktivität, in der Melatonin-medierten Senkung der cGMP-Gehalte nachweisen. Aus diesem Grund muss in Betracht gezogen werden, dass andere, NO-unabhängige Prozesse, für diesen Effekt verantwortlich sind. Beispielsweise ist bekannt, dass die Phosphorylierung der sGC durch die PKA zu gesteigerter Enzymaktivität führt [155,156]. Somit könnte die Hemmung der cAMP-Signalkaskade einschließlich der PKA durch Melatonin für eine reduzierte Aktivität der sGC verantwortlich sein.

Des Weiteren deuten Ergebnisse von Untersuchungen am Rattenherz darauf hin, dass eine enge Verknüpfung der cAMP- und cGMP-Signalkaskade in der Vermittlung des Melatoninsignals vorliegt: In jüngsten Studien wurde gezeigt, dass die Blockade der NOS und der sGC zu einer Aufhebung des cAMP-senkenden Melatonin-Effektes führt [157]. In wie weit ein solches Zusammenspiel der beiden Signaltransduktionswege auch in pankreatischen β -Zellen bei Melatonin-medierten Effekten von Bedeutung ist, bleibt Gegenstand weiterer Untersuchungen.

6.3.4 Untersuchungen an Pankreata von Tier und Mensch

Melatoninrezeptor-*knockout*-Mäuse sind als Tiermodell für Studien zu Rezeptor-medierten Melatonin-Effekten bereits etabliert [46,49,115,116-118]. Die Erkenntnis, dass Melatonin die sGC-Expression in pankreatischen β -Zellen senkt und die cGMP-Konzentration über die Modulation der sGC-Aktivität reduziert wird, führte zu der Annahme, dass ein Melatoninrezeptor-*knockout* zu Veränderungen der

cGMP-Signalkaskade im Pankreas führen könnte. Die molekularbiologischen Untersuchungen der vorliegenden Arbeit konnten zeigen, dass die Expression der sGC bei *knockout* des MT₂-Rezeptors bzw. beider Melatoninrezeptoren sowohl in Pankreata von Tag- und Nachttieren als auch direkt in LANGERHANSschen Inseln signifikant erhöht ist. Anhand dieser Ergebnisse konnte erneut bestätigt werden, dass Melatonin Rezeptor-mediiert Einfluss auf die cGMP-Transduktionskaskade nimmt und dass offensichtlich vor allem der MT₂-Rezeptor an der cGMP-senkenden Wirkung von Melatonin beteiligt ist. Damit werden die Resultate aus *batch*-Inkubationsversuchen der β -Zelllinie auch mit Untersuchungen am Tiermodell ergänzt.

Zusätzlich wurden erstmals auch Aussagen zu möglichen Tag-Nacht-Unterschieden in der Expression von Guanylatzyklasen in LANGERHANSschen Inseln und Gesamtpankreata von Ratten und Mäusen getroffen. Bereits Daten früherer Studien konnten nachweisen, dass einige Komponenten der cGMP-Signalkaskade Schwankungen der Aktivität in Abhängigkeit von der Tageszeit aufweisen: Sowohl bei der cGMP-Konzentration und der GC-Aktivität als auch in der Aktivität der cGMP-abhängigen Phosphodiesterasen und der Proteinkinase G sind Veränderungen im 24h-Tagesrhythmus zu erkennen [75,158]. In Ergänzung zu diesen Erkenntnissen an anderen Spezies, Organen und Geweben konnten die Ergebnisse der Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit belegen, dass die sGC-mRNA in Abhängigkeit vom Zeitpunkt der Pankreas- oder Inselgewinnung von Ratten bzw. Mäusen unterschiedlich stark exprimiert ist: In Inseln der Wistar-Ratte zeigte sich nachts gegenüber den Werten der Tagtiere eine signifikant verringerte Expression der sGC-mRNA. Es kann vermutet werden, dass die nachts stark erhöhte Melatoninfreisetzung zur Supprimierung der sGC-Transkripte führt, wie es auch *in vitro* nach Langzeit-Melatonininkubation bei INS1-Zellen der Fall war. Dagegen konnte in Gesamtpankreata von Wildtyp-Mäusen beim Tag-Nacht-Vergleich kein Unterschied in der sGC-Expression festgestellt werden. Die Ursache dieser unterschiedlichen Ergebnisse liegt vermutlich an Spezies-spezifischen Besonderheiten. Des Weiteren muss bedacht werden, dass bei den Wildtyp-Mäusen im Tag-Nacht-Vergleich ausschließlich Gesamtpankreata betrachtet werden konnten, während bei dem Rattenmodell separierte LANGERHANSsche Inseln zur Verfügung standen. Somit beziehen sich die Resultate der Untersuchungen an WR-Ratten allein auf das endokrine Pankreasgewebe, während bei den Mausversuchen ebenso exokrine Anteile der Bauchspeicheldrüse analysiert wurden. Studien direkt an frisch separierten β -Zellen der Tiermodelle waren im Rahmen dieser Arbeit nicht realisierbar, jedoch ist die Möglichkeit der Beschränkung ausschließlich auf den endokrinen Gewebeanteil gegenüber der Nutzung des Gesamtpankreas für Fragestellungen zur Insulin-produzierenden β -Zelle von Vorteil. Auch wenn LANGERHANSsche Inseln zu 70 bis 90 % aus β -Zellen bestehen, kann anhand dieser Versuche am Tiermodell nicht eindeutig geklärt werden, ob es sich bei diesen Ergebnissen um β -Zell-spezifische Charakteristika handelt. Möglicherweise treten auch bei A-, D- oder Pankreas-Polypeptid-sezernierenden PP-Zellen der Inseln Unterschiede in der sGC-mRNA-Expression auf, die sich bei Untersuchungen auf Inselebene widerspiegeln.

Weiterführende Versuche unter Synchronisation der INS1-Zellen mittels Serumschock bzw. *knockdown* der einzelnen Melatoninrezeptoren sollen Aufschluss über eine mögliche circadiane Rhythmik der cGMP-Kaskade sowie die Bedeutung der Melatoninrezeptoren MT₁ und MT₂ für die Synchronisation circadianer Prozesse speziell in der pankreatischen β -Zelle geben.

Neben den beschriebenen molekularbiologischen Untersuchungen der sGC-mRNA konnte zusätzlich festgestellt werden, dass in LANGERHANSschen Inseln der Wistar-Ratte - im Unterschied zu den membranständigen Guanylatzyklase-Isoformen mGC A und mGC C - auch die mGC B nachts deutlich geringer exprimiert ist als am Tag. Die Ursache und Bedeutung dieses Tag-Nacht-Unterschiedes ist bislang ungeklärt. Studien zur Rhythmizität der cGMP-Konzentrationen bzw. GC-Aktivität in pankreatischem Gewebe lagen bisher nicht vor. Ergebnisse von Versuchen in anderen Organen sind rar; sie sind ausschließlich beim Hamster durchgeführt wurden und von widersprüchlichen Aussagen gekennzeichnet: Im SCN wurden nur tagsüber maximale cGMP-Konzentrationen gemessen [158], während in der Retina auch bei Dunkelheit hohe cGMP-Gehalte nachgewiesen werden konnten [75]. Weitere Studien zur rhythmischen Aktivität von Komponenten der cGMP-Signalkaskade, dessen Ursache und physiologischer Wirkung sind erforderlich um aussagekräftige Kenntnisse zu erlangen.

Frühere Studien belegen einen engen Zusammenhang zwischen der Melatonin- und Insulinsekretion. Die Daten deuten darauf hin, dass Melatonin Einfluss auf die Diabeteserkrankung und damit assoziierte metabolische Störungen nimmt. Die Quantifizierung der GC-Expression in pankreatischen Inseln Typ2-diabetischer GK-Tiere im Vergleich zu stoffwechselgesunden WR-Ratten konnte Unterschiede aufzeigen: GK-Tiere weisen gegenüber stoffwechselgesunden WR-Ratten ständig deutlich erhöhte Blutglukosekonzentrationen und bei Dunkelheit eine signifikant verstärkte Insulinsekretion bei niedrigeren Melatonin-Plasmawerten auf [96]. Im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte *real-time* PCR-Untersuchungen konnten zeigen, dass nachts die mRNA-Expression in Inseln Typ2-diabetischer Tiere gegenüber WR-Ratten bei allen in der pankreatischen Insel exprimierten GC-Isoformen erhöht ist. Ferner ist die mGC C-mRNA bei GK-Ratten in Inseln von Tag- und Nachttieren deutlich erhöht. Es konnte zudem gezeigt werden, dass die Expression der sGC sowie der mGC B bei Typ2-diabetischen Ratten gegenüber WR-Ratten hinsichtlich der Tag- und Nachttiere genau entgegengesetzte Werte aufweist. Diese Ergebnisse ergänzen frühere Untersuchungen zum Zusammenhang von Melatonin und Typ2-Diabetes [36].

Zusätzlich zum Tag-Nacht-Vergleich wurde im Rahmen dieser Untersuchungen die Expression der sGC als offenbar bedeutende GC-Isoform in der Übermittlung der Melatoninwirkung an Pankreata von WR- und GK-Ratten verglichen, welche 9 Wochen Melatonin oder als Kontrollgruppe äquimolare Mengen Ethanol über das Trinkwasser aufgenommen hatten. Die Ergebnisse zeigen Ähnlichkeiten mit den Versuchen an Inseln von WR- und GK-Ratten, welche am Tag oder in der Nacht separiert wurden. In beiden Fällen wurde bei hohen Melatoninkonzentrationen - natürlicherweise nachts auftretend oder nach Melatoninsubstitution - eine erniedrigte sGC-Expression bei WR-Ratten festgestellt. Dies bestätigt die Vermutung, dass nächtliche Veränderungen der sGC-Expression offensichtlich assoziiert sind mit natürlicherweise hohen Melatoninwerten. Des Weiteren zeigten Daten zur Expression des MT_2 -Rezeptors im Pankreas, dass bei WR-Ratten die MT_2 -mRNA nach Melatoningabe im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant aufreguliert ist und dass dieser Effekt bei GK-Ratten in umgekehrter Weise auftritt. Mit dem Wissen, dass Melatonin seine hemmende Wirkung auf die cGMP-Signalkaskade offensichtlich über den MT_2 -Rezeptor vermittelt, kann vermutet werden: Die Melatoningabe führt im Pankreas von WR-Ratten zur Aufregulierung des MT_2 -Rezeptors und konsekutiv zur verstärkten Inhibierung der sGC-Expression;

umgekehrt ist die verringerte MT₂-Rezeptor-Expression bei GK-Tieren von einer erhöhten sGC-Expression begleitet.

Zunehmend wurden in der Vergangenheit auch Patientendaten in Untersuchungen zur Bedeutung von Melatonin auf die pankreatische β -Zelle einbezogen, wodurch ein Brückenschlag zwischen experimentellen und klinischen Befunden hergestellt werden konnte. In Übereinstimmung mit GK-Ratten weisen Typ2-diabetische Patienten erhöhte Glukose- und Insulin-Plasmakonzentrationen bei gleichzeitig erniedrigten Melatoningehalten auf [96]. Des Weiteren konnte das humane Pankreas und die LANGERHANSsche Insel hinsichtlich des Melatoninrezeptor-Status bei Stoffwechselunauffälligen und Typ2-Diabetikern charakterisiert werden. Sowohl der MT₁- als auch der MT₂-Rezeptor ist im Pankreas exprimiert und bei Typ2-diabetischen Patienten signifikant erhöht, was vermutlich auf Kompensationsmechanismen bei geringen Melatoninplasmawerten zurückzuführen ist [56,104]. Es ist bekannt, dass mit steigendem Alter die Melatoninkonzentration im Plasma sinkt und das Erkrankungsrisiko für Typ2-Diabetes zunimmt. Möglicherweise ist der gestörte Glukose- und Insulinhaushalt bei Typ2-Diabetikern unter anderem auf eine verminderte Insulin-senkende Wirkung des Melatonins in der pankreatischen β -Zelle zurückzuführen.

Interessanterweise zeigen jüngste Ergebnisse genomweiter Assoziationsstudien, dass MT₂-Rezeptor-Genvarianten mit erhöhter Nüchtern-Blutglukose sowie verminderter β -Zellfunktion einhergehen können [159]. Des Weiteren wurde bekannt, dass bestimmte, häufig auftretende SNPs (*single nucleotide polymorphisms*) in diesem Genlokus mit einem erhöhten Typ2-Diabetes-Risiko assoziiert sind [120,159,160]. Träger dieses Risiko-Allels weisen ebenso wie Typ2-Diabetiker eine erhöhte MT₂-Rezeptor-Expression in pankreatischen Inseln auf [56,104,119]. Die Daten bestätigen die Kenntnisse zum Einfluss von Melatonin sowie zur Bedeutung des MT₂-Rezeptortyps in der Regulierung der Insulinsekretion. Es werden auch therapeutische Ansätze zur Behandlung und Medikation bei Typ2-Diabetikern, wie beispielsweise die Blockade der MT₂-Rezeptoren, diskutiert [119].

