

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

Melatonin und Insulin bei diabetischen und stoffwechselgesunden
Ratten – Evidenzen für Wechselwirkungen zwischen Pinealocyten
und pankreatischen β -Zellen

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

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

von Thomas Frese
geboren am 20.10.1980 in Rodewisch/Vogtland
Betreuer: Prof. Dr.med.habil. Elmar Peschke

Gutachter:

- 1.
- 2.

eingereicht am:

verteidigt am:

Meinen Lehrern

Referat

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die Halle'sche Population der GOTO-KAKIZAKI (GK)-Ratten, ein Typ 2-diabetisches Tiermodell, hinsichtlich der diabetischen Stoffwechsellage, des pinealen Melatoninstoffwechsels und der Melatoninplasmakonzentration untersucht. Als Kontrolltiere dienten metabolisch gesunde Wistar-Ratten. Es wurde gezeigt, dass Hyperglykämie und Hypoinsulinämie bei neugeborenen und bis zu 3 Wochen alten GK-Ratten auf einer reduzierten Anzahl pankreatischer β -Zellen, vermindertem Insulingehalt der β -Zellen und Störungen des *glucose-sensing* bei verminderter Glucokinase-mRNA-Expression beruhen. Glukosetransporter 2 (GLUT 2) und Glucokinase zeigen ein tageszeitliches Muster ihrer mRNA-Expression. Dies führt zum zeitgleichen Maximum der Glukose-6-Phosphorylierung mit der Fressphase der Ratten, verstärkt die Glukose-stimulierte Insulinsekretion und vermindert die postprandiale Hyperglykämie. Der Rhythmus der Expression von Genen des Glukose-Sensor-Komplexes ist bei GK-Ratten nicht gestört. Bei 6 und 24 Wochen alten GK-Ratten zeigt sich eine kompensierte Hyperglykämie. Dies ist durch nahezu normale GLUT 2-mRNA-Expression und Hyperinsulinämie bedingt, obwohl die Glucokinase-mRNA-Expression erniedrigt ist. Die Dekompensation der metabolischen Situation bei 42-Wochen alten GK-Ratten ist durch Zerstörung der β -Zellen mit nahezu fehlendem GLUT 2 in der Zellmembran und weiter verminderter Glucokinase-Expression bedingt. Dies zeigt sich im Blutglukose-Tagesprofil der 42 Wochen alten GK-Ratten. Der Einfluss von Melatonin auf die Blutglukosekonzentration und den Glukosestoffwechsel ist vielfach beschrieben. Der Grund für gestörte diurnale Rhythmen der Plasmamelatonin-konzentrationen bei diabetischen Tiermodellen oder Typ 2-Diabetikern ist unklar. Deshalb wurden Melatonin und seine Vorstufen (Tryptophan, 5-Hydroxytryptophan, Serotonin und N-Acetylserotonin) in Epiphysen diabetischer GK-Ratten und stoffwechselgesunder Wistar-Ratten mittels *high performance liquid chromatography* (HPLC) untersucht. Tageszeit- und altersabhängige Effekte wurden berücksichtigt. Es wurde die Expression der Tryptophanhydroxylase-, der Arylalkylamin-N-actetyltransferase- und der Hydroxyindol-O-methyltransferase-mRNA ermittelt. Es zeigten sich Anhaltspunkte für eine verminderte Aktivität der Tryptophanhydroxylase mit Verminderung aller Vorstufen des Melatonins ab dem 5-Hydroxytryptophan in Epiphysen diabetischer GK-Ratten. Die Plasmamelatoninkonzentrationen waren bei GK-Ratten erniedrigt. Beide Tierstämme wiesen das typische Tagesprofil und einen altersabhängigen Abfall der Plasmamelatoninkonzentration auf. Die Ergebnisse belegen den hemmenden Einfluss von Insulin auf die pineale Melatoninsekretion.

Frese, Thomas: Melatonin und Insulin bei diabetischen und stoffwechselgesunden Ratten – Evidenzen für Wechselwirkungen zwischen Pinealocyten und pankreatischen β -Zellen. Halle, Univ., Med. Fak., Diss., 78 Seiten, 2009

Inhaltsverzeichnis

1	Verzeichnis der Abkürzungen und Symbole	IV
2	Einführung	1
2.1	Insulin und pankreatische β -Zelle	2
2.1.1	Struktur der Insulingene von Menschen und Ratten	2
2.1.2	Übersicht über die Synthese des Insulins	2
2.1.3	Diversität von Human- und Ratteninsulin	2
2.1.4	Mechanistik der pankreatischen Insulinsekretion	3
2.1.5	Insulinrezeptoren und ihre Signaltransduktion	4
2.1.6	Wirkungen des Insulins	5
2.1.7	Insulinabbau und Insulin-clearance	6
2.2	Grundlagen des Diabetes mellitus	6
2.3	Diabetische Tiermodelle	7
2.3.1	Entwicklung der GOTO-KAKIZAKI-Ratte	7
2.3.2	Allgemeine Eigenschaften der GOTO-KAKIZAKI-Ratte	8
2.4	Melatonin und Epiphyse	9
2.4.1	Vorkommen des Melatonins	9
2.4.2	Übersicht über die Synthese des Melatonins	9
2.4.3	Mechanistik der pinealen Melatoninabgabe	12
2.4.4	Melatoninrezeptoren und ihre Signaltransduktion	12
2.4.5	Wirkungen des Melatonins	13
2.4.6	Melatoninabbau und Melatonin-clearance	14
3	Ziele der Arbeit	14
4	Material und Methoden	15
4.1	Tierhaltung und Tierzucht	15
4.2	Tiertötung	15
4.3	Bestimmung der Blutglukosekonzentration	16
4.4	Gewinnung des Blutplasmas	16
4.5	Inselseparation	17
4.6	Perifusion	17
4.7	Melatonin-Radioimmunoassay	18
4.8	Insulin-Radioimmunoassay	18
4.9	High Performance Liquid Chromatography-Bestimmungen	19
4.10	Hämalaun-Eosin-Färbung	20
4.11	Immunhistochemie zur Markierung von Insulin, GLUT 2 und Glucokinase	20
4.12	RNA-Isolierung und DNase-Behandlung	21
4.13	Reverse-Transkriptase-Reaktion	22

4.14	Quantitative real-time Polymerase-Chain-Reaction	22
4.15	Grafische Darstellung der Ergebnisse und statistische Auswertung	24
5	Ergebnisse	25
5.1	Allgemeine Befunde	25
5.2	Befunde im Blut und in davon abgeleitetem Probenmaterial	26
5.2.1	Blutglukose	26
5.2.2	Insulin	28
5.3	Befunde zur pankreatischen β -Zelle und ihrem Glukose-Sensor-Komplex	30
5.3.1	Allgemeine Befunde zur Morphologie der LANGERHANS'schen Inseln	30
5.3.2	Glukosetransporter 2-mRNA	31
5.3.3	Glucokinase-mRNA	32
5.3.4	Insulin-Immunhistochemie	33
5.3.5	Glukosetransporter 2-Immunhistochemie	33
5.3.6	Glucokinase-Immunhistochemie	37
5.3.7	Ergebnisse der Perifusionsversuche	37
5.4	Plasmamelatonin und pineale Melatonin synthese	39
5.4.1	Plasmamelatonin	39
5.4.2	Allgemeine Befunde zu den Pinealorganen	40
5.4.3	Tryptophanhydroxylase-mRNA	41
5.4.4	Arylalkylamin-N-acetyltransferase-mRNA	41
5.4.5	Hydroxyindol-O-methyltransferase-mRNA	42
5.4.6	Melatonin und seine Vorstufen in Pinealorganen	43
6	Diskussion	49
7	Zusammenfassung	60
8	Literaturverzeichnis	61
9	Thesen	78
10	Danksagung	VI
11	Lebenslauf	VII
12	Selbständigkeitserklärung und Erklärung über Promotionsversuche	VIII
13	Publikationen und Stipendien	IX
13.1	Originalpublikationen	IX
13.2	Übersichtsarbeiten	IX
13.3	Falldarstellungen	IX
13.4	Kongressbeiträge	X
13.5	Stipendien	XI

1 Verzeichnis der Abkürzungen und Symbole

AANAT	Arylkylamin-N-acetyltransferase
Acetyl-CoA	Acetyl-Coenzym A
AS	Aminosäure
ADP	Adenosin-5'-diphosphat
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
BB	Bio-Breeding
BHE	Bureau of Home Economics
bp	<i>base pairs</i>
cAMP	cyclisches Adenosin-3'-5'-monophosphat
cDNA	<i>complementary deoxyribonucleic acid</i>
CREB	<i>cAMP response-element binding protein</i>
DAG	Diacylglycerol
DAPI	4,6-Diamidino-2-phenylindol
DPBS	DULBECCO's <i>phosphate buffered saline</i>
EC <i>n</i>	Enzyme Commission (Einordnung in Nomenklatur durch arabische Zahlen)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
F _{<i>n</i>}	Filialgeneration
GCK	Glucokinase (= Hexokinase IV)
GK	GOTO-KAKIZAKI
GLUT <i>n</i>	Glukosetransporter (Isoform durch arabische Ziffer bezeichnet)
HIOMT	Hydroxyindol-O-methyltransferase
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i>
IDE	<i>insulin degrading enzyme</i>
IGF	<i>insulin like growth factor</i>
IP ₃	Inositol-1,4,5-trisphosphat
K _D	Dissoziationskonstante
KIR	<i>kalium inward rectifier</i>
K _M	MICHAELIS-MENTEN-Konstante
MAP	<i>mitogen-activated protein</i>
MAT IIa	L-Methionin-adenosyltransferase Isoform IIa
mRNA	<i>messenger ribonucleic acid</i>
NOD	<i>non-obese diabetic</i>
NZO	New Zealand Obese (Mouse)
OLETEF	Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty (Rat)
PALP	Pyridoxal-5'-phosphat (Vitamin B ₆ entsprechend)

PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
RT-PCR	<i>reverse transcriptase polymerase chain reaction</i>
RIA	Radioimmunoassay
RNA	<i>ribonucleic acid</i>
RSA	Rinderserumalbumin
SAM	S-Adenosylmethionin
SAHC	S-Adenosylhomocystein
SEM	<i>standard error of mean</i>
SUR	<i>sulfonylurea-receptor</i>
TAE	<i>Tris-acetic acid-EDTA</i>
τ	Periodendauer
UDP	Uridin-5'-diphosphat
ZDF	ZUCKER Diabetic Fatty (Rat)

Die Bezeichnung von Maßeinheiten erfolgt nach dem Système International d'Unites. Die Bezeichnung von anatomischen Strukturen richtet sich nach der Terminologia Anatomica (Fassung des Federative Comitee on Anatomical Terminology von 1998). Soweit nicht anders angegeben, beziehen sich Konzentrationsangaben auf wässrige Lösungen und sind Masse pro Volumen-Konzentrationen. Auf Personen zurückgehende Namen sind in Kapitälchen, im deutschen Sprachgebrauch in ihrer Bedeutung feststehende, fremdsprachige Begriffe kursiv gedruckt. Soweit nicht anders bezeichnet, handelt es sich bei Aminosäuren um die L-Isomere und bei Kohlenhydraten um die D-Isomere.

1 Einführung

PAUL LANGERHANS beschrieb 1869 im Rahmen seiner Dissertation die später von LAGUESSE nach ihm benannten ovalen Inselkörperchen, die zwischen 75 und 500 μm groß und von einer Pseudokapsel umgeben sind. Sie entsprechen beim Menschen etwa 2 % der Gesamtmasse des Pankreas und bestehen zu etwa 80 % aus zentralliegenden, insulinsezernierenden β -Zellen. Eher randständige α -, δ - und PP-Zellen mit ihren Sekretionsprodukten, den Proteohormonen Glukagon, Somatostatin und Pankreatischem Polypeptid, kompletieren im Wesentlichen die einzelne Insel [1]. Homo- und heterologe endokrin aktive Zellen bilden durch *gap junctions* ein funktionelles Synzytium [2] und durch *tight junctions* eine für die parakrine Beeinflussung relevante Kompartimentierung [3, 4]. Die Anordnung der Zelltypen ist in Inseln des diffusen Pankreas der Nager von höherer Regelmäßigkeit als in denen des kompakten humanen Pankreas [5, 6]. Die Durchblutung der Inseln erfolgt durch ein bis zwei Arteriolen, welche in das β -Zell-Zentrum vorstoßen, sich in glomerulumartig angeordnete, fenestrierte Kapillaren aufzweigen [7] und das insulinreiche Blut zentrifugalradiär mit Passage der α - und später der δ -Zellen abführen [8]. Neben den Inseln finden sich aber auch disseminierte, endokrin aktive Zellen. Im August 1921 konnte durch BANTING und BEST erstmals Insulin aus Pankreasgewebe von Hunden [9] und später Rindern extrahiert werden. Die Kristallisationsfähigkeit des Insulins wurde 1926 durch ABEL gezeigt [10]. WINTERSTEIN wies nach, dass es sich bei Insulin um ein Polypeptid handelt, dessen Primär- und Tertiärstruktur durch SANGER et al. (1953) und RYLE et al. (1955) endgültig geklärt wurde [11-13]. Diese Erkenntnisse bildeten zunächst die Grundlage zum Verständnis der Physiologie der Glukosehomöostase und der Regulation des Intermediärstoffwechsels.

ARATEUS VON CAPPADOCCIA (etwa 90-30 v.u.Z.) führte den Terminus Diabetes für ein von Polyurie geprägtes und bereits im Alten Ägypten bekanntes Krankheitsbild ein. Das Adjektiv mellitus wurde durch THOMAS WILLIS 1674 hinzugefügt [14], obwohl der typische Harnschaubefund schon etwa 400 v.u.Z. durch den Inder SUSRUTA beschrieben wurde [15, 16]. Die Kenntnisse um das Insulin und seine Hauptwirkung eröffneten die Möglichkeiten von der – zunächst probatorischen – Substitutionstherapie insulinabhängiger Diabetesformen. Deren Erfolg wurde in einem verzweifelten Therapieversuch von BANTING und BEST an dem 14-jährigen Diabetiker LEONARD THOMPSON im Jahre 1922 eindrucksvoll belegt [17] und bis zur Bereitung von rekombinanten Insulinen und ihren Derivaten im Industriemaßstab weiterentwickelt. Die ungleich häufigeren so genannten insulinunabhängigen Diabetesformen wurden durch Kenntnisse der Physiologie und Pathophysiologie der β -Zelle sowie der Insulinzielgewebe therapierbar. Letztlich bildet aber oft auch hier die Applikation exogenen Insulins die therapeutische *ultima ratio*.

2.1 Insulin und pankreatische β -Zelle

2.1.1 Struktur der Insulingene von Menschen und Ratten

Humaninsulin ist im Bereich p15.5 des Chromosoms 11 kodiert. Das humane Insulingen enthält zwei Introns [18]. Wie auch einige Fischarten und Mäuse besitzen Ratten zwei Insulingene [19]. Sie sind im chromosomalen Bereich 1q54-q55 (Ratteninsulin I) und 1q41 (Ratteninsulin II) zu finden. Beide nichtallelischen Ratteninsulin-Gene enthalten ein 119 bp langes Intron 17 bp oberhalb des Initiationscodons. Das Gen für Ratteninsulin II enthält außerdem ein 490 bp langes Intron zwischen den für die AS 38 (Q) und 39 (V) des Proinsulins – also AS 8 und 9 des C-Peptides – codierenden Regionen. Ein entsprechendes Transkriptionsprodukt (hnRNA) wurde gezeigt [20, 21]. Prinzipiell ist zuerst das Signalpeptid, nachfolgend die B-Kette, das C-Peptid und die A-Kette kodiert. Mit diabetischer Stoffwechsellage assoziierte Punktmutationen des Insulingens sind bekannt [22]. Die Rolle von Polymorphismen der 5'-untranslatierten Region ist unklar [23, 24]. Eine Reihe von Transkriptionsfaktoren reguliert die Expression des Insulingens [25, 26]. Dies erlaubt eine Regulation durch die Blutglukosekonzentration [27, 28] und die autokrine Rückkopplung [1, 29-31].

2.1.2 Übersicht über die Synthese des Insulins

Nach Transkription und Abschluss aller posttranskriptionellen Modifikationen erfolgt die Translation zum Präproinsulin. Die in Insulinoma-Zellen und unter diabetischen Stoffwechselbedingungen alternativ gespleißte Präproinsulin-mRNA wird hierbei mit höherer Effizienz translatiert [32, 33]. Nach Translokation in das rauhe endoplasmatische Reticulum wird das 24 AS lange Signalpeptid abgespaltet. Es folgt die Bildung der Disulfidbrücken (1 innerhalb der A-Kette, 2 zwischen den Ketten). Der letzte Syntheseschritt besteht in der Abspaltung des C-Peptides (34 AS) aus dem Proinsulin durch spezifische Prohormon-Konvertasen sowohl innerhalb des GOLGI-Apparates als auch in den β -Granula. Dies impliziert die äquimolare Sekretion von Insulin (51 AS) und C-Peptid, frühestens 3 h nach Transkriptionsbeginn [17]. Parallel dazu erfolgt die Exozytose von Proinsulin, Split-Proinsulinen und Intermediärinsulinen mit einem Anteil von jeweils etwa 2% [34]. Die konzentrationsabhängige – insbesondere in Anwesenheit von Zn^{2+} -Ionen – mögliche Aggregation und Speicherung von Insulin in Form von Dimeren und Hexameren [35] ist weithin bekannt.

2.1.3 Diversität von Human- und Ratteninsulin

Ein grundlegender Unterschied zwischen Human- und Ratteninsulin ist die Existenz zweier nonallelicher Insuline bei den Nagern, die sich in zwei Aminosäuren der B-Kette unterscheiden (Abb. 1). Diese als Insulin I und Insulin II bezeichneten Subformen werden bei physio-

logischen Glukosekonzentrationen etwa in gleichem Maße (Verhältnis 1,4:1) synthetisiert und sezerniert [20, 36]. Die Aminosäuresequenzen, die molaren Massen (etwa 5800 g/mol) und die biologischen Aktivitäten (etwa 23,80 IU/mg) der Insuline unterscheiden sich nur gering. Bei den Präpro- und Proinsulinen sind die Unterschiede stärker ausgeprägt.

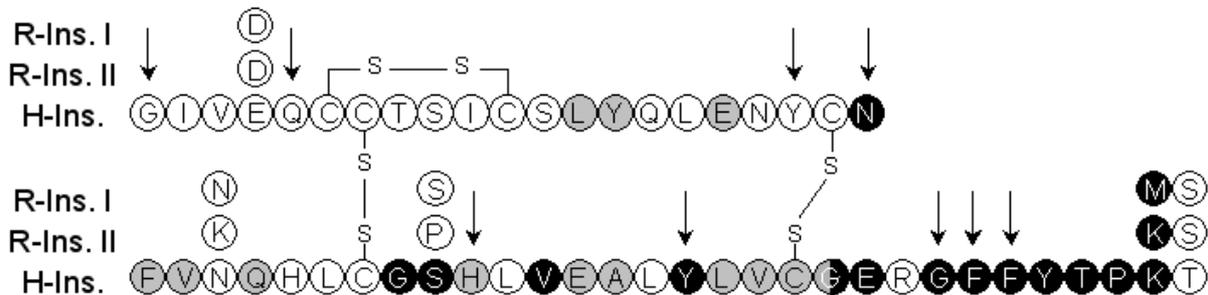


Abb. 1: Aminosäuresequenz von Ratteninsulin I und II im Vergleich zu Humaninsulin. Die durch Pfeile markierten Aminosäuren binden an den Insulinrezeptor. Die schwarz beziehungsweise grau hinterlegten Aminosäuren sind an der Assoziation des Insulins zu Di- bzw. Hexameren beteiligt (modifiziert nach [17]).

2.1.4 Mechanismus der pankreatischen Insulinsekretion

Die Sekretion von Insulin kann durch verschiedene Stimuli ausgelöst werden. Sie beruht letztlich aber immer auf einer Depolarisation der Zellmembran der pankreatischen β -Zelle. Die folgende Öffnung spannungsabhängiger Kalziumkanäle führt zu einem Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration. Vermittelt durch das Zytoskelett fusionieren Clathrinummantelte Vesikel mit der Zellmembran. Es kommt zur exozytotischen Freisetzung von Insulin. Die Insulinfreisetzung erfolgt rhythmisch. Dies beruht auf einer höherfrequenten ($8 \text{ s} \leq \tau \leq 30 \text{ s}$) und einer niederfrequenten ($150 \text{ s} \leq \tau \leq 300 \text{ s}$) Oszillation. Erstere wird durch Glukose und konsekutive Veränderungen der intrazellulären Kalziumkonzentration gesteuert. Sie ist für die Amplitude des Plasmainsulins relevant. Letztere beruht auf glykolytisch oder mitochondrial generierten Rhythmen des Glukosemetabolismus und gibt die Frequenz der Schwankungen des Plasmainsulins vor [37, 38]. Weiterhin erfolgt die *in vivo* und *in vitro* Insulinsekretion aber auch circadian-rhythmisch [39-42]. *In vivo* kann die Depolarisation durch cholinerge und β -adrenerge Innervation der neuroendokrinen β -Zelle vermittelt werden. *In vitro* wird sie durch Arginin oder Kaliumchlorid herbeigeführt. Der stärkste Stimulus der Insulinsekretion ist ein Anstieg der extrazellulären Glukosekonzentration [43]. Die Aufnahme von Glukose in die β -Zelle erfolgt als durch GLUT 2 erleichterte Diffusion. Wie alle bekannten GLUT-Isoformen besitzt auch diese für β -Zellen, Hepatocyten, renale Tubulusepithelien und den Intestinaltrakt spezifische Isoform zwölf hydrophobe Transmembrandomänen. GLUT 2 hat eine niedrige Affinität zu Glukose. Der K_M -Wert liegt bei etwa 17 mmol/l [44]. Er ist damit wesentlich höher als bei anderen GLUT-Isoformen. Eine Sättigung des

GLUT 2 ist selbst in pathologischen Extremsituationen kaum möglich. Dies, sowie die – im Gegensatz zu GLUT 4 – ständige und insulinunabhängige Lokalisation in der Zellmembran führen zu einem transmembranösen Glukosetransport, dessen Diffusionsgeschwindigkeit der extrazellulären Glukosekonzentration direkt linear proportional ist. Wenn die Quantität von GLUT 2 hinreichend ist, ergibt sich eine hohe Diffusionsstromdichte mit schneller Angleichung von extra- und intrazellulärer Glukosekonzentration. Andere GLUT-Isoformen (z.B. GLUT 1) werden zwar von β -Zellen synthetisiert, haben aber letztlich keine Relevanz für die Glukoseaufnahme. Gemeinsam mit GLUT 2 bildet die pankreatische Isoform der Glukokinase (EC 2.7.1.2; Hexokinase IV) den Glukosesensor-Komplex der β -Zelle. Im Gegensatz zu anderen Hexokinasen besitzt die Glukokinase eine erhöhten K_M -Wert für Glukose (etwa 11 mmol/l [45]) und die von ihr katalysierte ATP-abhängige Glukose-6-Phosphorylierung wird nicht produktgehemmt. Letztlich ist die Glukokinase das limitierende Enzym für die Glukose-Utilisation der β -Zelle. Die Hexokinase I (EC 2.7.1.1, $K_M \approx 215 \mu\text{mol/l}$) trägt lediglich einen unwesentlichen Anteil zur Glukosephosphorylierung bei. Glukose-6-Phosphat wird über die Glykolyse und den Citratzyklus metabolisiert. Über Umwandlungsprodukte werden auch andere Substrate (insbesondere Aminosäuren) verwertet. Das entstehende ATP führt zu einem Anstieg des intrazellulären ATP/ADP-Verhältnisses und bindet kompetitiv an die KIR6.2-Untereinheiten eines aus jeweils vier SUR1-KIR6.2-Heterodimeren zusammengesetzten Kaliumkanals der β -Zelle, was zum Schließen des Kanals mit konsekutiver Depolarisation der Zellmembran führt [1, 46]. Intrazelluläres cAMP kann über eine SUR1-assoziierte Bindungsstelle die Offenwahrscheinlichkeit des Kanals herabsetzen. Weiterhin begünstigt es die Fusion insulinhaltiger Vesikel mit der Zellmembran [47]. So haben also alle Stimuli eine gemeinsame zellphysiologische Endstrecke.

2.1.5 Insulinrezeptoren und ihre Signaltransduktion

Der Insulinrezeptor gehört mit dem *insulin-like growth factor*(IGF)-1-Rezeptor und dem *insulin-related-receptor* zu einer gemeinsamen Unterfamilie der Rezeptor-Tyrosinkinasen. Durch alternatives Spleissen entstehen zwei Subformen von Insulinrezeptoren: Zum einen der auch durch IGF-2 aktivierbare Typ A und zum anderen der Typ B [48]. Bei ersterem wird der das Exon 11 des Insulinrezeptor-Gens codierende Abschnitt der hnRNA entfernt, bei letzterem nicht. Daher enthält die B Isoform 12 zusätzliche Aminosäuren am C-Terminus der α -Untereinheit [49]. Insulinrezeptoren sind heterotetramere Moleküle aus je zwei α - und β -Untereinheiten. Die extrazellulär gelegenen α -Untereinheiten binden ein Insulinmolekül. Sie sind durch eine Disulfidbrücke untereinander und durch eine weitere mit der extrazellulären Domäne je einer β -Untereinheit verbunden. Die β -Untereinheiten sind durch eine α -helikale Transmembrandomäne in der Zellmembran verankert. Die Synthese des Rezeptors erfolgt

über ein einzelnes Polypeptid (Prorezeptor), welches posttranslational durch Proteolyse und Disulfidbrückenbildung zum modifiziert wird. Die Bindung eines Insulinmoleküls bewirkt die Autophosphorylierung von bis zu 7 der 13 intrazellulären Tyrosylreste. Der Insulinrezeptor kann aber auch Proteinkinase A-abhängig an Seryl- und Threonylresten phosphoryliert und dadurch in seiner Tyrosinkinaseaktivität vermindert werden. Die Insulinrezeptor-Substrate und *growth factor receptor-bound protein 2(Grb2)-associated binder-1* binden als Adaptermoleküle an den autophosphorylierten Rezeptor, werden an eigenen Tyrosylresten phosphoryliert und vermitteln die intrazelluläre Wirkung des Insulins über *Src homology 2*-Domänen-haltige Proteine wie zum Beispiel die Phosphatidylinositol-3-Kinase und Grb2, das seinerseits zur Aktivierung der *mitogen-activated protein*-Kinasen notwendig ist. Die Inaktivierung des Rezeptors erfolgt durch Protein-Tyrosin-Phosphatasen. Nach Internalisation des Ligand-Rezeptor-Komplexes beginnt die Reutilisierung des Rezeptors mit intraendosomaler Abspaltung und Zerlegung des Insulins durch das *insulin degrading enzyme* [50, 51]. Es genügt eine Besetzung von etwa 20% der verfügbaren Insulinrezeptoren [52], um eine maximale metabolische Wirkung auszulösen. Die Bindung von Insulin an den Rezeptor setzt die Affinität unbesetzter Rezeptoren herab [52].

2.1.6 Wirkungen des Insulins

Die Insulinrezeptor-vermittelten Stoffwechselwirkungen des Insulins sind bei Nagetieren und Menschen sehr ähnlich. Die entscheidenden Zielgewebe hierfür sind Skelettmuskel sowie Fett- und Lebergewebe. Es lassen sich schnelle und langsame Wirkungen unterscheiden: Zu den schnellen Wirkungen gehört die Steigerung des Kaliumtransportes in Leber- und Muskelzellen und des GLUT 4-assoziierten Glukosetransportes in Muskel- und Fettzellen durch Phosphatidylinositol-3-Kinase und hauptsächlich Insulinrezeptor-CAP-Cbl-vermittelte vermehrte Translokation des Rezeptors aus intrazellulären Membranvesikeln in die Zellmembran. Dies führt zu einer regulativen Senkung der Blutglukosekonzentration auf Werte zwischen 3,5 und 5,5 mmol/l. Durch Aktivierung der cAMP-spezifischen Phosphodiesterase wird die intrazelluläre cAMP-Konzentration gesenkt. Durch die veränderten Phosphorylierungsverhältnisse wird die Aktivität von Enzymen anaboler Stoffwechselwege erhöht und die von Enzymen kataboler Stoffwechselwege vermindert. Durch Aktivierung von *mitogen-activated protein*(MAP)-Kinasen und die Senkung der intrazellulären cAMP-Konzentrationen werden – als langsame Wirkungen – die Induktion anabol wirkender Transporter- und Enzymsysteme (Glukose- und Aminosäure-Transporter, Glykolyse, Glykogen-, Protein- und Triglyceridsynthese) und die Repression katabol wirkender Enzymsysteme (Glykogenolyse, Glukoneogenese, Proteolyse, Lipolyse, β -Oxidation, Ketogenese) vermittelt. Metabolische Wirkungen und die damit verbundene spezifische Genexpression sind Phosphatidylinositol-3-Kinase-vermittelt. Die *growth factor receptor-bound*

protein 2- und *Src homology 2*-Domänen-haltige Proteine-vermittelte und MAP-Kinase-medierte Wirkung auf die allgemeine Genexpression soll hier nicht weiter behandelt werden. Der Einfluss auf Zellproliferation und -differenzierung wird über alle drei genannten Vermittler gesteuert. Proinsulin, Split-Proinsuline und Intermediärinsuline haben keine nennenswerten Stoffwechselwirkungen [53]. Das Proinsulin ist aber von hoher antigener Potenz [54].

2.1.7 Insulinabbau und Insulinclearance

Als möglicher Abbauweg des Insulins wird die reduktive Spaltung der Disulfidbrücken im Blutplasma durch die Glutathion-Insulin-Dehydrogenase mit nachfolgender proteolytischer Spaltung der freien Ketten diskutiert. In allen insulinsensitiven Geweben kann Insulin nach Bindung an den Insulinrezeptor durch membranständiges *insulin degrading enzyme* gespalten oder aber endozytotisch aufgenommen werden [51]. Diese, überwiegend zytoplasmatisch lokalisierte, Metalloproteinase ist das geschwindigkeitsbestimmende Enzym des Insulinabbaus [55]. *Insulin degrading enzyme*-katalysiert die Spaltung der B-Kette. Im Anschluss erfolgt die Reduktion der Disulfidbrücken durch die Protein-Disulfid-Isomerase. Danach werden die freie A-Kette und die B-Ketten-Fragmente durch lysosomale Proteasen abgebaut. Unter physiologischen Bedingungen wird die Hälfte des portalen Insulins von der Leber aufgenommen. Jeweils die Hälfte des peripheren, also posthepatischen, Insulins und Proinsulins sowie 70% des C-Peptides werden renal – durch Filtration und Degradation – eliminiert [51, 56]. Die Plasmahalbwertszeit beträgt beim Menschen zwischen 4 und 6 min [56, 57]. Die Nebenprodukte der Insulinsynthese weisen höhere Halbwertszeiten auf [58].