Ergänzend zu den Expressionsuntersuchungen bei WR- und GK-Ratten wurde im Rahmen dieser Arbeit zusätzlich die mRNA der sGC - als offenbar bedeutende Isoform im Zusammenhang von Melatonin mit dem cGMP-Signalweg - in Pankreata stoffwechselunauffälliger und Typ2-diabetischer Patienten quantifiziert. Voruntersuchungen mittels PCR und Restriktionsanalyse konnten erstmals nachweisen, dass sowohl die α 2- als auch die β 1-Untereinheit der löslichen Guanylatzyklase im humanen Gesamtpankreas und der LANGERHANSschen Insel exprimiert sind. Bislang konnte lediglich die Existenz der membranständigen Isoform mGC C im Pankreasgesamtgewebe [161] oder dem exokrinen Gewebeanteil [162] nachgewiesen werden. Beim Vergleich der sGC-Expression zwischen stoffwechselunauffälligen und Typ2-diabetischen Patienten konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden. Im Gegensatz zu den Versuchen an WR- und GK-Ratten war hierbei eine Aufschlüsselung der Ergebnisse in Tag- und Nachtwerte bzw. Untersuchungen direkt an LANGERHANSschen Inseln nicht möglich. Studien zur Untersuchung von cGMP-Konzentrationen im Plasma des Menschen konnten zeigen, dass cGMP eine circadiane Rhythmizität mit hohen Werten in der Nacht aufweist und dass eine Melatoninapplikation die cGMP-Konzentration im humanen Plasma erhöht [163,164]. Möglicherweise ergeben sich bei Typ2-diabetischen Patienten aufgrund geringerer Plasma-Melatoninkonzentrationen

Veränderungen in der rhythmischen Sekretion von cGMP aus pankreatischem Gewebe, die bei einer zusammenfassenden Auswertung von Tag- und Nachtwerten der Patienten nicht sichtbar werden. Weiterhin muss bedacht werden, dass es sich bei dem hier untersuchten Patientenmaterial um sehr inhomogenes Gewebe handelt, wodurch zahlreiche weitere Parameter, wie Anzahl und Größe der Inseln oder Grad der Fibrosierung bzw. Entzündung [104], Einfluss auf die Ergebnislage nehmen können (siehe Abschnitt 6.1).

Neben Studien zum Melatonin- und Glukosestoffwechsel bei Typ2-diabetischen Ratten und Patienten sollen zukünftig auch Untersuchungen zu Veränderungen bei Typ1-Diabetes eine Rolle spielen. Zusätzlich zu Versuchen an Ratten mit Streptozotocin-induziertem Typ1-Diabetes [98] sollen Erhebungen an spontan-diabetischen LEW.1AR1-*iddm*-Ratten sowie Plasmauntersuchungen unbehandelter Patienten mit Typ1-Diabetes im Tagesprofil einbezogen werden.

6.4 Zur Bedeutung des cGMP für die Insulinsekretion

In Kenntnis, dass Melatonin die cGMP-Konzentration in pankreatischen β -Zellen senkt, kam die Frage auf, ob durch diesen Effekt die Insulinsekretion beeinflusst wird. Bisherige Untersuchungen zur Beteiligung der NO/cGMP-Signalkaskade in der Regulation der Insulinsekretion lieferten widersprüchliche Resultate [14-16,18-20,22,24]. Im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte Inkubationsversuche mit INS1-Zellen unter Verwendung des membrangängigen cGMP-Analogons 8-Br-cGMP konnten den Nachweis erbringen, dass cGMP die Insulinfreisetzung in Abhängigkeit von der Dosis erhöht. In Übereinstimmung zeigten Ergebnisse von Tsuura und Mitarb. [22] eine signifikante Erhöhung der Insulinsekretion durch das ebenfalls membrangängige Dibutyryl-cGMP in Inseln der Ratte. Auch an einer β -Zelllinie der Maus konnte belegt werden, dass bromiertes cGMP eine leicht verstärkende Wirkung auf die Insulinfreisetzung hat [14]. Zudem haben Smukler und Mitarb. [24] am Modell der INS1-Zelle nachgewiesen, dass der Einsatz von NO-Donatoren zur Erhöhung der NO-Konzentration - und damit vermutlich auch der cGMP-Bildung - mit einer deutlichen Erhöhung der Insulinsekretion einhergeht.

Umgekehrt kann aus diesen Ergebnissen gefolgert werden, dass die Senkung der cGMP-Konzentration durch Melatonin vermutlich mit einer Hemmung der Insulinsekretion verbunden ist. Die Ergebnisse sprechen dafür, dass Melatonin über die cGMP-Signalkaskade ebenso einen Insulin-senkenden Effekt vermittelt, wie es bei der bekannten Wirkung über den cAMP-Signalweg der Fall ist. Um mögliche Mechanismen der Melatoninwirkung auf die Insulinsekretion durch Senkung der cGMP-Konzentrationen aufzudecken, wurden weiterführend Untersuchungen über die mögliche Beteiligung der Proteinkinase G (PKG) als bedeutender Bestandteil der cGMP-Signaltransduktionskade durchgeführt. Obwohl die Existenz der PKG im Pankreas und auch speziell in pankreatischen β -Zellen der Maus bekannt ist, gab es bislang keine Hinweise auf die Bedeutung des Proteins für die Insulinsekretion. Die Daten belegen, dass die Blockade der PKG bei gering erhöhter cGMP-Konzentration die Insulin-erhöhende cGMP-Wirkung nicht beeinflusst; bei höherem cGMP-Gehalt die Blockade der PKG jedoch zur Hemmung der cGMP-medierten Insulinsteigerung führt. Es kann daher vermutet werden, dass die PKG erst bei höheren cGMP-Konzentrationen aktiviert wird und an der Signaltransduktion der cGMP-Kaskade beteiligt ist. Untersuchungen unter Einsatz weiterer 8-Br-cGMP-Konzentrationen könnten diese Ergebnisse verifizieren.

Neben der Aktivierung der PKG sind CNG-Kanäle Effektorproteine des cGMP zur Regulation verschiedener zellulärer und physiologischer Prozesse. Die Funktionalität und Bedeutung dieser Kanäle ist vor allem in olfaktorischen Zellen und in Photorezeptoren der Retina hinreichend untersucht [11,12]. CNG-Kanäle sind jedoch nicht nur auf sensorische Zellen beschränkt, sondern wurden inzwischen auch in Hippocampus, Herz, Testis, Niere, Kolon, Lunge und Endothelzellen nachgewiesen [165,166]. Mit dem Nachweis der mRNA von CNG-Kanal-Untereinheiten in der INS1-Zelle stellte sich die Frage, ob CNG-Kanäle als Komponenten des cGMP-Transduktionsweges auch hinsichtlich der Signalkaskade zur Insulinfreisetzung von Bedeutung sind. Die Ergebnisse dieser Inkubationsversuche belegen, dass in INS1-Zellen offensichtlich ein funktionell aktiver Kanal existiert, da die spezifische Blockade des CNG-Kanals mit *L-cis*-Diltiazem zu einer signifikanten Senkung der Insulinsekretion führte. Zudem wurde durch Blockade der CNG-Kanäle der Insulin-steigernde Effekt von 8-Br-cGMP aufgehoben. Aus diesen Befunden kann gefolgert werden, dass CNG-Kanäle auch Teil der Insulinsekretionskaskade sind und speziell bei Vermittlung der Insulin-steigernden Wirkung von cGMP eine Rolle spielen.

Interessanterweise zeigten Ergebnisse von Zellexperimenten und *real-time* RT-PCR-Untersuchungen weiterhin, dass eine Langzeit-Inkubation mit Melatonin zur Dosis-abhängigen Senkung der mRNA-Expression des CNG-Kanals führt. Es kann angenommen werden, dass dies ein *downstream*-Effekt verminderter cGMP-Konzentrationen durch Melatonin ist, welcher folglich zu Änderungen in der Insulinfreisetzung führt. Mit diesen Ergebnissen wurden erstmals Aussagen zum Vorkommen von CNG-Kanälen in INS1-Zellen, zu deren Beteiligung an der Insulinsekretionskaskade und zum Einfluss von Melatonin auf diese Kanäle getroffen. CNG-Kanäle werden direkt durch Bindung von cGMP oder cAMP geöffnet, wenn cGMP auch in einigen Geweben, wie beispielsweise der Retina, ein wirksamerer Agonist ist als cAMP [167]. Somit kann der Einfluss auf die mRNA-Expression des CNG-Kanals ebenso aus der Melatonin-medierten Inhibierung des cAMP-Signalweges resultieren.

Bei der Wertung der Ergebnisse muss jedoch bedacht werden, dass die Transkripte der CNG-Kanal-Untereinheiten lediglich in der INS1-Zelle detektiert werden konnten, nicht jedoch in Insel oder Pankreas der Ratte. Möglicherweise ist das Expressionsniveau zu gering um auch in Inseln oder Pankreata detektiert werden zu können. Zum Vorkommen von CNG-Kanälen in nativen β -Zellen, zum Verständnis der Funktionalität dieser Kanäle in der Insulinsekretion sowie zum Einfluss von Melatonin auf diese Proteine sind weiterführende Untersuchungen notwendig.

6.5 Vorstellungen über die Signalwege des Melatonins in der pankreatischen β -Zelle

Die Rezeptor-medierte Wirkung von Melatonin auf die Insulinfreisetzung konnten in den vergangenen Jahren weitreichend charakterisiert werden. Erste Untersuchungen erbrachten den Nachweis, dass Melatonin sowohl in isolierten Inseln neonater oder adulter Ratten als auch in INS1-Zellen zur Senkung der Forskolin-stimulierten Insulinsekretion führt. Diese Wirkung wird über die Hemmung der Adenylatzyklase/cAMP-Signaltransduktionskaskade vermittelt, verbunden mit einer Senkung der PKA-Aktivität [13,95,100,101]. Die Aufhebung des Melatonineffektes durch den Melatoninrezeptor-Antagonisten Luzindol sowie durch Pertussistoxin als Blocker der α -Untereinheit inhibitorischer, G-Protein-gekoppelter Rezeptoren konnten belegen, dass das Hormon seine Insulin-senkende Wirkung über Rezeptoren mediiert [100,101,103]. Weiterhin erbrachten Untersuchungen an INS1-Zellen den Nachweis für die

Beteiligung der IP_3 -Signalkaskade in der Vermittlung der Melatoninwirkung: Melatonin verstärkt Rezeptor-medierte die IP_3 -Freisetzung, einhergehend mit Erhöhung der Kalzium-Konzentration durch Liberalisierung aus intrazellulären Speichern und Steigerung der Insulinsekretion. Dabei findet im Unterschied zum Adenylatzyklase-cAMP-System, bei dem eine 6- bis 8-stündige Inkubation mit Melatonin vorausgehen muss um Effekte zu erkennen, eine schnelle und rasch vorübergehende Aktivierung statt. Die Senkung von cAMP und die Erhöhung der IP_3 -Freisetzung stellen gegensätzliche Signale für die Insulinfreisetzung dar. Die Ergebnisse deuten jedoch darauf hin, dass die hemmende Wirkung von Melatonin auf die cAMP-Kaskade und somit die Senkung der Insulinfreisetzung überwiegt [102,103].

Ergänzend zu Untersuchungen des cAMP- und IP_3 -Weges wurde im Rahmen dieser Arbeit die Wirkung von Melatonin auf die cGMP-Transduktionskaskade als dritten bedeutenden Signalweg in Zellen untersucht. In Abbildung 32 sind die Vorstellungen der Melatoninwirkung über die cGMP-Kaskade in der pankreatischen β -Zelle schematisch dargestellt. Es konnte nachgewiesen werden, dass Melatonin cGMP Rezeptor-medierte senkt, wobei offenbar der MT_2 -Rezeptor-Isoform eine größere Bedeutung zukommt als dem MT_1 -Rezeptortyp. Dieser cGMP-senkende Effekt wird über die Hemmung der löslichen Guanylatzyklase vermittelt. Bei länger andauernder Melatoninwirkung kommt es zur Rezeptor-unabhängigen Reduzierung der NO-Konzentration über Hemmung der NOS. Weiterhin konnte nachgewiesen werden, dass cGMP unter Beteiligung von CNG-Kanälen und der PKG die Insulinsekretion stimuliert. Es ist demnach davon auszugehen, dass Melatonin durch Senkung der cGMP-Konzentration die Insulinsekretion hemmt und damit synergistisch zur Insulin-hemmenden Wirkung über die cAMP-Signalkaskade wirkt.