2.2 Grundlagen des Diabetes mellitus

Diabetes mellitus ist eine weitverbreitete Stoffwechselstörung [59, 60], die auf verminderter Insulinwirkung beruht und sich in erster Linie durch eine Hyperglykämie auszeichnet. Die Insuffizienz der Insulinwirkung kann auf verminderter Insulinsynthese (Mangel an funktions-tüchtigen β -Zellen, Defekte im β -Zell-spezifischen Glukosemetabolismus, Mutationen des Insulingens oder seiner Regulatoren) sowie Rezeptor- bzw. Postrezeptordefekten (Downregulation durch Hyperinsulinämie, Mutationen, falsche Phosphorylierung, insuffiziente Rezeptorreutilisation) beruhen. Ebenso kann das zirkulierende Insulin vermindert oder durch Strukturstörungen in seiner Wirksamkeit eingeschränkt sein. Prinzipiell werden diabetische Stoffwechselstörungen nach der Notwendigkeit der Insulinsubstitution und dem bisher typischen Manifestationsalter unterschieden. Formen des *insulin dependent diabetes mellitus* (IDDM) sind der klassische Typ 1 Diabetes des jungen Menschen mit immunbedingter Zerstörung der β -Zellen sowie der *late autoimmune diabetes in adults* (LADA), welcher ebenfalls mit der Bildung von Autoantikörpern einhergeht, sich aber erst im Erwachsenenalter manifes-

tiert. Die Formen des *maturity onset diabetes of the young* (MODY) stellen sich bereits im Kindes- und Jugendalter zum Teil als diskret manifestierende diabetische Stoffwechselstörungen dar, die auf Mutationen in für die β -Zelle-relevanten Genen (Glucokinase, HNFs) beruhen. Der sogenannte Typ 2 Diabetes stellt die häufigste Manifestationsform beim Erwachsenen dar. Seine Ursachen sind vielfältig (genetische Prädisposition, hyperkalorische Ernährung). Häufig tritt er als „Metabolisches Syndrom“ in Komorbidität mit Adipositas, arterieller Hypertonie, Hyperurikämie und Hyperlipidämie auf. Letztlich kann die diabetische Stoffwechsellage aber auch Begleitstörung anderer endokriner Dysregulationen sein. Alle Diabetesformen führen ohne adäquate Therapie konsekutiv zu Gefäß- und Nervenschädigungen. Bedingt durch Lebensstil- und demografische Veränderungen nahm die Prävalenz des Typ 2 Diabetes in den letzten Jahrzehnten sehr stark zu [59, 60]. Das Manifestationsalter hat sich ebenfalls erniedrigt. Auch beim Typ 1 Diabetes findet sich eine Erhöhung der Prävalenz, ohne das dafür eindeutige Gründe genannt werden können [61]. Alle Formen des Diabetes mellitus führen zu lebenslanger Inanspruchnahme von Gesundheitsleistungen.

2.3 Diabetische Tiermodelle

Die ersten diabetischen Labortiere waren wohl durch MINKOWSKI und von MERING 1889 pankreatektomierte Hunde, die durch ihre diabetische Stoffwechsellage die Relevanz des Pankreas für den Kohlenhydratstoffwechsel belegten [62]. Bei den meisten diabetischen Tiermodellen handelt es sich aber – aus rein praktischen Gründen – um Nager, in aller Regel Ratten und Mäuse [63, 64]. Es gibt verschiedene Modelle des *insulin dependent diabetes mellitus* (IDDM). Die diabetische Stoffwechsellage kommt durch nahezu spezifische Zerstörung der pankreatischen β -Zellen mittels experimenteller Diabetogene wie Streptozotocin oder Alloxan [65] beziehungsweise autoimmun-bedingter Zerstörung des Inselapparates – zum Beispiel NOD-Mäuse, BB- und LEW.1AR1/Ztm-iddm-Ratten [66-68] – zu stande. Bei Modellen des non-IDDM handelt es sich meist um selektiv gezüchtete oder um in Diabetes relevanten Genen gezielt manipulierte [69] und daher spontan diabetische Tierstämme. Es lassen sich adipöse – zum Beispiel OLETF- und ZDF-Ratten sowie NZO- und KK-Mäuse – und nichtadipöse – zum Beispiel GK- und BHE-Ratten sowie *athymic nude mice/USC*-Stämme unterscheiden. Auch subtotal pankreatektomierte Tiere finden als Modelle des non-IDDM Verwendung [64]. Eine Sonderform stellt *Psammomys obesus* dar, denn die diabetische Stoffwechsellage wird durch Zufuhr hochkalorischer Nahrung erzeugt [70, 71].

2.3.1 Entwicklung der GOTO-KAKIZAKI-Ratte

Der Stamm der GOTO-KAKIZAKI-Ratten (GK-Ratten) wurde 1973 durch YOSHIO GOTO und MASAEI KAKIZAKI an der Universität Tokio etabliert. Dazu wurde mit 211 (davon 130 Männ-

chen) Wistar-Ratten nach zwölfstündigem Fasten ein oraler Glukose-Toleranztest durchgeführt. Als Selektionskriterium für den Inzuchtstamm dienten die kumulierten Blutglukosekonzentrationen 30, 60, 90 und 120 Minuten nach Glukoseapplikation. Von den 211 möglichen Tieren der Parental-Generation wurden 18 Tiere mit der geringsten Glukosetoleranz, also den höchsten kumulierten Blutglukosewerten, zur weiteren Zucht ausgewählt. Keines dieser 18 Tiere wies einen pathologischen oralen Glukosetoleranztest oder einen pathologischen Nüchternblutglukosewert auf. Die 1. Filial-Generation umfasste 162 Tiere, von denen wiederum 25 zur weiteren Zucht selektiert wurden. Die selektive Züchtung wurde bis zur Verpaarung der 175 Tiere aus der 3. Filial-Generation beibehalten. Die Verpaarung von Geschwistern wurde ab der 4. Filial-Generation zusätzlich zur selektiven Zucht ausgeführt, um die Erhöhung der Intensität der abnormalen Stoffwechsellage zu beschleunigen [72-74]. Während der gesamten Zucht nahm die Glukosetoleranz der Tiere un stetig ab. Alle Tiere der 9. Filial-Generation wiesen bereits im Alter von zwei Wochen eine gestörte Glukosetoleranz auf. Dies wurde auch daran deutlich, dass die Rate von Tieren mit Glukosurie nach oralem Glukosetoleranztest mit zunehmender Generationenanzahl stieg. Der Nüchternblutglukosewert stieg im Verlauf des Zuchtverfahrens un stetig von $4,44 \pm 0,05$ mmol/l in der Parental-Generation auf $6,12 \pm 0,12$ mmol/l in der 15. Filial-Generation an.

2.3.2 Allgemeine Eigenschaften der GOTO-KAKIZAKI-Ratte

Durch GOTO und KAKIZAKI wurde ein Tiermodell für den spontanen nicht insulinabhängigen Diabetes mellitus erzeugt. Das Körpergewicht der GK-Ratten liegt unter dem der alters- und geschlechtsgleichen, metabolisch gesunden Wistar-Ratten [72, 73, 75]. Die Glukosetoleranz der GK-Ratten ist gegenüber der von metabolisch gesunden Vergleichstieren vermindert. Die gestörte Glukosetoleranz wurde in der 8. Lebenswoche sehr deutlich, zeigte aber keine altersabhängige Progredienz. Der Nüchternblutglukosewert stieg bis zur 15. Filial-Generation nur gering an. In der Mehrzahl der aktuellen Publikationen wurde für die GK-Ratten ein, im Vergleich zu entsprechenden Wistar-Ratten, signifikant erhöhter Nüchternblutglukosewert erhoben. Gleiches gilt für die Blutglukosewerte, die bei freiem Nahrungszugang ermittelt wurden. Im Vergleich zu Wistar-Ratten sind die gemessenen Plasmainsulinwerte der GK-Ratten in der Regel niedriger. Es besteht eine auf einem Postrezeptordefekt beruhende Insulinresistenz [50]. Der „Insulinrezeptor an sich“ ist funktionstüchtig, ist aber auch in geringerem Ausmaße als bei gesunden Vergleichstieren in die Zellmembran von Lebergewebe transloziert [76]. Der (prä-)diabetische Stoffwechselzustand hat bei den GK-Ratten eine geschlechtsunabhängige Ausprägung [72]. Trotz mehrfacher und zum Teil kontrovers geführter Diskussionen gibt es keinen sicheren Anhalt für eine hauptsächlich uniparentale, spezifisch maternale, Vererbung der für die Ausprägung des Phänotyps verantwortlichen Merkmale [77, 78]. GK-Ratten zeigen die typischen Spätfolgen des

Diabetes mellitus. Über das Auftreten einer Neuropathie mit erniedrigten Nervenleitgeschwindigkeiten bei erhöhtem neuralen Polyol-Gehalt und neuraler Myo-Inositol-Depletion [79, 80], der diabetischen Katarakt und Retinopathie sowie einer altersabhängigen Nephropathie mit Verdickung der glomerulären Basalmembran [81] bei GK-Ratten wurde berichtet. Diese Veränderungen entsprechen Spätfolgen des humanen Diabetes mellitus.

2.4 Melatonin und Epiphyse

Die Epiphyse (Epiphysis cerebri, Corpus pineale, Glandula pinealis, Pinealorgan) war schon GALEN (130-200) bekannt. Die alten Griechen hielten sie für ein Ventil der Seele. DESCARTES (1596-1650) schrieb ihr eine Funktion als kontrollierende Schnittstelle zwischen Seele und Körper zu. Bis in das 19. Jahrhundert hinein galt die Epiphyse als rudimentäres Organ. Ausgangs des 19. Jahrhunderts wurden erste endokrine Funktionen postuliert, die im 20. Jahrhundert weiter konkretisiert wurden, ohne daß ein Sekretionsprodukt bekannt war [82]. So blieben die Funktionen der Epiphyse unklar. Eine produktive Epiphysenforschung begann erst mit der Entdeckung des Melatonins durch LERNER (1958) und der durch WURTMANN und AXELROD (1965) aufgestellten Hypothese, dass die Epiphyse durch Veränderung der Melatoninausschüttung der Übersetzung von Veränderungen der Umgebungshelligkeit dient [83].

2.4.1 Vorkommen des Melatonins

Das dem Serotonin (5-Hydroxytryptamin; Molare Masse: 176,22 g/mol) eng verwandte Indolamin Melatonin (5-Methoxy-N-acetyltryptamin; Molare Masse: 232,28 g/mol) wurde 1958 aus Pinealorganen von Rindern durch LERNER isoliert und charakterisiert. Seinen Namen hat es wegen seines bleichenden Effekts (Melanophorenkontraktions-Prinzip) bekommen [82]. Melatonin ist ein verbreitetes Hormon. Es findet sich in Prokaryonten, Protisten und Eukaryonten. Insbesondere in tierischen Eukaryonten (Säugetiere, Vögel, Amphibien, Knorpel- und Knochenfische, Cyclostomata) wurde es intensiv untersucht. Melatonin wurde aber auch in Pilzen, Algen und höheren Pflanzen nachgewiesen. Der Dinoflagellat *Gonyaulax polyedra* ist für besonders hohe Melatoninkonzentrationen – bis zu 50 ng/mg Protein [84] – bekannt.

2.4.2 Übersicht über die Synthese des Melatonins

Bei Säugetieren wird Melatonin unter anderem in der Retina, der HARDER'schen Drüse der Nagetiere und in der Darmmukosa synthetisiert. Die einzig bekannten Zelltypen mit circadian- und circannual-rhythmischer Melatoninsynthese sind die Photorezeptorzellen der Retina und die Pinealocyten. Ausgangssubstanz der Melatoninsynthese ist die essentielle Aminosäure L-Tryptophan. Die Aufnahme erfolgt über einen hochaffinen Transporter [85]. Danach wird Tryptophan zunächst in den Mitochondrien der Pinealocyten durch die eisen-

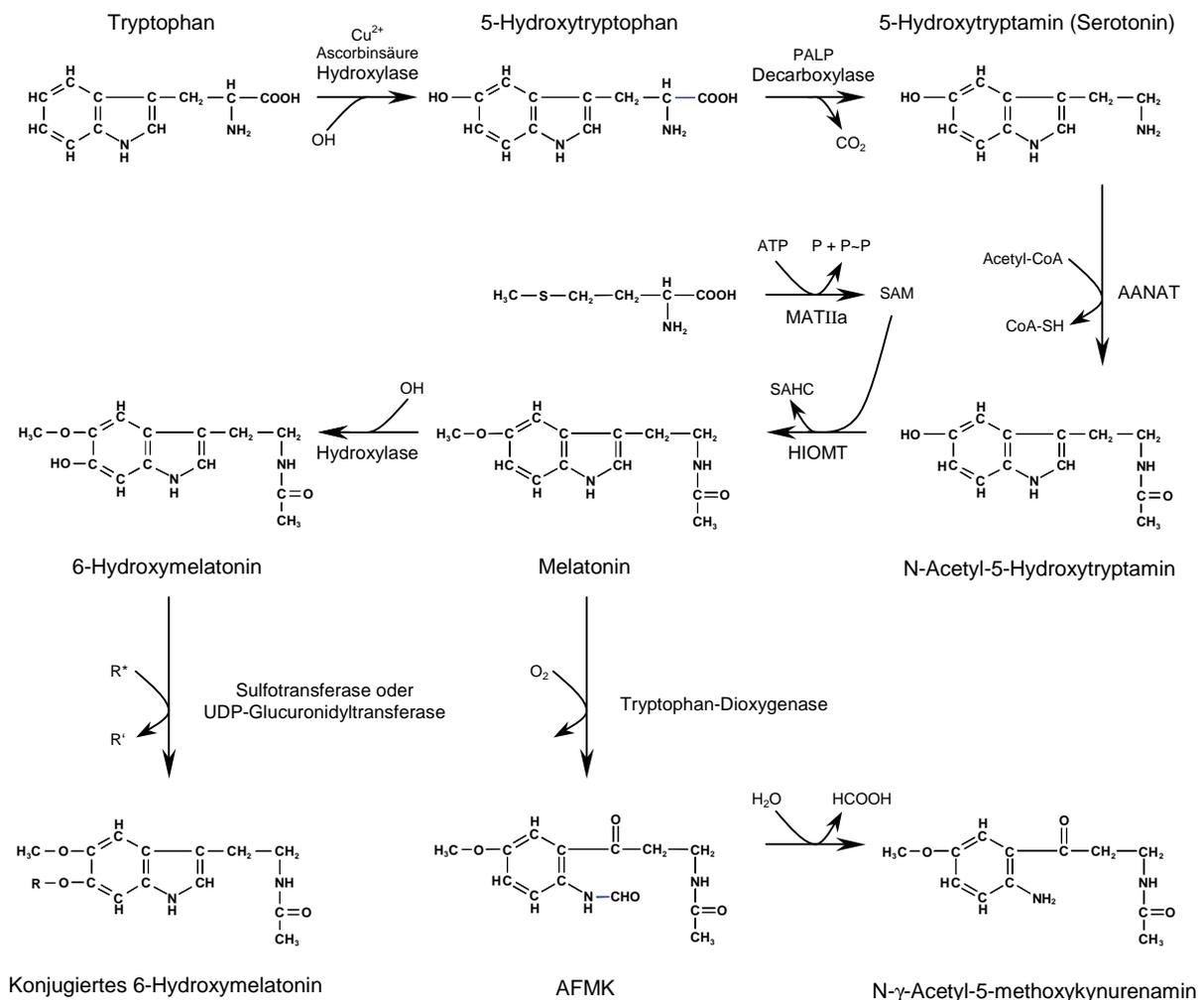
haltige Tryptophanhydroxylase (EC 1.14.16.4) [86] mit Tetrahydrobiopterin als Kofaktor an C5 zu 5-Hydroxytryptophan hydroxyliert. Dies ist der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Serotoninsynthese [87, 88]. In Pinealocyten wird er durch die Isoform 1 der Tryptophanhydroxylase katalysiert [87, 89]. Die mRNA-Expression dieses Enzyms zeigt eine circadiane Rhythmik mit etwa vierfach vermehrter Expression während der Dunkelphase [90]. Die Tryptophanhydroxylase hat bereits am Tag eine hohe Grundaktivität und steigert diese in der Nacht um bis zu 100% [91, 92]. Ausgelöst wird diese Steigerung durch eine Stimulation der Proteinkinase A bedingt durch erhöhte cAMP-Werte nach noradrenerger Stimulation des Pinealocyten. Die Tryptophanhydroxylase-Protein besitzt eine Halbwertszeit von 75 min [93]. Die enzymatische Aktivität kann durch para-Chlorophenylalanin gehemmt werden [94]. Der Hydroxylierung folgt im Zytoplasma die Pyridoxalphosphat-abhängige Decarboxylierung (Aromatische Aminosäure Decarboxylase; EC 4.1.1.28) [95, 96] an C1 zu 5-Hydroxytryptamin (Serotonin). Die Aromatische Aminosäure Decarboxylase ist ein relativ unspezifisches Enzym und der Reaktionsschritt ist nicht limitierend für die Synthese von Serotonin [96, 97]. Während der Hellphase wurden Serotoninmengen von bis zu 250 pmol je Pineal, während der Dunkelphase von unter 25 pmol je Pineal ermittelt, wobei das Tagesprofil invers zu dem des Melatonins ist [98, 99]. Ein Teil des Serotonins wird an der an C1 gebundenen Aminogruppe zu N-Acetylserotonin acetyliert. Katalysiert wird die Reaktion durch das Enzym Arylalkylamin-N-acetyltransferase (AANAT; EC 2.3.1.87) unter Nutzung des Kofaktors Acetyl-Koenzym A [100, 101]. Diese Reaktion wird als einer der geschwindigkeitsbestimmenden Schritte der Melatoninsynthese angesehen. Allerdings ist unter starker noradrenerger Stimulation das Reaktionsprodukt N-Acetylserotonin in ausreichender Menge vorhanden. So wird der Katalysator der Folgereaktion, die 5-Hydroxyindol-O-methyltransferase (HIOMT), geschwindigkeitsbestimmend [102].

Es existieren zwei Typen eines Enzyms mit N-Acetyltransferase-Aktivität im Pineal: Die Arylamin- und die Arylalkylamin-N-Acetyltransferase (ANAT und AANAT), diese sind jeweils nach ihrem Vorzugssubstrat benannt [101]. Da die Affinität der AANAT für Serotonin deutlich höher ist, ist nur dieses Enzym für die Melatoninsynthese von Bedeutung. Die AANAT-Aktivität unterliegt bei Ratten ausgeprägten tageszeitlichen Schwankungen [103]. So sind im Rattenpineal mRNA und Protein von AANAT tagsüber kaum nachweisbar, steigen nachts jedoch bis zu 150-fach an [104-107]. Beim Menschen hingegen wird die AANAT konstitutiv hoch exprimiert [108, 109], da hier das Enzym hauptsächlich post-translational reguliert ist. Die Promoterregion des AANAT Gens der Ratte enthält mit einem cAMP-Response-Element eine Bindungsstelle für phosphoryliertes cAMP-Response-Element-Binding-Protein sowie eine CCAAT-Box [110]. Dies belegt, wie entscheidend der noradrenerge, cAMP-stimulierende Signalweg für die Melatoninsynthese ist. Ferner ist eine durch ein Uhren-

Heterodimer von BMAL1/CLOCK aktivierbare E-Box im ersten AANAT-Gen-Intron beschrieben. In der Retina ist eine Aktivierung der AANAT durch Uhrengene belegt. Im Rattenpineal soll dieser spezielle Weg allerdings nicht angelegt sein [111]. Die AANAT besitzt eine sehr kurze Halbwertszeit von nur 3 bis 5 Minuten. Nach einem nächtlichen Lichtpuls oder zu Ende der Dunkelphase sinkt innerhalb weniger Minuten die Aktivität der AANAT. Die Verringerung der Transkription auf mRNA Ebene hinkt diesem Aktivitätsverlust hinterher, so dass hier post-transkriptionale oder post-translationale Regulationen diskutiert werden [106]. Je nach Spezies steht entweder die transkriptionelle (z.B. Ratte) oder die post-translationale (z.B. Mensch) Regulation der AANAT im Vordergrund. Charakteristisch für die post-transkriptionale Regulation ist eine prozessbedingte längere Verzögerung zwischen gesteigerter Genexpression und gesteigerter Enzymaktivität, während die post-translationale Regulation sehr schnell die Enzymaktivität steigert [112, 113]. Die AANAT ist ein an zwei Serin-Resten phosphorylierbares Enzym. Die Protein-Kinase-A-abhängige Phosphorylierung erhöht die Reaktionsgeschwindigkeit der von ihr katalysierten N-Acetylierung. Weiterhin ist die katalytische Aktivität der AANAT vom intrazellulären Redoxzustand abhängig, da die Oxidierung zweier freier Sulfhydrylgruppen zur Ausbildung einer intramolekularen Disulfidbrücke führt, wodurch das aktive Zentrum weniger frei liegt und die Reaktionsgeschwindigkeit sinkt [114]. In Nebenwegen kann Serotonin zu 5-Methoxytryptophan [115, 116], zu 5-Methoxytryptamin [117, 118] sowie über 5-Hydroxyindol-acetaldehyd und 5-Hydroxyindolessigsäure zu 5-Methoxyindolessigsäure verstoffwechselt werden. Im letzten Reaktionsschritt wird N-Acetylserotonin zu Melatonin umgewandelt. Es erfolgt die S-Adosylmethionin-abhängige O-Methylierung durch die HIOMT (EC 2.1.1.4) [117]. Die HIOMT überträgt eine Methylgruppe vom Cofaktor S-Adosyl-L-methionin auf verschiedene Indole [119]. S-Adosylmethionin wird in einer Nebenreaktion aus ATP und Methionin durch die L-Methionin-adenosyltransferase Isoform IIa (MAT IIa) synthetisiert. Die HIOMT hat im Gegensatz zur AANAT eine sehr lange Halbwertszeit von 24 h. Ein schwacher nächtlicher Aktivitätsanstieg um 40% konnte gezeigt werden [120, 121]. Im Gegensatz zur AANAT ist dieser Aktivitätsanstieg nicht kurzfristig durch Noradrenalin oder cAMP-stimulierende Substanzen induzierbar, sondern erst über mehrere Tage und Wochen vermag eine noradrenerge Modulation die HIOMT-Aktivität zu verändern [120]. Ohne nächtliches Noradrenalin sinkt die Aktivität des Enzyms innerhalb von zwei Wochen auf 50 % des normalen Tagesniveaus ab [121]. Andere Neurotransmitter wie Neuropeptid-Y spielen bei der annualen Regulation der HIOMT ebenfalls eine Rolle [120]. Es wurde gezeigt, dass in der Dunkelphase die AANAT-Aktivität so hoch ist, dass die HIOMT Aktivität geschwindigkeitsbestimmend für die Melatoninsynthese wird. Die HIOMT ist nur langfristig regulierbar und wird als entscheidendes Stellglied annualer Regulation angesehen. Die beiden wesentlichen Enzyme bei der Synthese von Melatonin sind die AANAT und die HIOMT. Die

Aktivität der AANAT bestimmt bis zu einem Spezies-spezifischem Maximum die Dauer der nächtlichen Melatoninsynthese, während die Aktivität der HIOMT die Amplitude beeinflusst. Die Lage des Melatoningipfels innerhalb der Dunkelphase ist Spezies-spezifisch.

Abb. 2: Übersicht über die Synthese und den Abbau des Melatonins.



2.4.3 Mechanistik der pinealen Melatoninabgabe

Melatonin diffundiert leicht durch Zellmembranen [122]. Es wird folglich im Pinealocyten nicht gespeichert und diffundiert unmittelbar nach der Synthese [123] in das umgebende Gewebe und den Liquor cerebrospinalis. Durch die Verteilung im Liquorraum und Diffusion in die umgebenden Gewebe und Blutgefäße erfolgt die Verteilung im Organismus [122].

2.4.4 Melatoninrezeptoren und ihre Signaltransduktion

Bisher wurden drei Typen von Melatoninrezeptoren gefunden und in ihren Eigenschaften charakterisiert. Sie wurden als MT_1 -, MT_2 - und MT_3 -Rezeptoren bezeichnet. Als Synonyme wurden früher die Bezeichnungen MT_{1a} -, MT_{1b} -, MT_{1c} -Rezeptor verwendet [124, 125]. Die

zellmembranständigen MT_1 - und MT_2 -Rezeptor finden sich in zahlreichen Geweben. In pankreatischen β -Zellen von Ratten, Mäusen und Menschen sowie in der Ratten-Insulinoma Zelllinie INS1 ging man zunächst nur von der Existenz des MT_1 -Rezeptor aus [126, 127]. Jüngere Untersuchungen belegen aber auch hier das gleichzeitige Vorhandensein des MT_2 -Rezeptor [128]. Es handelt sich dabei um G_i -Protein-gekoppelte Proteine mit sieben Transmembrandomänen. Sie vermitteln eine die Adenylatcyclase inhibierende und die intrazelluläre cAMP-Konzentration senkende Wirkung. Der MT_1 -Rezeptor ist aber auch G_q -Protein-gekoppelt, wodurch die Stimulation der Phospholipase C und konsekutiv die Erhöhung der intrazellulären DAG-, IP_3 - und Kalziumkonzentration in der β -Zelle ermöglicht wird [129]. Er wird circadian-rhythmisch exprimiert. Hohe Melatoninkonzentrationen vermindern die Synthese des MT_1 -Rezeptors [130]. Über den MT_2 -Rezeptor wird zusätzlich auch die lösliche Guanylat-Cyclase inhibiert, was zum Abfall der intrazellulären cGMP-Konzentration führt [131]. Die K_D beträgt für beide Rezeptorsubtypen zwischen 10 und 200 pmol/l. Bei dem MT_3 -Rezeptor handelt es sich um eine Bindungsstelle und keinen Rezeptor [132]. Er weist ein anderes Bindungsverhalten und andere kinetische Eigenschaften als die Rezeptoren auf. Er ist deutlich hydrophober und nicht in der Zellmembran lokalisiert. Die K_D ist etwa 5 nmol/l, liegt also deutlich über der der MT_1 - und MT_2 -Rezeptoren. Letztlich handelt es um ein Analogon der humanen Chinonreduktase 2 [133, 134]. Auch durch die Bindung von Melatonin an andere intrazelluläre Proteine – zum Beispiel aus der Familie der Kalziumbindenden Proteine [135] – kann ein regulativer Einfluss zu Stande kommen. Neben den beschriebenen membranständigen wird die Relevanz nukleärer Melatoninrezeptoren diskutiert. Es wurde bereits gezeigt, dass die zur Subfamilie RZR und ROR gehörigen Proteine Melatonin mit K_D -Werten im nanomolaren Bereich binden können [136]. Dass die RZR/ROR-gesteuerte Transkription von Genen melatoninabhängig erhöht ist wurde ebenfalls gezeigt [137]. Es sind bisher keine anderen natürlichen Liganden dieser Rezeptoren bekannt, wohl aber existiert eine Reihe von Regulatoren. Die genaue Bedeutung nukleärer Melatoninrezeptoren ist derzeit noch unklar.

2.4.5 Wirkungen des Melatonins

Melatonin hat äußerst vielfältige Effekte. Diese reichen von der Übersetzung abiotischer Umweltfaktoren (Helligkeit, Photoperiode, Temperatur) und der Antizipation wiederkehrender Umweltveränderungen bis zum Schutz vor extern oder intern generierten, schädigenden Einflüssen wie zum Beispiel oxidativem Stress oder UV-induzierter Photooxidation in Pflanzen und niederen Organismen [138, 139]. Im Allgemeinen wirkt Melatonin hemmend auf die Sekretion endokriner Drüsen. Beim Menschen hat Melatonin blutdrucksenkende und hypotherme Wirkung. Auch wirkt es „schlaf-vermittelnd“. Melatonin – und teilweise auch seine Metaboliten – werden onkostatische [140], antiinflammatorische und immunmodula-

torische Funktionen zugeschrieben [122, 141]. Die Einflüsse von Melatonin auf den Stoffwechsel wurden vielfach untersucht. Melatonin senkt die Insulinsekretion von Ratten-Insulinom (INS-1) Zellen und LANGERHANS'sche Inseln von Ratten und Mäusen [127, 142]. Melatonin vermindert die Insulinresistenz und kann Dyslipidämien bei diabetischen Tieren (*Rodentia*) und Patienten mit Diabetes mellitus Typ 2 ausgleichen [143].

2.4.6 Melatoninabbau und Melatoninclearance

Der hauptsächlich hepatische Abbau des Melatonins beginnt mit der Hydroxylierung an C6 und anschließender Sulfatierung – seltener Glucuronidierung – und folgender renaler Elimination. In extrahepatischen Geweben kann die De-Acetylierung durch verschiedene Enzyme erfolgen [122]. Melatonin und seine Metaboliten sind in Speichel und Urin nachweisbar. Wegen der vielfach beschriebenen *radical-scavenger*-Funktion des Melatonins wird ein Melatoninverbrauch durch Reaktion mit freien Radikalen diskutiert [122]. Die Plasmahalbwertszeit des Melatonins beträgt bei Ratten, Hamstern und Hunden etwa 20 Minuten [144-146], bei Affen und Menschen dagegen etwa 35 Minuten [147], was einer geringeren hepatischen Clearance zugeschrieben wird [145]. Die Plasmahalbwertszeit unterliegt bei Nagern keinen tageszeitlichen Schwankungen [144, 148].

3 Ziele der Arbeit

Ziel und Absicht der hier vorgelegten Arbeit ist es,

- Typ 2 diabetische GK-Ratten in verschiedenen Altersstufen bezüglich allgemeiner Merkmale und hinsichtlich der Ausprägung der diabetischen Stoffwechsellage im Vergleich zu metabolisch gesunden Wistar-Ratten zu charakterisieren,
- die tageszeitliche Variabilität von Blutglukose und Plasmainsulin in Abhängigkeit von Alter und Stoffwechselsituation der Tiere zu untersuchen,
- den Glukose-Sensor-Komplex der pankreatischen β -Zelle stoffwechselgesunder Wistar-Ratten und Typ 2 diabetischer GK-Ratten unter Berücksichtigung tageszeitlicher und altersabhängiger Veränderungen morphologisch (Konfokale Laser Scanning Mikroskopie), molekularbiologisch (*real-time* RT-PCR) und funktionell (Perifusions-system) zu untersuchen,
- Plasmamelatonininkonzentrationen bei Typ 2 diabetischen GK-Ratten und stoffwechselgesunden Wistar-Ratten unter Berücksichtigung von Alter und Tageszeit zu erfassen,

- pineales Melatonin und seine Vorstufen in Abhängigkeit von Tageszeit sowie Alter und Stoffwechsellage der Ratten durch *high performance liquid chromatography* zu detektieren und die mRNA-Expression von Enzymen der pinealen Melatoninsynthese durch *real-time* RT-PCR zu untersuchen,
- um das Phänomen erniedrigten Plasmamelatonins bei diabetischen Individuen unter Einbeziehung von Tiermodellen zu klären.

4 Material und Methoden

4.1 Tierhaltung und Tierzucht

GOTO-KAKIZAKI-Ratten (Generation Tokohudu F42 + 6, M&B Animal Models, Ry, Dänemark) und Wistar-Ratten (Stamm Han:WIST, Tierzucht GmbH Schönwalde, Schönwalde, Deutschland) wurden räumlich getrennt unter gleichen Bedingungen in Übereinkunft mit den gültigen Tierschutzrichtlinien gehalten. Die einzelnen Haltungskäfige waren altersabhängig mit zwei bis vier Tieren des gleichen Geschlechts besetzt. Alle Ratten hatten freien Zugang zu Wasser und Pelletfutter (Altromin 1324, Altromin GmbH, Lage, Deutschland). Die Weibchen beider Stämme erhielten ab der Verpaarung bis zum Absetzen der Jungtiere im Alter von vier Wochen höherkalorisches Pelletfutter (Altromin 1314, Altromin GmbH, Lage, Deutschland). Die Vermehrung der seit 1999 gehaltenen Wistar-Ratten erfolgte durch Auszucht (Rotationszucht nach RAPP). Eine Verpaarung von Geschwistertieren fand nicht statt. Die GOTO-KAKIZAKI-Ratten wurden durch Inzucht vermehrt. Die relative Luftfeuchte betrug, bei einer Temperatur von 22 ± 1 °C, zwischen 60 und 70%. Das Lichtregime umfasste je 12 h Hell- und Dunkelphase (L:D = 12:12). Das Licht wurde um 07:00 Uhr MESZ angeschaltet.

4.2 Tiertötung

1.) 8 bis 10 Tage alte Wistar- und GOTO-KAKIZAKI-Ratten wurden nach Bestimmung des Körpergewichts dekapitiert. Die ersten Tropfen des dabei austretenden Blutes wurden verworfen, ein weiterer Tropfen zur Bestimmung der Blutglukosekonzentration mittels der Glukose-Oxidase-Methode (konfektionierte Teststreifen) verwendet. Nach schichtweiser Präparation und medianer Laparotomie wurde das diffuse Pankreas teilweise stumpf von umgebenden Strukturen gelöst und zur Inselfeparation verwendet.

2.) Die Tötungen älterer Tiere erfolgten 5 h nach Beginn der Hellphase. Für die Untersuchung von Merkmalen im Tagesgang wurden die Tiere ausgehend von oben genanntem Zeitpunkt in einem zeitlichen Abstand von jeweils 3 h getötet. Ein weiterer

Tötungszeitpunkt wurde 6,5 h nach Beginn der Dunkelphase in das Raster eingefügt. Die von verschiedenen Zuchtpaaren geworfenen Wistar- beziehungsweise GOTO-KAKIZAKI-Ratten wurden im Alter von 3, 6, 24 und 42 Wochen getötet. Die Tiere wurden unter Beachtung der zeitpunktentsprechenden Lichtverhältnisse und Zuhilfenahme einer Rotlichtlampe aus den Käfigen entnommen und mit Diethylether (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland) narkotisiert. Anschliessend wurde das Körpergewicht bestimmt und durch Kappen der Schwanzspitze Blut zur Bestimmung der Blutglukosekonzentration (siehe dort) gewonnen. Nach Fixierung des jeweiligen Tieres erfolgte durch schichtweise Präparation eine mediane Laparotomie mit anschliessender, etwa linksmedioklavikulärer, Thorakotomie. Das Diaphragma wurde im Bereich des Centrum tendineum teilweise zertrennt und das Herz spitzenseitig durch stumpfes Präparieren freigelegt. Es folgte die Entnahme von zentralvenösem Blut durch Punktion des rechten Herzventrikels mit einer heparinisierten (Liquemin®N, Hoffmann-La Roche AG, Grenzach-Wyhlen, Deutschland) Spritze. Anschließend wurde das diffuse Pankreas von den umgebenden Strukturen gelöst, entnommen und in 4% Paraformaldehyd bzw. – zur Verhinderung der RNA-Degradation – in RNA-Later (Ambion Europe Ltd., Huntingdon, Cambridgeshire, Großbritannien) asserviert. Weiterhin wurde ein keilförmiges Stück aus dem linken Leberlappen entnommen. Die anschliessende Entnahme von Gehirn und Corpus pineale erfolgte nach suboccipitaler Dekapitation und beidseitiger Durchtrennung des Schädels. Vom Foramen magnum ausgehend parallel zur Sutura squamosa bis auf Höhe der Sutura coronalis, so dass die beiden Ossa parietalia gemeinsam mit dem mittleren Anteil des Os occipitale mühelos abgehoben werden konnten. Nach dem gegebenenfalls notwendigen Entfernen von Anteilen der Dura mater wurde das Corpus pineale von den Meningen gelöst, in ein 2 ml-Eppendorf-Tube verbracht, anschliessend in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C aufbewahrt.

4.3 Bestimmung der Blutglukosekonzentration

Zur Bestimmung der Blutglukosekonzentration wurde die Glukose-Oxidase-Methode genutzt. Es wurde ein handelsübliches Gerät (MediSense®Precision® Xtra) mit Teststreifen (MediSense®Precision®Plus, Abbott Diagnostika, Wiesbaden, Deutschland) verwendet.

4.4 Gewinnung des Blutplasmas

Das durch Ventrikelpunktion (siehe oben) gewonnene Vollblut wurde 6 Minuten bei $700 \times g$ zentrifugiert. Das Plasma wurde abpipettiert, in 2 ml-Eppendorf-Tubes aliquotiert und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C aufbewahrt.

4.5 Inselfeparation

Das den neonaten Tieren entnommene Gesamtpankreas und das milznahe Drittel des Pankreas der 6 Wochen alten Tiere wurde mehrfach geteilt und in 30 ml HANKS'-Medium (4 °C, ohne RSA) verbracht. 2 mg Kollagenase (Serva 178 9, SERVA Electrophoresis GmbH Heidelberg, Deutschland) wurden mit 2 ml HANKS'-Medium (RSA-frei) in einem 5 ml fassendem Borosilikatröhrchen gelöst. Die Kollagenaselösung wurde nach Zugabe der Pankreas-teile 5 bis 6 Minuten in der Hand stark geschüttelt. Zum Abstoppen der Reaktion wurde die erhaltene Suspension in ein Becherglas mit 40 ml HANKS'-Medium (4 °C, 2 mg RSA pro ml) gegossen. Nach 10 min wurden 30 ml des Mediums abgegossen und sofort durch das gleiche Volumen frischen Mediums ersetzt. Nach weiteren 10 min wurden erneut 30 ml des Mediums abgegossen und der verbleibende Rest mit den sedimentierten LANGERHANS-Inseln in eine Petrischale überführt. Unter Zuhilfenahme eines Stereomikroskopes (Stemi SV6, Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland) und einer Kaltlichtquelle (KL1500 electronic, Schott AG, Mainz, Deutschland) wurden die einzelnen Inseln mit einer Glaskapillare aufgenommen und in ein Augenschälchen mit HANKS'-Medium (4 °C, 2 mg RSA pro ml) übertragen. Es folgte ein Aufreinigungsschritt durch erneutes Übertragen in ein weiteres Augenschälchen. Danach wurden die Perifusionssäulen mit den LANGERHANS'schen-Inseln befüllt (siehe Superfusion). Für molekularbiologische Untersuchungen wurden die 2 ml-Eppendorf-Tubes vor der Zugabe der Inseln mit 1,5 ml HANK's-Medium (2 mg RSA pro ml) befüllt und anschliessend 10 min bei $150 \times g$ zentrifugiert, das überstehende Medium abpipettiert und nach einem weiteren Waschschrift mit 1 ml DULBECCO's *Phosphate Buffered Saline* (DPBS, Cambrex BioScience, Verviers, Belgien) sofort zur RNA-Extraktion (siehe dort) verwendet beziehungsweise bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C aufbewahrt.

4.6 Perifusion

Die Perifusionstechnik – modifiziert nach CSERNUS et al. [149] – ist eine etablierte Methode zur Untersuchung der Sekretionsleistung endokriner Gewebe unter Berücksichtigung kinetischer und quantitativer Gesichtspunkte. Sie wurde von PESCHKE et al. [39] ausführlich beschrieben. Etwa 250 bis 300 separierte LANGERHANS'sche-Inseln wurden mit Sephadex G10 (Sartorius, Göttingen, Deutschland) in jeweils eine Perifusionssäule eingebettet. Die von einem Wassermantel umgebenen und dadurch gewärmten Perifusionssäulen wurden mit einer Flussrate von 0,33 ml/min mit temperiertem (37 °C) und begastem Nährmedium (Medium 199, Glukose insgesamt 8,6 mmol/l, 1,75 g/l RSA, 80 mg/l Gentamycin; sämtlich Sigma-Aldrich GmbH, München, Deutschland) durchströmt. Ein vor der Perifusionssäule angebrachtes 4-Wege-Ventil (Rheodyne Typ50; Rheodyne Europe GmbH, Alsbach, Deutschland) erlaubte die definierte Zufuhr von ebenfalls temperierten Stimulanzen. Die konstante

Flussrate wurde durch regulierbare Peristaltikpumpen (Ismatec, Glattbrugg, Schweiz) gewährleistet. Mit Hilfe eines automatischen Fraktionssammlers Retriever II (Fa. Isco, Lincoln, NJ, USA) wurden 1- bzw. 3-Minutenfraktionen in 5 ml fassende Borosilikatröhrchen, die um einen Abbau des Insulins zu vermeiden 25 µl des Protease-Inhibitors Aprotinin (Trasylo®) enthielten, aufgenommen und für den Insulin-Radioimmunoassay asserviert.

4.7 Melatonin-Radioimmunoassay

Zur Bestimmung der Melatoninplasmakonzentration wurde ein handelsüblicher RIA (Bühlmann Laboratories AG, Allschwil, Schweiz) verwendet. Das Blutplasma wurde wie beschrieben gewonnen, bei -80 °C gelagert und unmittelbar vor der weiteren Verwendung bei Raumtemperatur aufgetaut. Um ein Verstopfen der Extraktionssäulen durch Fibringerinnsel zu vermeiden, wurden die Plasmaproben kurz zentrifugiert. In jede Säule wurde 1 ml Probenmaterial gefüllt und 1 min bei 200 × g zentrifugiert. Es folgten zwei Waschschrte mit je 1 ml 10% (v/v) Methanol in Aqua tridestillata und ein Waschschrte mit 1 ml reinem Hexan (HPLC-grade, Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland) 1 min bei 500 × g. Nach dem Umsetzen der C-18-Säulen in neue Borosilikatglasröhrchen wurden die Proben mit je 1 ml reinem Methanol für 1 min bei 200 × g eluiert. Das Methanol wurde verdampft und die Proben mit 1 ml Inkubationspuffer rekonstituiert, gevortext und 30 min bei Raumtemperatur äquilibriert. Je 400 µl der rekonstituierten Extrakte wurden in zwei Polystyrol-Röhrchen abpipettiert und jeweils 100 µl Melatonin-Antiserum sowie 100 µl ¹²⁵J-Melatonin Tracer dazu gegeben. Es folgte eine Inkubationszeit von 16 h bei 4 °C. Nach Zugabe von 100 µl der Sekundär-Antikörper-Suspension wurde weitere 15 min bei 4 °C inkubiert. Es wurde je 1 ml Aqua tridestillata (4 °C) zugegeben und anschliessend 5 min in der Kühlzentrifuge (3-5 °C) bei 2000 × g zentrifugiert. Der Überstand wurde durch Dekantieren entfernt und die Aktivität der Proben 2 min im Gamma Counter (LSC 1400 Wallac Incorporated, USA) gemessen. Die Berechnung der den Aktivitäten entsprechenden Melatoninplasmakonzentrationen erfolgte mit der Software des Gamma Counters auf Basis der gemäß dem Kit erstellten Eichkurve.

4.8 Insulin-Radioimmunoassay

Die Bestimmung der Insulinkonzentrationen erfolgte mit einem handelsüblichem RIA (DPC Biermann GmbH, Bad Nauheim, Deutschland). Die Standards wurden mit den mitgelieferten Komponenten gemäß der Anleitung zum RIA erstellt. Bei den Tierproben wurden zu 205 µl Rattenplasma 205 µl Zellkulturmedium (Medium 199; Sigma-Aldrich GmbH, München, Deutschland) pipettiert, das erhaltene Gemisch gevortext und für die Doppelbestimmung in zwei Proben zu je 200 µl in die vorgesehenen antikörperbeschichteten Polypropylenröhrchen

aufgeteilt. Zur Auswertung der Perfusionen wurden jeweils 200 µl unverdünntes Superfusat eingesetzt. Nach Zugabe von 1 ml ¹²⁵J-Insulin Tracer (etwa 400 cpm) wurden Proben und Standards 20 h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dem Dekantieren und kurzem Trocknen durch Ausklopfen wurden die Proben 1 min im Gamma Counter gemessen. Die Berechnung der den Aktivitäten entsprechenden Insulinkonzentrationen erfolgte mit der Software des Gamma Counters auf Basis der gemäß dem Kit erstellten Eichkurve für Humaninsulin, da Ratteninsulin kommerziell nicht verfügbar war.

4.9 High Performance Liquid Chromatography-Bestimmungen

Blutplasma wurde wie oben beschrieben gewonnen. Als Antikoagulant wurde EDTA (200 µl 8% auf 10 ml Vollblut) verwendet. Die Lagerung der Proben erfolgte auf Crash-Eis für höchstens 1 h. Es wurde 5 min bei 2200 x g in einer Kühlzentrifuge bei 4°C zentrifugiert. Zur Ausfällung aller Proteine wurden 250 µl Plasma in ein 1,5 ml-Eppendorf-Tube mit 500 µl 4%-iger HClO₄-plus (2 mM EDTA sowie 1% Ascorbat und 0,1% Cystein) gegeben. In der Probe enthaltener Sauerstoff wurde mit einer Argongasdurchströmung (5 s) ausgetrieben. Nach weiterer Zentrifugation (20 min, 20.000 x g bei 4 °C) wurde der Überstand in neues Eppendorf-Tube überführt. Die schockgefrorenen Proben wurden bei -80 °C gelagert.

Bei denselben Ratten, von denen die Plasmaproben stammten, wurden die Epiphysen nach Entnahme sofort in ein vorher ausgewogenes, gekühltes (4 °C) 200 µl-Eppendorf-Tube mit 50 µl vorgelegtem 4%-ige HClO₄-plus gegeben. Die Kühlung wurde während des gesamten weiteren Procedere beibehalten. Es erfolgte die Bestimmung des Feuchtgewichtes der Epiphysen durch Differenzwägung und anschließend die Homogenisierung (1 min) der Epiphyse nach Überführung in ein Homogenisierungsgläschen. Das Homogenisat wurde mit 25 µl frischer HClO₄ (als Spülflüssigkeit) in ein frisches Eppendorf-Tube gegeben. In der Probe enthaltener Sauerstoff wurde mit einer Argongasdurchströmung (20 s) ausgetrieben. Nach weiterer Zentrifugation (20 min, 20000 x g bei 4 °C) wurde der Überstand in neue Eppendorf-Tubes überführt, der Rest verworfen. Die Proben wurden schockgefroren und bis zur Messung bei -80 °C gelagert. Nach Auftauen der Proben erfolgte (unter weiterer Kühlung bei 4 °C und Durchmischung am Vortex-Mixer) die Neutralisierung mit 10%-iger NaOH-Lösung. Für Plasmaproben waren ca. 13-15 µl 10%-ige NaOH-Lösung auf 100 µl und für Epiphysenproben ca. 8,5-10 µl 10%-ige NaOH-Lösung auf 50 µl notwendig. Unmittelbar nach Neutralisation erfolgte die HPLC-Vermessung mit einer handelsüblichen Anlage (Agilent Series 1100; Agilent Technologies Deutschland GmbH, Böblingen, Deutschland) und einer LiChroCART 125-4-Säule. Der Fluss betrug 0,6 ml/min, das Injektionsvolumen 10 µl. Als Laufmittel diente eine Mischung aus 600 ml KH₂PO₄-Pufferlösung (pH 4,5, Einwaage pro Liter: 5 g KH₂PO₄, 170 mg Octansulfonsäure und 60 mg EDTA) und 200 ml Methanol.

Die Wellenlängen für Extinktion und Emission waren 285 und 345 nm. Mittels der aus der Eichkurve ermittelten Geradengleichung wurden die jeweiligen Konzentrationen (c) berechnet (Formel 1).

$$c = (Area - b_0) / b_1 \quad (1)$$

$$V_f = m / \rho \quad (2)$$

$$x_1 = (75 \mu l + V_f) / V_f \quad (3)$$

$$x_2 = (40 \mu l + V_n) / 40 \mu l \quad (4)$$

$$n = c * x_1 * x_2 / V_f \quad (5)$$

Berechnung des ersten Verdünnungsfaktors: Das Feuchtvolumen (V_f) wurde aus dem Feuchtgewicht (m) der Epiphyse in [mg] mit einer angenommenen Dichte (ρ) von 1,33 mg/ μ l berechnet (Formel 2). Hierzu wurden 75 μ l addiert (50 μ l Perchlorsäure Aufnahme + 25 μ l Perchlorsäure zum Spülen des Homogenators) und durch das Feuchtvolumen geteilt (Formel 3). Berechnung des zweiten Verdünnungsfaktors: Das entnommene Volumen (40 μ l) wurde mit dem Volumen (V_n) an 10%-iger Natronlauge, welches zur Neutralisation nötig war (9 μ l) addiert und durch das entnommene Volumen geteilt (Formel 4). Beide Verdünnungsfaktoren wurden nun mit der Konzentration multipliziert und durch das Feuchtvolumen geteilt, um die Substanzmenge zu erhalten (Formel 5).

4.10 Hämalaun-Eosin-Färbung

5 μ m dicke Pankreas-Paraffinschnitte wurden in Xylol zweimal 5 min entparaffiniert, in einer absteigenden Alkoholreihe gewässert (Isopropanol [100%], Ethanol [96; 80; 70; 60%]) je 3 min, Carl-Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland), zweimal kurz in Aqua destillata gewaschen und 5 min mit Hämalaun gefärbt, danach 10 min in fließendem Wasser gespült und 7 min in 0,04%igem Eosin gefärbt. Nach kurzem Waschen wurden die Schnitte in einer aufsteigenden Alkoholreihe (Ethanol [60; 70; 80; 96%], Isopropanol [100%], je 3 min) entwässert und nach zweimal 5 min in Xylol mit Entellan (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) eingedeckt.

4.11 Immunhistochemie zur Markierung von Insulin, GLUT 2 und Glucokinase

5 μ m dicke Paraffinschnitte wurden 3 h im Trockenschrank bei 60 °C und im Anschluss bei Raumtemperatur zweimal 5 min in Xylol entparaffiniert. Die Wässerung erfolgte in einer absteigenden Alkoholreihe (siehe oben). Es folgte ein Waschschriff in Aqua dest und eine zehnmünütige Äquilibriumierung in PBS (0,02 mol/l KH_2PO_4 , 0,1 mol/l Na_2HPO_4 ; pH = 7,4). Reines Ziegenormalserum (ZNS; Jackson ImmunoResearch, West Grove, Pennsylvania,

USA) wurde durch Zugabe von PBT (PBS mit 0,3% Triton X-100 [Calbiochem, San Diego, California, USA]) zur Endkonzentration von 5% verdünnt. Auf die Schnitte wurden jeweils 35 µl des 5%igen ZNS pipettiert. Nach einstündiger Inkubation in einer feuchten Kammer wurden 35 µl der 1:100 mit PBT verdünnten Primärantikörperlösung (siehe Tab. 1) aufgetragen und die Schnitte in einer feuchten Kammer bei 4 °C über Nacht inkubiert. Anschließend wurde dreimal 20 min in PBS gewaschen und danach die 1:100 mit PBT verdünnte Sekundärantikörperlösung (Cyanin3-konjugiertes Ziege-anti-Hase-IgG; Jackson ImmunoResearch, West Grove, Pennsylvania, USA) aufgetragen. Alle weiteren Schritte erfolgten unter Lichtabschluss. Nach einstündiger Inkubation wurde abermals dreimal 20 min in PBS gewaschen. Die Fluoreszenzmarkierung der Zellkerne erfolgte durch DAPI (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland). Hierfür wurden jeweils 35 µl des 1:1000 verdünnten Farbstoffes für 3 min auf jeden Schnitt aufgetragen und anschließend 20 min mit PBS und kurz mit Aqua dest gewaschen. Danach wurden die Schnitte in einer Kammer getrocknet und mit Entellan eingedeckt. Die Schnitte wurden bis zur fluoreszenzmikroskopischen Betrachtung und digitaler Fotodokumentation im Kühlschrank aufbewahrt.

Tabelle 1: Zur Immunhistochemie verwendete Primärantikörper

Zielantigen	Spezifität	Lieferant
Insulin	Meerschweinchen-anti-Mensch	Dako GmbH, Hamburg, Deutschland
GLUT 2	Kaninchen-anti-Ratte	Chemicon international, Temecula, CA, USA
Glucokinase	Kaninchen-anti-Ratte	Medizinische Hochschule, Hannover, Deutschland

4.12 RNA-Isolation und DNase-Behandlung

Pankreata wurden entnommen, zur Inaktivierung der Pankreas-RNAsen 24 h bei 4 °C in RNA-Later (Ambion Europe Ltd., Huntingdon, Cambridgeshire, Großbritannien) zwischengelagert und bis zur RNA-Extraktion in RNA-Later bei -20 °C aufbewahrt. LANGERHANS'sche-Inseln wurden nach der Separation zweimal mit je 1 ml DPBS (Cambrex BioScience, Verviers, Belgien) gewaschen und nach Zentrifugation (10 min bei 150 × g) der Überstand abpipettiert. Alle anderen Gewebeproben wurden sofort nach der Entnahme verpackt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschliessend bei -80 °C gelagert. Zur RNA-Extraktion wurden die Proben aufgetaut, das RNA-Later abgegossen, und das Gesamtpankreas in 6 ml Trizol® (Life Technologies, Karlsruhe, Deutschland) mit einem T 25 basic ULTRA-TURRAX® (IKA Labortechnik GmbH, Staufen, Deutschland) homogenisiert. Für andere Organproben wurde bei gleichem Vorgehen 1 ml Trizol® je 100 mg Gewebe verwendet. Die homogenisierten Proben wurden 5 min bei Raumtemperatur (RT) inkubiert.

Anschließend wurden 0,2 ml Chloroform (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland) je 1 ml Trizol® zugegeben und die Proben etwa 15 s stark geschüttelt. Nach Inkubation (3 min bei RT) wurde 15 min bei 6 °C und 10000 × g zentrifugiert und die wässrige Phase je nach Volumen in ein neues 12 ml Zentrifugenröhrchen oder 2 ml-Eppendorf-Tube übernommen. Pro 1 ml Trizol® wurden 0,5 ml Isopropanol (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland) zugesetzt, um die RNA zu präzipitieren. Nach 10 min Inkubation bei RT wurde erneut 15 min bei 6 °C und 10000 × g zentrifugiert. Zum Waschen der RNA wurden je 1 ml Trizol® und 0,75 ml 75%iges Ethanol (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland) zugesetzt, die Probe kurz gevortext und anschließend 5 min bei 7500 × g und 6 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde durch Dekantieren entfernt, das RNA-Pellet luftgetrocknet und - je nach ursprünglicher Gewebemenge - durch Zugabe von 50 µl bis 1 ml nucleasefreiem Wasser (ProMega, Madison, Wisconsin, USA) und Inkubation über Nacht bei 4 °C gelöst. Die gelöste RNA-Probe wurde in ein 1,5 ml-Eppendorf-Tube übertragen und bei -20 °C gelagert. 100 µl gelöster RNA wurden nach Zugabe von 10 µl DNase Puffer und 1 µl (2 IU entsprechend) DNase I leicht gemischt und 30 min bei 37 °C inkubiert. Nach dem Resuspendieren und Zugabe von 10 µl Reagenz wurde gevortext und 2 min bei RT inkubiert. Der durch Zentrifugieren entstandene Überstand wurde in im Eppendorf-Tube bei -20 °C gelagert. Es erfolgte die photometrische RNA-Konzentrationsbestimmung (Absorption bei 260 nm) und Gelelektrophorese (1,3% denaturierendes Formaldehyd-Agarose Gel). Als Qualitätsmerkmal der RNA galt die Darstellbarkeit von 28S und 18S rRNA nach Ethidiumbromid-färbung des Gels.

4.13 Reverse-Transkriptase-Reaktion

Das 1 µg RNA entsprechende Volumen gelöster RNA wurde im 1,5 ml-Eppendorf-Tube für 10 min bei 70 °C inkubiert, auf Eis abgekühlt und abzentrifugiert. Nach Zugabe von 4 µl 25 mmol/l MgCl₂, 2 µl *Reverse Transcription Buffer*, 2 µl 10 mmol/l dNTP Mix, 0,5 µl RNase Inhibitor, 1 µl *Random Primer* und 1 µl (15 IU entsprechend) AMV *Reverse Transcriptase* wurde das Volumen mit nucleasefreiem Wasser auf 20 µl aufgefüllt und 1 h bei 37 °C inkubiert. Nach Erhitzen (5 min, 99 °C) und Abkühlen auf Eis wurde abzentrifugiert. Der mit nucleasefreiem Wasser auf 100 µl aufgefüllte cDNA-Ansatz wurde bei -20 °C gelagert.

4.14 Quantitative *real-time* RT-Polymerase-Chain-Reaction

Die *real-time* RT-PCR wurde im Rotor-Gene-2000 Real-Time-Cycler (LTF Labortechnik GmbH, Wasserburg, Deutschland) durchgeführt. Zur Dokumentation wurde die gerätezugehörige Software, RotorGene Version 4.6., benutzt. Das Probenvolumen betrug jeweils 20 µl und setzte sich aus 10 µl MasterMix (ProMega, Madison, Wisconsin, USA), 0,5

µl SybrGreen (Biotrend Chemikalien GmbH, Köln, Deutschland), 4,5 µl nucleasefreiem Wasser (ProMega, Madison, Wisconsin, USA), jeweils 0,5 µl Primer vorwärts und rückwärts (25 nmol/ml, Primersequenzen siehe Tab. 2) für beide Transkriptionsrichtungen sowie 4 µl cDNA-Probe zusammen. In den Kontrollansätzen wurden statt der cDNA-Probe 4 µl nucleasefreies Wasser eingesetzt.

Tabelle 2: Verwendete Primer und resultierende Amplikonlängen.

Ziel-mRNA	Richtung	Nukleotidsequenz	Amplikonlänge [bp]
RNA-Polymerase 2	vorwärts rückwärts	5'-GTA CTG GGC ATT GAG GCT GT-3' 5'-TGT GCA GCT GCT TCC ATA AG-3'	233
GLUT 2	vorwärts rückwärts	5'-TGG GTT CCT TCC AGT TC G-3' 5'-AGG CTG GTG TCG TAT G-3'	186
Glucokinase	vorwärts rückwärts	5'-AAG CAC AAG AAA CTG CCC CTG G-3' 5'-TTG CCA CCA CAT CCA TCT CAA AG-3'	187
Tryptophanhydroxylase 1	vorwärts rückwärts	5'-AAA CTG GCA ACG TGC TAC TT -3' 5'-TTG GCA AAT TCT CTC ATC TTC T -3'	254
AANAT	vorwärts rückwärts	5'-GAA GGG AGA CAG CAG TTC-3' 5'-GTC CTG GTC TTG CCT TTG-3'	144
HIOMT	vorwärts rückwärts	5'-GCT GGT GAC TTC TTC CGT TC-3' 5'-TGC AGC ATC ATG TTG AGT GA-3'	218

Zu Beginn der *real-time* RT-PCR erfolgte die zweiminütige Denaturierung der Probe bei 95 °C. Jeder der 40 durchlaufenen Zyklen setzte sich aus vier Temperaturstufen zusammen: 94 °C, 64 °C und 72 °C für jeweils 30 s sowie abschließend 80 °C für 15 s. Durch Nutzung der Touchdown-Option wurde die niedrigste Temperaturstufe in den ersten sechs Zyklen von 64 °C auf 59 °C reduziert und für die restlichen Zyklen beibehalten. Nach Durchlaufen aller Zyklen erfolgten zwei Temperaturschritte bei 40 °C (für 2 min) und 50 °C (für 1 min). Die Schmelzkurve wurde bei einem Temperaturanstieg von 1 °C pro 5 s bis zu einer Maximaltemperatur von 99 °C aufgezeichnet. Nach Abkühlen der Proben wurden diese aus dem Thermocycler entnommen und bei 4 °C zwischengelagert. Zur Überprüfung der Amplikonlänge wurden 10 µl der Probe mit 5 µl *BlueJuice* (1,5 ml 0,25 mol/l EDTA, 2 ml Glycerin, 0,4 ml 0,5% Bromphenolblau) versetzt. 5 µl eines in DNA-Fragmente von 100 bp graduierten Längenstandards wurden mit 5 µl nucleasefreiem Wasser und 5 µl *BlueJuice* versetzt. Proben und Standard wurden auf ein 3%iges Argarosegel aufgetragen. Als Laufpuffer und Gelgrundlage diente TAE (pH = 8,0). Bei einer Spannung von 80 V und einer Stromstärke von 200 mA erfolgte die elektrophoretische Auftrennung der Proben. Nach Ethidiumbromidfärbung (0,0001%, 15 min) und Wässerung in Aqua dest (etwa 30 min)

erfolgte die fotografische Dokumentation nach UV-Fluoreszenzanregung. Die Auswertung der PCR-Ergebnisse erfolgte nach der 2dd-Methode [150] insofern die Effizienz der Reaktion [151] größer 1,9 war.

4.16 Grafische Darstellung der Ergebnisse und statistische Auswertung

Die angegebenen Werte zeigen jeweils den Mittelwert und den zugehörigen Standardmessfehler (*standard error of the mean* [SEM]). Die Berechnung dieser Werte und ihre grafische Darstellung erfolgten mit GraphPadPrism 4.00 für Windows XP (GraphPad Software, San Diego, USA). Zur Prüfung auf Signifikanz wurden, je nach zugrundeliegenden Daten und Fragestellungen, mit der selben Software der MANN-WHITNEY-WILCOXON-Test für unabhängige Stichproben oder eine zweifaktorielle Varianzanalyse (*two-way ANOVA*) mit anschließender Kontrasttestung mit BONFERRONI-Korrektur durchgeführt. Bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ wurden beobachtete Unterschiede als signifikant betrachtet. Signifikanzen mit $p < 0,05$ sind in den Grafiken mit *, solche mit $p < 0,01$ mit ** und solche mit $p < 0,001$ mit *** gekennzeichnet.

5 Ergebnisse

5.1 Allgemeine und zufällige Befunde

Die Vermehrung der GK-Ratten gestaltete sich zunächst schwierig. Im Vergleich zu den metabolisch gesunden Wistar-Ratten waren die Anzahl der Würfe je Zuchtpaar sowie die Wurfgrößen geringer und die perinatale Mortalität der Jungtiere größer. Die Tierhaltung erwies sich hingegen als unkompliziert. Im Vergleich zu metabolisch gesunden Wistar-Ratten waren die GK-Ratten weniger aktiv. In ihrem Verhalten schienen die Tiere aber nicht durch die abnorme Stoffwechsellage beeinträchtigt zu sein. Das Gewicht der GK-Ratten lag in jeder Altersgruppe signifikant unter dem der Kontrolltiere. Für beide Tierstämme wurde eine kontinuierliche und jeweils von Altersgruppe zu Altersgruppe signifikante Gewichtszunahme beobachtet (Tab. 3). Die Zunahme des Körpergewichts nach dem Alter von 24 Wochen fiel bei den GK-Ratten deutlich geringer aus. Grafisch sind diese Ergebnisse in Abb. 3 dargestellt.

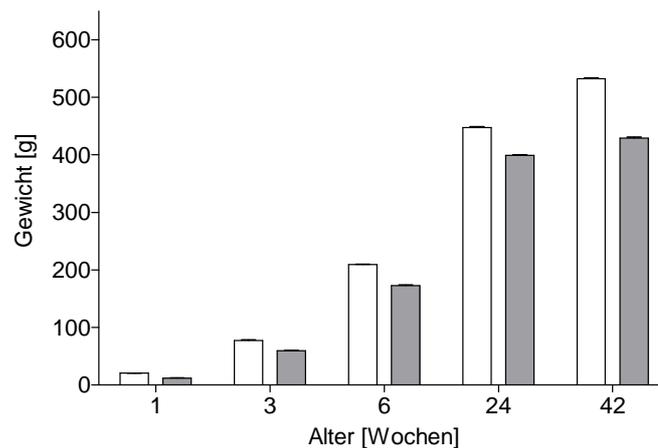


Abb. 3: Mittelwert \pm SEM des Körpergewichtes [g] von Wistar-Ratten (transparent) und GK-Ratten (grau) , n = 24.

Tabelle 3: Mittelwert \pm SEM des Körpergewichtes [g] von Wistar-Ratten und GK-Ratten, jeweils n = 24, p: Signifikanzniveau für Mann-Whitney-U-Test.

Alter [Wochen]	Wistar		GK		p
	M	SEM	M	SEM	
1	20,72	0,08	11,99	0,11	< 0,001
3	77,25	1,34	59,91	0,33	< 0,001
6	209,45	0,79	173,04	0,58	< 0,001
24	447,53	1,67	399,31	1,24	< 0,001
42	532,13	1,52	429,50	1,18	< 0,001

Bei mehreren GK-Altieren wurde eine Katarakt festgestellt (Abb. 4). Neoplasien wurden in keiner der Tiergruppen beobachtet. Auffällig waren bei den GK-Ratten 3 mikrosome Jungtiere. Ebenso zeigte sich bei einer GK-Ratte eine linksseitig polyzystische Niere. Die rechtsseitige Niere war makroskopisch intakt und das Tier insgesamt unbeeinträchtigt. Bei den adulten Wistar-Ratten fand sich in einem Falle eine bemerkenswerte Splenomegalie, die mit einem geringen Hämatokritwert einherging. Auch dieses Tier war äußerlich unauffällig. Proben diese Tiere gingen nicht in die Untersuchungen ein.



Abb. 4: Katarakt bei einer 100 Wochen alten männlichen GK-Ratte (Blutglukose 11,2 mmol/l, Gewicht 433 g).