Offen bleiben die Fragen nach der physiologischen Bedeutung der Melatoninwirkung über drei verschiedene *second-messenger*-Systeme und der Beteiligung unterschiedlicher Rezeptortypen an der Vermittlung des Melatoninsignals. Möglicherweise gibt es Unterschiede in Abhängigkeit von der Tagesperiodik, Dauer der Melatoninwirkung oder der Intensität des Einflusses auf die Insulinfreisetzung. Es ist bekannt, dass Melatonin über den MT_2 -Rezeptor nicht nur Einfluss auf die cGMP-, sondern auch auf die cAMP-Signalkaskade nimmt [13,88]. Da in der INS1-Zelle sowohl die Senkung der cAMP- als auch der cGMP-Konzentration zu einer Hemmung der Insulinsekretion führt, liegt die Vermutung nahe, dass beide Signalkaskaden funktionell eng miteinander in Verbindung stehen.

Schließlich muss auch in Betracht gezogen werden, dass weitere, bisher nicht untersuchte Signalwege in die Mediierung des Melatonineffektes auf die Insulinsekretion der pankreatischen β -Zelle involviert sind. Neueste Daten weisen beispielsweise auf die MT_1 -Rezeptor-medierte Tyrosinphosphorylierung des Insulin-like-growth-factor(IGF)-Rezeptors und des Insulin-Rezeptors in pankreatischen Inseln hin. Darüber hinaus wird sowohl der PI_3 -Kinase/Akt-Signalweg als auch die MEK/ERK-Transduktionskaskade durch Melatonin aktiviert, wodurch das Indolamin Einfluss auf Zellproliferation, -wachstum und -differenzierung nehmen könnte [168]. Zudem bleibt bislang unklar, ob Melatonin auch Einfluss auf den Auswärtstransport von cAMP oder cGMP über MRP-Transporter bzw. den Abbau der *second messenger* durch Phosphodiesterasen nimmt.

Obwohl einige Fragen offen bleiben, konnten die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen die Kenntnis zu Melatonin-assoziierten Signaltransduktionsmechanismen in der pankreatischen β -Zelle erweitern. Sowohl Inkubationsversuche an INS1-Zellen als auch die Einbeziehung von

Inseln und Pankreata verschiedener Tiermodelle und humanem Pankreasgewebe wurden unter Verwendung unterschiedlichster Untersuchungsmethoden die Bedeutung des MT_2 -Rezeptors und der Melatoninwirkung auf die cGMP-Signalkaskade in pankreatischen β -Zellen sowie Effekte des Indolamins auf die Insulinsekretion aufgezeigt.

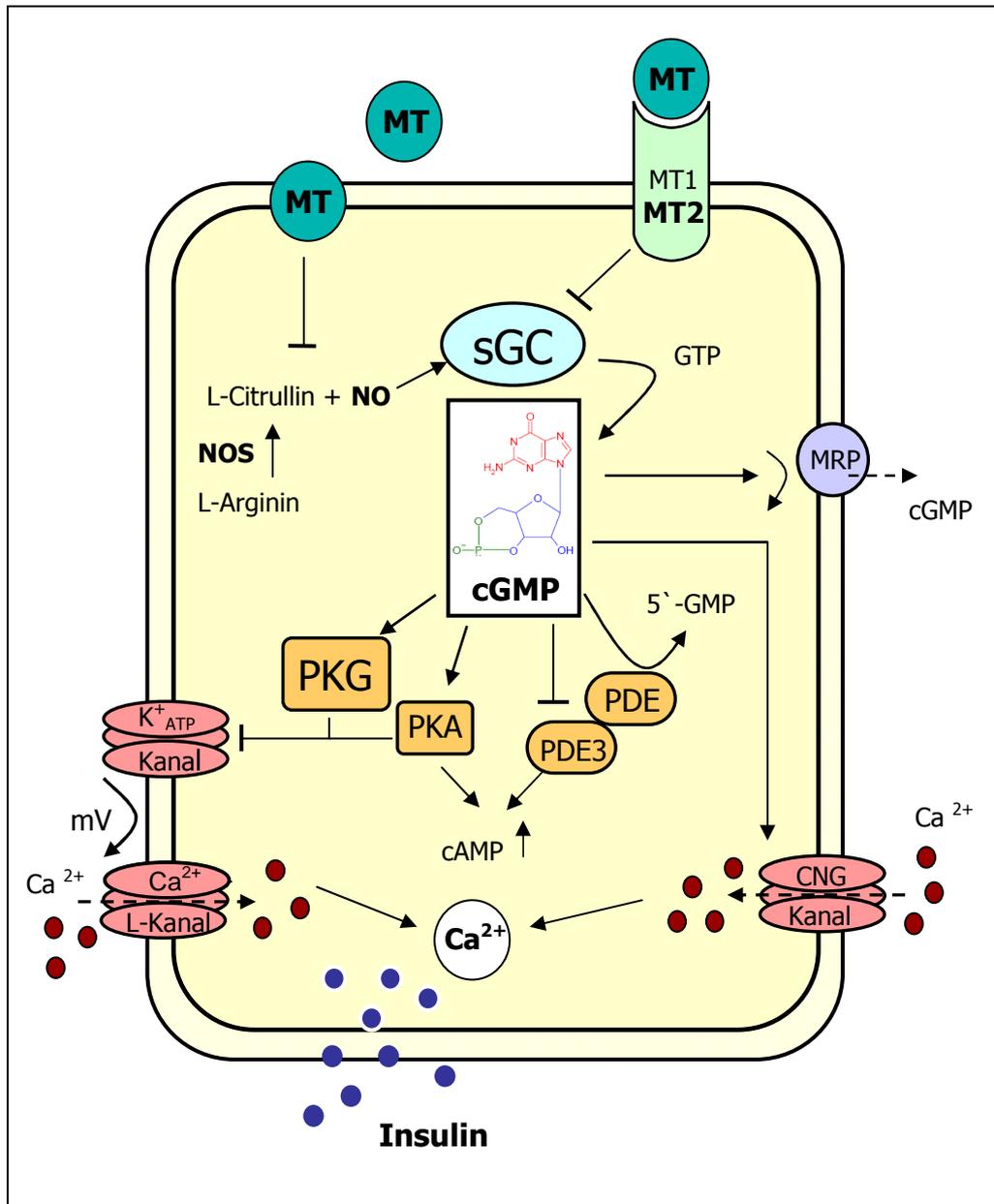


Abb. 32: Vorstellungen über den Einfluss von Melatonin auf die cGMP-Signalkaskade und die Insulinsekretion in der pankreatischen β -Zelle. ATP, Adenosintri-phosphat; cAMP, zyklisches 3'-5'-Adenosinmonophosphat; cGMP, zyklisches 3'-5'-Guanosinmonophosphat; CNG, *cyclic nucleotide-gated*; GTP, Guanosintri-phosphat; MRP, *multidrug resistance-associated protein*; MT, Melatonin; $MT_{1/2}$, Melatoninrezeptor 1/2; NO, Stickstoffmonoxid; NOS, Stickstoffmonoxid-Synthase; PDE, Phosphodiesterase; PKA, Proteinkinase A; PKG, Proteinkinase G; sGC, lösliche Guanylatzyklase.

7 Zusammenfassung

Diabetes mellitus und damit einhergehende schwerwiegende Spätkomplikationen gehören weltweit zu den häufigsten Erkrankungen und Todesursachen. In Deutschland leiden derzeit etwa sechs Millionen Menschen an Typ2-Diabetes; es wird von einer Dunkelziffer an Erkrankungen in Millionenhöhe ausgegangen. Damit gewinnt die Forschung zu Ätiologie, Prävention sowie diagnostischer und therapeutischer Behandlungsmöglichkeiten des Diabetes mellitus und seiner akuten und chronischen Komplikationen zunehmend an Bedeutung.

In den letzten Jahrzehnten konnten zahlreiche *in vitro*- und tierexperimentelle Untersuchungen sowie die Einbeziehung von Patientendaten den Nachweis zum Einfluss von Melatonin auf die Insulinsekretion, den Kohlenhydratstoffwechsel, Mechanismen der Signaltransduktion in der pankreatischen β -Zelle und Veränderungen bei diabetischer Stoffwechsellaage erbringen.

Ziel dieser Arbeit war es zu untersuchen, welche Bedeutung der cGMP-Signalkaskade und dem MT_2 -Rezeptor in der Vermittlung der Melatoninwirkung auf die Insulinsekretion zukommen. Inkubationsversuche mit Glukose-responsiven, Insulin-produzierenden Ratten-Insulinoma-Zellen (INS1) als Modell der pankreatischen β -Zelle und Einsatz des unspezifischen Melatoninrezeptor-Antagonisten Luzindol sowie des MT_2 -Rezeptor-spezifischen Antagonisten 4P-PDOT (4-Phenyl-2-propionamidotetralin) konnten erstmalig belegen, dass - neben dem MT_1 -Rezeptor - auch der MT_2 -Rezeptor an der Melatonin-medierten Senkung der Insulinsekretion beteiligt ist.

Weiterhin wurde der Nachweis erbracht, dass Melatonin nicht nur Einfluss auf die cAMP- und IP_3 -Signalkaskade in pankreatischen β -Zellen nimmt, sondern ebenso die cGMP-Konzentration in Abhängigkeit von Dosis- und Inkubationszeit senkt. Zellinkubationsversuche mit Melatoninrezeptor-Antagonisten zeigten, dass dieser Effekt mit großer Wahrscheinlichkeit über den MT_2 -Rezeptor mediiert wird.

Für spezielle Untersuchungen zur Melatoninwirkung auf die cGMP-Signalkaskade wurden Pankreata, LANGERHANSsche Inseln sowie INS1-Zellen zunächst hinsichtlich der Komponenten dieses Transduktionsweges charakterisiert. RT-PCR- und Restriktionsanalysen konnten erstmals den Expressionsnachweis der löslichen Guanylatzyklase (sGC) sowie der membranständigen Guanylatzyklase-Isoformen mGC A, B und C erbringen. Ferner wurde die Expression der Proteinkinase-Isoform PKG 1 und der cGMP-abbauenden Phosphodiesterasen-Isoformen PDE 1, 2, 5, 9 und 10 sowie der cGMP-regulierten, cAMP-spezifischen PDE 3 nachgewiesen. Zudem konnten Untereinheiten von cGMP-gesteuerten CNG(*cyclic nucleotide-gated*)-Kanälen und cGMP-transportierenden *multidrug resistance-associated*-Proteinen MRP 4, 5 und 8 detektiert werden.

Ergebnisse von *real-time* RT-PCR-Untersuchungen an INS1-Zellen zeigten erstmals, dass die Expression der sGC, nicht aber die der mGC-Isoformen, nach Langzeit-Melatonininkubation Dosis-abhängig gesenkt wird. Inkubationsversuche unter Einsatz des Stickstoffmonoxid(NO)-Donators SNAP (S-Nitroso-N-acetyl-DL-penicillamin) und der spezifischen sGC-Inhibitoren ODQ (1H-(1,2,4)-oxadiazolo-(4,3- α)-

quinoxalin-1-on) und NS2028 (4H-8-bromo-1,2,4-oxadiazolo-(3,4d)-benz-(b)(1,4)-oxazin-1-on) konnten belegen, dass Melatonin seine cGMP-senkende Wirkung über die sGC vermittelt.

Untersuchungen in INS1-Zellen zum Einfluss von Melatonin auf die NO-Konzentration zeigten, dass die Inkubation mit Melatonin nach 1 Stunde Inkubationszeit zu keiner Veränderung des NO-Gehaltes führt. Darüber hinaus resultierten Versuche mit Vorinkubation des unspezifischen NO-Synthase(NOS)-Inhibitors L-NMMA (N^G-monomethyl-L-arginin) nicht in einer Aufhebung der Melatonin-medierten Reduzierung von cGMP. Zusammengenommen deuten die Daten darauf hin, dass die Rezeptor-medierte Senkung der cGMP-Konzentration durch Kurzzeit-Melatoninwirkung nicht durch Inhibierung der sGC über Hemmung der NOS erklärt werden kann. Demgegenüber resultierten Langzeit-Melatonininkubationen von 4 oder 24 Stunden in einer Rezeptor-unabhängigen, Dosis-abhängigen Senkung von NO durch Hemmung der NOS. Es kann daher vermutet werden, dass die cGMP-Senkung bei Langzeit-Melatonininkubation noch verstärkt wird, indem NO-unabhängige sowie NO-abhängige Melatonineffekte auf die sGC additiv wirken.

Molekularbiologische Untersuchungen an Melatoninrezeptor-*knockout*-Mäusen bestätigen und ergänzen die Ergebnisse aus Inkubationsversuchen der β -Zelllinie INS1. Es konnte festgestellt werden, dass die sGC-mRNA sowohl in tags- oder nachts gewonnenen Pankreata als auch direkt in LANGERHANSschen Inseln bei *knockout* des MT₂-Rezeptors bzw. beider Melatoninrezeptoren signifikant stärker exprimiert ist als bei Wildtyp-Mäusen. Damit konnte auch *in vivo* der Zusammenhang zwischen Rezeptor-medierter Melatoninwirkung und cGMP-Transduktionskaskade aufgezeigt werden.

Weiterhin konnten erstmals Aussagen zur Guanylatzyklase-Expression in LANGERHANSschen Inseln und Gesamtpankreata von Ratten und Mäusen in Abhängigkeit von der Tageszeit getroffen werden: Während in Gesamtpankreata von Wildtyp-Mäusen im Tag-Nacht-Vergleich kein Unterschied in der sGC-Expression festgestellt werden konnte, ist die sGC in Inseln der Wistar-Ratte nachts deutlich geringer exprimiert als am Tag. Zudem ist bei Ratten nach Melatoninsubstitution über das Trinkwasser die pankreatische sGC-Expression im Vergleich zur Kontrollgruppe erniedrigt. Erstaunlicherweise tritt dieser Effekt bei Typ2-diabetischen Tieren im genau gegensätzlicher Weise auf: Sowohl in nachts gewonnenen Inseln auch in Pankreata von Melatonin-substituierten Ratten ist die sGC-mRNA im Vergleich zu tags gewonnenen oder unbehandelten Tieren stärker exprimiert. Diese *in-vivo*-Daten lassen auf einen Einfluss von natürlicherweise hohen Melatoninwerten in der Nacht auf die sGC-Expression in pankreatischem Gewebe und Veränderungen bei Vorliegen eines Typ2-Diabetes schließen.

Zellinkubationsversuche mit dem membrangängigen cGMP-Analogon 8-Bromo-cGMP führten zur Klärung der Frage, ob und über welchen Mechanismus sich Veränderungen der cGMP-Konzentrationen auf die Insulinsekretion auswirken. Die Ergebnisse belegen, dass cGMP die Insulinfreisetzung in Abhängigkeit von der Dosis signifikant erhöht und dass dieser Effekt über die Proteinkinase G mediert wird. Aus diesen Ergebnissen kann gefolgert werden, dass die Senkung der cGMP-Konzentration durch

Melatonin vermutlich ebenso mit einer Hemmung der Insulinsekretion verbunden ist, wie es bereits von seiner Wirkung über den cAMP-Transduktionsweg bekannt ist.

Erstmalig konnten zudem Aussagen zur Bedeutung von CNG-Kanälen für die Insulinsekretion sowie zum Einfluss von Melatonin auf diese Kanäle getroffen werden. Die spezifische Blockade der CNG-Kanäle mit L-*cis*-Diltiazem führte bei INS1-Zellen zu signifikanter Senkung der Insulinsekretion sowie zur Aufhebung der Insulin-steigernden Wirkung von 8-Bromo-cGMP. Die Daten weisen auf eine Beteiligung der CNG-Kanäle an der Insulinsekretionskaskade sowie speziell an der Insulin-steigernden Wirkung von cGMP hin. Quantitative *real-time* RT-PCR-Untersuchungen zeigten ferner, dass nach Langzeit-Melatonininkubation die mRNA-Expression der CNG-Kanäle in Abhängigkeit von der Dosis signifikant gesenkt wird. Es kann angenommen werden, dass dies ein *downstream*-Effekt verminderter cGMP-Konzentrationen durch Melatonin ist, welcher folglich zu Änderungen in der Insulinfreisetzung führen kann.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zur physiologischen Bedeutung des MT₂-Rezeptors für die Vermittlung des Melatoninsignals, zum Einfluss von Melatonin auf die cGMP-Signalkaskade in pankreatischen β -Zellen sowie zu Besonderheiten bei Typ2-Diabetes ergänzen bisherige Untersuchungen und erweitern das Verständnis über die Wirkung von Melatonin auf die Insulinsekretion und Signaltransduktionsmechanismen in der pankreatischen β -Zelle. Perspektivisch könnten die Ergebnisse zum Zusammenhang von Melatonin und dem Glukosestoffwechsel Ansatzpunkte zum besseren Verständnis der Diabetogenese und möglichen Behandlungen liefern.

8 Summary

Diabetes mellitus and associated serious late diabetic syndromes are one of the most common diseases and causes of death. In Germany, approximately six million people suffer from type 2 diabetes; the estimated number of unknown cases is, however, into the millions. Therefore, research in aetiology, prevention as well as diagnostic and therapeutic medical treatment of diabetes and its acute and chronic complications gains in importance. During the last decades, numerous in vitro and animal studies as well as the inclusion of medical patient data provided evidence for the influence of melatonin on insulin secretion, carbohydrate metabolism, signal transduction mechanisms in pancreatic β -cells and characteristic changes in the course of diabetes.

The aim of the present study was to examine the relevance of the cGMP signalling pathway as well as of the MT_2 melatonin receptor in mediating melatonin effects on insulin secretion. Incubation experiments were performed using the glucose-responsive, insulin-producing rat insulinoma cell line INS1 and the unspecific melatonin receptor antagonist luzindole as well as the MT_2 -receptor specific antagonist 4P-PDOT (4-phenyl-2-propionamidotetraline). For the first time, results clearly demonstrate that the MT_2 receptor - in addition to the well-known MT_1 receptor function - is involved in mediating melatonin effects on insulin secretion.

Furthermore, the results provided evidence that melatonin not only influences the cAMP and IP_3 concentrations, but also significantly inhibits cGMP concentration in a time- and dose-dependent manner. Cell incubation studies with melatonin receptor antagonists demonstrated that this effect is probably mediated via the MT_2 melatonin receptor subtype.

For specific investigations about the influence of melatonin on the cGMP signalling cascade, pancreata, islets of LANGERHANS as well as INS1 cells were characterized according to the expression of components involved in the cGMP signal transduction pathway. For the first time, RT-PCR and restriction analysis established the expression of the soluble guanylate cyclase (sGC) as well as the membrane guanylate cyclase isoforms mGC A, B and C. In addition, results provided evidence for the expression of cGMP-specific phosphodiesterases PDE 1, 2, 5, 9, 10 and the cGMP-regulated, cAMP-specific isoform PDE 3. Moreover, subunits of cGMP-modulated CNG (cyclic nucleotide-gated) channels as well as cGMP-transporting multidrug resistance-associated-proteins MRP 4, 5 und 8 could be detected in INS1 cells.

Results of quantitative real-time RT-PCR analysis with INS1 cells demonstrated that the mRNA expression of the sGC, but not of mGC isoforms, was significantly reduced after long-term melatonin incubation in a dose-dependent manner. Incubation experiments with the nitric oxide (NO) donor SNAP (S-nitrosoacetyl penicillamine) and the specific sGC inhibitors ODQ (1H-(1,2,4)-oxadiazolo-(4,3- α)-quin-oxalin-1-one) and NS2028 (4H-8-bromo-1,2,4-oxadiazolo-(3,4-d)-benz-(b)(1,4)-oxazin-1-one) could prove that melatonin mediates its cGMP-inhibiting effects via the sGC.

Research about the influence of melatonin on NO production in INS1 cells demonstrated, that NO concentration was not changed after melatonin application for 1 hour. In addition, studies with preincubation of the non-selective NO synthase (NOS) inhibitor L-NMMA (N^G -monomethyl-L-arginine) did not abolish the melatonin-mediated reduction of cGMP concentrations. Taken together, data lead to the assumption that the receptor-mediated inhibition of cGMP concentration caused by short-term melatonin action can not be explained by sGC-inhibition induced by a reduced NOS-activity. In contrast, long-term melatonin incubation of 4 or 24 hours resulted in a receptor-independent and dose-dependent decrease of NO induced by NOS inhibition. Therefore, it can be assumed that long-term melatonin incubation would intensify the cGMP inhibition as NO-dependent as well as NO-independent melatonin actions could have additive effects on sGC function.

Molecular investigations with melatonin receptor knockout mice confirm and complement the results obtained from incubation experiments with INS1 cells. It could be established that sGC-mRNA expression levels in pancreata of animals sacrificed at night or during the day as well as determined directly in islets of LANGERHANS was significantly higher in $MT_2^{-/-}$ or $MT_{1/2}^{-/-}$ knockout mice than in wild type animals. Thus, the interrelationship between the receptor-mediated melatonin action and the cGMP signaling cascade could be revealed in vivo as well.

In addition, results provided conclusive information about guanylate cyclase expression levels in islets of LANGERHANS and pancreata extracted from rats or mice in dependence of the time of the day: Whereas no difference in sGC expression could be detected in pancreata extracted from wild type mice comparing night- and daytime values, the sGC expression level in islets of Wistar rats was lower at night than during the day. Moreover, the pancreatic sGC expression levels were reduced in rats which were melatonin-substituted by administration of the hormone to the drinking water, compared to the control group. Astonishingly, this effect appeared to be inverted in case of type 2 diabetes: Both, in islets obtained at night and in pancreata of melatonin-substituted rats, the sGC-mRNA expression was higher compared with the daytime values or untreated animals. These in vivo-collected data suggest an influence of higher melatonin levels during the night on sGC expression levels in pancreatic tissue and variations in case of type 2 diabetes.

Cell incubation experiments using the membrane-permeant cGMP analogue 8-Bromo-cGMP addressed the question, as to how changes in cGMP concentrations would effect the insulin secretion. The results demonstrated that cGMP significantly increased the insulin secretion in a dose-dependent manner and that this effect was mediated via the protein kinase G. It can be concluded, that the melatonin-mediated decrease of cGMP concentration is probably also associated with an insulin-inhibiting effect, similar to the well established cAMP-mediated melatonin action.

Furthermore, the relevance of CNG channels for mechanisms of insulin secretion as well as the influence of melatonin on these channels were investigated for the first time. The specific blocking of CNG channels with l-cis-diltiazem in INS1 cells resulted in a significant decrease of insulin secretion and in an abolishment of the insulin-increasing action of 8-Bromo-cGMP. These data indicate that CNG

channels are involved in the insulin secretion cascade as well as in the insulin-increasing effect of cGMP. In addition, quantitative real-time RT-PCR analysis demonstrated that long-term melatonin incubation resulted in a dose-dependent decrease of CNG channel expression levels. It can be assumed that this observation can be explained as a downstream effect of a melatonin-mediated reduction of cGMP concentrations, which consequently leads to changes in insulin secretion.

The results of the present study point out the physiological relevance of the MT₂ receptor in mediating the melatonin action, the influence of melatonin on the cGMP signalling cascade as well as characteristic changes in case of type 2 diabetes. The data complement previous investigations and improve the knowledge about the melatonin effect on insulin secretion and mechanisms of signal transduction in pancreatic β -cells. Prospectively, the knowledge about the interrelationship between melatonin and the carbohydrate metabolism could be a basis for a better understanding of the genesis of diabetic diseases and possible treatments.

9 Literaturverzeichnis

- [1] Kuhn, M. (2003). Structure, regulation, and function of mammalian membrane guanylyl cyclase receptors, with a focus on guanylyl cyclase-A. *Circ Res* 93, 700-9.
- [2] Harteneck, C., Koesling, D., Soling, A., Schultz, G. und Bohme, E. (1990). Expression of soluble guanylyl cyclase. Catalytic activity requires two enzyme subunits. *FEBS Lett* 272, 221-3.
- [3] Maurice, D. H., Palmer, D., Tilley, D. G., Dunkerley, H. A., Netherton, S. J., Raymond, D. R., Elbatarny, H. S. und Jimmo, S. L. (2003). Cyclic nucleotide phosphodiesterase activity, expression, and targeting in cells of the cardiovascular system. *Mol Pharmacol* 64, 533-46.
- [4] Bender, A. T. und Beavo, J. A. (2006). Cyclic nucleotide phosphodiesterases: molecular regulation to clinical use. *Pharmacol Rev* 58, 488-520.
- [5] Jedlitschky, G., Burchell, B. und Keppler, D. (2000). The multidrug resistance protein 5 functions as an ATP-dependent export pump for cyclic nucleotides. *J Biol Chem* 275, 30069-74.
- [6] Chen, Z. S., Guo, Y., Belinsky, M. G., Kotova, E. und Kruh, G. D. (2005). Transport of bile acids, sulfated steroids, estradiol 17-beta-D-glucuronide, and leukotriene C4 by human multidrug resistance protein 8 (ABCC11). *Mol Pharmacol* 67, 545-57.
- [7] Chen, Z. S., Lee, K. und Kruh, G. D. (2001). Transport of cyclic nucleotides and estradiol 17-beta-D-glucuronide by multidrug resistance protein 4. Resistance to 6-mercaptopurine and 6-thioguanine. *J Biol Chem* 276, 33747-54.
- [8] Schlossmann, J., Feil, R. und Hofmann, F. (2003). Signaling through NO and cGMP-dependent protein kinases. *Ann Med* 35, 21-7.
- [9] Lucas, K. A., Pitari, G. M., Kazerounian, S., Ruiz-Stewart, I., Park, J., Schulz, S., Chepenik, K. P. und Waldman, S. A. (2000). Guanylyl cyclases and signaling by cyclic GMP. *Pharmacol Rev* 52, 375-414.
- [10] Wells, G. B. und Tanaka, J. C. (1997). Ion selectivity predictions from a two-site permeation model for the cyclic nucleotide-gated channel of retinal rod cells. *Biophys J* 72, 127-40.
- [11] Biel, M., Sautter, A., Ludwig, A., Hofmann, F. und Zong, X. (1998). Cyclic nucleotide-gated channels-mediators of NO:cGMP-regulated processes. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 358, 140-4.
- [12] Craven, K. B. und Zagotta, W. N. (2006). CNG and HCN channels: two peas, one pod. *Annu Rev Physiol* 68, 375-401.
- [13] Kemp, D. M., Ubeda, M. und Habener, J. F. (2002). Identification and functional characterization of melatonin Mel 1a receptors in pancreatic beta cells: potential role in incretin-mediated cell function by sensitization of cAMP signaling. *Mol Cell Endocrinol* 191, 157-66.
- [14] Laychock, S. G., Modica, M. E. und Cavanaugh, C. T. (1991). L-arginine stimulates cyclic guanosine 3',5'-monophosphate formation in rat islets of Langerhans and RINm5F insulinoma cells: evidence for L-arginine:nitric oxide synthase. *Endocrinology* 129, 3043-52.
- [15] Matsuura, N., Ishikawa, T., Abe, S., Yuyama, H., Sugino, F., Ishii, K. und Nakayama, K. (1999). Nitric oxide-cyclic GMP system potentiates glucose-induced rise in cytosolic Ca²⁺ concentration in rat pancreatic beta-cells. *Life Sci* 65, 1515-22.
- [16] Kaneko, Y., Ishikawa, T., Amano, S. und Nakayama, K. (2003). Dual effect of nitric oxide on cytosolic Ca²⁺ concentration and insulin secretion in rat pancreatic beta-cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 284, C1215-22.