5.2 Befunde im Blut und davon abgeleiteten Proben

5.2.1 Blutglukose

Mit Ausnahme der neonaten Tiere zeigten GK- gegenüber Wistar-Ratten in allen Altersgruppen eine signifikante Hyperglykämie. Bei neonaten Tieren waren die Mittelwerte nicht signifikant erhöht oder erniedrigt. Bis zum Alter von 6 Wochen vergrößerte sich der Unterschied. Beide Tierstämme zeigten einen signifikanten Abfall der Blutglukosekonzentration bei Tieren zwischen 6 und 24 Wochen ($p < 0,001$ bei Wistar- und $p < 0,05$ bei GK-Ratten). Bei Wistar-Ratten fand sich kein Unterschied der Blutglukosewerte zwischen 24 und 42 Wochen alten Tieren. Bei GK-Ratten zeigte sich hingegen ein signifikanter Anstieg der Blutglukosekonzentration ($9,26 \pm 0,641$ vs. $11,82 \pm 0,851$ mmol/l; $p < 0,05$). Diese Ergebnisse sind in Tab. 4 und Abb. 5 zusammengefasst.

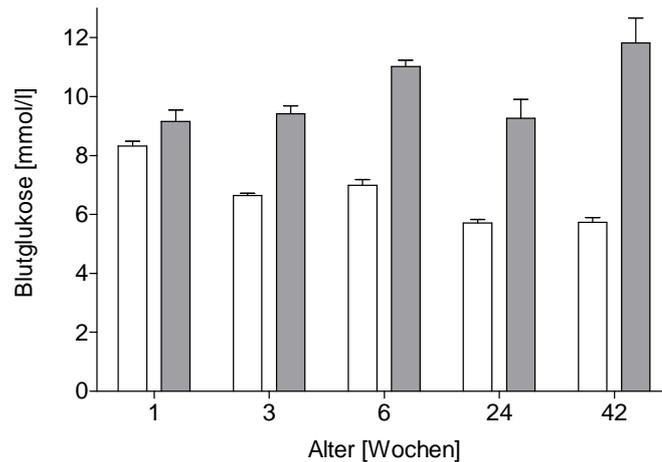


Abb. 5: Mittelwert \pm SEM der 12:00 h Blutglukosewerte [mmol/l] von Wistar-Ratten (transparent) und GK- Ratten (grau), jeweils n = 12.

Tabelle 4: Mittelwert \pm SEM der 12:00 h Blutglukosewerte [mmol/l] von Wistar- Ratten und GK-Ratten, jeweils n = 12, p: Signifikanzniveau für Mann-Whitney-U-Test.

Alter [Wochen]	Wistar		GK		p
	M	SEM	M	SEM	
1	8,32	0,19	9,16	0,39	n.s.
3	6,64	0,07	9,42	0,27	< 0,001
6	6,99	0,19	11,02	0,22	< 0,001
24	5,71	0,12	9,26	0,64	< 0,001
42	5,74	0,15	11,82	0,85	< 0,001

Bei 6 Wochen alten Tieren fanden sich in keinem der untersuchten Stämme signifikante tageszeitabhängige Veränderungen der Blutglukosekonzentration. Die ermittelten Werte lagen zwischen $6,64 \pm 0,22$ und $7,72 \pm 0,19$ mmol/l bei Wistar- bzw. $10,62 \pm 0,74$ und $11,40 \pm 0,41$ mmol/l bei GK-Ratten. Bei 42 Wochen alten GK-Ratten zeigte sich ein deutlicher Anstieg der Blutglukosekonzentrationen, der vor Beginn der Dunkelphase beginnt und sich in der ersten Hälfte der Dunkelphase fortsetzt. Die 42 Wochen alten Wistar-Ratten zeigten hingegen nur einen geringen Anstieg der Blutglukosekonzentrationen, ebenfalls in der ersten Hälfte der Dunkelphase. Die tageszeitlich abhängigen Unterschiede sind signifikant ($p < 0,01$ für GK- und für Wistar-Ratten). Grafisch sind die Tagesgänge in Abb. 6 zusammengefasst.

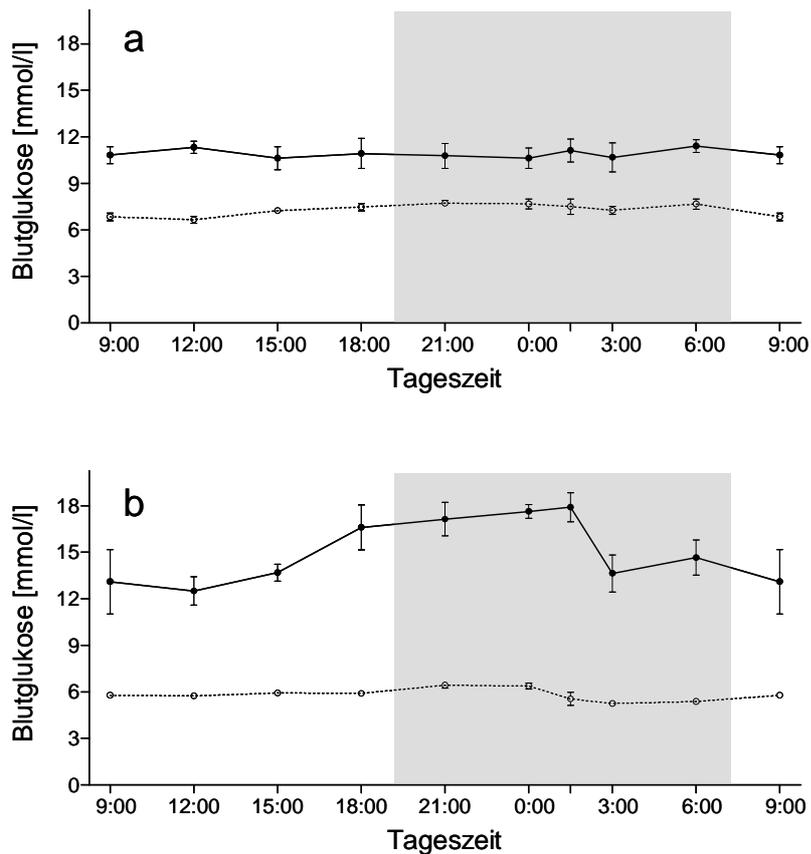


Abb. 6: Blutglukose-Tagesprofil von Wistar-Ratten (gebrochene Linie) und GK-Ratten (durchgezogene Linie) verschiedenen Alters, jeweils Mittelwert \pm SEM, $4 \leq n \leq 12$; 6a: 6 Wochen, 6b: 42 Wochen.

5.2.2 Insulin

Die jeweils mitte Hellzeit (12:00 h) ermittelten Plasmainsulinkonzentrationen (Tab. 5 und Abb. 7) zeigten – im Vergleich zu Wistar-Ratten – eine signifikante Hypoinsulinämie der neonaten GK-Ratten ($10,2 \pm 1,32$ vs. $16,5 \pm 1,65$ mIU/l; $p < 0,05$). Bei den 3 und 6 Wochen alten GK-Ratten ($8,5 \pm 0,7$ vs. $13,9 \pm 3,47$ mIU/l, bzw. $17,4 \pm 3,32$ vs. $24,5 \pm 3,97$ mIU/l) wurde keine Hypoinsulinämie festgestellt. Bei 24 Wochen alte GK-Ratten wurde hingegen eine signifikante und sehr ausgeprägte Hyperinsulinämie ($34,1 \pm 5,81$ vs. $6,9 \pm 1,1$ mIU/l; $p < 0,001$) registriert. Bei den 42 Wochen alten Tieren war der Unterschied geringer ausgeprägt ($18,4 \pm 2,61$ vs. $8 \pm 1,12$ mIU/l; $p < 0,01$).

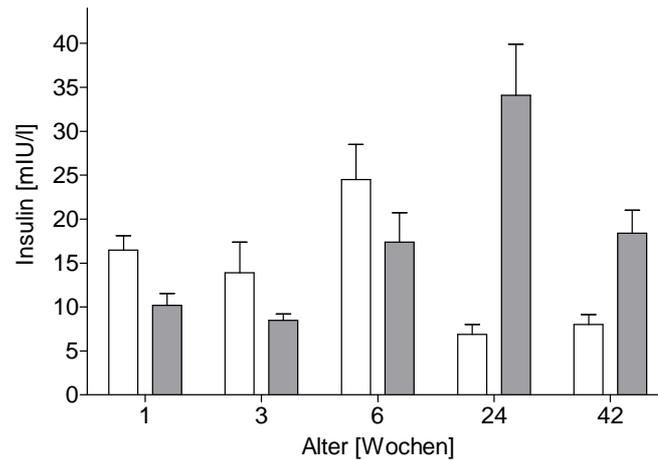


Abb. 7: Mittelwert \pm SEM der 12:00 h Plasmainsulinwerte [mIU/l] von Wistar-Ratten (transparent) und GK-Ratten (grau), jeweils $n = 12$.

Tabelle 5: Mittelwert \pm SEM der 12:00 h Plasmainsulinwerte [mIU/l] von Wistar-Ratten und GK-Ratten, jeweils $n = 12$, p: Signifikanzniveau für Mann-Whitney-U-Test.

Alter [Wochen]	Wistar		GK		p
	M	SEM	M	SEM	
1	16,5	1,65	10,2	1,32	< 0,05
3	13,9	3,47	8,5	0,7	n.s.
6	24,5	3,97	17,4	3,32	n.s.
24	6,9	1,1	34,1	5,81	< 0,001
42	8	1,12	18,4	2,61	< 0,01

Im Tagesgang fanden sich bei den 6 Wochen alten GK-Ratten Plasmainsulinkonzentrationen, die denen der Wistar-Ratten entsprechen oder nicht signifikant erniedrigt sind. Während der Dunkelphase unterschieden sich die Insulinwerte der einzelnen GK-Ratten erheblich. Im Vergleich zu entsprechenden Wistar-Ratten waren sie in der Regel deutlich, aber nicht signifikant, erhöht. Bei 42 Wochen alten GK-Ratten fanden sich nahezu im gesamten Tagesgang zum Teil signifikante Hyperinsulinämie. Bei Wistar-Ratten stiegen die Plasmainsulinkonzentrationen während der ersten Hälfte der Dunkelphase an und waren höher als bei GK-Ratten. Diese erreichten, wie auch in der Gruppe der 6 Wochen alten Tiere, die höchsten Werte gegen Ende der Dunkelphase. Die Ergebnisse sind in Abb. 7 und Abb. 8 zusammenfassend grafisch dargestellt.

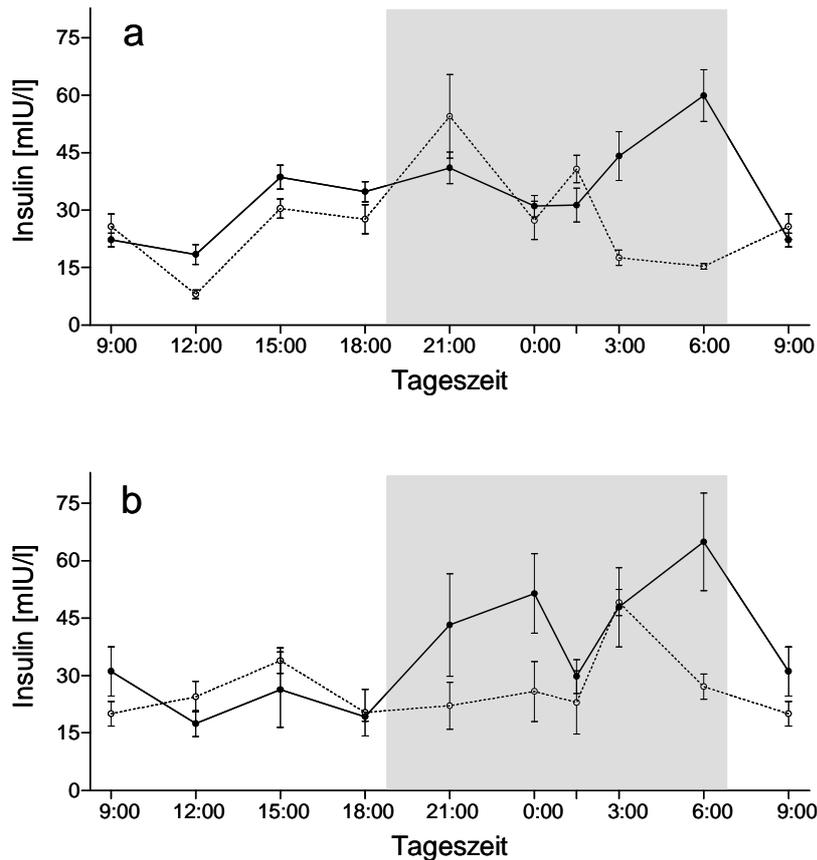


Abb. 8: Plasmapinsulin-Tagesprofil von Wistar-Ratten (gebrochene Linie) und GK-Ratten (durchgezogene Linie) verschiedenen Alters, jeweils Mittelwert \pm SEM, $4 \leq n \leq 12$; 8a: 6 Wochen, 8b: 42 Wochen.

5.3 Befunde zur pankreatischen β -Zelle und ihrem Glukosesensorkomplex

5.3.1 Allgemeine Befunde zur Morphologie der LANGERHANS'schen Inseln

Die LANGERHANS'schen Inseln der Wistar-Ratten stellten sich in allen Altersgruppen rund bis längsoval dar. Bei beiden Rattenstämmen fand sich eine deutliche Zunahme des endokrinen Gewebes zwischen den 3 und 6 Wochen alten Tieren. In den beiden jüngsten Altersgruppen waren die Inseln auch hier in der Regel längsoval. Sie schienen aber kleiner als die von Wistar-Ratten zu sein. Dieser Befund wurde im Rahmen von Inselseparationen bestätigt. Bei den 24 Wochen alten GK-Ratten fanden sich dagegen heterogene Inseln, die entweder sehr groß und von unregelmäßiger Gestalt waren oder sich als kleine Gruppen Insulin-positiv markierten Gewebes ohne typische Inselstruktur darstellten. In der Gruppe der 42 Wochen alten GK-Ratten waren die selten zu findenden großen Gruppen Insulin-positiv markierter Zellen von Bindegewebssträngen durchzogen. Es fanden sich keine regulären Inseln, wohl aber zahlreiche kleine Insulin-positiv markierte Zellgruppen.

5.3.2 Glukosetransporter 2-mRNA

Die GLUT 2-mRNA Expression war in den Pankreata 3- und 42-Wochen alter GK-Ratten signifikant niedriger als in denen von Wistar-Ratten ($p < 0,01$ bzw. $p < 0,05$). Beim Vergleich 6-Wochen alter Tiere zeigte sich kein Unterschied. Der Unterschied beim Vergleich 24 Wochen alter Ratten war nicht signifikant (Abb. 9). Deutliche tageszeitabhängige Veränderungen der Expressionshöhe wurden sowohl bei 6-Wochen alten Wistar- als auch GK-Ratten gefunden (Abb. 10). Die höchsten Gehalte an GLUT 2-mRNA zeigten sich bei GK-Ratten während der ersten Hälfte der Dunkelphase. Bei Wistar-Ratten fand sich das Maximum an pankreatischer GLUT 2-mRNA zum Ende der Dunkelphase. Die Amplitude der GLUT 2-mRNA Expression betrug etwa das Vierfache des Minimums von Wistar-Ratten. Bei GK-Ratten war sie etwas geringer. Im Tagesverlauf zeigten sich in den Pankreata von GK-Ratten gering reduzierte Gehalte an GLUT 2-mRNA.

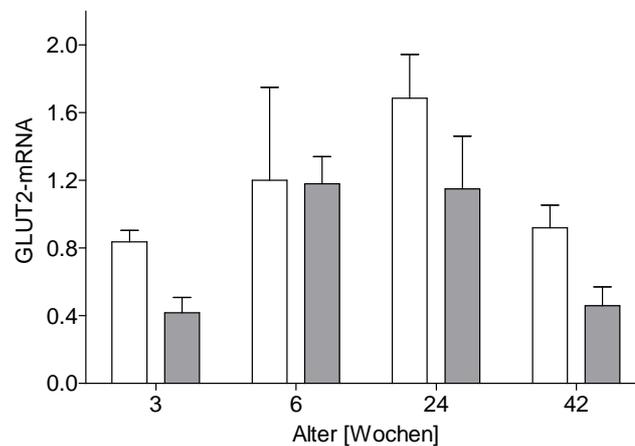


Abb. 9: Mittelwert \pm SEM der GLUT 2-mRNA (12:00 h, relativ zu RP 2-mRNA) von Wistar-Ratten (transparent) und GK-Ratten (grau), jeweils $n = 4$.

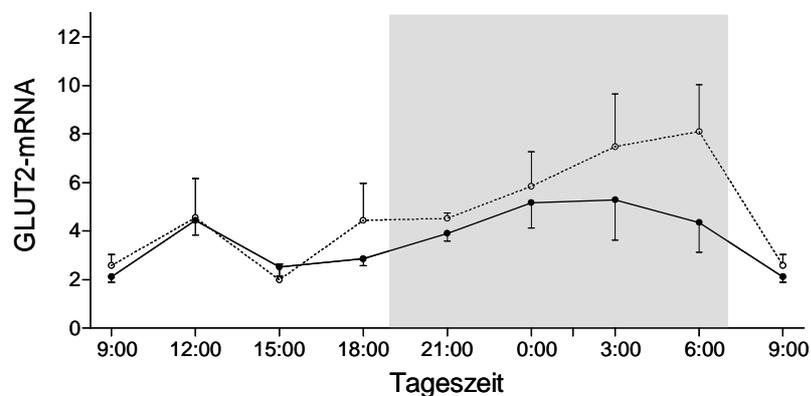


Abb. 10: Tagesgang der GLUT 2-mRNA Expression (relativ zu RP 2-mRNA) in Pankreata 6 Wochen alter Wistar-Ratten (gebrochene Linie) und GK-Ratten (durchgezogene Linie), jeweils Mittelwert \pm SEM; $n = 4$.

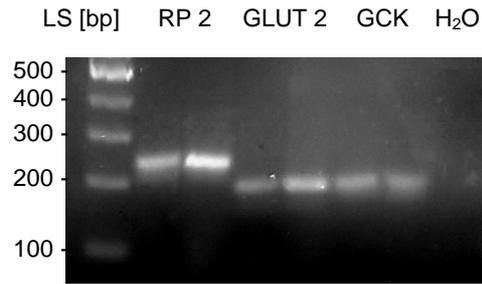


Abb. 11: cDNA-Gel der PCR-Produkte für RNA-Polymerase 2 (233 bp), GLUT 2 (186 bp) und Glucokinase (187 bp) aus Pankreata von Wistar- (jeweils links) und GK-Ratten (jeweils rechts) sowie H₂O-Negativkontrolle.

5.3.3 Glucokinase-mRNA

Es zeigten sich erniedrigte Glucokinase-mRNA-Werte in den Pankreata von GK-Ratten. Signifikante Unterschiede wurden bei 3- und 24-Wochen alten Tieren gefunden ($p < 0,05$ bzw. $p < 0,01$). In der Gruppe der 6-Wochen alten Tiere war der Unterschied nicht signifikant. Weder bei GK- noch Wistar-Ratten zeigten sich deutliche altersabhängige Veränderungen. Der Gehalt an Glucokinase-mRNA war bei den 24- und 42-Wochen alten GK-Ratten niedriger als bei den jüngeren Tieren. Der Unterschied zu Wistar-Ratten war in der Gruppe der 24 Wochen alten Tiere maximal (zusammengefasst in Abb. 12). Auch der Gehalt an Glucokinase-mRNA zeigte eine klare tageszeitliche Abhängigkeit (Abb. 13), sowohl in den Pankreata 6-Wochen alter Wistar- als auch GK-Ratten. Die höchsten Werte wurden während der zweiten Hälfte der Hellphase gefunden, die niedrigsten während der Dunkelphase. Zu allen Zeitpunkten war der Gehalt an Glucokinase-mRNA in den Pankreata der GK-Ratten höher. Die Amplitude der Expressionshöhe war größer als jene von GLUT 2-mRNA und in den Pankreata von GK-Ratten höher als bei denen von Wistar-Ratten.

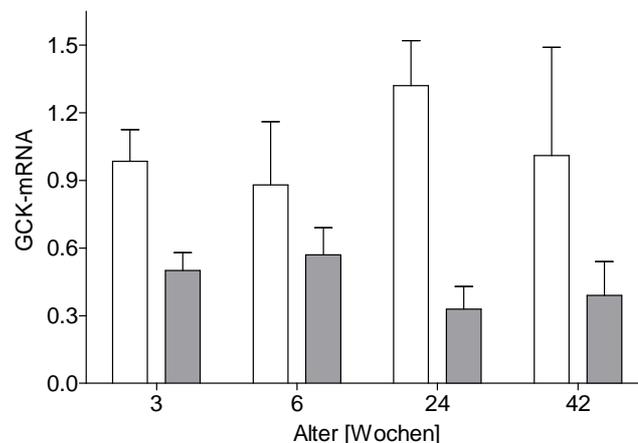


Abb. 12: Mittelwert \pm SEM der Glucokinase-mRNA (12:00 h, relativ zu RP 2-mRNA) von Wistar-Ratten (transparent) und GK-Ratten (grau), jeweils $n = 4$.

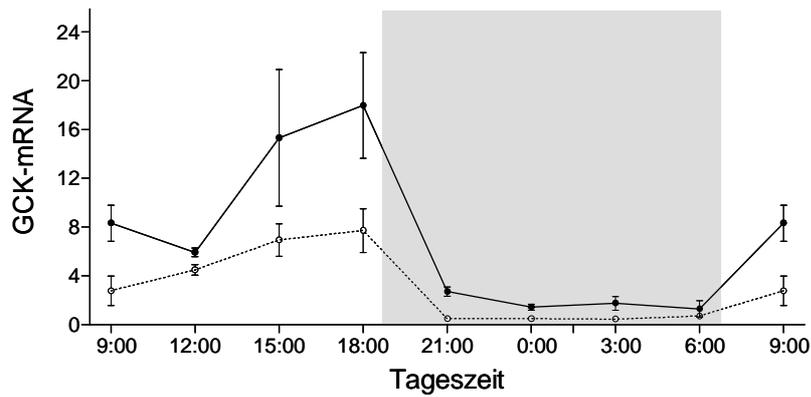


Abb. 13: Tagesgang der Glucokinase-mRNA Expression (relativ zu RP 2-mRNA) in Pankreata 6 Wochen alter Wistar-Ratten (gebrochene Linie) und GK-Ratten (durchgezogene Linie), jeweils Mittelwert \pm SEM; n = 4.

5.3.4 Insulin-Immunhistochemie

Die Insulin-Markierungen (Abb. 14) zeigten in allen Altersgruppen bei GK-Ratten eine geringere Intensität als bei Wistar-Ratten. Positiv markierte Zellen fanden sich bei den 3 Wochen alten Tieren beider Stämme im Zentrum der LANGERHANS'schen Inseln. Die Markierung war bei beiden Tierstämmen beim Vergleich der Einzelzellen homogen. Die zytoplasmatische Markierung zeigte ein feingranuläres Muster. Bei den 6 Wochen alten Tieren wurden gleiche Befunde erhoben. Die 24 Wochen alten GK-Ratten zeigten eine deutliche Aufhebung der intra-insulären Homogenität, einhergehend mit weniger geschlossenen positiv markierten Zellverbänden. Einzelne Zellen erschienen in gleicher Intensität wie bei den Wistar-Ratten. In der Gruppe der ältesten Tiere zeigte sich ein deutlicher Verlust Insulin-positiver Zellen bei den GK-Ratten. Die Markierung war überwiegend schwach ausgeprägt, dennoch war bei einzelnen Zellen die Intensität gleich derer von Wistar-Ratten. Das feingranuläre Verteilungsmuster blieb durch alle Altersgruppen erhalten. In den teilweise sehr intensiv markierten Zellen gelang allerdings keine sichere Abgrenzung.

5.3.5 Glukosetransporter 2-Immunhistochemie

Die fluoreszenz- und konfokalmikroskopischen Aufnahmen (Abb. 15) zeigten in der Gruppe der 3 Wochen alten Tiere eine intensivere Markierung bei den GK-Ratten. Der Besatz der Zellmembranen mit GLUT 2 war jedoch bei Wistar- und GK-Ratten inhomogen und unvollständig. Eine anteilig zytoplasmatische Markierung war bei beiden Tierstämmen festzustellen. Bei den 6 Wochen alten Wistar-Ratten fand sich eine intensive und distinkte Markierung des ausschließlich membrangebundenen Rezeptors. Es zeigte sich ein wabenähnliches Muster, das die Abgrenzung von Einzelzellen ermöglichte. Bei den GK-Ratten dieser Altersgruppe bestand eine sehr deutliche zytoplasmatische Markierung. Es fanden sich nur einzelne β -Zellen mit ausgeprägt membranständiger Markierung. Insbesondere bei den 24 Wochen alten Wistar-Ratten ließ sich eine deutliche Zunahme der Signalintensität

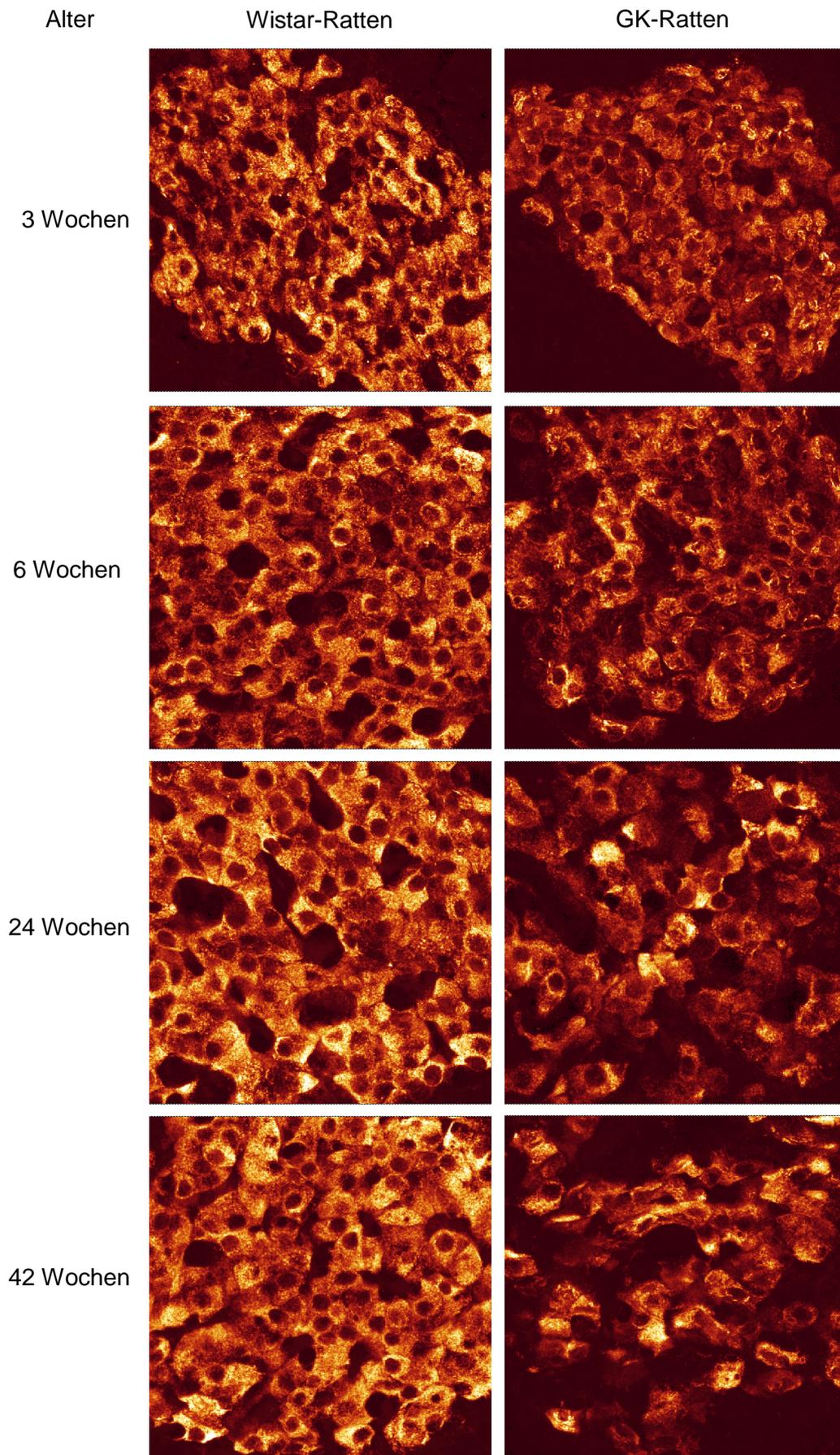


Abb. 13: Konfokalmikroskopische-Aufnahmen Insulin markierter Zellen in LANGERHANS'schen Inseln von Wistar- und GK-Ratten in verschiedenen Altersgruppen. Die Bilder entsprechen jeweils 100×100 µm.

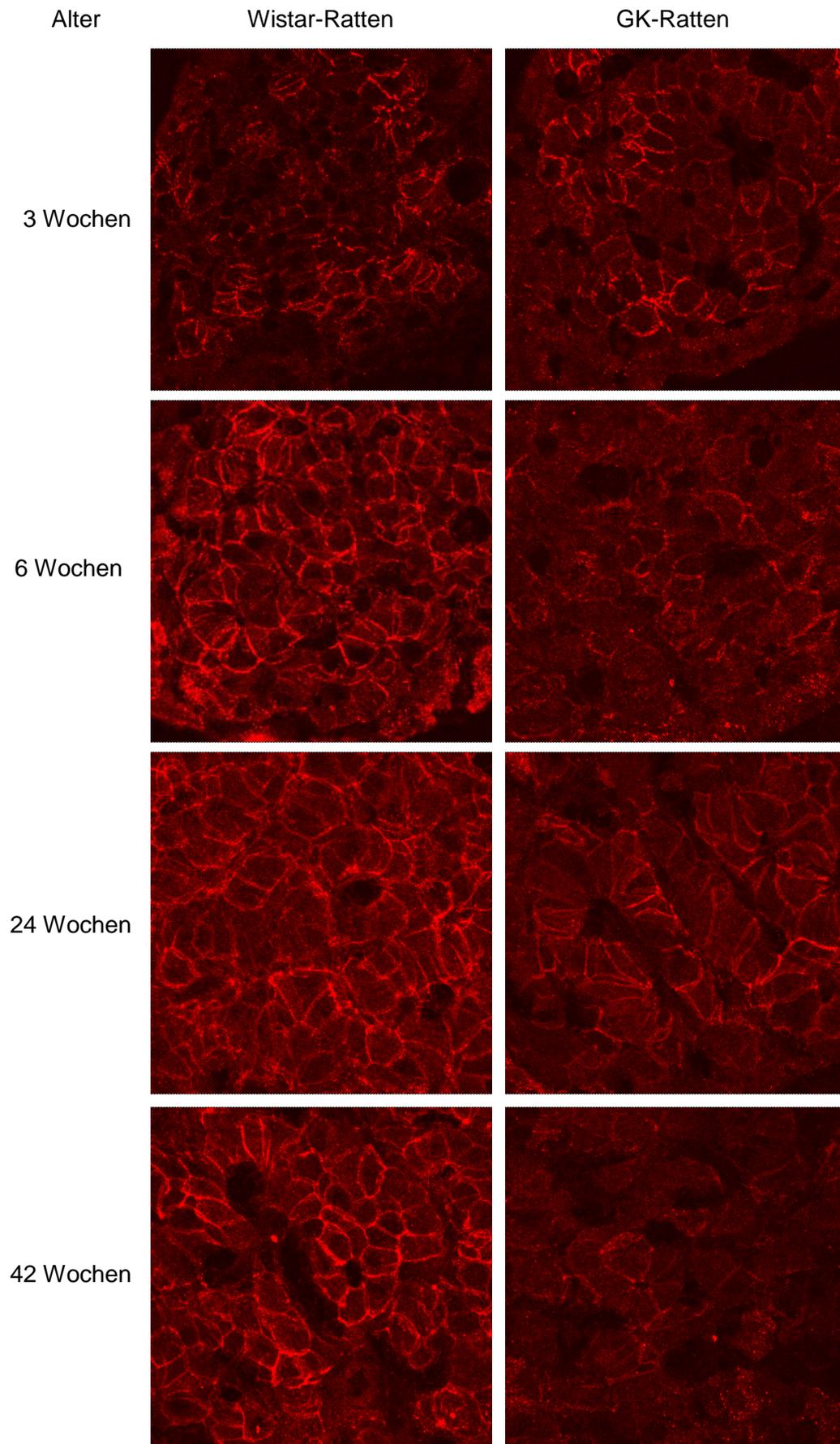


Abb. 14: Konfokalmikroskopische-Aufnahmen GLUT 2 markierter Zellen in LANGERHANS'schen Inseln von Wistar- und GK-Ratten in verschiedenen Altersgruppen. Die Bilder entsprechen jeweils 100×100 µm.