- [17] Vara, E. und Tamarit-Rodriguez, J. (1991). Does cyclic guanosine monophosphate mediate nor-adrenaline-induced inhibition of islet insulin secretion stimulated by glucose and palmitate? *Biochem J* 278 (Pt 1), 243-8.
- [18] Jones, P. M., Persaud, S. J., Bjaaland, T., Pearson, J. D. und Howell, S. L. (1992). Nitric oxide is not involved in the initiation of insulin secretion from rat islets of Langerhans. *Diabetologia* 35, 1020-7.
- [19] Sjöholm, A. (1997). Glucose stimulates islet beta-cell mitogenesis through GTP-binding proteins and by protein kinase C-dependent mechanisms. *Diabetes* 46, 1141-7.
- [20] Antoine, M. H., Hermann, M., Herchuelz, A. und Lebrun, P. (1993). Sodium nitroprusside inhibits glucose-induced insulin release by activating ATP-sensitive K⁺ channels. *Biochim Biophys Acta* 1175, 293-301.
- [21] Green, I. C., Delaney, C. A., Cunningham, J. M., Karmiris, V. und Southern, C. (1993). Interleukin-1 beta effects on cyclic GMP and cyclic AMP in cultured rat islets of Langerhans-arginine-dependence and relationship to insulin secretion. *Diabetologia* 36, 9-16.
- [22] Tsuura, Y., Ishida, H., Hayashi, S., Sakamoto, K., Horie, M. und Seino, Y. (1994). Nitric oxide opens ATP-sensitive K⁺ channels through suppression of phosphofructokinase activity and inhibits glucose-induced insulin release in pancreatic beta cells. *J Gen Physiol* 104, 1079-98.
- [23] Ding, Y. und Rana, R. S. (1998). Nitric oxide does not initiate but potentiates glucose-induced insulin secretion in pancreatic beta-cells. *Biochem Biophys Res Commun* 251, 699-703.
- [24] Smukler, S. R., Tang, L., Wheeler, M. B. und Salapatek, A. M. (2002). Exogenous nitric oxide and endogenous glucose-stimulated beta-cell nitric oxide augment insulin release. *Diabetes* 51, 3450-60.
- [25] Sunouchi, T., Suzuki, K., Nakayama, K. und Ishikawa, T. (2008). Dual effect of nitric oxide on ATP-sensitive K⁺ channels in rat pancreatic beta cells. *Pflugers Arch* 456, 573-9.
- [26] Korf, H. W., Stehle, J. H. (2005). Das circadiane System der Säugetiere -integraler Bestandteil des neuroendokrinen Systems. In: Peschke E.: *Endokrinologie, Zeitstrukturen endokriner Systeme*. Verlag Sächs Akad Wiss, Stuttgart, Leipzig, S. 9-31.
- [27] Stehle, J. H. und Korf, H. W. (1996). Neuroendokrine Signaltransduktion: Das Pinealorgan als Modell für cAMP-modulierte Genexpression. *Neuroforum* 4, 13-22.
- [28] Morse, D. und Sassone-Corsi, P. (2002) Time after time: inputs to and outputs from the mammalian circadian oscillators. *Trends Neurosci* 25, 632-7.
- [29] Peschke, E. und Peschke, D. (1998). Evidence for a circadian rhythm of insulin release from perfused rat pancreatic islets. *Diabetologia* 41, 1085-92.
- [30] Mühlbauer, E., Wolgast, S., Finckh, U., Peschke, D. und Peschke, E. (2004). Indication of circadian oscillations in the rat pancreas. *FEBS Lett* 564, 91-6.
- [31] Chong, N. W., Bernard, M. und Klein, D. C. (2000). Characterization of the chicken serotonin N-acetyltransferase gene. Activation via clock gene heterodimer/E box interaction. *J Biol Chem* 275, 32991-8.
- [32] Hardeland, R., Reiter, R. J., Poeggeler, B. und Tan, D. X. (1993). The significance of the metabolism of the neurohormone melatonin: antioxidative protection and formation of bio-active substances. *Neurosci Biobehav Rev* 17, 347-57.

- [33] Poeggeler, B., Thuermann, S., Dose, A., Schoenke, M., Burkhardt, S. und Hardeland, R. (2002). Melatonin's unique radical scavenging properties - roles of its functional substituents as revealed by a comparison with its structural analogs. *J Pineal Res* 33, 20-30.
- [34] Reiter, R. J. (1993). The melatonin rhythm: both a clock and a calendar. *Experientia* 49, 654-64.
- [35] Reiter, R. J. (1998). Melatonin and human reproduction. *Ann Med* 30, 103-8.
- [36] Peschke, E. (2008). Melatonin, endocrine pancreas and diabetes. *J Pineal Res* 44, 26-40.
- [37] Song, Y., Chan, C. W. Y., Brown, G. M., Pang, S. F., Silverman, M. (1997). Studies of the renal action of melatonin: Evidence 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, 93-100.
- [38] Reppert, S. M. (1997). Melatonin receptors: molecular biology of a new family of G protein-coupled receptors. *J Biol Rhythms* 12, 528-31.
- [39] Tomas-Zapico, C. und Coto-Montes, A. (2005). A proposed mechanism to explain the stimulatory effect of melatonin on antioxidative enzymes. *J Pineal Res* 39, 99-104.
- [40] Blask, D. E., Sauer, L. A. und Dauchy, R. T. (2002). Melatonin as a chronobiotic/anticancer agent: cellular, biochemical, and molecular mechanisms of action and their implications for circadian-based cancer therapy. *Curr Top Med Chem* 2, 113-32.
- [41] Doolen, S., Krause, D. N., Dubocovich, M. L. und Duckles, S. P. (1998). Melatonin mediates two distinct responses in vascular smooth muscle. *Eur J Pharmacol* 345, 67-9.
- [42] Ting, K. N., Blaylock, N. A., Sugden, D., Delagrang, P., Scalbert, E. und Wilson, V. G. (1999). Molecular and pharmacological evidence for MT1 melatonin receptor subtype in the tail artery of juvenile Wistar rats. *Br J Pharmacol* 127, 987-95.
- [43] Guerrero, J. M. und Reiter, R. J. (2002). Melatonin-immune system relationships. *Curr Top Med Chem* 2, 167-79.
- [44] Reppert, S. M., Weaver, D. R. und Ebisawa, T. (1994). Cloning and characterization of a mammalian melatonin receptor that mediates reproductive and circadian responses. *Neuron* 13, 1177-85.
- [45] Reppert, S. M., Godson, C., Mahle, C. D., Weaver, D. R., Slaugenhaupt, S. A. und Gusella, J. F. (1995). Molecular characterization of a second melatonin receptor expressed in human retina and brain: the Mel1b melatonin receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 8734-8.
- [46] Drazen, D. L. und Nelson, R. J. (2001). Melatonin receptor subtype MT2 (Mel 1b) and not mt1 (Mel 1a) is associated with melatonin-induced enhancement of cell-mediated and humoral immunity. *Neuroendocrinology* 74, 178-84.
- [47] Dubocovich, M. L., Masana, M. I., Iacob, S. und Sauri, D. M. (1997). Melatonin receptor antagonists that differentiate between the human Mel1a and Mel1b recombinant subtypes are used to assess the pharmacological profile of the rabbit retina ML1 presynaptic heteroreceptor. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 355, 365-75.
- [48] Hunt, A. E., Al-Ghoul, W. M., Gillette, M. U. und Dubocovich, M. L. (2001). Activation of MT(2) melatonin receptors in rat suprachiasmatic nucleus phase advances the circadian clock. *Am J Physiol Cell Physiol* 280, C110-8.
- [49] Jin, X., von Gall, C., Pieschl, R. L., Gribkoff, V. K., Stehle, J. H., Reppert, S. M. und Weaver, D. R. (2003). Targeted disruption of the mouse Mel(1b) melatonin receptor. *Mol Cell Biol* 23, 1054-60.

- [50] Gerdin, M. J., Masana, M. I., Rivera-Bermudez, M. A., Hudson, R. L., Earnest, D. J., Gillette, M. U. und Dubocovich, M. L. (2004). Melatonin desensitizes endogenous MT2 melatonin receptors in the rat suprachiasmatic nucleus: relevance for defining the periods of sensitivity of the mammalian circadian clock to melatonin. *Faseb J* 18, 1646-56.
- [51] Weaver, D. R., Liu, C. und Reppert, S. M. (1996). Nature's knockout: the Mel1b receptor is not necessary for reproductive and circadian responses to melatonin in Siberian hamsters. *Mol Endocrinol* 10, 1478-87.
- [52] Liu, C., Weaver, D. R., Jin, X., Shearman, L. P., Pieschl, R. L., Gribkoff, V. K. und Reppert, S. M. (1997). Molecular dissection of two distinct actions of melatonin on the suprachiasmatic circadian clock. *Neuron* 19, 91-102.
- [53] Vanecek, J. (1998). Cellular mechanisms of melatonin action. *Physiol Rev* 78, 687-721.
- [54] Wang, L. M., Suthana, N. A., Chaudhury, D., Weaver, D. R. und Colwell, C. S. (2005). Melatonin inhibits hippocampal long-term potentiation. *Eur J Neurosci* 22, 2231-7.
- [55] Larson, J., Jessen, R. E., Uz, T., Arslan, A. D., Kurtuncu, M., Imbesi, M. und Manev, H. (2006). Impaired hippocampal long-term potentiation in melatonin MT2 receptor-deficient mice. *Neurosci Lett* 393, 23-6.
- [56] Peschke, E., Stumpf, I., Bazwinsky, I., Litvak, L., Dralle, H. und Mühlbauer, E. (2007). Melatonin and type 2 diabetes - a possible link? *J Pineal Res* 42, 350-8.
- [57] Ekmekcioglu, C. (2006). Melatonin receptors in humans: biological role and clinical relevance. *Bio-med Pharmacother* 60, 97-108.
- [58] Nosjean, O., Ferro, M., Coge, F., Beauverger, P., Henlin, J. M., Lefoulon, F., Fauchere, J. L., Delagrangé, P., Canet, E. und Boutin, J. A. (2000). Identification of the melatonin-binding site MT3 as the quinone reductase 2. *J Biol Chem* 275, 31311-7.
- [59] Reppert, S. M., Weaver, D. R. und Godson, C. (1996). Melatonin receptors step into the light: cloning and classification of subtypes. *Trends Pharmacol Sci* 17, 100-2.
- [60] Drew, J. E., Barrett, P., Mercer, J. G., Moar, K. M., Canet, E., Delagrangé, P. und Morgan, P. J. (2001). Localization of the melatonin-related receptor in the rodent brain and peripheral tissues. *J Neuroendocrinol* 13, 453-8.
- [61] Dufourny, L., Levasseur, A., Migaud, M., Callebaut, I., Pontarotti, P., Malpoux, B. und Monget, P. (2008). GPR50 is the mammalian ortholog of Mel1c: evidence of rapid evolution in mammals. *BMC Evol Biol* 8, 105.
- [62] Pandi-Perumal, S. R., Trakht, I., Srinivasan, V., Spence, D. W., Maestroni, G. J., Zisapel, N. und Cardinali, D. P. (2008). Physiological effects of melatonin: role of melatonin receptors and signal transduction pathways. *Prog Neurobiol* 85, 335-53.
- [63] New, D. C., Tsim, S. T. und Wong, Y. H. (2003). G protein-linked effector and second messenger systems involved in melatonin signal transduction. *Neurosignals* 12, 59-70.
- [64] Brydon, L., Roka, F., Petit, L., de Coppet, P., Tissot, M., Barrett, P., Morgan, P. J., Nanoff, C., Strosberg, A. D. und Jockers, R. (1999). Dual signaling of human Mel1a melatonin receptors via G(i2), G(i3), and G(q/11) proteins. *Mol Endocrinol* 13, 2025-38.
- [65] Markowska, M., Mrozkowiak, A., Pawlak, J. und Skwarlo-Sonta, K. (2004). Intracellular second messengers involved in melatonin signal transduction in chicken splenocytes in vitro. *J Pineal Res* 37, 207-12.