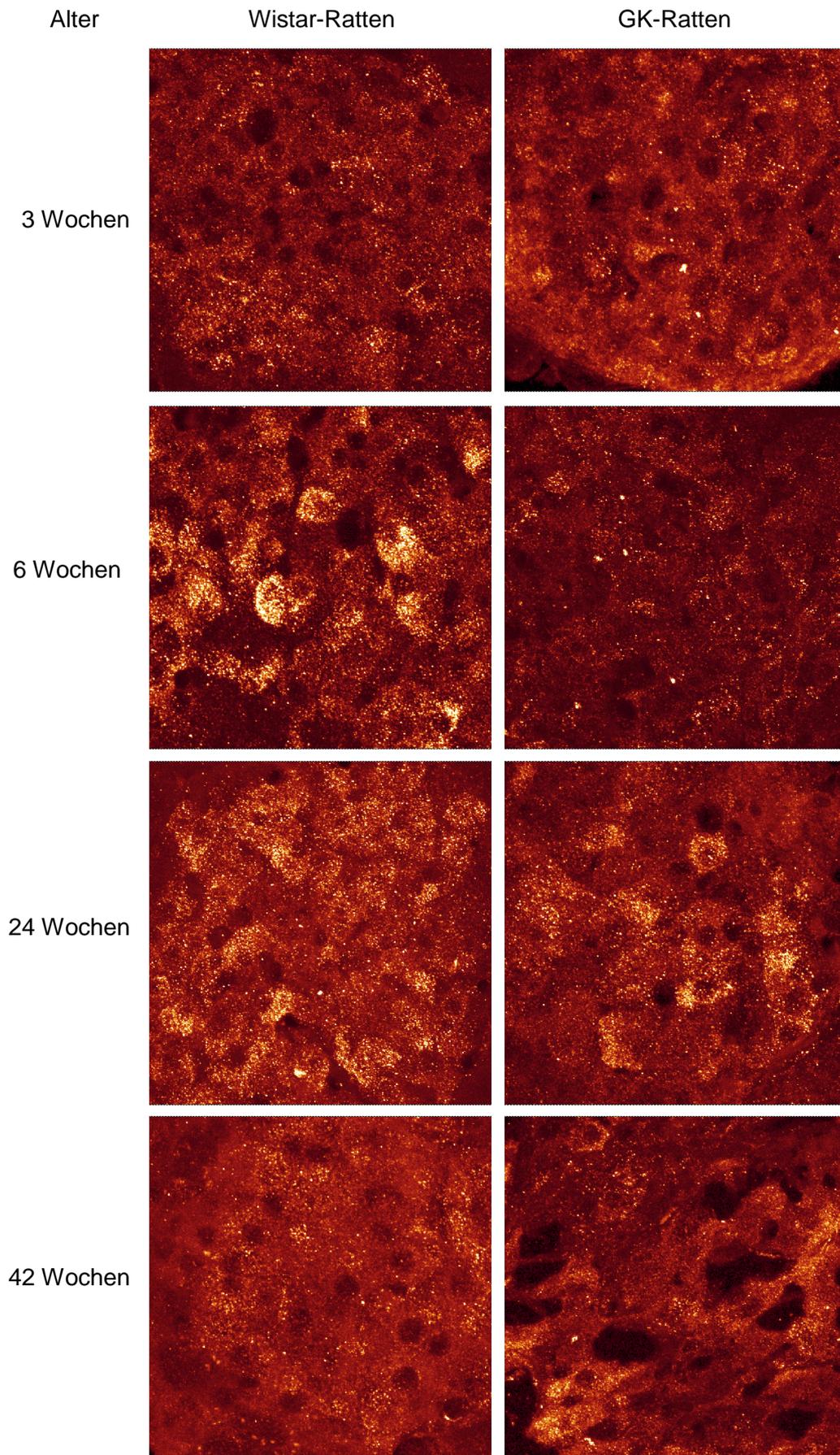


Abb. 15: Konfokalmikroskopische-Aufnahmen Glucokinase markierter Zellen in LANGERHANS'schen Inseln von Wistar- und GK-Ratten in verschiedenen Altersgruppen. Die Bilder entsprechen jeweils 100×100 µm.

beobachten. Wie in der vorherigen Altersgruppe war der GLUT 2 auch hier klar zellmembranständig lokalisiert. Die GK-Ratten zeigten eine stark verminderte Signalintensität. Die Membranständigkeit war – bei zytoplasmatischer Akkumulation von GLUT 2 – zum Teil aufgelöst. In der Gruppe der 42 Wochen alten Ratten zeigte sich eine Abnahme der Intensität verbunden mit angedeutetem Verlust der Membranständigkeit des GLUT 2 bei Wistar-Ratten. Es wurde ein brillenähnliches Muster mit diskreter zytoplasmatischer Markierung sichtbar. Bei den GK-Ratten war die Membranständigkeit nahezu aufgehoben.

5.3.6 Glucokinase-Immunhistochemie

In der Gruppe der 3 Wochen alten Tiere zeigte sich bei GK-Ratten eine geringere intensive Markierung der pankreatischen β -Zellen. Die anteilig nukleäre Markierung war bei GK- und Wistar-Ratten – jeweils bezogen auf die Gesamtmarkierung – ähnlich. Bei den 6 Wochen alten GK-Ratten zeigte sich wiederum eine vergleichsweise schwache Markierung. Im Vergleich zu den Wistar-Ratten war die deutlich häufigere Lokalisation in den Zellkernen der β -Zellen auffällig. Die in dieser Altersgruppe erhobenen Befunde wurden in den Gruppen der 24 und 42 Wochen alten Tiere bestätigt. Es zeigte sich hierbei eine weitere Abnahme der Signalintensität bei den GK-Ratten. Die Ergebnisse sind in Abb. 15 zusammengefasst.

5.3.7 Ergebnisse der Perifusionsversuche

Die mit LANGERHANS'schen Inseln neonater Tiere durchgeführten Perifusionsuntersuchungen zeigten unter 45-minütiger Glukosestimulation (15 mmol/l) bei GK-Ratten nur eine geringe erste Phase der Insulinsekretion. Die zweite Phase stellte sich nicht wie bei den Wistar-Ratten ansteigend, sondern auf dem Niveau der abgeklungenen ersten Phase verweilend dar. Das Muster der Arginin-stimulierten Insulinsekretion (45 min, 15 mmol/l) war in beiden Tiergruppen sehr ähnlich. Die etwa achtminütige Initialsekretion war bei Wistar-Ratten etwa 1,5fach, bei GK-Ratten hingegen etwa 3fach stärker als unter Glukosestimulation. Ihr folgte eine stabile Sekretion für die restliche Stimulationsdauer, die - verglichen mit der jeweiligen Initialsekretion - bei Wistar-Ratten ein höheres Niveau aufwies. Die nach dreiminütiger KCl-, Glukose- und Arginin-Stimulationen (jeweils 25 mmol/l) ermittelte Insulinsekretion war in Ausmaß und Relation den Initialantworten der 45-minütigen Stimulationen vergleichbar. Forskolin führte (3 min, Reihenfolge der Konzentrationen 1, 5 und 3 μ mol/l) zu einer deutlichen Steigerung der Insulinsekretion bei beiden Tiergruppen. Diese fiel nach Stimulation mit 1 μ mol/l nur wenig geringer aus als nach 5 μ mol/l. Die nach 3 μ mol/l Forskolin ermittelte Antwort war hingegen deutlich geringer. Auffällig war die bei LANGERHANS'schen Inseln von GK-Ratten im Vergleich zur KCl-, Arginin- und Glukose-

stimulation deutlich größere Forskolin-induzierte Steigerung der Insulinsekretion (Tab. 6 und Abb. 16b). Diese Ergebnisse wurden auch unter den Bedingungen von Batchkulturen (Ergebnisse nicht gezeigt) erhalten. Die nach Zelllyse gemessene Insulinfreisetzung war – bei jeweils etwa 250 berücksichtigten Inseln – von GK-Ratten 15715 nmol, bei Wistar-Ratten 60149 nmol.

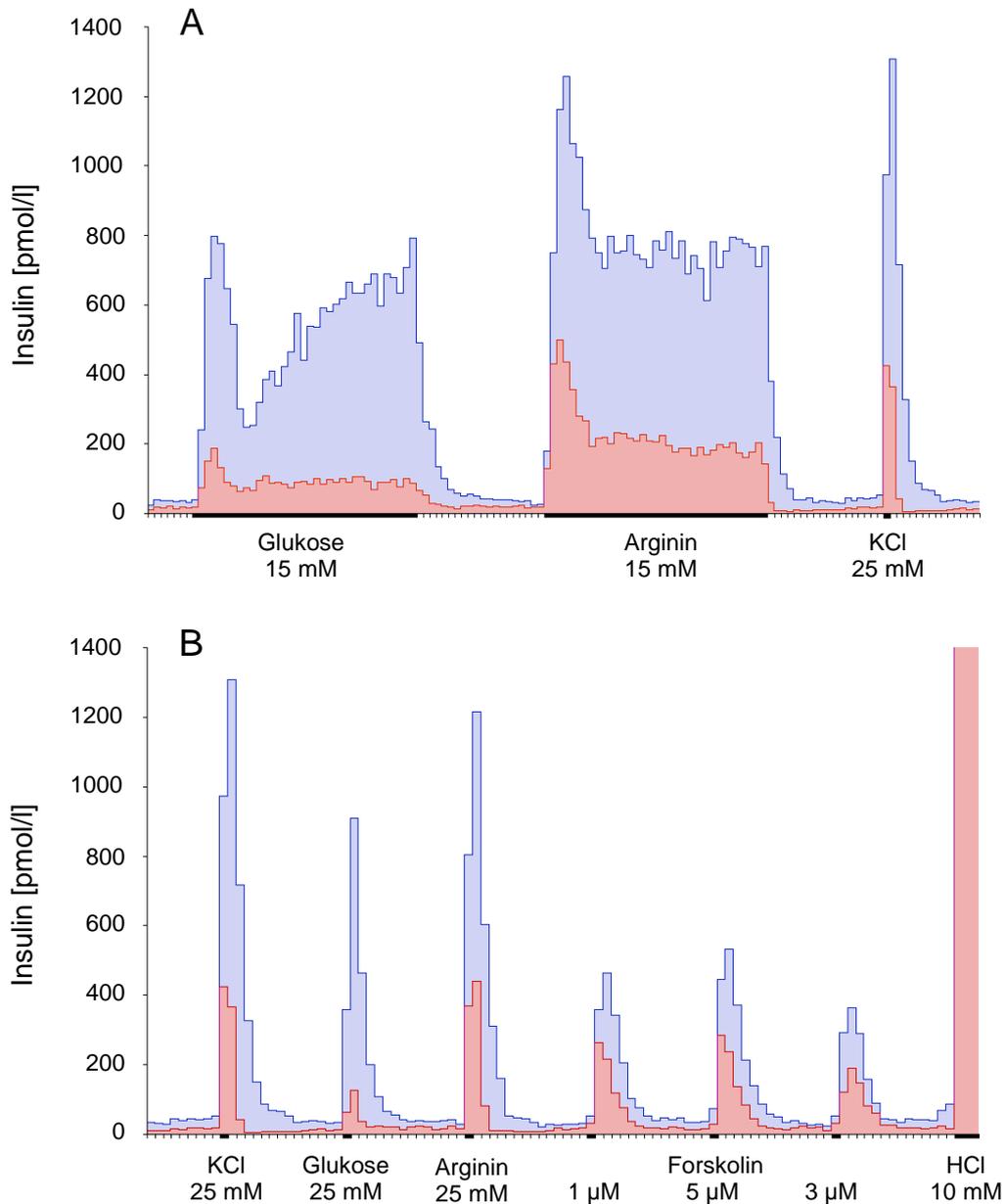


Abb. 16: Grafische Zusammenfassung der Insulinantworten auf Glukose- und Arginin-Langzeitstimulation (A) und Kurzzeitstimulation (B) aus LANGERHANS'schen Inseln von GK- (rosè) und Wistar-Ratten (blau).

Tabelle 6: Zusammenfassung der absoluten und relativen (bezogen auf dreiminütige 25mmol/l KCl-Stimulation) Intensitäten von Insulinantworten aus LANGERHANS'schen-Inseln von GK- und Wistar-Ratten.

Stimulation	Insulin GK-Ratten [%]	Insulin Wistar-Ratten [%]
15mM Glukose – erste Phase	85,2	119,9
15mM Glukose – zweite Phase	270,1	441,4
15mM Glukose – total	355,3	561,3
15mM Arginin – erste Phase	317,3	249
15mM Arginin – zweite Phase	630,4	559,7
15mM Arginin – total	947,3	808,7
25mM KCl	100	100
25mM Glukose	23,2	55,7
25mM Arginin	107,2	88,1
1µM Forskolin	83,1	38,4
5µM Forskolin	94,1	47,3
3µM Forskolin	72,1	29,7
10mM HCl	6630,8	6162,8

5.4 Plasmamelatonin und Befunde zur pinealen Melatoninsynthese

5.4.1 Plasmamelatonin

Die Melatoninplasmakonzentration der 6 Wochen alten Tiere zeigte hauptsächlich erniedrigte Werte bei den GK-Ratten. An den Zeitpunkten 06:00 und 09:00 Uhr glichen sich die Werte. Auffällig war ein vorzeitiger Anstieg der Melatoninplasmakonzentration bei GK-Ratten, der sich in einem signifikant ($p < 0,05$) höherem 21:00 Uhr Wert widerspiegelte. Die Maximalwerte traten in dieser Altersgruppe um 1:30 Uhr auf und betragen $900,8 \pm 233,4$ bei Wistar- bzw. $558,8 \pm 122,7$ pmol/l bei GK-Ratten. Bezogen auf den gesamten Tagesgang war die Erniedrigung der Melatoninplasmakonzentration bei GK-Ratten signifikant ($p < 0,05$). Die 42 Wochen alten GK-Ratten zeigten über den gesamten Tag niedrigere Werte als altersgleiche Wistar-Ratten. Zum 9:00 Uhr Zeitpunkt glichen sich die Werte nahezu an. Die maximalen Melatoninplasmakonzentrationen wurden bei beiden Tierstämmen in dieser Altersgruppe um 3:00 Uhr ermittelt. Sie betragen $361,8 \pm 9,5$ bei Wistar- bzw. $154,7 \pm 36,1$ pmol/l bei GK-Ratten. Bezogen auf den gesamten Tagesgang war die Erniedrigung der Melatoninplasmakonzentrationen bei GK-Ratten mit $p < 0,001$ signifikant. Die aus jeweils 4 Tieren pro Messpunkt ermittelten Ergebnisse sind in Abb. 17 grafisch dargestellt.

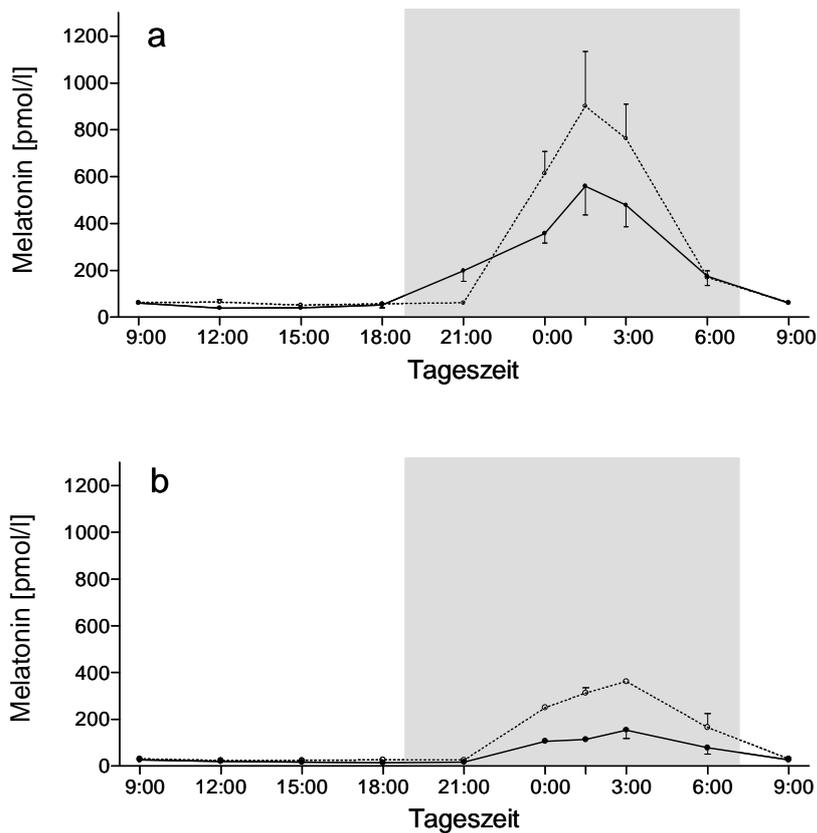


Abb. 17: Tagesgang der Melatoninplasmakonzentrationen von Wistar-Ratten (gebrochene Linie) und GK- Ratten (durchgezogene Linie), jeweils Mittelwert \pm SEM, n = 4; 17a: 6 Wochen, 17b: 42 Wochen.

5.4.2 Allgemeine Befunde zu den Pinealorganen

Tabelle 7: Mittelwert \pm SEM der Pinealgewichte, des pinealen Protein- und RNA-Gehaltes (jeweils n = 20) bei GK- und Wistar-Ratten unterschiedlichen Alters. p: Signifikanzniveau für Mann-Whitney-U-Test.

Alter [Wochen]	Pinealgewicht [mg]			Pineales Protein [μ g]			Pinealer RNA-Gehalt [μ g]		
	Wistar	p	GK	Wistar	p	GK	Wistar	p	GK
6-8	1,44 \pm 0,08	n.s.	1,45 \pm 0,10	57,1 \pm 3,6	< 0,05	45,4 \pm 3,0	32,7 \pm 0,9	n.s.	33,3 \pm 1,4
p	< 0,05		n.s.	< 0,001		< 0,05	n.s.		n.s.
42-50	1,76 \pm 0,07	< 0,001	1,24 \pm 0,1	82,4 \pm 3,5	< 0,001	30,5 \pm 3,4	27,7 \pm 0,8	n.s.	29,2 \pm 0,4

Die Gewichte und der Gesamt-RNA-Gehalt der Epiphysen (Tab. 7) zeigte in der Gruppe der sechs Wochen alten Tiere keine signifikanten Unterschiede. Bei den 42 Wochen alten Wistar-Ratten hingegen trat eine Zunahme des Epiphysengewichtes, bei den GK-Ratten keine signifikante Veränderung ein. Die Pinealorgane von GK-Ratten wiesen einen geringeren Proteingehalt als die Pinealorgane von Wistar-Ratten auf. Altersabhängig zeigt sich bei Wistar-Ratten eine Zunahme, bei GK-Ratten eine Abnahme des pinealen Protein-

gehalten. Der Gesamt-RNA-Gehalt ist bei Epiphysen 42 Wochen alter Tiere beider Stämme nicht signifikant verschieden, jedoch gegenüber den 6 Wochen alten Tieren vermindert.

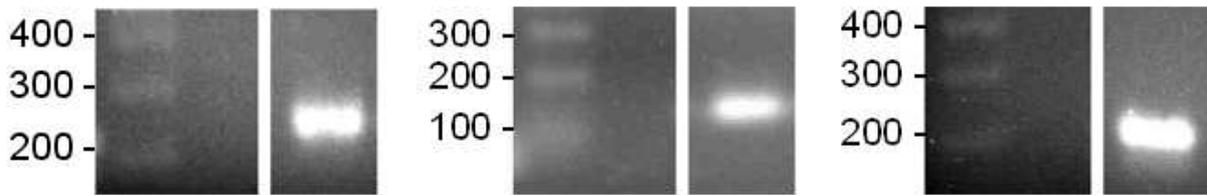


Abb. 18: cDNA-Gel der PCR-Produkte von Tryptophanhydroxylase (254 bp), Arylalkylamin-N-acetyltransferase (144 bp) und Hydroxyindol-O-methyltransferase (218 bp). (Längenstandard, Reaktionsprodukte von Proben einer 6 Wochen alten Wistar-Ratte, H₂O-Kontrolle).

5.4.3 Tryptophanhydroxylase-mRNA

Die *real-time* RT-PCR-Untersuchungen wiesen eine tendenzielle Verminderung der Tryptophanhydroxylase-mRNA während der Dunkelperiode auf. Bei den 6 Wochen alten Tieren traten keine Unterschiede zwischen GK- und Wistar-Ratten auf. Bei 42-Wochen alten GK-Ratten zeigte sich im Vergleich zu den 6-Wochen alten Tieren und im Vergleich zu altersgleichen Wistar-Ratten eine erhöhte pineale Tryptophanhydroxylase-mRNA-Expression.

5.4.4 Arylalkylamin-N-acetyltransferase-mRNA

Die Expression der AANAT-mRNA in Pinealorganen wurde im Tagesverlauf erfasst. Bei den 6 Wochen alten Tieren fand sich bei GK-Ratten ein früherer Anstieg der Expression als bei Wistar-Ratten. Die Expressionshöhe unterschied sich aber in dieser Altersgruppe im Tagesverlauf nicht signifikant. Wie auch bei den Gruppen der 42 Wochen alten Tiere war der Rhythmus der Expression nicht gestört. Die höchsten Gehalte an mRNA fanden sich etwa um 1:30 Uhr. In Pinealorganen 42 Wochen alter GK-Ratten war die AANAT-Expression im Vergleich zu altersgleichen metabolisch gesunden Wistar-Ratten deutlich erniedrigt. Die Amplitude der pinealen AANAT-mRNA-Expression (bezogen jeweils auf den Zeitraum zwischen von 12:00 bis 18:00 Uhr) war etwa 140 bei 6 Wochen alten Wistar-Ratten und 115 bei 6 Wochen alten GK-Ratten. Die Epiphysen von 42 Wochen alten Tieren zeigten - für beide Tierstämme gleich - eine Amplitude von 62.

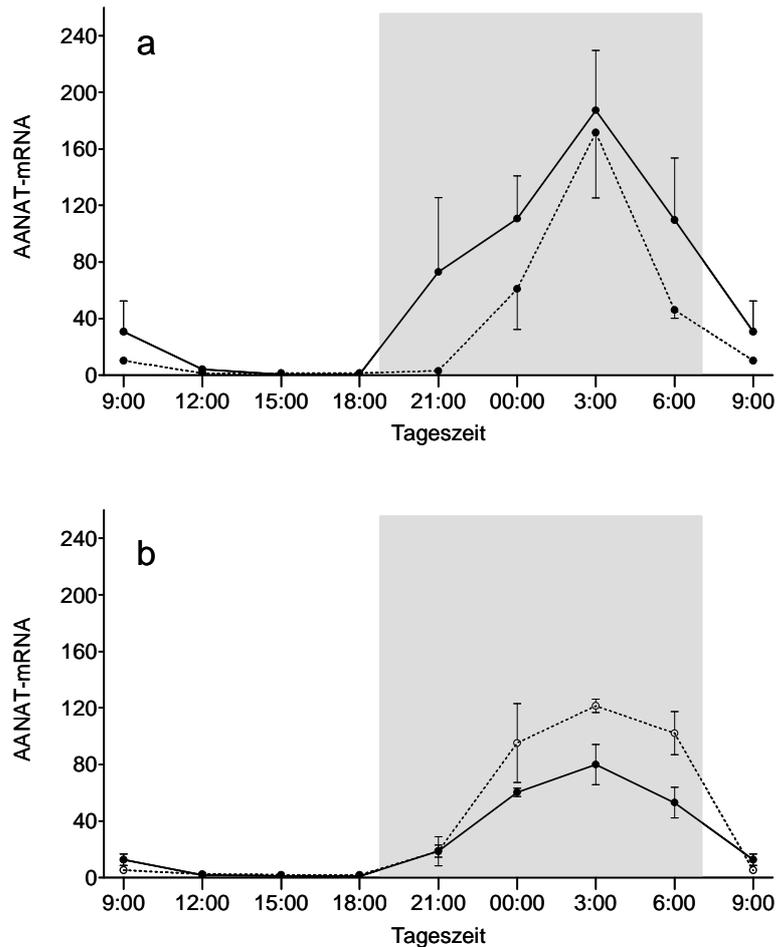


Abb. 19: Tagesgang der AANAT-mRNA-Expression (relativ zu RP 2-mRNA) der Pineale von Wistar-Ratten (gebrochene Linie) und GK-Ratten (durchgezogene Linie), jeweils Mittelwert \pm SEM, n = 4; 19a: 6 Wochen, 19b: 42 Wochen).

5.4.4 Hydroxyindol-O-methyltransferase-mRNA

Der Vergleich der Hydroxyindol-O-methyltransferase(HIOMT)-mRNA-Expression bei 6 Wochen alten diabetischen GK- und metabolisch gesunden Wistar-Ratten fanden sich keine wesentlichen Unterschiede zwischen den Tierstämmen (Abb. 20a). Im Tagesgang der HIOMT-mRNA-Expression zeigte sich eine vermehrte Expression zu Beginn und insbesondere zur Mitte der Dunkelphase. Die Amplitude der HIOMT-mRNA-Expression wies im Tagesgang bei 6 Wochen alten Ratten geringe Werte auf. Bei den 42 Wochen alten GK-Ratten zeigten sich ähnliche Verhältnisse. Bei Epiphysen 42 Wochen alter GK-Ratten war die HIOMT-mRNA-Expression im Vergleich zu Wistar-Ratten während der Dunkelphase erhöht. Die Epiphysen 42 Wochen alter Wistar-Ratten wiesen keine tageszeitabhängigen Veränderungen der HIOMT-mRNA-Expression auf (Abb. 20b). Weitere alternsabhängige Unterschiede der HIOMT-mRNA-Expression wurden nicht erfasst.

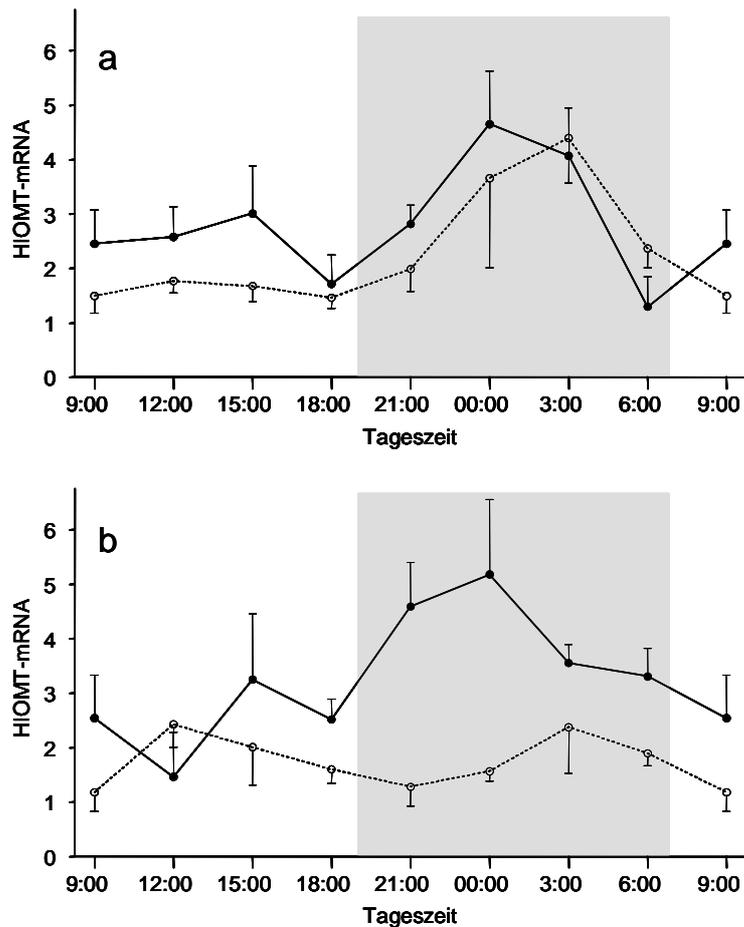


Abb. 20: Tagesgang der HIOMT-mRNA-Expression (relativ zu RP 2-mRNA) in Pinealen von Wistar-Ratten (gebrochene Linie) und GK-Ratten (durchgezogene Linie), jeweils Mittelwert \pm SEM, $n = 4$; 20a: 6 Wochen, 20b: 42 Wochen.

5.4.6 Melatonin und seine Vorstufen in Pinealorganen

Alle Vorstufen des Melatonins wurden in einer Probe im Rahmen eines HPLC-Laufes detektiert. Die Retentionszeiten veränderten sich im Laufe der Messungen gering. Die erhaltenene Daten wurden durch Messungen gegen einen Standard-Gemisch der Vorstufen überprüft. Das Chromatogramm von zur Mitte der Hellphase gewonnenen Proben (Abb. 21a) zeigte 5-Hydroxytryptophan ($r_t = 2,4$ min), Tryptophan ($r_t = 4,1$ min) und Serotonin ($r_t = 5,4$ min). N-Acetylserotonin ($r_t = 6,1$ min) hingegen war chromatographisch nur von Proben der Dunkelphase detektierbar (Abb. 21b). Die Retentionszeit von Melatonin betrug $r_t = 31,7$ min. Auch Melatonin war nur in Proben, die Mitte der Dunkelphase gewonnenen worden waren, nachweisbar.

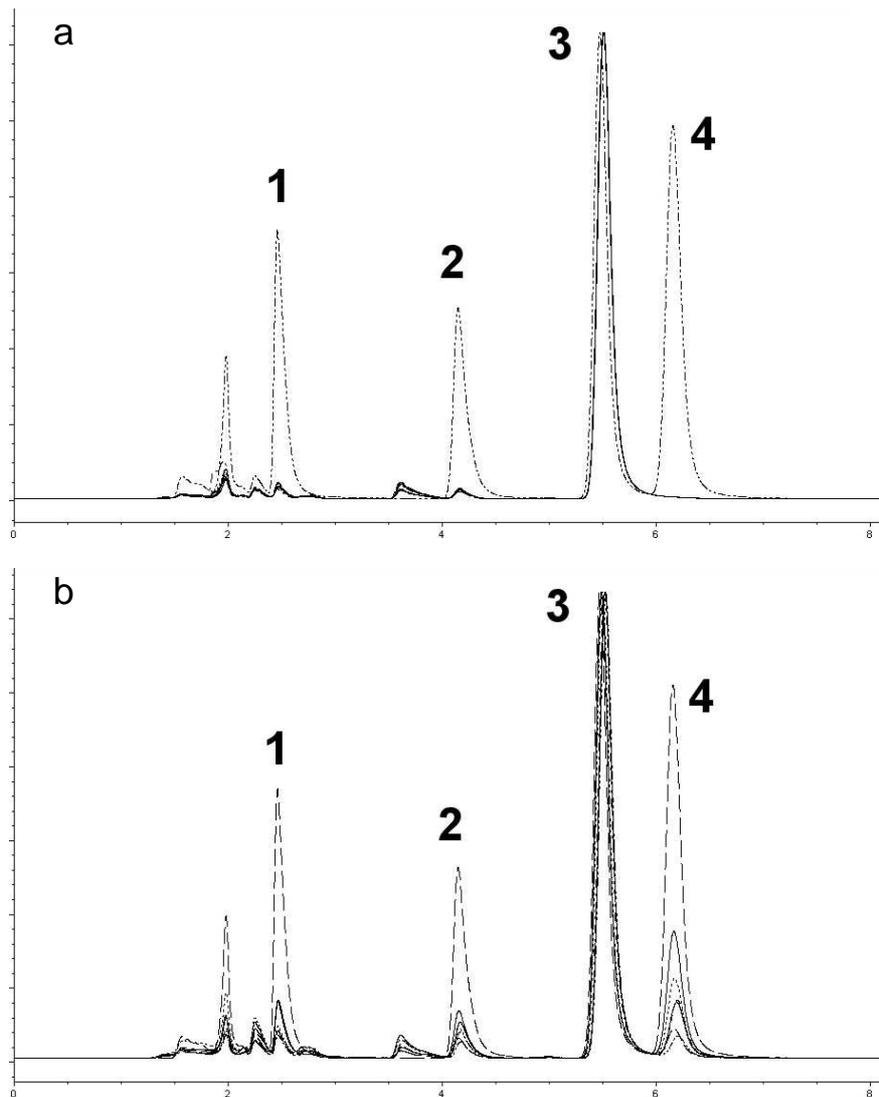


Abb. 21: Synoptische Darstellung von HPLC-Messungen von 10 Pinealorganen (Abb. 21a: Hellphase, Abb. 21b: Dunkelphase). Die gepunktete Linie spiegelt ein Gemisch aus Lösungen von 5-Hydroxytryptophan (1), Tryptophan (2), Serotonin (3) und N-Acetylserotonin (4) wider.

Der pineale Tryptophangehalt zeigte weder tageszeitliche noch alters- oder Tierstamm-spezifische signifikante Unterschiede. Bei sonst nur tendenzieller Verminderung (Abb. 22) zeigte sich beim Vergleich zwischen 42 Wochen alten GK- und Wistar-Ratten (jeweils Hellphase) in den Pinealen von GK-Ratten signifikant weniger Tryptophan ($123,54 \pm 10,589$ vs. $66,31 \pm 8,555$ pmol, $p < 0,01$; Tab. 8).

5-Hydroxytryptophan war in Pinealorganen von GK-Ratten im Vergleich zu den metabolisch gesunden Wistar-Ratten statistisch signifikant erniedrigt. Einzig der Vergleich von 6-Wochen alten Ratten beider Stämme (Dunkelphase) zeigte keinen signifikanten Unterschied ($13,62 \pm 2,091$ vs. $9,56 \pm 2,308$ pmol; $p > 0,05$). Die ermittelten pinealen 5-Hydroxytryptophanmengen lagen zwischen $3,31 \pm 0,8$ und $9,58 \pm 2,31$ pmol bei Epiphysen von GK-Ratten sowie $11,33 \pm 2,7$ und $13,62 \pm 2,09$ pmol bei Epiphysen von Wistar-Ratten. Es fanden sich keine tageszeitlichen oder alternsassozierten Unterschiede (Abb. 23, Tab. 9).

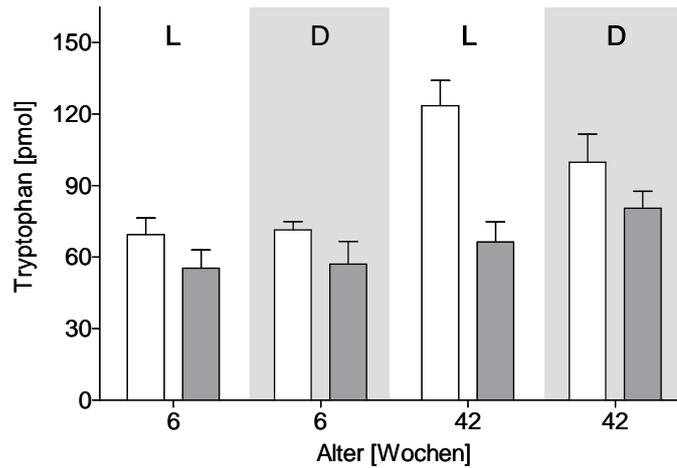


Abb. 22: Mittelwert \pm SEM des pinealen Tryptophangehaltes [pmol] von Wistar-Ratten (transparent) und GK-Ratten (grau), jeweils $n = 6$. Grau hinterlegte Balken: Mitte Dunkelphase.

Tabelle 8: Mittelwert \pm SEM des pinealen Tryptophangehaltes [pmol] von Wistar- und GK-Ratten, jeweils $n = 6$. Grau hinterlegte Felder: Mitte Dunkelphase, p : Signifikanzniveau für Mann-Whitney-U-Test.

Alter [Wochen]	Wistar		GK		p
	M	SEM	M	SEM	
6	69,47	6,95	55,30	7,64	n.s.
6	71,43	3,50	57,07	9,54	n.s.
42	123,54	10,59	66,31	8,55	< 0,001
42	99,82	11,81	80,49	7,20	n.s.

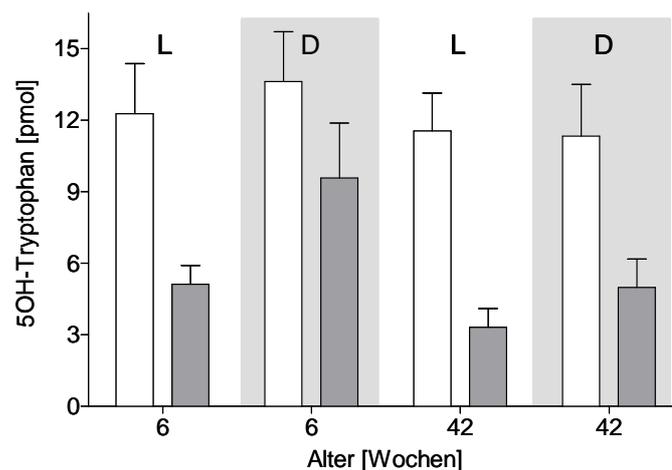


Abb. 23: Mittelwert \pm SEM des pinealen 5-OH-Tryptophangehaltes [pmol] von Wistar-Ratten (transparent) und GK-Ratten (grau), jeweils $n = 6$. Grau hinterlegte Balken: Mitte Dunkelphase.

Tabelle 9: Mittelwert \pm SEM des pinealen 5-OH-Tryptophangehaltes [pmol] von Wistar- und GK-Ratten, jeweils n = 6. Grau hinterlegte Felder: Mitte Dunkelphase, p: Signifikanzniveau für Mann-Whitney-U-Test.

Alter [Wochen]	Wistar		GK		p
	M	SEM	M	SEM	
6	12,27	2,11	5,12	0,79	< 0,05
6	13,62	2,09	9,58	2,31	n.s.
42	11,54	1,60	3,31	0,80	< 0,01
42	11,33	2,17	4,99	1,19	< 0,05

Der Serotoningehalt war in Epiphysen von GK-Ratten in allen zu Wistar-Ratten verglichenen Gruppen signifikant geringer (Tab. 10). Weiterhin zeigten sich statistisch signifikante tageszeitabhängige Veränderungen mit erniedrigten pinealen Serotoninmengen während der Dunkelphase. Altersabhängige Unterschiede wurden nicht festgestellt (Abb. 24).

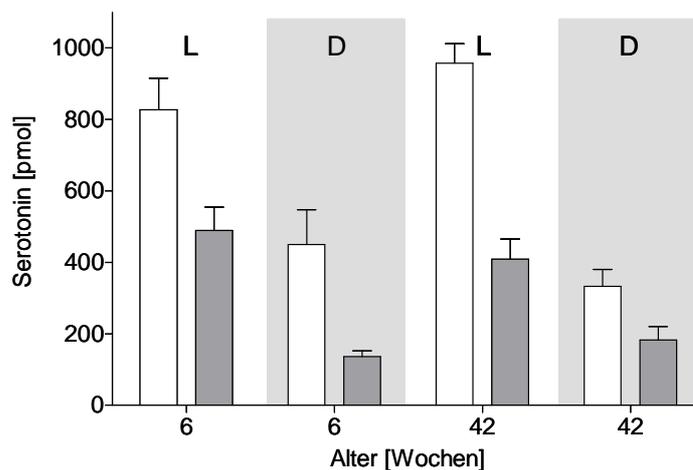


Abb. 24: Mittelwert \pm SEM des pinealen Serotoningehaltes [pmol] von Wistar-Ratten (transparent) und GK-Ratten (grau), jeweils n = 6. Grau hinterlegte Balken: Mitte Dunkelphase.

Tabelle 10: Mittelwert \pm SEM des pinealen Serotoningehaltes [pmol] von Wistar- und GK-Ratten, jeweils n = 6. Grau hinterlegte Felder: Mitte Dunkelphase, p: Signifikanzniveau für Mann-Whitney-U-Test.

Alter [Wochen]	Wistar		GK		p
	M	SEM	M	SEM	
6	827,61	87,86	489,71	64,72	< 0,05
6	449,81	98,09	136,16	17,00	< 0,05
42	957,77	54,85	409,03	56,29	< 0,001
42	333,29	47,12	183,16	37,09	< 0,05

N-Acetylserotonin war in Proben, die zur Mitte der Hellphase gewonnen wurden, nicht nachweisbar. Der Vergleich 6-Wochen alter GK- und Wistar-Ratten zeigte keinen

signifikanten Unterschied. In den Epiphysen von 42-Wochen alten GK-Ratten fand sich jedoch signifikant weniger N-Acetylserotonin als in denen von Wistar-Ratten. Der pineale N-Acetylserotoningehalt war bei 42-Wochen alten GK-Ratten signifikant ($p < 0,01$) niedriger als bei 6-Wochen alten GK-Ratten (Abb. 25 und Tab. 11).

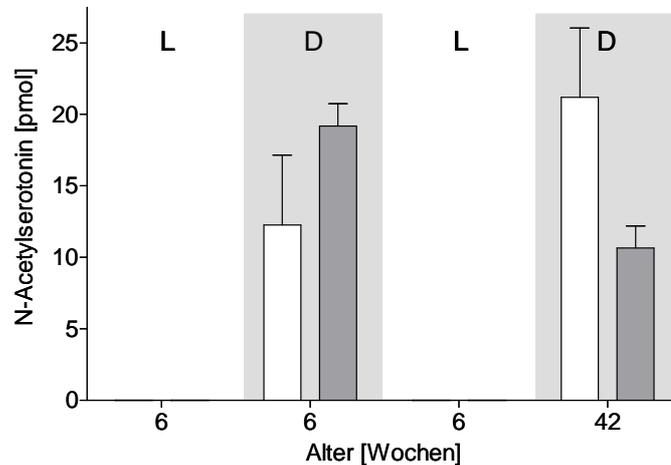


Abb. 25: Mittelwert \pm SEM des pinealen N-Acetylserotoningehaltes [pmol] von Wistar-Ratten (transparent) und GK-Ratten (grau), jeweils $n = 6$. Grau hinterlegte Balken: Mitte Dunkelphase. Während der Hellphase war das pineale N-Acetylserotonin nicht zu detektieren.

Tabelle 11: Mittelwert \pm SEM des pinealen N-Acetylserotoningehaltes [pmol] von Wistar-Ratten (transparent) und GK-Ratten (grau), jeweils $n = 6$. Grau hinterlegte Felder: Mitte Dunkelphase, p: Signifikanzniveau für Mann-Whitney-U-Test. Während der Hellphase war das pineale N-Acetylserotonin nicht zu detektieren.

Alter [Wochen]	Wistar		GK		p
	M	SEM	M	SEM	
6	12,27	4,89	19,17	1,57	n.s.
42	21,19	4,85	10,65	1,54	n.s.

Das pineale Melatonin war ebenso wie N-Acetylserotonin nur zur Mitte der Dunkelphase nachweisbar. Die in Epiphysen enthaltene Stoffmenge ist mindestens 10fach geringer als die seiner Vorformen. Es zeigte sich eine deutliche Altersabhängigkeit mit signifikant (jeweils $p < 0,01$) niedrigeren Werten in der Gruppe der 42 Wochen alten Tiere. Bei 6 Wochen alten Tieren waren die in den Proben von GK-Ratten ermittelten Werte signifikant erniedrigt. Im Vergleich der Tierstämme bei 42 Wochen alten Tieren zeigte sich nur eine tendenzielle Verminderung in den Proben von GK-Ratten (Abb. 26 und Tab. 12).

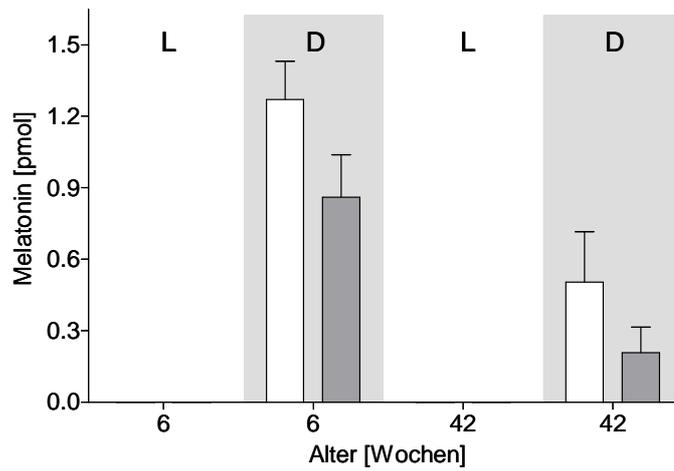


Abb. 26: Mittelwert \pm SEM des pinealen Melatoningehaltes [pmol] von Wistar- (transparent) und GK- (grau) Ratten, jeweils $n = 6$. Grau hinterlegte Balken: Mitte Dunkelphase. Während der Hellphase war das pineale Melatonin nicht zu detektieren.

Tbl. 12: Mittelwert \pm SEM des pinealen Melatoningehaltes [pmol] von Wistar- (transparent) und GK- (grau) Ratten, jeweils $n = 6$. Grau hinterlegte Felder: Mitte Dunkelphase, p: Signifikanzniveau für Mann-Whitney-U-Test. Während der Hellphase war das pineale Melatonin nicht zu detektieren.

Alter [Wochen]	Wistar		GK		p
	M	SEM	M	SEM	
6	1,27	0,16	0,86	0,18	n.s.
42	0,50	0,21	0,21	0,11	n.s.

6 Diskussion

Diabetische Tiermodelle dienen der Aufklärung von humanen Diabetesformen. Die GK-Ratten sind ein etabliertes Modell des Diabetes mellitus Typ 2.

Bei den GK-Ratten fällt das im Vergleich zu metabolisch gesunden Kontrolltieren verminderte Körpergewicht auf (Abb. 3). Diesbezüglich sind die Ergebnisse übereinstimmend zu denen anderer Arbeitsgruppen [75], auch zu denen von GOTO und KAKIZAKI selbst [72, 73]; dies steht im Gegensatz zur Situation bei anderen diabetischen Tiermodellen wie der NZO-Maus und der ZDF- oder OLETF-Ratte [152-154]. Für die Halle'sche Population der GK-Ratten konnten durch regelmäßige Überprüfungen Infektionskrankheiten als Grund des verminderten Gewichtes ausgeschlossen werden. Vergleichend zum Typ 2 Diabetes mellitus des Menschen entfällt für die GK-Ratte die (Körper-betonte) Adipositas als Manifestationsfaktor, obwohl Gewichtsabnahme und Kachexie auch zu den charakteristischen Symptomen des unbehandelten und manifesten Typ 2 Diabetes mellitus gehören.

Die unter *ad libitum*-Bedingungen im Alters- und Tierstammvergleich ermittelten Blutglukosekonzentrationen belegen die Manifestation der diabetischen Stoffwechsellage bei GK-Ratten zwischen der ersten und dritten Lebenswoche (Abb. 4). Einschränkend muss gesagt werden, dass die Erfassung der Werte mit einem für Rattenblut nicht validiertem System erfolgte. Die unkompliziert anzuwendenden Teststreifen (handelsübliches System, basierend auf der Glukose-Oxidase-Methode) wurden ausgewählt, da für Rattenblut validierte Verfahren nicht verfügbar waren und nur so eine schnelle Bestimmung mit minimalem Volumeneinsatz durchgeführt werden konnte. Da sich die Blutglukosekonzentrationen von in Diethyläthernarkose getöteten Ratten nicht von jenen unter einer Isoflurannarkose getöteten unterschieden (Daten nicht gezeigt), ist nicht von einer Beeinflussung der Absolutwerte durch Diethyläther auszugehen. Die für GK- und für Wistar-Ratten erhaltenen Absolutwerte stehen in Einklang mit den Resultaten anderer Arbeitsgruppen. Dies gilt auch für exemplarisch bestimmte Nüchtern-Blutglukosekonzentrationen (Daten nicht gezeigt). Blutglukosekonzentrationen bei GK-Ratten wurden bisher noch nicht unter Berücksichtigung von Alter- und Tageszeit publiziert. Vergleicht man die Blutglukosekonzentration von 3 und 6 Wochen alten GK- und Wistar-Ratten mit denen von 24 Wochen alten Tieren, so fällt ein signifikanter Abfall auf (Abb. 5 und Tab. 4). Diese Beobachtung kann mit einer geringgradig verminderten Glukosetoleranz bei jungen Tieren [155, 156] erklärt werden, die bei den GK-Ratten von einer kompensierten Hyperglykämie begleitet wird. Durch die Progression der metabolischen Störungen bei GK-Ratten nimmt der Unterschied in den Blutglukosenkonzentrationen beider Stämme mit dem Alter zu (Abb. 5). Dies belegen auch die Tageszeit-abhängigen

Untersuchungen (Abb. 6). Bei 6 Wochen alten GK-Ratten zeigen sich noch ausbalancierte Blutglukosekonzentrationen. Bei 42 Wochen alten GK-Ratten treten hingegen klare Tageszeit-abhängige Veränderungen auf. Diese finden sich – wenn auch nur sehr schwach – ebenso bei Wistar-Ratten. Hier ist das prandiale Geschehen ursächlich. Der deutlich höhere Anstieg bei den GK-Ratten zeigt eine schwer gestörte Glukosetoleranz an. Die parallel erfassten – und nicht adäquat ansteigenden – Plasmainsulinwerte (Abb. 8) machen deutlich, dass eine Störung der Glukose-stimulierten Insulinsekretion vorliegt.

Betrachtet man die unter *ad libitum*-Bedingungen ermittelten Plasmainsulinwerte so zeigen sich bei den bis zu 6 Wochen alten GK-Ratten teilweise hypoinsulinämische Verhältnisse. Der bestehende Unterschied kehrt sich schliesslich in signifikante Hyperinsulinämie bei 24 und 42 Wochen alten GK-Ratten um (Abb. 7). Andere Arbeitsgruppen publizierten Plasma-insulinwerte von GK-Ratten im Vergleich zu metabolisch gesunden Kontrolltieren, die teilweise signifikant, teilweise nur tendenziell erniedrigt waren. Insofern bestätigen die in dieser Arbeit mitgeteilten Ergebnisse die bisher nur auf Einzelzeitpunkten beruhende bekannte Datenlage. Berücksichtigt man nun aber die zunächst für die 6 Wochen alten Tiere erhobenen Insulin-Tagesprofile – die ja auch die Zeitpunkte der Nahrungsaufnahme und das postprandiale Geschehen erfassen und nicht wie die meisten Untersuchungen nur punktuell während der Ruhephase der Tiere erfasste Werte widerspiegeln – so zeigen sich Hyperinsulinämie. Vor dem Hintergrund dieser Untersuchungen kann der vielfach gezogene Schluss, junge GK-Ratten seien hypoinsulinämisch, nur eingeschränkte Gültigkeit besitzen. Die zur Mitte der Hellphase ermittelten Insulinplasmakonzentrationen bestätigen die von anderen Arbeitsgruppen an jungen GK-Ratten durchgeführten Untersuchungen. Aber auch gegenteilige Daten sind publiziert [75]. Bisher wurden jedoch keine Studien durchgeführt, die das tageszeitliche und postprandiale Geschehen berücksichtigten. In der vorliegenden Arbeit wird also zum erstenmal eine nächtliche, mutmaßlich postprandiale, Hyperinsulinämie in jungen GK-Ratten mitgeteilt (Abb. 8). Die Ergebnisse der fluoreszenzimmunhistochemischen Untersuchungen belegen den mit der Dauer der diabetischen Stoffwechsellage zunehmenden Verlust von β -Zellen. Dies würde die bei 42 Wochen alten GK-Ratten geringere Hyperinsulinämie erklären. Ebenso erklärt sich der starke postprandiale Anstieg der Blutglukosekonzentration und das Fehlen einer postprandialen Hyperinsulinämie bei 42 Wochen alten GK-Ratten. Bei 42 Wochen alten Wistar-Ratten zeigte sich hingegen während der Dunkelphase erhöhte Insulinkonzentrationen und nur ein äußerst geringer Anstieg der Blutglukosekonzentration (Abb. 6b und Abb. 8b). Dies belegt erstens die regelrechte physiologische Antwort bezüglich der Nahrungsaufnahme und zweitens die stabileren circadianen Rhythmen der älteren Tiere, welche - bei GK- und Wistar-Ratten - zu zeitgleicher Nahrungsaufnahme und synchronem Ansteigen der Plasmainsulinkonzentration führen.

Eine initial verminderten β -Zell-Anzahl bei GK-Ratten führt zu verminderter Insulinsekretion [157-159]. Dies wird dadurch bestätigt, dass die Behandlung mit *glucagon-like peptide-1* oder *exendin-4* die Entwicklung der diabetischen Stoffwechsellaage verzögert und abmildert [160]. Bei GK-Ratten besteht eine hereditäre, auf der Mutation des *insulin degrading enzyme*-codierenden Gens beruhende, Insulinresistenz [50]. Da diese Mutation auch beim Menschen existiert [161] entsprechen die Ergebnisse bekannten Phänomenen des humanen Typ 2 Diabetes. In Zusammenschau mit den in dieser Arbeit dargestellten Ergebnissen zu Blutglukose und Plasmainsulin wird deutlich: Die verminderte Insulinwirkung führt schon in 6 Wochen alten GK-Ratten zu einer Hyperglykämie. Die Hyperinsulinämie kompensiert den postprandialen Anstieg der Plasmaglukose. Die stärker verminderte Insulinwirkung führt in 42 Wochen alten GK-Ratten zu einer deutlich stärker ausgeprägten Hyperglykämie als bei den jüngeren Tieren. Progredienter Verlust und Dedifferenzierung der pankreatischen β -Zellen machen die Mehrsekretion von Insulin unmöglich. Dafür spricht der postprandiale Anstieg der Blutglukosekonzentration bei den 42 Wochen alten GK-Ratten.

Die sichere Manifestation der diabetischen Stoffwechsellaage bei männlichen GK-Ratten verbunden mit dem – im relativen Vergleich zum Menschen – frühen Manifestationsalter sind jedoch nicht charakteristisch für den humanen Typ 2 Diabetes mellitus.

Glukose-Sensor

Das *glucose sensing* ist eine grundlegende und spezifische Funktion der pankreatischen β -Zelle. Es wird durch eine ungestörte Funktion beider Komponenten des Glukosesensors, GLUT 2 und Glucokinase, ermöglicht. Der Glukosetransporter ermöglicht hierbei den Einstrom von Glukose in die β -Zelle durch erleichterte Diffusion [162]. Die in einer gewissen Zeit die Zellmembran passierende Stoffmenge steigt linear mit der Konzentrationsdifferenz. Voraussetzung hierfür ist die hauptsächlich und insulinunabhängige Lage des Transporters in der Zellmembran, sein hoher K_M -Wert [44] sowie eine hinreichende Menge an GLUT 2. Die niedrigaffine Isoform IV der Hexokinase (Glucokinase) katalysiert die ATP-abhängige Glukose-6-Phosphorylierung. Hierbei handelt es sich um den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Glukosemetabolisierung in der pankreatischen β -Zelle. Andere GLUT- und Hexokinase-Isoformen haben unter physiologischen Bedingungen keine Relevanz für Glukoseaufnahme und -phosphorylierung. Neben anderen Ursachen sind Störungen des *glucose sensing* einer der Hauptfaktoren, die zu einer diabetischen Stoffwechselstörung beitragen. Diese Störungen können hereditär – wie zum Beispiel Mutationen im Glucokinasegen [163] – oder erworben sein. Hyperglykämie und β -Zellstress führen zu progredienten

glucose sensing-Defekten und Dedifferenzierung der β -Zellen [164]. Dies umfasst auch die verminderte Expression und zytoplasmatische Akkumulation von GLUT 2 - ein weit bekanntes Phänomen bei diabetischen Tiermodellen [44, 165, 166] - und die verminderte Aktivität von Glucokinase. Die vermehrte Expression und Aktivität von Hexokinase I und Glukose-6-Phosphatase wurde in β -Zellen diabetischer Individuen ebenso beobachtet. Erstere kann ein bedeutendes Ausmaß annehmen [167, 168]. Letztere führt zur Dephosphorylierung von Glukose-6-Phosphat und dadurch zu ineffizientem *glucose sensing*. Dies wiederum führt zum indirekten Verlust von ATP, einem verminderten Glukose-induziertem Anstieg des ATP/ADP-Verhältnisses und somit einer verminderten Glukose-stimulierten Insulinsekretion [169, 170]. Die in dieser Arbeit dargelegten Ergebnisse bestätigen diese Beobachtungen. So konnte eine Reduktion der β -Zellanzahl und eine cytoplasmatische Akkumulation von GLUT 2 in β -Zellen gezeigt werden (Abb. 14). Diese Tendenzen waren altersabhängig und weisen auf eine reduzierte Glukoseaufnahme der pankreatischen β -Zellen hin. Die tageszeitabhängigen Veränderungen der GLUT 2-mRNA Expression wurden bisher noch nicht untersucht. Jedoch sollte bedacht werden, dass GLUT 2 unter physiologischen Bedingungen nicht der limitierende Faktor für die Glukoseutilisation der pankreatischen β -Zelle ist. Andererseits kann eine Aufregulation von GLUT 2 unter diabetischen Bedingungen entstehende Funktionsstörungen teilweise kompensieren. Die Alterationen des GLUT 2-assoziierten Glukosetransportes erklären aber nicht die diabetische Stoffwechsellage der GK-Ratten [166].

Die verminderte Expression und vermehrt (peri-)nukleäre Lage der Glucokinase - wie durch *real-time* RT-PCR und Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie bestätigt - weisen auf eine gestörte Glukose-6-Phosphorylierung der pankreatischen β -Zellen von GK-Ratten hin. Die β -Zell-Glucokinase war bisher weder Gegenstand morphologischer noch altersabhängiger Untersuchungen bei GK-Ratten. Die hier vorliegenden Ergebnisse unterstützen jedoch Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen, die eine verminderte Translokation von Glucokinase in den Hepatocyten von ZDF- und GK-Ratten zeigten [154]. Das Vorhandensein von Glucokinase im Zellkern von Hepatocyten ist anerkannt. Die glukoseabhängige Translokation vom nukleären zum cytoplasmatischen Kompartiment ermöglicht eine glukosestimulierte Glukose-Phosphorylierung [171, 172]. Die perinukleäre Lokalisation von Glucokinase in pankreatischen β -Zellen wurde von NOME et al. [173] beschrieben. Auch wurde eine lösliche Fraktion mit höherer enzymatischer Aktivität von einer intrazellulär gebundenen mit niedriger enzymatischer Aktivität unterschieden [174]. Weitere Untersuchungen sind notwendig um zu klären, inwiefern die glukoseregulierte intrazelluläre Bindung von Glucokinase - beispielsweise an Insulingranula [175] - oder die Translokation und Regulation der β -Zell Glucokinase identisch zu der in Hepatocyten ist.

Die hier vorgelegten Ergebnisse zu tageszeitlichen Veränderungen der Glucokinase-mRNA Expression ermöglichen eine neue Sicht der funktionellen Bedeutung des *glucose sensing*. Die unveränderte Tagesrhythmik der Expression von GLUT 2- und Glucokinase-mRNA bei GK-Ratten war unerwartet und gegensätzlich zu den in der Literatur geäußerten Vermutungen [176]. Vergleicht man die Phasen erhöhter Glucokinase-mRNA Expression und die postprandiale Phase – die von einem Anstieg der Blutglukose bei 42 Wochen alten GK-Ratten bestimmt wird (Abb. 13) – zeigt sich eine Phasenverschiebung von 3 bis 6 h. Nimmt man für die Synthese des enzymatisch aktiven Glucokinase-Proteins eine ebensolche Zeitspanne an und berücksichtigt eine Glucokinase-Halbwertszeit von 19 bis 30 h [177, 178], so würden die maximale Nahrungsaufnahme und die maximale Glucokinase-Aktivität pankreatischer β -Zellen "in Phase" liegen. Die hierdurch optimierte Insulinsekretion führt zur Vermeidung postprandialer Hyperglykämie. Über rhythmische Insulinsekretion mit unterschiedlichen Frequenzen, zum Beispiel ultradiane [37, 38] und circadiane Rhythmen der Insulinsekretion wird in der Literatur mehrfach berichtet. Dieses Phänomen wurde sowohl unter *in vivo*- [40, 42, 179] als auch *in vitro*-Bedingungen [39] beobachtet. Die rhythmische Expression von Genen des Glukose-Sensor Komplexes könnte Ursache der rhythmischen Insulinsekretion aus pankreatischen β -Zellen der Ratten sein.

Die hier dargelegten Ergebnisse legen einen progressiven Defekt des *glucose sensing* bei GK-Ratten nahe, an dem beide Komponenten des Glukose-Sensor Komplexes - GLUT 2 und Glucokinase - beteiligt sind.

Wie in den Perifusionsexperimenten an den Inseln neonater Ratten gezeigt sind Störungen des *glucose sensing*, reduzierte (erste Phase) Glukose-stimulierten Insulinsekretion und verminderter Insulingehalt pro Insel frühzeitige Ereignisse der Manifestation der diabetischen Stoffwechsellage von GK-Ratten. Hinzu kommt eine hereditäre Insulinresistenz durch verminderte Aktivität des *insulin-degrading enzyme* [50, 55]. Entgegen anderen Arbeiten [180] ist es unwahrscheinlich, dass die reduzierte erste Phase Glukose-stimulierten Insulinsekretion auf einer verminderten Anzahl zellmembrangebundener Insulingranula beruht. Diese Annahme wird durch die eigenen Ergebnisse der Arginin- und KCl-Stimulationen in den Perifusionsuntersuchungen widerlegt, da sich hierbei eine stärkere Insulinfreisetzung als bei alleiniger Glukosestimulation zeigte (Abb. 16). Die relative Sekretion war bei GK- und Wistar-Ratten ähnlich. Die absolute Sekretionsmenge war - bei gleicher Anzahl von LANGERHANS'schen-Inseln je Perifusionssäule - durch die bei GK-Ratten verminderte β -Zellanzahl verringert (Abb. 16 und Tab. 6). Dies wird durch Daten anderer Arbeitsgruppen bestätigt, da der Insulingehalt pro Nanogramm insulärer DNA in GK- und Wistar-Inseln ähnlich ist [75,

169]. Entsprechend sind die LANGERHANS'schen-Inseln von GK-Ratten kleiner als jene von Wistar-Ratten, was den eigenen mikroskopischen Beobachtungen entspricht. Die bemerkenswert höhere Forskolin-induzierte Insulinsekretion der Inseln von GK-Ratten kann mit dem Vorhandensein einer bekannten Punktmutation im Promotorbereich des Adenylatcyclase-3-Gens zusammenhängen. Diese führt zur vermehrten Expression von Adenylatcyclase-3 und dadurch zu einer erhöhten cAMP-Synthese der β -Zellen von GK-Ratten [181, 182]. Die cAMP-Freisetzung von „im Batch“ kultivierten LANGERHANS'schen-Inseln der GK-Ratten war nach Stimulation mit 3 beziehungsweise 5 $\mu\text{mol/l}$ Forskolin höher als jene aus Inseln der Wistar-Ratten (Daten nicht gezeigt). Da GK-Ratten Inseln offensichtlich kleiner sind und nur den halben DNA-Gehalt der Wistar-Ratten Inseln [169] aufweisen, ergibt sich hieraus ein weiterer Beleg für eine relative cAMP-Überproduktion.