- [66] Berridge, M. J. und Irvine, R. F. (1989). Inositol phosphates and cell signalling. *Nature* 341, 197-205.
- [67] Godson, C. und Reppert, S. M. (1997). The Mel1a melatonin receptor is coupled to parallel signal transduction pathways. *Endocrinology* 138, 397-404.
- [68] Martinuzzo, M., Del Zar, M. M., Cardinali, D. P., Carreras, L. O. und Vacas, M. I. (1991). Melatonin effect on arachidonic acid metabolism to cyclooxygenase derivatives in human platelets. *J Pineal Res* 11, 111-5.
- [69] Zhang, H., Akbar, M. und Kim, H. Y. (1999). Melatonin: an endogenous negative modulator of 12-lipoxygenation in the rat pineal gland. *Biochem J* 344, 487-93.
- [70] Del Zar, M. M., Martinuzzo, M., Falcon, C., Cardinali, D. P., Carreras, L. O. und Vacas, M. I. (1990). Inhibition of human platelet aggregation and thromboxane-B2 production by melatonin: evidence for a diurnal variation. *J Clin Endocrinol Metab* 70, 246-51.
- [71] Kornblihtt, L. I., Finocchiaro, L. und Molinas, F. C. (1993). Inhibitory effect of melatonin on platelet activation induced by collagen and arachidonic acid. *J Pineal Res* 14, 184-91.
- [72] Vanecek, J. und Klein, D. C. (1992). Melatonin inhibits gonadotropin-releasing hormone-induced elevation of intracellular Ca²⁺ in neonatal rat pituitary cells. *Endocrinology* 130, 701-7.
- [73] Vanecek, J. und Klein, D. C. (1992). Sodium-dependent effects of melatonin on membrane potential of neonatal rat pituitary cells. *Endocrinology* 131, 939-46.
- [74] Lopez-Gonzalez, M. A., Calvo, J. R., Osuna, C. und Guerrero, J. M. (1992). Interaction of melatonin with human lymphocytes: evidence for binding sites coupled to potentiation of cyclic AMP stimulated by vasoactive intestinal peptide and activation of cyclic GMP. *J Pineal Res* 12, 97-104.
- [75] Faillace, M. P., Keller Sarmiento, M. I. und Rosenstein, R. E. (1996). Melatonin effect on the cyclic GMP system in the golden hamster retina. *Brain Res* 711, 112-7.
- [76] Vanecek, J. und Vollrath, L. (1989). Melatonin inhibits cyclic AMP and cyclic GMP accumulation in the rat pituitary. *Brain Res* 505, 157-9.
- [77] Gilad, E., Matzkin, H. und Zisapel, N. (1997). Inactivation of melatonin receptors by protein kinase C in human prostate epithelial cells. *Endocrinology* 138, 4255-61.
- [78] Bubis, M. und Zisapel, N. (1999). Involvement of cGMP in cellular melatonin responses. *Biol Cell* 91, 45-9.
- [79] Petit, L., Lacroix, I., de Coppet, P., Strosberg, A. D. und Jockers, R. (1999). Differential signaling of human Mel1a and Mel1b melatonin receptors through the cyclic guanosine 3'-5'-monophosphate pathway. *Biochem Pharmacol* 58, 633-9.
- [80] Tamura, E. K., Silva, C. L. und Markus, R. P. (2006). Melatonin inhibits endothelial nitric oxide production in vitro. *J Pineal Res* 41, 267-74.
- [81] Gitto, E., Reiter, R. J., Cordaro, S. P., La Rosa, M., Chiurazzi, P., Trimarchi, G., Gitto, P., Calabro, M. P. und Barberi, I. (2004). Oxidative and inflammatory parameters in respiratory distress syndrome of preterm newborns: beneficial effects of melatonin. *Am J Perinatol* 21, 209-16.
- [82] Silva, C. L., Tamura, E. K., Macedo, S. M., Cecon, E., Bueno-Alves, L., Farsky, S. H., Ferreira, Z. S. und Markus, R. P. (2007). Melatonin inhibits nitric oxide production by microvascular endothelial cells in vivo and in vitro. *Br J Pharmacol* 151, 195-205.

- [83] Pozo, D., Reiter, R. J., Calvo, J. R. und Guerrero, J. M. (1997). Inhibition of cerebellar nitric oxide synthase and cyclic GMP production by melatonin via complex formation with calmodulin. *J Cell Biochem* 65, 430-42.
- [84] Bettahi, I., Pozo, D., Osuna, C., Reiter, R. J., Acuna-Castroviejo, D. und Guerrero, J. M. (1996). Melatonin reduces nitric oxide synthase activity in rat hypothalamus. *J Pineal Res* 20, 205-10.
- [85] Storr, M., Koppitz, P., Sibae, A., Saur, D., Kurjak, M., Franck, H., Schusdziarra, V. und Allescher, H. D. (2002). Melatonin reduces non-adrenergic, non-cholinergic relaxant neurotransmission by inhibition of nitric oxide synthase activity in the gastrointestinal tract of rodents in vitro. *J Pineal Res* 33, 101-8.
- [86] Vesely, D. L. (1981). Melatonin enhances guanylate cyclase activity in a variety of tissues. *Mol Cell Biochem* 35, 55-8.
- [87] Satake, N., Oe, H., Sawada, T. und Shibata, S. (1991). The mode of vasorelaxing action of melatonin in rabbit aorta. *Gen Pharmacol* 22, 219-21.
- [88] Spessert, R., Heil, K., Gupta, B. B. und Vollrath, L. (1992). Biphasic 24-hour variations in cyclic GMP accumulation in the rat pineal gland are due to corresponding changes in the activity of cytosolic and particulate guanylate cyclase. *J Neurochem* 59, 2081-6.
- [89] Menendez-Pelaez, A., Poeggeler, B., Reiter, R. J., Barlow-Walden, L., Pablos, M. I. und Tan, D. X. (1993). Nuclear localization of melatonin in different mammalian tissues: immunocytochemical and radioimmunoassay evidence. *J Cell Biochem* 53, 373-82.
- [90] Becker-Andre, M., Wiesenberg, I., Schaeren-Wiemers, N., Andre, E., Missbach, M., Saurat, J. H. und Carlberg, C. (1994). Pineal gland hormone melatonin binds and activates an orphan of the nuclear receptor superfamily. *J Biol Chem* 269, 28531-4.
- [91] Greiner, E. F., Kirfel, J., Greschik, H., Dorflinger, U., Becker, P., Mercep, A. und Schule, R. (1996). Functional analysis of retinoid Z receptor beta, a brain-specific nuclear orphan receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 10105-10.
- [92] Benitez-King, G. (2006). Melatonin as a cytoskeletal modulator: implications for cell physiology and disease. *J Pineal Res* 40, 1-9.
- [93] Peschke, E., Peschke, D., Hammer, T. und Csernus, V. (1997). Influence of melatonin and serotonin on glucose-stimulated insulin release from perfused rat pancreatic islets in vitro. *J Pineal Res* 23, 156-63.
- [94] Csernus, V. J., Hammer, T., Peschke, D. und Peschke, E. (1998). Dynamic insulin secretion from perfused rat pancreatic islets. *Cell Mol Life Sci* 54, 733-43.
- [95] Picinato, M. C., Haber, E. P., Cipolla-Neto, J., Curi, R., de Oliveira Carvalho, C. R. und Carpinelli, A. R. (2002). Melatonin inhibits insulin secretion and decreases PKA levels without interfering with glucose metabolism in rat pancreatic islets. *J Pineal Res* 33, 156-60.
- [96] Peschke, E., Frese, T., Chankiewicz, E., Peschke, D., Preiss, U., Schneyer, U., Spessert, R. und Mühlbauer, E. (2006). Diabetic Goto Kakizaki rats as well as type 2 diabetic patients show a decreased diurnal serum melatonin level and an increased pancreatic melatonin-receptor status. *J Pineal Res* 40, 135-43.
- [97] Ramracheya, R. D., Muller, D. S., Squires, P. E., Brereton, H., Sugden, D., Huang, G. C., Amiel, S. A., Jones, P. M. und Persaud, S. J. (2008). Function and expression of melatonin receptors on human pancreatic islets. *J Pineal Res* 44, 273-9.

- [98] Peschke, E., Wolgast, S., Bazwinsky, I., Pönicke, K. und Mühlbauer, E. (2008). Increased melatonin synthesis in pineal glands of rats in streptozotocin induced type 1 diabetes. *J Pineal Res* 45, 439-48.
- [99] de Lima, L. M., dos Reis, L. C. und de Lima, M. A. (2001). Influence of the pineal gland on the physiology, morphometry and morphology of pancreatic islets in rats. *Braz J Biol* 61, 333-40.
- [100] Peschke, E., Fauteck, J. D., Musshoff, U., Schmidt, F., Beckmann, A. und Peschke, D. (2000). Evidence for a melatonin receptor within pancreatic islets of neonate rats: functional, autoradiographic, and molecular investigations. *J Pineal Res* 28, 156-64.
- [101] Peschke, E., Mühlbauer, E., Musshoff, U., Csernus, V. J., Chankiewicz, E. und Peschke, D. (2002). Receptor (MT(1)) mediated influence of melatonin on cAMP concentration and insulin secretion of rat insulinoma cells INS-1. *J Pineal Res* 33, 63-71.
- [102] Bach, A. G., Wolgast, S., Mühlbauer, E. und Peschke, E. (2005). Melatonin stimulates inositol-1,4,5-trisphosphate and Ca²⁺ release from INS1 insulinoma cells. *J Pineal Res* 39, 316-23.
- [103] Peschke, E., Bach, A. G. und Mühlbauer, E. (2006). Parallel signaling pathways of melatonin in the pancreatic beta-cell. *J Pineal Res* 40, 184-91.
- [104] Stumpf, I., (2006). Diplomarbeit (Dipl. troph.) Charakterisierung von Melatoninrezeptoren auf Pankreata stoffwechselgesunder und diabetischer Patienten. Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.
- [105] Mühlbauer, E. und Peschke, E. (2007). Evidence for the expression of both the MT1- and in addition, the MT2-melatonin receptor, in the rat pancreas, islet and beta-cell. *J Pineal Res* 42, 105-6.
- [106] Asfari, M., Janjic, D., Meda, P., Li, G., Halban, P. A. und Wollheim, C. B. (1992). Establishment of 2-mercaptoethanol-dependent differentiated insulin-secreting cell lines. *Endocrinology* 130, 167-78.
- [107] Kuramoto, T., Werrbach-Perez, K., Perez-Polo, J. R. und Haber, B. (1981). Membrane properties of a human neuroblastoma II: Effects of differentiation. *J Neurosci Res* 6, 441-9.
- [108] Stumpf, I., Mühlbauer, E. und Peschke, E. (2008). Involvement of the cGMP pathway in mediating the insulin-inhibitory effect of melatonin in pancreatic beta-cells. *J Pineal Res* 45, 318-27.
- [109] Stumpf, I., Bazwinsky, I. und Peschke, E. (2009). Modulation of the cGMP signaling pathway by melatonin in pancreatic beta-cells. *J Pineal Res* 46, 140-7.
- [110] Portha, B. (2005). Programmed disorders of beta-cell development and function as one cause for type 2 diabetes? The GK rat paradigm. *Diabetes Metab Res Rev* 21, 495-504.
- [111] Goto, Y., Suzuki, K., Ono, T., Sasaki, M. und Toyota, T. (1988). Development of diabetes in the non-obese NIDDM rat (GK rat). *Adv Exp Med Biol* 246, 29-31.
- [112] Goto, Y., Kakizaki M (1981). The spontaneous diabetes rat: a model of non insulin dependent diabetes mellitus. *Proc Japan Acad* 57, 381-84.
- [113] Miralles, F. und Portha, B. (2001). Early development of beta-cells is impaired in the GK rat model of type 2 diabetes. *Diabetes* 50 Suppl 1, S84-8.
- [114] Ebihara, S., Marks, T., Hudson, D. J. und Menaker, M. (1986). Genetic control of melatonin synthesis in the pineal gland of the mouse. *Science* 231, 491-3.