Melatonin

Die pineale Melatoninsynthese wird durch aus sympathischen Nervenendigungen freigesetztes Noradrenalin stimuliert [123]. Es steigert die Melatoninsynthese durch Erhöhung der Aktivität der Tryptophanhydroxylase, der AANAT sowie der HIOMT. Dadurch wird die Hypothese erniedrigter Melatoninsynthese und -freisetzung im Falle einer durch Diabetes hervorgerufenen Neuropathie des Sympathikus - wie von O'BRIEN et al. [183] und TUTUNCU et al. [184] postuliert - plausibel. Gerade für die schon bei GK-Ratten im Alter von 6 Wochen gefundenen niedrigeren Melatoninplasmakonzentrationen scheint dieser Erklärungsansatz allerdings nicht plausibel, da die diabetische Stoffwechsellaage nur kurz und mäßig ausgeprägt ist. Das beobachtete Phänomen könnte also - gerade bei 6 Wochen alten Tieren - auf drei prinzipielle Ursachen zurückzuführen sein: 1. Störungen der pinealen Melatoninsynthese, 2. Erhöhung des Verteilungsvolumens für Melatonin und 3. Erhöhte Melatoninclearance bei diabetischen GK-Ratten. Berücksichtigt man das niedrigere Körpergewicht von GK-Ratten und den amphiphilen Charakter des Melatonins, so müsste das Verteilungsvolumen bei GK-Ratten erniedrigt und daher die Melatoninplasmakonzentrationen erhöht sein. Fragen des Melatoninabbaus und seiner Clearance wurden im Rahmen dieser Arbeit nicht bearbeitet, da pineale Prozesse im Vordergrund stehen sollten und andernfalls der Rahmen der Arbeit gesprengt worden wäre. Folglich wurden die Substrate der Melatoninsynthese und die Vorstufen des Melatonins untersucht.

Die Epiphysen von GK- und Wistar-Ratten der verschiedenen Altersgruppen waren hinsichtlich des Gesamt-RNA-Gehaltes gleich (Tab. 7). Das Gewicht der Epiphysen 42-Wochen alter GK-Ratten und der pineale Proteingehalt bei GK-Ratten ist gegenüber den

Epiphysen von Wistar Ratten vermindert. Dies kann Ausdruck einer Hypotrophie der Epiphysen sein, die sich bei bestehender autonomer Neuropathie entwickelt hat.

Obwohl der Tryptophanplasmakonzentrationen nur bedingt mit dem pinealen Tryptophangehalt korreliert [185], können erniedrigte Tryptophanplasmakonzentrationen beim Menschen zu einer verminderten Melatoninsynthese führen [186]. Ein unter diabetischer Stoffwechsellage auftretender Tryptophanmangel kann eine Verminderung der cerebralen Serotoninsynthese bei Ratten verursachen [187, 188]. Dies könnte dann zu einer Verminderung der pinealen Melatoninsynthese sowie der Melatoninplasmakonzentrationen führen. In anderen Untersuchungen gefundene diurnale Veränderungen der Tryptophanplasmakonzentrationen [189] oder des pinealen Tryptophangehaltes [185] konnten in den eigenen Untersuchungen nicht bestätigt werden (Abb. 22). Die Tryptophanplasmakonzentrationen (Daten nicht gezeigt) und der pineale Tryptophangehalt war zwischen beiden Tierstämmen nicht signifikant verschieden. Die über ein hochaffines Transportersystem [85] realisierte Tryptophanaufnahme in die Pinealocyten von diabetischen GK-Ratten ist also ungestört.

Die in den Epiphysen von GK-Ratten deutliche - und in drei der vier verglichenen Gruppen auch signifikante - Erniedrigung des 5-OH-Tryptophans weist auf eine verminderte Aktivität der pinealen Tryptophanhydroxylase hin (Abb. 23). Trotz der bekannten circadian-rhythmischen Synthese dieses Enzyms [190] und nachgewiesener Aktivitätssteigerung während der Dunkelphase [91, 92] zeigten sich keine circadianen Veränderungen des pinealen 5-OH-Tryptophangehaltes. Die Tryptophanhydroxylase-mRNA-Expression zeigte keine diurnalen Veränderungen. Die pineale Tryptophanhydroxylase (Isoform 1; EC 1.14.16.4) katalysiert den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Serotoninsynthese [86-88]. Unter Berücksichtigung eines K_M -Wertes von $7,8 \pm 2,2 \mu\text{mol/l}$ [191] und der ermittelten pinealen Tryptophankonzentrationen (etwa $55\text{-}95 \mu\text{mol/l}$) wird klar, dass die pineale Tryptophanhydroxylase im 7 bis 12-fachen halbmaximalen Sättigungsbereich - also vollständig gesättigt - arbeitet. Mit einer Substrathemmung muss bei Konzentrationen über $70 \mu\text{mol/l}$ gerechnet werden [191]. Eine Reduzierung der Tryptophanhydroxylase-Aktivität wurde bei diabetischer Stoffwechsellage (IDDM) beobachtet [188], dieses Phänomen war durch Insulingabe reversibel [187]. Die Hydroxylierung von Tryptophan erfolgt in Gegenwart von Eisen (Fe^{2+}), Sauerstoff und Tetrahydrobiopterin (5,6,7,8-Tetrahydropteridin) [192, 193]. Im Rahmen einer diabetischen Stoffwechsellage wurden erniedrigte Tetrahydrobiopterin-Konzentrationen in verschiedenen Geweben von OLETF-Ratten [194], Mäusen [195] und Ratten [196] mit STZ-induziertem Diabetes und auch im Aorten-Gewebe von GK-Ratten [197] nachgewiesen. Tetrahydrobiopterin spielt nicht nur bei der Melatoninsynthese eine Rolle. Es ist auch

essentieller Kofaktor der Tyrosinhydroxylase [193]. Hierbei handelt es sich um ein Schlüsselenzym der Katecholaminsynthese [198]. In Zusammenfassung mit Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen sind also reduzierte Konzentrationen von Serotonin, Melatonin, Adrenalin und Noradrenalin sowohl bei diabetischen GK-Ratten als auch Typ 2 diabetischen Patienten bekannt [199, 200]. Dies wird durch publizierte Ergebnisse über reduzierte cerebrale [201] und hippocampale [202] Serotoninmengen bei diabetischen Ratten weiter gestützt. Insgesamt können die in diabetischen GK-Ratten gefundenen Verminderungen des pinealen 5-OH-Tryptophangehaltes - und ihre Folgen – auf einem Tetrahydrobiopterin-Mangel beruhen.

Weder bei der Tryptophanaufnahme in die Pinealocyten noch bei der Decarboxylierung des 5-OH-Tryptophanes durch die Aromatische-Aminosäure Decarboxylase [123] tritt eine Sättigung ein, also sind circadiane Veränderungen des pinealen 5-OH-Tryptophangehaltes auch nicht zu erwarten, weil das Edukt Tryptophan im Überschuss zufließt und das Reaktionsprodukt 5-OH-Tryptophan (pineale Konzentration etwa 3 bis 15 $\mu\text{mol/l}$) sofort durch die Decarboxylase (K_M -Wert etwa 19 $\mu\text{mol/l}$ [203]) verbraucht wird. Letzteres wird auch durch die relativ geringe Stoffmenge pinealen 5-OH-Tryptophanes deutlich (vgl. Abb. 23 und Abb. 22, 24). Cofaktor der Aromatischen-Aminosäure Decarboxylase ist Pyridoxalphosphat [95, 96]. Die Konzentrationen von Pyridoxalphosphat sind bei diabetischen Individuen erniedrigt. Die für das pineale Serotonin gezeigten Ergebnisse (Abb. 24) erklären sich aus den erniedrigten 5-OH-Tryptophankonzentrationen in den Epiphysen diabetischer GK-Ratten. Die in den durchgeführten Untersuchungen bei stoffwechselgesunden Wistar-Ratten ermittelten pinealen Serotoninmengen (333 bis 957 pmol) sind höher als die von anderen Untersuchern angegebenen (25 bis 250 pmol) [98, 99]. Die Ergebnisse zeigen weiter, dass das Tagesprofil des pinealen Serotonins (Abb. 24) invers zu dem des Melatonins (Abb. 26) ist [99]. Dies könnte im Zusammenhang mit rhythmischen Änderungen der AANAT-Aktivität stehen [103]. In der Epiphyse von Ratten ist die AANAT-Aktivität vorwiegend transkriptionell reguliert [104-107]. Die etwa 150fache Aufregulation der AANAT-mRNA-Expression in den 6 Wochen alten metabolisch gesunden Wistar-Ratten steht im Einklang zu früheren Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen. In einer früheren Publikation von Peschke et al. [204] konnte eine unauffällige Aktivität der pinealen AANAT (je mg pinealen Gesamtproteins) beschrieben werden. Die Gesamt-AANAT-Aktivität (pro Pineal) war jedoch bei den diabetischen GK-Ratten erniedrigt. Dies kann Resultat einer verminderten Noradrenalinwirkung und vermehrten AANAT-Abbaus sein.

Die mRNA-Daten zur AANAT-Expression und die durchgeführten Aktivitätsmessungen belegen die bekannte circadian-rhythmische Aktivitätserhöhung in der Dunkelphase [204].

Diese Aktivitätserhöhung erklärt auch die im Vergleich zur Hellphase während der Dunkelphase erniedrigten Serotoninwerte in Epiphysen von GK- und Wistar-Ratten (Abb. 24). Unabhängig hiervon zeigte sich eine altersabhängige Verminderung der pinealen Serotoninkonzentrationen bei GK- und Wistar-Ratten sowohl während der Hell- als auch Dunkelphase. Da bei den 5-OH-Tryptophankonzentrationen keine solchen Veränderungen auftreten und die AANAT-mRNA-Expression altersabhängig vermindert ist, sind altersabhängige Veränderungen der Aromatischen-Aminosäure Decarboxylase zwingend. Für dieses Enzym ist eine circadian-rhythmische Expression beschrieben, die der vermehrten Bereitstellung von Serotonin als Substrat der AANAT während den Dunkelphasen dient.

Die AANAT gilt als geschwindigkeitsbestimmendes Enzym der pinealen Melatoninsynthese. Insbesondere unter der Bedingung sehr hoher AANAT-Aktivität während der Dunkelphase, kann jedoch die HIOMT zum geschwindigkeitsbestimmenden Enzym der Melatoninsynthese werden [123, 205]. Bei den 6 Wochen alten Ratten zeigten sich hinsichtlich der pinealen AANAT-mRNA-Expression keine relevanten Unterschiede zwischen GK- und Wistar-Ratten. Messungen der AANAT-Aktivität wiesen jedoch bei GK-Ratten eine verringerte AANAT-Aktivität pro Pineal auf [204], wohingegen die AANAT-Aktivität pro Milligramm pinealen Gesamtproteins ebenso wie die mRNA-Expression kaum Unterschiede erkennen ließ. Es wurden keine Untersuchungen zum AANAT-Proteingehalt, dem Phosphorylierungsgrad und der Expression regulatorischer Proteine durchgeführt. Die AANAT-Aktivität kann auch über den intrazellulären Redox-Status beeinflusst werden. Dies geschieht über die Bildung intramolekularer Disulfidbrücken aus freien Sulfhydrylgruppen, was zu einer Konformationsänderung und Aktivitätsverlust des Enzyms führt. Über diesen Mechanismus erklärt sich auch die *in vitro*-Inaktivierung der AANAT durch Disulfidbrücken enthaltende Proteine wie Insulin [114]. Verminderungen des Glutathion-Gehaltes zu Gunsten von Glutathion-Disulfid im Rahmen diabetischer Stoffwechsellagen sind bekannt [206]. Ob dieser Mechanismus unter *in vivo*-Bedingungen zu einer relevanten Verminderung der AANAT-Aktivität und folglich der Melatoninsynthese führt, bleibt fraglich. Entsprechende Untersuchungen wurden bisher nicht publiziert. In der Gruppe der 42 Wochen alten Ratten zeigte sich eine niedrigere AANAT-mRNA-Expression in den Epiphysen von GK-Ratten (Abb. 19b). Eine Phasenverschiebung trat nicht auf. Die ermittelten Mengen an N-Acetylserotonin in Pinealorganen von 42 Wochen alten GK-Ratten waren geringer als in jenen von 6 Wochen alten GK-Ratten (Abb. 25). Sie verhalten sich damit ähnlich wie die ermittelten Serotoninmengen. Die ausschließliche Detektierbarkeit von N-Acetylserotonin während der Dunkelphase spiegelt die circadian-rhythmische Aktivität der AANAT wider.

Wie auch N-Acetylserotonin war das Melatonin nur in Proben von während der Dunkelphase entnommenen Epiphysen detektierbar. Betrachtet man die im Mittel detektierten Stoffmengen so ist eindeutig, dass Melatonin im Pinealorgan nicht gespeichert wird. Dies erklärt sich unter anderem aus der Amphiphilie des Melatonins. Entsprechende Aussagen finden sich auch in den publizierten Arbeiten anderer Gruppen [122, 123]. Die ermittelten pinealen Melatoninmengen der untersuchten Tiergruppen verhalten sich verhältnismäßig ebenso zueinander wie die Melatoninplasmakonzentrationen. Dies erklärt sich über die Diffusion des synthetisierten Melatonins aus den Pinealocyten und dem somit von anderen Faktoren unabhängigen Fließgleichgewicht zwischen intra- und extrazellulärem Melatonin. Die hier ermittelten pinealen Melatoninmengen waren geringer als jene bereits für Wistar-Ratten publizierten [207]. Andererseits lagen aber die ermittelten Melatoninplasmakonzentrationen über den von anderen Gruppen beschriebenen [123].

Die Rhythmizität der Melatoninplasmakonzentrationen war bei diabetischen GK-Ratten erhalten. Im Rahmen der erfassten Messpunkte zeigte sich keine relevante Verschiebung der Maxima (Abb. 17). Sowohl bei GK als auch in Wistar-Ratten zeigte sich ein deutlich alternsassoziierter Abfall der Melatoninplasmakonzentrationen. Auch beim Menschen ist die altersabhängige Reduzierung der Melatoninplasmakonzentrationen bekannt [208, 209]. Der bei GK-Ratten stärker ausgeprägte relative alternsassozierte Abfall kann auf einer progredienten Störung im Sinne einer Neuropathie des autonomen Nervensystems beruhen. Dies würde auch die im Vergleich der 42 Wochen alten GK- und Wistar-Ratten verminderte AANAT-mRNA-Expression erklären und mit Hinweisen auf eine Funktionseinschränkung von Epiphysen mit zunehmendem Alter übereinstimmen.

Die Einflüsse von Melatonin auf den Stoffwechsel wurden vielfach untersucht. Melatonin senkt die Insulinsekretion von Ratten-Insulinom (INS-1) Zellen und LANGERHANS' Inseln von Ratten und Mäusen [127, 142]. In anderen Untersuchungen wurde nachgewiesen, dass die Entfernung der Epiphyse zu einer Hyperglykämie führen kann, pinealektomierte Tiere also eine Diabetes-ähnliche Stoffwechselstörung entwickeln können [210-212]. Aber auch gegensätzliche Ergebnisse wurden publiziert. So zeigte sich nach Zufuhr exogenen Melatonins ein Anstieg der Blutglukose [213] und eine Verminderung der Insulinsekretion [214, 215]. Auch über die Reduktion der Blutglukosewerte und erhöhte Plasmainsulinkonzentrationen nach Pinealektomie wurde berichtet [216, 217]. Basierend auf der Tatsache, dass Melatonin die Insulinkonzentrationen bei Menschen [218] und Ratten [219, 220] senkt, besteht Konsens über eine hemmende Wirkung der Epiphyse auf die Insulinsekretion pankreatischer β -Zellen. Die Hemmung der Insulinsekretion durch Melatonin soll durch den MT2-Rezeptor pankreatischer β -Zellen mediiert werden [221]. Bestimmte

Genotypen des MT2-Rezeptors führen dabei zu einer verminderten Glukosetoleranz [222]. Der länger bekannte – und dem MT1-Rezeptor zugeschriebene – Effekt von Melatonin auf die pankreatische β -Zelle wurde teilweise zurückgewiesen, weil sich bei Untersuchungen an Goldhamstern [223], Ratten und Mäusen kein hemmender Effekt von Melatonin auf die Glukose-stimulierte Insulinsekretion zeigte. Auch die basale Insulinfreisetzung von Ratten- und Mäuse- β -Zellen blieb unbeeinflusst [224, 225]. Bei Rattenmodellen des non-IDDM zeigte sich nach langzeitiger Melatoningabe eine verringerte Hyperinsulinämie, die auf eine Minderung der Insulinresistenz zurückgeführt wird. Der Effekt kommt über eine Normalisierung des Profils der Plasmalipide zustande. Die Blutglukosekonzentration blieb unverändert [143]. Nach erfolgter Pinealektomie zeigten sich gegensätzliche Ergebnisse sowie ein Anstieg der Blutglukosekonzentration [226]. Aber auch eine direkte Aktivierung von Insulinrezeptoren durch Melatonin wurde beschrieben [227]. Bezüglich der Beeinflussung der diabetischen Stoffwechsellage fanden sich ähnliche Befunde auch bei Patienten mit Diabetes mellitus Typ 2 [228, 229].

Die pineale Melatoninsynthese wurde in Abhängigkeit von Tageszeit und Alter bei diabetischen GK-Ratten und metabolisch gesunden Wistar-Ratten als Kontrolltieren untersucht. Die bei diabetischen GK-Ratten im Vergleich zu metabolisch gesunden Wistar-Ratten insgesamt signifikant erniedrigten Melatoninplasmakonzentrationen sind vergleichbar mit der bekannten Phänomenologie bei Ratten und Hamstern mit Streptozotocin-induziertem Diabetes [230-232] [207, 231, 232]. Letztlich kann sich aber die Situation bei diesen Tiermodellen mit chemisch-induziertem Diabetes von jener in spontan diabetischen GK-Ratten unterscheiden. Aber auch bei Patienten mit Diabetes mellitus Typ 2 zeigte sich ein Fehlen der nocturnalen Melatoninspitzenkonzentrationen [204]. Der Einfluss von Insulin auf die (Noradrenalin-stimulierte) pineale Melatoninsynthese ist weniger gut untersucht. In einer Arbeit von GARCIA et al. [233] wird eine Stimulierung der pinealen Melatoninsynthese durch Insulin postuliert. Die eigenen Ergebnisse (Daten nicht gezeigt) legen hingegen eine Insulin-medierte Verminderung der Noradrenalin-stimulierten pinealen Melatoninsynthese nahe. Dieser Effekt kann durch eine Aktivierung der p38-MAP-Kinase erklärt werden, da die Aktivierung dieser Kinase nachweislich die AANAT-Aktivität vermindert [234]. Diabetische STZ-Ratten, ein Tiermodell mit absolutem Insulinmangel, weisen hingegen erhöhte pineale Melatoninsynthese und Melatoninplasmakonzentrationen auf [235].

7 Zusammenfassung

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die Halle'sche Population der GOTO-KAKIZAKI (GK) Ratten, ein Typ 2 diabetisches Tiermodell, hinsichtlich der diabetischen Stoffwechsellage, des pinealen Melatoninstoffwechsels und der Melatoninplasmakonzentration untersucht. Als Kontrolltiere dienten metabolisch gesunde Wistar-Ratten. Es wurde gezeigt, dass Hyperglykämie und Hypoinsulinämie bei neugeborenen und bis zu 3 Wochen alten GK-Ratten auf einer reduzierten Anzahl pankreatischer β -Zellen, vermindertem Insulingehalt der β -Zellen und Störungen des *glucose-sensing* bei verminderter Glucokinase-mRNA-Expression beruhen. Glukosetransporter 2 (GLUT 2) und Glucokinase zeigen ein tageszeitliches Muster ihrer mRNA-Expression. Dies führt zum zeitgleichen Maximum der Glukose-6-Phosphorylierung mit der Fressphase der Ratten, und verstärkt die Glukose-stimulierte Insulinsekretion und vermindert die postprandiale Hyperglykämie. Der Rhythmus der Expression von Genen des Glukose-Sensor-Komplexes ist bei GK-Ratten nicht gestört. Bei 6 und 24 Wochen alten GK-Ratten zeigt sich eine kompensierte Hyperglykämie. Dies ist durch nahezu normale GLUT 2-mRNA-Expression und Hyperinsulinämie bedingt, obwohl die Glucokinase-mRNA-Expression erniedrigt ist. Die Dekompensation der metabolischen Situation bei 42-Wochen alten GK-Ratten ist durch Zerstörung der β -Zellen mit nahezu fehlendem GLUT 2 in der Zellmembran und weiter verminderter Glucokinase-Expression bedingt. Dies zeigt sich im Blutglukose-Tagesprofil der 42 Wochen alten GK-Ratten. Der Einfluss von Melatonin auf die Blutglukosekonzentration und den Glukosestoffwechsel ist vielfach beschrieben. Der Grund für gestörte diurnale Rhythmen der Plasmamelatonin-konzentrationen bei diabetischen Tiermodellen oder Typ 2 Diabetikern ist unklar. Deshalb wurden Melatonin und seine Vorstufen (Tryptophan, 5-Hydroxytryptophan, Serotonin und N-Acetylserotonin) in Epiphysen diabetischer GK-Ratten und stoffwechselgesunder Wistar-Ratten mittels *high performance liquid chromatography* (HPLC) untersucht. Tageszeit- und altersabhängige Effekte wurden berücksichtigt. Es wurde die Expression der Tryptophanhydroxylase-, der Arylalkylamin-N-acteyltransferase- und der Hydroxyindol-O-methyltransferase-mRNA ermittelt. Es zeigten sich Anhaltspunkte für eine verminderte Aktivität der Tryptophanhydroxylase mit Verminderung aller Vorstufen des Melatonins ab dem 5-Hydroxytryptophan in Epiphysen diabetischer GK-Ratten. Die Plasmamelatoninkonzentrationen waren bei GK-Ratten erniedrigt. Beide Tierstämme wiesen das typische Tagesprofil und einen altersabhängigen Abfall der Plasmamelatoninkonzentration auf. Die Ergebnisse belegen den hemmenden Einfluss von Insulin auf die pineale Melatoninsekretion.

8 Literaturverzeichnis

1. Kulkarni RN: The islet beta-cell. *Int J Biochem Cell Biol* 36 (2004) 365-371
2. Meda P, Kohen E, Kohen C, Rabinovitch A, Orci L: Direct communication of homologous and heterologous endocrine islet cells in culture. *J Cell Biol* 92 (1982) 221-226
3. Orci L: The microanatomy of the islets of Langerhans. *Metabolism* 25 (1976) 1303-1313
4. Pipeleers D: Islet cell interactions with pancreatic B-cells. *Experientia* 40 (1984) 1114-1126
5. Cook DL, Taborsky Jr. GL: B-Cell Function and Insulin Secretion. In Ellenberg and Rifkin's diabetes mellitus: theory and practice, 4 ed. Rifkin H, Porte Jr. D, Eds. New York, Amsterdam, London, Elsevier, 1990, p. 972
6. Cossel L: Morphologie und Pathomorphologie des Inselorgans. In Diabetes mellitus Bibergeil H, Ed. Jena, G. Fischer Verlag, 1989, p. 61-107
7. Bonner-Weir S, Orci L: New perspectives on the microvasculature of the islets of Langerhans in the rat. *Diabetes* 31 (1982) 883-889
8. Samols E, Stagner JI: Islet somatostatin--microvascular, paracrine, and pulsatile regulation. *Metabolism* 39 (1990) 55-60
9. Banting FG, Best CH: The internal secretion of the pancreas. *J Lap Clin Med* 7 (1922) 251-266
10. Murnaghan JH, Talalay P: John Jacob Abel and the crystallization of insulin. *Perspect Biol Med* 10 (1967) 334-380
11. Sanger F, Thompson EO: The amino-acid sequence in the glyceryl chain of insulin. II. The investigation of peptides from enzymic hydrolysates. *Biochem J* 53 (1953) 366-374
12. Sanger F, Thompson EO: The amino-acid sequence in the glyceryl chain of insulin. I. The identification of lower peptides from partial hydrolysates. *Biochem J* 53 (1953) 353-366
13. Ryle AP, Sanger F, Smith LF, Kitai R: The disulphide bonds of insulin. *Biochem J* 60 (1955) 541-556
14. Henschen F: On the term diabetes in the works of Aretaeus and Galen. *Med Hist* 13 (1969) 190-192
15. Sanders LJ: From Thebes to Toronto and the 21st Century: An incredible Journey. *Diabetes Spectr* 15 (2002)
16. Frank LL: Diabetes mellitus in the texts of old Hindu medicine (Charaka, Susruta, Vagbhata). *Am J Gastroenterol* 27 (1957) 76-95
17. Hürter P, Danne T: Diabetes bei Kindern und Jugendlichen. Berlin, Springer-Verlag, 2005

18. Bennett ST, Todd JA: Human type 1 diabetes and the insulin gene: principles of mapping polygenes. *Annu Rev Genet* 30 (1996) 343-370
19. Harper ME, Ullrich A, Saunders GF: Localization of the human insulin gene to the distal end of the short arm of chromosome 11. *Proc Natl Acad Sci U S A* 78 (1981) 4458-4460
20. Lomedico P, Rosenthal N, Efstratidis A, Gilbert W, Kolodner R, Tizard R: The structure and evolution of the two nonallelic rat preproinsulin genes. *Cell* 18 (1979) 545-558
21. Lomedico PT, Rosenthal N, Kolodner R, Efstratidis A, Gilbert W: The structure of rat preproinsulin genes. *Ann N Y Acad Sci* 343 (1980) 425-432
22. Steiner DF, Tager HS, Chan SJ, Nanjo K, Sanke T, Rubenstein AH: Lessons learned from molecular biology of insulin-gene mutations. *Diabetes Care* 13 (1990) 600-609
23. Bennett A, Sovio U, Ruokonen A, Martikainen H, Pouta A, Taponen S, Hartikainen AL, Franks S, Peltonen L, Elliott P, Jarvelin MR, McCarthy MI: No association between insulin gene variation and adult metabolic phenotypes in a large Finnish birth cohort. *Diabetologia* 48 (2005) 886-891
24. Lucassen AM, Julier C, Beressi JP, Boitard C, Froguel P, Lathrop M, Bell JI: Susceptibility to insulin dependent diabetes mellitus maps to a 4.1 kb segment of DNA spanning the insulin gene and associated VNTR. *Nat Genet* 4 (1993) 305-310
25. Sander M, German MS: The beta cell transcription factors and development of the pancreas. *J Mol Med* 75 (1997) 327-340
26. Dupont S, Vionnet N, Chevre JC, Gallina S, Dina C, Seino Y, Yamada Y, Froguel P: No evidence of linkage or diabetes-associated mutations in the transcription factors BETA2/NEUROD1 and PAX4 in Type II diabetes in France. *Diabetologia* 42 (1999) 480-484
27. Sharma A, Stein R: Glucose-induced transcription of the insulin gene is mediated by factors required for beta-cell-type-specific expression. *Mol Cell Biol* 14 (1994) 871-879
28. Melloul D, Cerasi E: Transcription of the insulin gene: towards defining the glucose-sensitive cis-element and trans-acting factors. *Diabetologia* 37 Suppl 2 (1994) S3-10
29. Borge PD, Moibi J, Greene SR, Trucco M, Young RA, Gao Z, Wolf BA: Insulin receptor signaling and sarco/endoplasmic reticulum calcium ATPase in beta-cells. *Diabetes* 51 Suppl 3 (2002) S427-433
30. Xu GG, Rothenberg PL: Insulin receptor signaling in the beta-cell influences insulin gene expression and insulin content: evidence for autocrine beta-cell regulation. *Diabetes* 47 (1998) 1243-1252
31. Aspinwall CA, Lakey JR, Kennedy RT: Insulin-stimulated insulin secretion in single pancreatic beta cells. *J Biol Chem* 274 (1999) 6360-6365

32. Minn AH, Lan H, Rabaglia ME, Harlan DM, Peculis BA, Attie AD, Shalev A: Increased insulin translation from an insulin splice-variant overexpressed in diabetes, obesity, and insulin resistance. *Mol Endocrinol* 19 (2005) 794-803
33. Minn AH, Kayton M, Lorang D, Hoffmann SC, Harlan DM, Libutti SK, Shalev A: Insulinomas and expression of an insulin splice variant. *Lancet* 363 (2004) 363-367
34. Hou X, Ling Z, Zambre Y, Foriers A, Houssa P, Deberg M, Sodoyez JC, Hales CN, Van der Auwera BJ, Pipeleers D, Van Schravendijk C: Proinsulin and its conversion intermediates in human pancreas and isolated islet tissue: kinetics and steady-state analysis. *Pancreas* 15 (1997) 113-121
35. Brange J, Andersen L, Laursen ED, Meyn G, Rasmussen E: Toward understanding insulin fibrillation. *J Pharm Sci* 86 (1997) 517-525
36. Ling Z, Heimberg H, Foriers A, Schuit F, Pipeleers D: Differential expression of rat insulin I and II messenger ribonucleic acid after prolonged exposure of islet beta-cells to elevated glucose levels. *Endocrinology* 139 (1998) 491-495
37. Bergsten P: Role of oscillations in membrane potential, cytoplasmic Ca²⁺, and metabolism for plasma insulin oscillations. *Diabetes* 51 Suppl 1 (2002) S171-176
38. Westerlund J, Bergsten P: Glucose metabolism and pulsatile insulin release from isolated islets. *Diabetes* 50 (2001) 1785-1790
39. Peschke E, Peschke D: Evidence for a circadian rhythm of insulin release from perfused rat pancreatic islets. *Diabetologia* 41 (1998) 1085-1092
40. Weinert D, Schuh J, Ulrich F: Tagesrhythmen der Plasmainsulinkonzentration in verschiedenen Ontogenesestadien. *Wiss. Z. Univ. Halle XXXVIII* (1989) 131-144
41. Weinert D, Ulrich FE, Schuh J: [Ontogenetic changes in the circadian rhythm of plasma insulin and its correlation to food intake]. *Biomed Biochim Acta* 46 (1987) 387-395
42. Weinert D, Ulrich FE, Schuh J: [Desynchronization of the circadian rhythm of plasma insulin levels and feeding schedules after inversion of periodicity]. *Biomed Biochim Acta* 45 (1986) 1135-1140
43. Rutter GA: Nutrient-secretion coupling in the pancreatic islet beta-cell: recent advances. *Mol Aspects Med* 22 (2001) 247-284
44. Johnson JH, Ogawa A, Chen L, Orci L, Newgard CB, Alam T, Unger RH: Underexpression of beta cell high Km glucose transporters in noninsulin-dependent diabetes. *Science* 250 (1990) 546-549
45. Trus MD, Zawulich WS, Burch PT, Berner DK, Weill VA, Matschinsky FM: Regulation of glucose metabolism in pancreatic islets. *Diabetes* 30 (1981) 911-922
46. Ueda K, Matsuo M, Tanabe K, Morita K, Kioka N, Amachi T: Comparative aspects of the function and mechanism of SUR1 and MDR1 proteins. *Biochim Biophys Acta* 1461 (1999) 305-313

47. Shibasaki T, Sunaga Y, Fujimoto K, Kashima Y, Seino S: Interaction of ATP sensor, cAMP sensor, Ca²⁺ sensor, and voltage-dependent Ca²⁺ channel in insulin granule exocytosis. *J Biol Chem* 279 (2004) 7956-7961
48. Pandini G, Conte E, Medico E, Sciacca L, Vigneri R, Belfiore A: IGF-II binding to insulin receptor isoform A induces a partially different gene expression profile from insulin binding. *Ann N Y Acad Sci* 1028 (2004) 450-456
49. Denley A, Brierley GV, Carroll JM, Lindenberg A, Booker GW, Cosgrove LJ, Wallace JC, Forbes BE, Roberts CT, Jr.: Differential activation of insulin receptor isoforms by insulin-like growth factors is determined by the C domain. *Endocrinology* 147 (2006) 1029-1036
50. Fakhrai-Rad H, Nikoshkov A, Kamel A, Fernstrom M, Zierath JR, Norgren S, Luthman H, Galli J: Insulin-degrading enzyme identified as a candidate diabetes susceptibility gene in GK rats. *Hum Mol Genet* 9 (2000) 2149-2158
51. Duckworth WC: Insulin degradation: mechanisms, products, and significance. *Endocr Rev* 9 (1988) 319-345
52. Waldhäusl WK, Roden M: *Diabetes mellitus Typ 2: Ätiologie und Pathogenese*. Berlin, Springer Verlag, 2004
53. Creemers JW, Jackson RS, Hutton JC: Molecular and cellular regulation of prohormone processing. *Semin Cell Dev Biol* 9 (1998) 3-10
54. Narendran P, Mannering SI, Harrison LC: Proinsulin-a pathogenic autoantigen in type 1 diabetes. *Autoimmun Rev* 2 (2003) 204-210
55. Akiyama H, Yokono K, Shii K, Ogawa W, Taniguchi H, Baba S, Kasuga M: Natural regulatory mechanisms of insulin degradation by insulin degrading enzyme. *Biochem Biophys Res Commun* 170 (1990) 1325-1330
56. Duckworth WC, Bennett RG, Hamel FG: Insulin degradation: progress and potential. *Endocr Rev* 19 (1998) 608-624
57. Waldhäusl WK, Bratusch-Marrain P, Kruse V, Jensen I, Nowotny P, Vierhapper H: Effect of insulin antibodies on insulin pharmacokinetics and glucose utilization in insulin-dependent diabetic patients. *Diabetes* 34 (1985) 166-173
58. Hürter P, Danne T: *Diabetes bei Kindern und Jugendlichen*. Berlin, Springer Verlag, 2005
59. Zimmet P: The burden of type 2 diabetes: are we doing enough? *Diabetes Metab* 29 (2003) 6S9-18
60. Frese T, Sandholzer H, Voigt S, Voigt R: Epidemiology of diabetes mellitus in German general practitioners' consultation--results of the SESAM 2-study. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 116 (2008) 326-328