- [115] Dubocovich, M. L., Hudson, R. L., Sumaya, I. C., Masana, M. I. und Manna, E. (2005). Effect of MT1 melatonin receptor deletion on melatonin-mediated phase shift of circadian rhythms in the C57BL/6 mouse. *J Pineal Res* 39, 113-20.
- [116] von Gall, C., Weaver, D. R., Moek, J., Jilg, A., Stehle, J. H. und Korf, H. W. (2005). Melatonin plays a crucial role in the regulation of rhythmic clock gene expression in the mouse pars tuberalis. *Ann N Y Acad Sci* 1040, 508-11.
- [117] Mühlbauer, E., Gross, E., Peschke, E. (2009). Loss of melatonin signalling and its impact on circadian rhythms in mouse organs regulating blood glucose. *Eur J Pharmacol* 606, 61-71.
- [118] Weil, Z. M., Hotchkiss, A. K., Gatien, M. L., Pieke-Dahl, S. und Nelson, R. J. (2006). Melatonin receptor (MT1) knockout mice display depression-like behaviors and deficits in sensorimotor gating. *Brain Res Bull* 68, 425-9.
- [119] Lyssenko, V., Nagorny, C. L., Erdos, M. R., Wierup, N., Jonsson, A., Spegel, P., Bugliani, M., Saxena, R., Fex, M., Pulizzi, N., Isomaa, B., Tuomi, T., Nilsson, P., Kuusisto, J., Tuomilehto, J., Boehnke, M., Altshuler, D., Sundler, F., Eriksson, J. G., Jackson, A. U., Laakso, M., Marchetti, P., Watanabe, R. M., Mulder, H. und Groop, L. (2009). Common variant in MTNR1B associated with increased risk of type 2 diabetes and impaired early insulin secretion. *Nat Genet* 41, 82-8.
- [120] Bouatia-Naji, N., Bonnefond, A., Cavalcanti-Proenca, C., Sparso, T., Holmkvist, J., Marchand, M., Delplanque, J., Lobbens, S., Rocheleau, G., Durand, E., De Graeve, F., Chevre, J. C., Borch-Johnsen, K., Hartikainen, A. L., Ruukonen, A., Tichet, J., Marre, M., Weill, J., Heude, B., Tauber, M., Lemaire, K., Schuit, F., Elliott, P., Jorgensen, T., Charpentier, G., Hadjadj, S., Cauchi, S., Vaxillaire, M., Sladek, R., Visvikis-Siest, S., Balkau, B., Levy-Marchal, C., Pattou, F., Meyre, D., Blakemore, A. I., Jarvelin, M. R., Walley, A. J., Hansen, T., Dina, C., Pedersen, O. und Froguel, P. (2009). A variant near MTNR1B is associated with increased fasting plasma glucose levels and type 2 diabetes risk. *Nat Genet* 41, 89-94.
- [121] Nonno, R., Pannacci, M., Lucini, V., Angeloni, D., Fraschini, F. und Stankov, B. M. (1999). Ligand efficacy and potency at recombinant human MT2 melatonin receptors: evidence for agonist activity of some mt1-antagonists. *Br J Pharmacol* 127, 1288-94.
- [122] Drew, J. E., Williams, L. M., Hannah, L. T., Barrett, P. und Abramovich, D. R. (1998). Melatonin receptors in the human fetal kidney: 2-[125I]iodomelatonin binding sites correlated with expression of Mel1a and Mel1b receptor genes. *J Endocrinol* 156, 261-7.
- [123] Dubocovich, M. L., Yun, K., Al-Ghoul, W. M., Benloucif, S. und Masana, M. I. (1998). Selective MT2 melatonin receptor antagonists block melatonin-mediated phase advances of circadian rhythms. *Faseb J* 12, 1211-20.
- [124] Audinot, V., Bonnaud, A., Grandcolas, L., Rodriguez, M., Nagel, N., Galizzi, J. P., Balik, A., Messenger, S., Hazlerigg, D. G., Barrett, P., Delagrangé, P. und Boutin, J. A. (2008). Molecular cloning and pharmacological characterization of rat melatonin MT1 and MT2 receptors. *Biochem Pharmacol* 75, 2007-19.
- [125] Gerdin, M. J., Masana, M. I., Ren, D., Miller, R. J. und Dubocovich, M. L. (2003). Short-term exposure to melatonin differentially affects the functional sensitivity and trafficking of the hMT1 and hMT2 melatonin receptors. *J Pharmacol Exp Ther* 304, 931-9.
- [126] Yan, J. H., Su, H. R., Boutin, J. A., Renard, M. P. und Wang, M. W. (2008). High-throughput screening assay for new ligands at human melatonin receptors. *Acta Pharmacol Sin* 29, 1515-21.
- [127] Ayoub, M. A., Levoe, A., Delagrangé, P. und Jockers, R. (2004). Preferential formation of MT1/MT2 melatonin receptor heterodimers with distinct ligand interaction properties compared with MT2 homodimers. *Mol Pharmacol* 66, 312-21.

- [128] Levoye, A., Jockers, R., Ayoub, M. A., Delagrangé, P., Savaskan, E. und Guillaume, J. L. (2006). Are G protein-coupled receptor heterodimers of physiological relevance?--Focus on melatonin receptors. *Chronobiol Int* 23, 419-26.
- [129] Anwar, M. M., Meki, A. R. und Rahma, H. H. (2001). Inhibitory effects of melatonin on vascular reactivity: possible role of vasoactive mediators. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 130, 357-67.
- [130] Hardeland, R. (1997). New actions of melatonin and their relevance to biometeorology. *Int J Biometeorol* 41, 47-57.
- [131] Carpenter, L., Cordery, D. und Biden, T. J. (2001). Protein kinase C δ activation by interleukin-1 β stabilizes inducible nitric-oxide synthase mRNA in pancreatic beta-cells. *J Biol Chem* 276, 5368-74.
- [132] Lajoix, A. D., Reggio, H., Chardes, T., Peraldi-Roux, S., Tribillac, F., Roye, M., Dietz, S., Broca, C., Manteghetti, M., Ribes, G., Wollheim, C. B. und Gross, R. (2001). A neuronal isoform of nitric oxide synthase expressed in pancreatic beta-cells controls insulin secretion. *Diabetes* 50, 1311-23.
- [133] Nakada, T., Suzuki, K., Fujii, Y., Matsuzawa, H. und Kwee, I. L. (2000). Independent component-cross correlation-sequential epoch (ICS) analysis of high field fMRI time series: direct visualization of dual representation of the primary motor cortex in human. *Neurosci Res* 37, 237-44.
- [134] Kaminski, A., Gao, H. und Morgan, N. G. (2004). Involvement of the cGMP signalling pathway in the regulation of viability in insulin-secreting BRIN-BD11 cells. *FEBS Lett* 559, 118-24.
- [135] Wang, X., Li, H., De Leo, D., Guo, W., Koshkin, V., Fantus, I. G., Giacca, A., Chan, C. B., Der, S. und Wheeler, M. B. (2004). Gene and protein kinase expression profiling of reactive oxygen species-associated lipotoxicity in the pancreatic beta-cell line MIN6. *Diabetes* 53, 129-40.
- [136] Ehses, J. A., Pelech, S. L., Pederson, R. A. und McIntosh, C. H. (2002). Glucose-dependent insulinotropic polypeptide activates the Raf-Mek1/2-ERK1/2 module via a cyclic AMP/cAMP-dependent protein kinase/Rap1-mediated pathway. *J Biol Chem* 277, 37088-97.
- [137] Arava, Y., Adamsky, K., Ezerzer, C., Ablamunits, V. und Walker, M. D. (1999). Specific gene expression in pancreatic beta-cells: cloning and characterization of differentially expressed genes. *Diabetes* 48, 552-6.
- [138] Rosman, G. J., Martins, T. J., Sonnenburg, W. K., Beavo, J. A., Ferguson, K. und Loughney, K. (1997). Isolation and characterization of human cDNAs encoding a cGMP-stimulated 3',5'-cyclic nucleotide phosphodiesterase. *Gene* 191, 89-95.
- [139] Kulkarni, S. K. und Patil, C. S. (2004). Phosphodiesterase 5 enzyme and its inhibitors: update on pharmacological and therapeutical aspects. *Methods Find Exp Clin Pharmacol* 26, 789-99.
- [140] Ahmad, M., Flatt, P. R., Furman, B. L. and Pyne, N. J. (2000). The role of the cyclic GMP-inhibited cyclic AMP-specific phosphodiesterase (PDE3) in regulating clonal BRIN-BD11 insulin secreting cell survival. *Cell Signal* 12, 541-8.
- [141] König, J., Hartel, M., Nies, A. T., Martignoni, M. E., Guo, J., Buchler, M. W., Friess, H. und Keppler, D. (2005). Expression and localization of human multidrug resistance protein (ABCC) family members in pancreatic carcinoma. *Int J Cancer* 115, 359-67.
- [142] Nooter, K., Westerman, A. M., Flens, M. J., Zaman, G. J., Scheper, R. J., van Wingerden, K. E., Burger, H., Oostrum, R., Boersma, T., Sonneveld, P. und et al. (1995). Expression of the multidrug resistance-associated protein (MRP) gene in human cancers. *Clin Cancer Res* 1, 1301-10.

- [143] Gilad, E., Wong, H. R., Zingarelli, B., Virag, L., O'Connor, M., Salzman, A. L. und Szabo, C. (1998). Melatonin inhibits expression of the inducible isoform of nitric oxide synthase in murine macrophages: role of inhibition of NFkappaB activation. *Faseb J* 12, 685-93.
- [144] Valero, N., Espina, L. M. und Mosquera, J. (2006). Melatonin decreases nitric oxide production, inducible nitric oxide synthase expression and lipid peroxidation induced by Venezuelan encephalitis equine virus in neuroblastoma cell cultures. *Neurochem Res* 31, 925-32.
- [145] Aydogdu, N., Erbas, H., Atmaca, G., Erten, O. und Kaymak, K. (2006). Melatonin reduces nitric oxide via increasing arginase in rhabdomyolysis-induced acute renal failure in rats. *Ren Fail* 28, 435-40.
- [146] Lahiri, D. K. und Ghosh, C. (1999). Interactions between melatonin, reactive oxygen species, and nitric oxide. *Ann N Y Acad Sci* 893, 325-30.
- [147] Turjanski, A. G., Saenz, D. A., Doctorovich, F., Estrin, D. A. und Rosenstein, R. E. (2001). Nitrosation of melatonin by nitric oxide: a computational study. *J Pineal Res* 31, 97-101.
- [148] Aydogan, S., Yerer, M. B. und Goktas, A. (2006). Melatonin and nitric oxide. *J Endocrinol Invest* 29, 281-7.
- [149] Saenz, D. A., Turjanski, A. G., Sacca, G. B., Marti, M., Doctorovich, F., Sarmiento, M. I., Estrin, D. A. und Rosenstein, R. E. (2002). Physiological concentrations of melatonin inhibit the nitridergic pathway in the Syrian hamster retina. *J Pineal Res* 33, 31-6.
- [150] Pechanova, O., Zicha, J., Paulis, L., Zenebe, W., Dobesova, Z., Kojsova, S., Jendekova, L., Sladkova, M., Dovinova, I., Simko, F. und Kunes, J. (2007). The effect of N-acetylcysteine and melatonin in adult spontaneously hypertensive rats with established hypertension. *Eur J Pharmacol* 561, 129-36.
- [151] Esposito, E., Iacono, A., Muia, C., Crisafulli, C., Mattace Raso, G., Bramanti, P., Meli, R. und Cuzzocrea, S. (2008). Signal transduction pathways involved in protective effects of melatonin in C6 glioma cells. *J Pineal Res* 44, 78-87.
- [152] Crespo, E., Macias, M., Pozo, D., Escames, G., Martin, M., Vives, F., Guerrero, J. M. und Acuna-Castroviejo, D. (1999). Melatonin inhibits expression of the inducible NO synthase II in liver and lung and prevents endotoxemia in lipopolysaccharide-induced multiple organ dysfunction syndrome in rats. *Faseb J* 13, 1537-46.
- [153] Andreopoulos, S. und Papapetropoulos, A. (2000). Molecular aspects of soluble guanylyl cyclase regulation. *Gen Pharmacol* 34, 147-57.
- [154] Pyriochou, A. und Papapetropoulos, A. (2005). Soluble guanylyl cyclase: more secrets revealed. *Cell Signal* 17, 407-13.
- [155] Zwiller, J., Revel, M. O. und Basset, P. (1981). Evidence for phosphorylation of rat brain guanylate cyclase by cyclic AMP-dependent protein kinase. *Biochem Biophys Res Commun* 101, 1381-7.
- [156] Kostic, T. S., Tomic, M., Andric, S. A. und Stojilkovic, S. S. (2002). Calcium-independent and cAMP-dependent modulation of soluble guanylyl cyclase activity by G protein-coupled receptors in pituitary cells. *J Biol Chem* 277, 16412-8.
- [157] Genade, S., Genis, A., Ytrehus, K., Huisamen, B. und Lochner, A. (2008). Melatonin receptor-mediated protection against myocardial ischaemia/reperfusion injury: role of its antiadrenergic actions. *J Pineal Res* 45, 449-58.

- [158] Ferreyra, G. A. und Golombek, D. A. (2001). Rhythmicity of the cGMP-related signal transduction pathway in the mammalian circadian system. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 280, R1348-55.
- [159] Prokopenko, I., Langenberg, C., Florez, J. C., Saxena, R., Soranzo, N., Thorleifsson, G., Loos, R. J., Manning, A. K., Jackson, A. U., Aulchenko, Y., Potter, S. C., Erdos, M. R., Sanna, S., Hottenga, J. J., Wheeler, E., Kaakinen, M., Lyssenko, V., Chen, W. M., Ahmadi, K., Beckmann, J. S., Bergman, R. N., Bochud, M., Bonnycastle, L. L., Buchanan, T. A., Cao, A., Cervino, A., Coin, L., Collins, F. S., Crisponi, L., de Geus, E. J., Dehghan, A., Deloukas, P., Doney, A. S., Elliott, P., Freimer, N., Gateva, V., Herder, C., Hofman, A., Hughes, T. E., Hunt, S., Illig, T., Inouye, M., Isomaa, B., Johnson, T., Kong, A., Krestyaninova, M., Kuusisto, J., Laakso, M., Lim, N., Lindblad, U., Lindgren, C. M., McCann, O. T., Mohlke, K. L., Morris, A. D., Naitza, S., Orru, M., Palmer, C. N., Pouta, A., Randall, J., Rathmann, W., Saramies, J., Scheet, P., Scott, L. J., Scuteri, A., Sharp, S., Sijbrands, E., Smit, J. H., Song, K., Steinthorsdottir, V., Stringham, H. M., Tuomi, T., Tuomilehto, J., Uitterlinden, A. G., Voight, B. F., Waterworth, D., Wichmann, H. E., Willemsen, G., Witteman, J. C., Yuan, X., Zhao, J. H., Zeggini, E., Schlessinger, D., Sandhu, M., Boomsma, D. I., Uda, M., Spector, T. D., Penninx, B. W., Altshuler, D., Vollenweider, P., Jarvelin, M. R., Lakatta, E., Waeber, G., Fox, C. S., Peltonen, L., Groop, L. C., Mooser, V., Cupples, L. A., Thorsteinsdottir, U., Boehnke, M., Barroso, I., Van Duijn, C., Dupuis, J., Watanabe, R. M., Stefansson, K., McCarthy, M. I., Wareham, N. J., Meigs, J. B., Abecasis, G. R. (2009). Variants in MTNR1B influence fasting glucose levels. *Nat Genet* 41, 77-81.
- [160] Staiger, H., Machicao, F., Schafer, S. A., Kirchhoff, K., Kantartzis, K., Guthoff, M., Silbernagel, G., Stefan, N., Haring, H. U. und Fritsche, A. (2008). Polymorphisms within the novel type 2 diabetes risk locus MTNR1B determine beta-cell function. *PLoS ONE* 3, e3962.
- [161] Kloeters, O., Friess, H., Giese, N., Buechler, M. W., Cetin, Y. und Kulaksiz, H. (2008). Uroguanylin inhibits proliferation of pancreatic cancer cells. *Scand J Gastroenterol* 43, 447-55.
- [162] Kulaksiz, H. und Cetin, Y. (2001). Uroguanylin and guanylate cyclase C in the human pancreas: expression and mutuality of ligand/receptor localization as indicators of intercellular paracrine signaling pathways. *J Endocrinol* 170, 267-75.
- [163] Zhdanova, I. V. und Raz, D. J. (1999). Effects of melatonin ingestion on cAMP and cGMP levels in human plasma. *J Endocrinol* 163, 457-62.
- [164] Zhdanova, I. V., Simmons, M., Marcus, J. N., Busza, A. C., Leclair, O. U. und Taylor, J. A. (1999). Nocturnal increase in plasma cGMP levels in humans. *J Biol Rhythms* 14, 307-13.
- [165] Kaupp, U. B. und Seifert, R. (2002). Cyclic nucleotide-gated ion channels. *Physiol Rev* 82, 769-824.
- [166] Matulef, K. und Zagotta, W. N. (2003). Cyclic nucleotide-gated ion channels. *Annu Rev Cell Dev Biol* 19, 23-44.
- [167] Fesenko, E. E., Kolesnikov, S. S. und Lyubarsky, A. L. (1985). Induction by cyclic GMP of cationic conductance in plasma membrane of retinal rod outer segment. *Nature* 313, 310-3.
- [168] Picinato, M. C., Hirata, A. E., Cipolla-Neto, J., Curi, R., Carvalho, C. R., Anhe, G. F. und Carpinelli, A. R. (2008). Activation of insulin and IGF-1 signaling pathways by melatonin through MT1 receptor in isolated rat pancreatic islets. *J Pineal Res* 44, 88-94.

9.1 Eigene wissenschaftliche Beiträge

Publikationen

Peschke, E., Stumpf, I., Bazwinsky, I., Litvak, L., Dralle, H. und Mühlbauer, E. (2007). Melatonin and type 2 diabetes - a possible link? *J Pineal Res* 42, 350-8.

Peschke, E. und Stumpf, I. (2009) MT₁- und MT₂-Rezeptor vermittelte Einflüsse von Melatonin auf die Signalkaskaden cAMP, cGMP und IP₃ pankreatischer β -Zelle. In: Peschke, E. (Hrsg.): Endokrinologie IV, Vorträge im Rahmen des Projektes „Zeitstrukturen endokriner Systeme“. Abh Sächs Akad Wiss, Math.-nat. Kl., Band xx, Heft x, S. Hirzel, Stuttgart/Leipzig, S. xx-xx (eingereicht).

Stumpf, I., Bazwinsky, I. und Peschke, E. (2009). Modulation of the cGMP signaling pathway by melatonin in pancreatic beta-cells. *J Pineal Res* 46, 140-7.

Stumpf, I., Mühlbauer, E. und Peschke, E. (2008). Involvement of the cGMP pathway in mediating the insulin-inhibitory effect of melatonin in pancreatic beta-cells. *J Pineal Res* 45, 318-27.

Kurzpublikationen

Stumpf, I., Mühlbauer E., Bazwinsky, I., Peschke, E. (2007). Characterization of melatonin receptors in human pancreatic tissue of type 2-diabetic and non-diabetic patients. *Verh Anat Ges.* (Posterpräsentation zum Anatomenkongress in Würzburg).

Stumpf, I., Mühlbauer E., Peschke E. (2008). Melatonin acts via melatonin receptors on the pancreatic β -cell using the cAMP-, IP₃- and probably also the cGMP-signalling pathway. *Endocrine Abstr* 16, P654 (Posterpräsentation zum *10th European Congress of Endocrinology*, Berlin).

Stumpf, I., Peschke, E., Mühlbauer, E. (2009). Melatonin senkt die Insulinsekretion in pankreatischen β -Zellen über die cAMP- und cGMP-Signalkaskade (Tagungsbeitrag zum Insel-Workshop in Greifswald, in Vorbereitung).

Stumpf, I., Mühlbauer, E., Bazwinsky-Wutschke, I., Peschke, E. (2009). Nachweis des MT₂-Melatonin-Rezeptors am Pankreas von Ratte und Mensch (Posterpräsentation zur Jahrestagung der Deutschen Diabetes-Gesellschaft in Leipzig, in Vorbereitung).

Stumpf, I., Peschke, E., Mühlbauer, E. (2009). Cyclic GMP is involved in mediating the insulin-inhibiting effect of melatonin in pancreatic β -cells (Posterpräsentation zur *4th International Conference on cGMP* in Regensburg, in Vorbereitung).

Diplomarbeit

Stumpf, I., (2006). Diplomarbeit (Dipl. troph.) Charakterisierung von Melatoninrezeptoren auf Pankreata stoffwechselgesunder und diabetischer Patienten. Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Ina Stumpf
Diplom-Ernährungswissenschaftlerin
geboren am 23.09.1982 in Schkeuditz
ledig

Ausbildung

Aug. 1993 - Juli 2001	Thomasschule - Gymnasium zu Leipzig Abschluss: Abitur
Okt. 2001 - Juli 2006	Studium der Ernährungswissenschaften an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg mit den Schwerpunkten Ernährungsmedizin und Methoden der Ernährungsforschung Abschluss: Diplom-Ernährungswissenschaftlerin Diplomarbeit: „Charakterisierung von Melatoninrezeptoren auf menschlichen Pankreata stoffwechselgesunder und diabetischer Patienten“ (Betreuer: Prof. Dr. E. Peschke, Institut für Anatomie und Zellbiologie, Medizinische Fakultät)
seit Okt. 2006	Promotion als wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Anatomie und Zellbiologie, Medizinische Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg Thema: „Bedeutung des second messenger cGMP für Rezeptor-medierte Melatonin-Effekte auf die Insulinsekretion der pankreatischen β -Zelle“ (Betreuer: Prof. Dr. E. Peschke, Institut für Anatomie und Zellbiologie, Medizinische Fakultät)

Praktika

Juli 2001 - Aug. 2001	Ernährungsberatungs- und Trainingszentrum Leipzig
Aug. 2002	Veterinär- und Lebensmittelüberwachungsamt Halle/Saale
Feb. 2004 - März 2004	Klinik Bad Rippoldsau, Modellklinik für Ernährungsmedizin
Juli 2004 - Aug. 2004	Universitätsklinik Leipzig, Abteilung Nephrologie und Diabetologie

Fortbildungen

Sept. 2002/2003	Aachener Diätetik-Fortbildung
Okt. 2002 - Juli 2003	Fachsprachkurs „Englisch für Biologen“
April 2004	15. Fortbildungsveranstaltung für Ernährungstherapie
März 2006/2007	Kongress der Deutschen Gesellschaft für Ernährung
Mai 2006	Kongress der Deutschen Diabetes-Gesellschaft
Febr. - April 2007	Weiterbildungsveranstaltung „Tierschutz/Versuchstierkunde“
Nov. - Dez. 2007	Kursleiterausbildung Stressbewältigung/Stressmanagement
Mai 2008	10th European Congress of Endocrinology

Erklärung

Hiermit versichere ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation „Untersuchungen zur Bedeutung des *second messenger* cGMP für Rezeptor-medierte Melatonin-Effekte auf die Insulinsekretion der pankreatischen β -Zelle“ selbständig angefertigt und diese nicht bereits für eine Promotion oder ähnliche Zwecke an einer anderen Universität eingereicht habe. Alle hierzu benutzten wissenschaftlichen Arbeiten und Hilfsmittel sind genau und vollständig angegeben worden.

Des Weiteren erkläre ich, dass keine Strafverfahren gegen mich anhängig sind.

Halle/Saale, den

.....

Ina Stumpf

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich ganz herzlich bei allen bedanken, die mich bei der Durchführung und Erstellung dieser Arbeit unterstützt haben.

An erster Stelle danke ich Herrn Prof. Dr. Dr. Bernd Fischer für die Möglichkeit der Anfertigung meiner Dissertation am Institut für Anatomie und Zellbiologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.

Mein besonderer Dank richtet sich an Herrn Prof. Dr. Elmar Peschke für die Überlassung des Themas und die Ermöglichung meiner Promotion in seiner Arbeitsgruppe. Ich danke sehr herzlich für seine intensive Betreuung - die wissenschaftliche Hilfestellung, aber auch die Freiheit zum selbständigen Arbeiten und zur Verwirklichung eigener Ideen waren von großer Bedeutung. Vor allem danke ich ihm auch für seine nachhaltige persönliche Unterstützung während meiner bisherigen wissenschaftlichen Ausbildung.

Großer Dank gebührt allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Peschke für ihre Hilfsbereitschaft und Unterstützung. Allen voran möchte ich Herrn Dr. Eckhard Mühlbauer für die zahlreichen konstruktiven Ratschläge und Anregungen, die freundliche Unterstützung meiner Vorhaben sowie die stete Diskussionsbereitschaft danken. Frau Dr. Ivonne Bazwinsky-Wutschke danke ich für die Bereitstellung von Zellmaterial und Helena Sucha für die Möglichkeit, Proben von Melatonin-behandelten Ratten für eigene Untersuchungen nutzen zu können.

Für die hervorragende technische Assistenz, die Einführung in verschiedene Methoden, ständige Hilfsbereitschaft und Ermunterung bedanke ich mich ganz herzlich bei Frau Annika Jordan, Frau Beate Heydel, Frau Sabine Schrötter und Frau Dr. Liudmila Litvak.

Schließlich möchte ich mich ganz herzlich bei meiner Familie und meinen Freunden bedanken. Ich danke für die Ermutigung, ihr Verständnis und gewissenhaftes Korrekturlesen dieser Arbeit - vor allem aber für die persönliche Unterstützung und Begleitung durch Höhen und Tiefen. Ein ganz besonders lieber Dank gilt meinem Verlobten Christian Bähr für seine stete Geduld, Motivation und uneingeschränkten Rückhalt.