61. Diabetes, Epidemiology, Research, International, Group: Secular trends in incidence of childhood IDDM in 10 countries. *Diabetes* 39 (1990) 858-864
62. Dittrich HM, Hahn von Dorsche H: [The anatomical and histological investigation of the pancreas in the 19th century and till the discovery of insulin (1921). 2. The pancreas research from the discovery of islets (1869) till the discovery of pancreas-diabetes (1889) (author's transl)]. *Anat Anz* 143 (1978) 231-241
63. Hunt CE, Lindsey JR, Walkley SU: Animal models of diabetes and obesity, including the PBB/Ld mouse. *Fed Proc* 35 (1976) 1206-1217
64. Rees DA, Alcolado JC: Animal models of diabetes mellitus. *Diabet Med* 22 (2005) 359-370
65. Szkudelski T: The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas. *Physiol Res* 50 (2001) 537-546
66. Malaisse WJ, Courtois P, Scott FW: Insulin-dependent diabetes and gut dysfunction: the BB rat model. *Horm Metab Res* 36 (2004) 585-594
67. Kikutani H, Makino S: The murine autoimmune diabetes model: NOD and related strains. *Adv Immunol* 51 (1992) 285-322
68. Jörns A, Kubat B, Tiedge M, Wedekind D, Hedrich HJ, Kloppel G, Lenzen S: Pathology of the pancreas and other organs in the diabetic LEW.1AR1/Ztm- iddm rat, a new model of spontaneous insulin-dependent diabetes mellitus. *Virchows Arch* 444 (2004) 183-189
69. Joshi RL, Lamothe B, Bucchini D, Jami J: Genetically engineered mice as animal models for NIDDM. *FEBS Lett* 401 (1997) 99-103
70. Shafrir E, Gutman A: *Psammomys obesus* of the Jerusalem colony: a model for nutritionally induced, non-insulin-dependent diabetes. *J Basic Clin Physiol Pharmacol* 4 (1993) 83-99
71. Jörns A, Tiedge M, Ziv E, Shafrir E, Lenzen S: Gradual loss of pancreatic beta-cell insulin, glucokinase and GLUT2 glucose transporter immunoreactivities during the time course of nutritionally induced type-2 diabetes in *Psammomys obesus* (sand rat). *Virchows Arch* 440 (2002) 63-69
72. Goto Y, Kakizaki M: The Spontaneous-Diabetes Rat: A Model of Noninsulin Dependent Diabetes Mellitus. *Proc Japan Acad.* 57 (1981) 381-384
73. Goto Y, Kakizaki M, Masaki N: Production of spontaneous diabetic rats by repetition of selective breeding. *Tohoku J Exp Med* 119 (1976) 85-90
74. Goto Y, Suzuki K, Ono T, Sasaki M, Toyota T: Development of diabetes in the non-obese NIDDM rat (GK rat). *Adv Exp Med Biol* 246 (1988) 29-31

75. Giroix MH, Vesco L, Portha B: Functional and metabolic perturbations in isolated pancreatic islets from the GK rat, a genetic model of noninsulin-dependent diabetes. *Endocrinology* 132 (1993) 815-822
76. Bisbis S, Bailbe D, Tormo MA, Picarel-Blanchot F, Derouet M, Simon J, Portha B: Insulin resistance in the GK rat: decreased receptor number but normal kinase activity in liver. *Am J Physiol* 265 (1993) E807-813
77. Gauguier D, Nelson I, Bernard C, Parent V, Marsac C, Cohen D, Froguel P: Higher maternal than paternal inheritance of diabetes in GK rats. *Diabetes* 43 (1994) 220-224
78. Gill-Randall RJ, Adams D, Ollerton RL, Alcolado JC: Is human Type 2 diabetes maternally inherited? Insights from an animal model. *Diabet Med* 21 (2004) 759-762
79. Suzuki K, Yen-Chung H, Toyota T, Goto Y, Hirata Y, Okada K: The significance of nerve sugar levels for the peripheral nerve impairment of spontaneously diabetic GK (Goto-Kakizaki) rats. *Diabetes Res* 14 (1990) 21-25
80. Yagihashi S, Tonosaki A, Yamada K, Kakizaki M, Goto Y: Peripheral neuropathy in selectively-inbred spontaneously diabetic rats: electrophysiological, morphometrical and freeze-replica studies. *Tohoku J Exp Med* 138 (1982) 39-48
81. Yagihashi S, Goto Y, Kakizaki M, Kaseda N: Thickening of glomerular basement membrane in spontaneously diabetic rats. *Diabetologia* 15 (1978) 309-312
82. Karasek M: Melatonin in humans-where we are 40 years after its discovery. *Neuroendocrinol Lett* 20 (1999) 179-188
83. Bergstrom WH, Hakanson DO: Melatonin: the dark force. *Adv Pediatr* 45 (1998) 91-106
84. Hardeland R, Fuhrberg B, Uria H, Behrmann G, Meyer TJ, Burkhardt S, Poeggeler B: Chronobiology of indoleamines in the dinoflagellate *Gonyaulax polyedra*: metabolism and effects related to circadian rhythmicity and photoperiodism. *Braz J Med Biol Res* 29 (1996) 119-123
85. Gutierrez CI, Urbina M, Obregon F, Glykys J, Lima L: Characterization of tryptophan high affinity transport system in pinealocytes of the rat. Day-night modulation. *Amino Acids* 25 (2003) 95-105
86. Lovenberg W, Jequier E, Sjoerdsma A: Tryptophan hydroxylation: measurement in pineal gland, brainstem, and carcinoid tumor. *Science* 155 (1967) 217-219
87. Sakowski SA, Geddes TJ, Thomas DM, Levi E, Hatfield JS, Kuhn DM: Differential tissue distribution of tryptophan hydroxylase isoforms 1 and 2 as revealed with monospecific antibodies. *Brain Res* 1085 (2006) 11-18
88. Walther DJ, Bader M: A unique central tryptophan hydroxylase isoform. *Biochem Pharmacol* 66 (2003) 1673-1680
89. Patel PD, Pontrello C, Burke S: Robust and tissue-specific expression of TPH2 versus TPH1 in rat raphe and pineal gland. *Biol Psychiatry* 55 (2004) 428-433

90. Sugden D: Comparison of circadian expression of tryptophan hydroxylase isoform mRNAs in the rat pineal gland using real-time PCR. *J Neurochem* 86 (2003) 1308-1311
91. Ehret M, Pevet P, Maitre M: Tryptophan hydroxylase synthesis is induced by 3',5'-cyclic adenosine monophosphate during circadian rhythm in the rat pineal gland. *J Neurochem* 57 (1991) 1516-1521
92. Shibuya H, Toru M, Watanabe S: A circadian rhythm of tryptophan hydroxylase in rat pineals. *Brain Res* 138 (1977) 364-368
93. Sitaram BR, Lees GJ: Diurnal rhythm and turnover of tryptophan hydroxylase in the pineal gland of the rat. *J Neurochem* 31 (1978) 1021-1026
94. Deguchi T, Barchas J: Effect of p-chlorophenylalanine on tryptophan hydroxylase in rat pineal. *Nat New Biol* 235 (1972) 92-93
95. Lovenberg W, Weissbach H, Udenfriend S: Aromatic L-amino acid decarboxylase. *J Biol Chem* 237 (1962) 89-93
96. Snyder SH, Axelrod J: A Sensitive Assay For 5-Hydroxytryptophan Decarboxylase. *Biochem Pharmacol* 13 (1964) 805-806
97. King TS, Steinlechner S, Steger RW: Comparison of diurnal and nocturnal rates of 5-hydroxytryptamine turnover in the rat mediobasal hypothalamus. *Experientia* 41 (1985) 417-419
98. Snyder SH, Axelrod J, Wurtman RJ, Fischer JE: Control Of 5-Hydroxytryptophan Decarboxylase Activity In The Rat Pineal Gland By Sympathetic Nerves. *J Pharmacol Exp Ther* 147 (1965) 371-375
99. Snyder SH, Axelrod J, Zweig M: Circadian rhythm in the serotonin content of the rat pineal gland: regulating factors. *J Pharmacol Exp Ther* 158 (1967) 206-213
100. Weissbach H, Redfield BG, Axelrod J: Biosynthesis of melatonin: enzymic conversion of serotonin to N-acetylserotonin. *Biochim Biophys Acta* 43 (1960) 352-353
101. Voisin P, Namboodiri MA, Klein DC: Arylamine N-acetyltransferase and arylalkylamine N-acetyltransferase in the mammalian pineal gland. *J Biol Chem* 259 (1984) 10913-10918
102. Miguez JM, Simonneaux V, Pevet P: The role of the intracellular and extracellular serotonin in the regulation of melatonin production in rat pinealocytes. *J Pineal Res* 23 (1997) 63-71
103. Klein DC, Weller JL: Indole metabolism in the pineal gland: a circadian rhythm in N-acetyltransferase. *Science* 169 (1970) 1093-1095
104. Borjigin J, Wang MM, Snyder SH: Diurnal variation in mRNA encoding serotonin N-acetyltransferase in pineal gland. *Nature* 378 (1995) 783-785
105. Roseboom PH, Coon SL, Baler R, McCune SK, Weller JL, Klein DC: Melatonin synthesis: analysis of the more than 150-fold nocturnal increase in serotonin N-

- acetyltransferase messenger ribonucleic acid in the rat pineal gland. *Endocrinology* 137 (1996) 3033-3045
106. Gastel JA, Roseboom PH, Rinaldi PA, Weller JL, Klein DC: Melatonin production: proteasomal proteolysis in serotonin N-acetyltransferase regulation. *Science* 279 (1998) 1358-1360
 107. Garidou ML, Bartol I, Calgari C, Pevet P, Simonneaux V: In vivo observation of a non-noradrenergic regulation of arylalkylamine N-acetyltransferase gene expression in the rat pineal complex. *Neuroscience* 105 (2001) 721-729
 108. Coon SL, Del Olmo E, Young WS, 3rd, Klein DC: Melatonin synthesis enzymes in *Macaca mulatta*: focus on arylalkylamine N-acetyltransferase (EC 2.3.1.87). *J Clin Endocrinol Metab* 87 (2002) 4699-4706
 109. Coon SL, Mazuruk K, Bernard M, Roseboom PH, Klein DC, Rodriguez IR: The human serotonin N-acetyltransferase (EC 2.3.1.87) gene (AANAT): structure, chromosomal localization, and tissue expression. *Genomics* 34 (1996) 76-84
 110. Burke Z, Wells T, Carter D, Klein D, Baler R: Genetic targeting: the serotonin N-acetyltransferase promoter imparts circadian expression selectively in the pineal gland and retina of transgenic rats. *J Neurochem* 73 (1999) 1343-1349
 111. Chen W, Baler R: The rat arylalkylamine N-acetyltransferase E-box: differential use in a master vs. a slave oscillator. *Brain Res Mol Brain Res* 81 (2000) 43-50
 112. Klein DC, Coon SL, Roseboom PH, Weller JL, Bernard M, Gastel JA, Zatz M, Iuvone PM, Rodriguez IR, Begay V, Falcon J, Cahill GM, Cassone VM, Baler R: The melatonin rhythm-generating enzyme: molecular regulation of serotonin N-acetyltransferase in the pineal gland. *Recent Prog Horm Res* 52 (1997) 307-357; discussion 357-308
 113. Stehle JH, von Gall C, Schomerus C, Korf HW: Of rodents and ungulates and melatonin: creating a uniform code for darkness by different signaling mechanisms. *J Biol Rhythms* 16 (2001) 312-325
 114. Namboodiri MA, Favilla JT, Klein DC: Pineal N-acetyltransferase is inactivated by disulfide-containing peptides: insulin is the most potent. *Science* 213 (1981) 571-573
 115. Balemans MG, Bary FA, Legerstee WC, van Benthem J: Estimation of the methylating capacity in the pineal gland of the rat with special reference to the methylation of N-acetylserotonin and 5-hydroxytryptophol separately. *Experientia* 34 (1978) 1434-1435
 116. Balemans MG, Noordegraaf EM, Bary FA, van Berlo MF: Estimation of the methylating capacity of the pineal gland. With special reference to indole metabolism. *Experientia* 34 (1978) 887-888
 117. Axelrod J, Weissbach H: Enzymatic O-methylation of N-acetylserotonin to melatonin. *Science* 131 (1960) 1312

118. Axelrod J, Weissbach H: Purification and properties of hydroxyindole-O-methyl transferase. *J Biol Chem* 236 (1961) 211-213
119. Baldessarini RJ, Kopin IJ: S-adenosylmethionine in brain and other tissues. *J Neurochem* 13 (1966) 769-777
120. Ribelayga C, Pevet P, Simonneaux V: Adrenergic and peptidergic regulations of hydroxyindole-O-methyltransferase activity in rat pineal gland. *Brain Res* 777 (1997) 247-250
121. Ribelayga C, Gauer F, Calgari C, Pevet P, Simonneaux V: Photoneural regulation of rat pineal hydroxyindole-O-methyltransferase (HIOMT) messenger ribonucleic acid expression: an analysis of its complex relationship with HIOMT activity. *Endocrinology* 140 (1999) 1375-1384
122. Pandi-Perumal SR, Srinivasan V, Maestroni GJ, Cardinali DP, Poeggeler B, Hardeland R: Melatonin: Nature's most versatile biological signal? *Febs J* 273 (2006) 2813-2838
123. Simonneaux V, Ribelayga C: Generation of the melatonin endocrine message in mammals: a review of the complex regulation of melatonin synthesis by norepinephrine, peptides, and other pineal transmitters. *Pharmacol Rev* 55 (2003) 325-395
124. Reppert SM: Melatonin receptors: molecular biology of a new family of G protein-coupled receptors. *J Biol Rhythms* 12 (1997) 528-531
125. Kokkola T, Laitinen JT: Melatonin receptor genes. *Ann Med* 30 (1998) 88-94
126. Peschke E, Fauteck JD, Musshoff U, Schmidt F, Beckmann A, Peschke D: Evidence for a melatonin receptor within pancreatic islets of neonate rats: functional, autoradiographic, and molecular investigations. *J Pineal Res* 28 (2000) 156-164
127. Peschke E, Mühlbauer E, Musshoff U, Csernus VJ, Chankiewicz E, Peschke D: Receptor (MT(1)) mediated influence of melatonin on cAMP concentration and insulin secretion of rat insulinoma cells INS-1. *J Pineal Res* 33 (2002) 63-71
128. Mühlbauer E, Peschke E: 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 (2007) 105-106
129. Bach AG, Wolgast S, Mühlbauer E, Peschke E: Melatonin stimulates inositol-1,4,5-trisphosphate and Ca²⁺ release from INS1 insulinoma cells. *J Pineal Res* 39 (2005) 316-323
130. Guerrero HY, Gauer F, Schuster C, Pevet P, Masson-Pevet M: Melatonin regulates the mRNA expression of the mt(1) melatonin receptor in the rat Pars tuberalis. *Neuroendocrinology* 71 (2000) 163-169
131. von Gall C, Stehle JH, Weaver DR: Mammalian melatonin receptors: molecular biology and signal transduction. *Cell Tissue Res* 309 (2002) 151-162

132. Boutin JA, Marcheteau E, Hennig P, Moulharat N, Berger S, Delagrangre P, Bouchet JP, Ferry G: MT3/QR2 melatonin binding site does not use melatonin as a substrate or a co-substrate. *J Pineal Res* 45 (2008) 524-531
133. Nosjean O, Ferro M, Coge F, Beauverger P, Henlin JM, Lefoulon F, Fauchere JL, Delagrangre P, Canet E, Boutin JA: Identification of the melatonin-binding site MT3 as the quinone reductase 2. *J Biol Chem* 275 (2000) 31311-31317
134. Nosjean O, Nicolas JP, Klupsch F, Delagrangre P, Canet E, Boutin JA: Comparative pharmacological studies of melatonin receptors: MT1, MT2 and MT3/QR2. Tissue distribution of MT3/QR2. *Biochem Pharmacol* 61 (2001) 1369-1379
135. Macias M, Escames G, Leon J, Coto A, Sbihi Y, Osuna A, Acuna-Castroviejo D: Calreticulin-melatonin. An unexpected relationship. *Eur J Biochem* 270 (2003) 832-840
136. Smirnov AN: Nuclear melatonin receptors. *Biochemistry (Mosc)* 66 (2001) 19-26
137. Carlberg C: Gene regulation by melatonin. *Ann N Y Acad Sci* 917 (2000) 387-396
138. Hardeland R: New actions of melatonin and their relevance to biometeorology. *Int J Biometeorol* 41 (1997) 47-57
139. Hardeland R, Behrmann G, Fuhrberg B, Poeggeler B, Burkhardt S, Uria H, Obst B: Evolutionary aspects of indoleamines as radical scavengers. Presence and photocatalytic turnover of indoleamines in a unicell, *Gonyaulax polyedra*. *Adv Exp Med Biol* 398 (1996) 279-284
140. Macchi MM, Bruce JN: Human pineal physiology and functional significance of melatonin. *Front Neuroendocrinol* 25 (2004) 177-195
141. Carrillo-Vico A, Guerrero JM, Lardone PJ, Reiter RJ: A review of the multiple actions of melatonin on the immune system. *Endocrine* 27 (2005) 189-200
142. Peschke E, Peschke D, Hammer T, Csernus V: Influence of melatonin and serotonin on glucose-stimulated insulin release from perfused rat pancreatic islets in vitro. *J Pineal Res* 23 (1997) 156-163
143. Nishida S, Segawa T, Murai I, Nakagawa S: Long-term melatonin administration reduces hyperinsulinemia and improves the altered fatty-acid compositions in type 2 diabetic rats via the restoration of Delta-5 desaturase activity. *J Pineal Res* 32 (2002) 26-33
144. Vaughan GM, Mason AD, Jr., Reiter RJ: Serum melatonin after a single aqueous subcutaneous injection in Syrian hamsters. *Neuroendocrinology* 42 (1986) 124-127
145. Yeleswaram K, McLaughlin LG, Knipe JO, Schabdach D: Pharmacokinetics and oral bioavailability of exogenous melatonin in preclinical animal models and clinical implications. *J Pineal Res* 22 (1997) 45-51
146. Gibbs FP, Vriend J: The half-life of melatonin elimination from rat plasma. *Endocrinology* 109 (1981) 1796-1798

147. Aldhous M, Franey C, Wright J, Arendt J: Plasma concentrations of melatonin in man following oral absorption of different preparations. *Br J Clin Pharmacol* 19 (1985) 517-521
148. Chan MY, Pang SF, Tang PL, Brown GM: Studies on the kinetics of melatonin and N-acetylserotonin in the rat at mid-light and mid-dark. *J Pineal Res* 1 (1984) 227-236
149. Csernus VJ, Hammer T, Peschke D, Peschke E: Dynamic insulin secretion from perfused rat pancreatic islets. *Cell Mol Life Sci* 54 (1998) 733-743
150. Pfaffl MW: A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 29 (2001) e45
151. Pfaffl MW, Horgan GW, Dempfle L: Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Res* 30 (2002) e36
152. Kim JH, Nishina PM, Naggert JK: Genetic models for non insulin dependent diabetes mellitus in rodents. *J Basic Clin Physiol Pharmacol* 9 (1998) 325-345
153. Ohneda M, Johnson JH, Lee YH, Nagasawa Y, Unger RH: Post-GLUT-2 defects in beta-cells of non-insulin-dependent diabetic obese rats. *Am J Physiol* 267 (1994) E968-974
154. Fujimoto Y, Donahue EP, Shiota M: Defect in glucokinase translocation in Zucker diabetic fatty rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 287 (2004) E414-423
155. Codina J, Vall M, Herrera E: Comparative changes with age of the fasting response in circulating ketone bodies, glucose and insulin and oral glucose tolerance test in the rat. *Comp Biochem Physiol A* 71 (1982) 231-236
156. Madar I, Sildan N, Ilonca A: Age-dependent glucose tolerance in young rats under normal conditions and under glucocorticoid administration. *Endocrinologie* 22 (1984) 113-116
157. Portha B, Giroix MH, Serradas P, Gangnerau MN, Movassat J, Rajas F, Bailbe D, Plachot C, Mithieux G, Marie JC: beta-cell function and viability in the spontaneously diabetic GK rat: information from the GK/Par colony. *Diabetes* 50 Suppl 1 (2001) S89-93
158. Miralles F, Portha B: Early development of beta-cells is impaired in the GK rat model of type 2 diabetes. *Diabetes* 50 Suppl 1 (2001) S84-88
159. Picarel-Blanchot F, Berthelie C, Bailbe D, Portha B: Impaired insulin secretion and excessive hepatic glucose production are both early events in the diabetic GK rat. *Am J Physiol* 271 (1996) E755-762
160. Tourrel C, Bailbe D, Lacorne M, Meile MJ, Kergoat M, Portha B: Persistent improvement of type 2 diabetes in the Goto-Kakizaki rat model by expansion of the

- beta-cell mass during the prediabetic period with glucagon-like peptide-1 or exendin-4. *Diabetes* 51 (2002) 1443-1452
161. Karamohamed S, Demissie S, Volcjak J, Liu C, Heard-Costa N, Liu J, Shoemaker CM, Panhuysen CI, Meigs JB, Wilson P, Atwood LD, Cupples LA, Herbert A: Polymorphisms in the insulin-degrading enzyme gene are associated with type 2 diabetes in men from the NHLBI Framingham Heart Study. *Diabetes* 52 (2003) 1562-1567
 162. Johnson JH, Newgard CB, Milburn JL, Lodish HF, Thorens B: The high Km glucose transporter of islets of Langerhans is functionally similar to the low affinity transporter of liver and has an identical primary sequence. *J Biol Chem* 265 (1990) 6548-6551
 163. Bell GI, Pilkis SJ, Weber IT, Polonsky KS: Glucokinase mutations, insulin secretion, and diabetes mellitus. *Annu Rev Physiol* 58 (1996) 171-186
 164. Jonas JC, Sharma A, Hasenkamp W, Ilkova H, Patane G, Laybutt R, Bonner-Weir S, Weir GC: Chronic hyperglycemia triggers loss of pancreatic beta cell differentiation in an animal model of diabetes. *J Biol Chem* 274 (1999) 14112-14121
 165. Jörns A, Tiedge M, Sickel E, Lenzen S: Loss of GLUT2 glucose transporter expression in pancreatic beta cells from diabetic Chinese hamsters. *Virchows Arch* 428 (1996) 177-185
 166. Ohneda M, Johnson JH, Inman LR, Chen L, Suzuki K, Goto Y, Alam T, Ravazzola M, Orci L, Unger RH: GLUT2 expression and function in beta-cells of GK rats with NIDDM. Dissociation between reductions in glucose transport and glucose-stimulated insulin secretion. *Diabetes* 42 (1993) 1065-1072
 167. Cockburn BN, Ostrega DM, Sturis J, Kubstrup C, Polonsky KS, Bell GI: Changes in pancreatic islet glucokinase and hexokinase activities with increasing age, obesity, and the onset of diabetes. *Diabetes* 46 (1997) 1434-1439
 168. Hosokawa H, Hosokawa YA, Leahy JL: Upregulated hexokinase activity in isolated islets from diabetic 90% pancreatectomized rats. *Diabetes* 44 (1995) 1328-1333
 169. Ostenson CG, Khan A, Abdel-Halim SM, Guenifi A, Suzuki K, Goto Y, Efendic S: Abnormal insulin secretion and glucose metabolism in pancreatic islets from the spontaneously diabetic GK rat. *Diabetologia* 36 (1993) 3-8
 170. Ling ZC, Hong-Lie C, Ostenson CG, Efendic S, Khan A: Hyperglycemia contributes to impaired insulin response in GK rat islets. *Diabetes* 50 Suppl 1 (2001) S108-112
 171. Toyoda Y, Miwa I, Kamiya M, Ogiso S, Nonogaki T, Aoki S, Okuda J: Evidence for glucokinase translocation by glucose in rat hepatocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 204 (1994) 252-256

172. Toyoda Y, Tsuchida A, Iwami E, Shironoguchi H, Miwa I: Regulation of hepatic glucose metabolism by translocation of glucokinase between the nucleus and the cytoplasm in hepatocytes. *Horm Metab Res* 33 (2001) 329-336
173. Noma Y, Bonner-Weir S, Latimer JB, Davalli AM, Weir GC: Translocation of glucokinase in pancreatic beta-cells during acute and chronic hyperglycemia. *Endocrinology* 137 (1996) 1485-1491
174. Tiedge M, Steffek H, Elsner M, Lenzen S: Metabolic regulation, activity state, and intracellular binding of glucokinase in insulin-secreting cells. *Diabetes* 48 (1999) 514-523
175. Rizzo MA, Magnuson MA, Drain PF, Piston DW: A functional link between glucokinase binding to insulin granules and conformational alterations in response to glucose and insulin. *J Biol Chem* 277 (2002) 34168-34175
176. Allaman-Pillet N, Roudot R, Oberson A, Abdelli S, Ruiz J, Beckmann JS, Schorderet DF, Bonny C: Circadian regulation of islet genes involved in insulin production and secretion. *Mol Cell Endocrinol* 226 (2004) 59-66
177. Iynedjian PB, Gjinovci A, Renold AE: Stimulation by insulin of glucokinase gene transcription in liver of diabetic rats. *J Biol Chem* 263 (1988) 740-744
178. Sibrowski W, Staegemann U, Seitz HJ: Accelerated turnover of hepatic glucokinase in starved and streptozotocin-diabetic rat. *Eur J Biochem* 127 (1982) 571-574
179. Malherbe C, De Gasparo M, De Hertogh R, Hoet JJ: Circadian variations of blood sugar and plasma insulin levels in man. *Diabetologia* 5 (1969) 397-404
180. Ohara-Imaizumi M, Nishiwaki C, Kikuta T, Nagai S, Nakamichi Y, Nagamatsu S: TIRF imaging of docking and fusion of single insulin granule motion in primary rat pancreatic beta-cells: different behaviour of granule motion between normal and Goto-Kakizaki diabetic rat beta-cells. *Biochem J* 381 (2004) 13-18
181. Abdel-Halim SM, Guenifi A, He B, Yang B, Mustafa M, Hojberg B, Hillert J, Bakhiet M, Efendic S: Mutations in the promoter of adenylyl cyclase (AC)-III gene, overexpression of AC-III mRNA, and enhanced cAMP generation in islets from the spontaneously diabetic GK rat model of type 2 diabetes. *Diabetes* 47 (1998) 498-504
182. Guenifi A, Abdel-Halim SM: Glucose enhances adenylyl cyclase responses in normal but not diabetic GK rat islets. *Pancreas* 22 (2001) 65-68
183. O'Brien IA, Lewin IG, O'Hare JP, Arendt J, Corrall RJ: Abnormal circadian rhythm of melatonin in diabetic autonomic neuropathy. *Clin Endocrinol (Oxf)* 24 (1986) 359-364
184. Tutuncu NB, Batur MK, Yildirim A, Tutuncu T, Deger A, Koray Z, Erbas B, Kabakci G, Aksoyek S, Erbas T: Melatonin levels decrease in type 2 diabetic patients with cardiac autonomic neuropathy. *J Pineal Res* 39 (2005) 43-49

185. Sugden D: Circadian change in rat pineal tryptophan content: lack of correlation with serum tryptophan. *J Neurochem* 33 (1979) 811-813
186. Zimmermann RC, McDougle CJ, Schumacher M, Olcese J, Mason JW, Hening GR, Price LH: Effects of acute tryptophan depletion on nocturnal melatonin secretion in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 76 (1993) 1160-1164
187. Manjarrez-Gutierrez G, Rocio Herrera-Marquez JR, Bueno-Santoyo S, Gonzalez-Ramirez M, Hernandez J: [Changes in brain serotonin biosynthesis in rats with diabetes mellitus induced by streptozocin: effect of insulin treatment]. *Rev Invest Clin* 52 (2000) 509-516
188. Manjarrez-Gutierrez G, Herrera-Marquez JR, Molina-Hernandez A, Bueno-Santoyo S, Gonzalez-Ramirez M, Hernandez J: [Changes in cerebra serotonin synthesis induced by insulin-dependent diabetes mellitus]. *Rev Invest Clin* 51 (1999) 293-302
189. Fernstrom JD, Larin F, Wurtman RJ: Daily variations in the concentrations of individual amino acids in rat plasma. *Life Sci* 10 (1971) 813-819
190. Johansen PA, Jennings I, Cotton RG, Kuhn DM: Tryptophan hydroxylase is phosphorylated by protein kinase A. *J Neurochem* 65 (1995) 882-888
191. Wang L, Erlandsen H, Haavik J, Knappskog PM, Stevens RC: Three-dimensional structure of human tryptophan hydroxylase and its implications for the biosynthesis of the neurotransmitters serotonin and melatonin. *Biochemistry* 41 (2002) 12569-12574
192. Noguchi T, Nishino M, Kido R: Tryptophan 5-hydroxylase in rat intestine. *Biochem J* 131 (1973) 375-380
193. Fitzpatrick PF: Tetrahydropterin-dependent amino acid hydroxylases. *Annu Rev Biochem* 68 (1999) 355-381
194. Okumura M, Masada M, Yoshida Y, Shintaku H, Hosoi M, Okada N, Konishi Y, Morikawa T, Miura K, Imanishi M: Decrease in tetrahydrobiopterin as a possible cause of nephropathy in type II diabetic rats. *Kidney Int* 70 (2006) 471-476
195. Cai S, Khoo J, Mussa S, Alp NJ, Channon KM: Endothelial nitric oxide synthase dysfunction in diabetic mice: importance of tetrahydrobiopterin in eNOS dimerisation. *Diabetologia* 48 (2005) 1933-1940
196. Hamon CG, Cutler P, Blair JA: Tetrahydrobiopterin metabolism in the streptozotocin induced diabetic state in rats. *Clin Chim Acta* 181 (1989) 249-253
197. Bitar MS, Wahid S, Mustafa S, Al-Saleh E, Dhaunsi GS, Al-Mulla F: Nitric oxide dynamics and endothelial dysfunction in type II model of genetic diabetes. *Eur J Pharmacol* 511 (2005) 53-64
198. Flatmark T: Catecholamine biosynthesis and physiological regulation in neuroendocrine cells. *Acta Physiol Scand* 168 (2000) 1-17

199. Pietraszek MH, Takada Y, Takada A, Fujita M, Watanabe I, Taminato A, Yoshimi T: Blood serotonergic mechanisms in type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus. *Thromb Res* 66 (1992) 765-774
200. Vakov L: [Basal blood level of serotonin in diabetes mellitus patients]. *Vutr Boles* 23 (1984) 79-84
201. Sandrini M, Vitale G, Vergoni AV, Ottani A, Bertolini A: Streptozotocin-induced diabetes provokes changes in serotonin concentration and on 5-HT_{1A} and 5-HT₂ receptors in the rat brain. *Life Sci* 60 (1997) 1393-1397
202. Kino M, Yamato T, Aomine M: Simultaneous measurement of nitric oxide, blood glucose, and monoamines in the hippocampus of diabetic rat: an in vivo microdialysis study. *Neurochem Int* 44 (2004) 65-73
203. Shikimi T, Inagaki C: Inhibitory effects of D-isomers of aromatic amino acids on the decarboxylation of L-5-hydroxytryptophan. *Jpn J Pharmacol* 28 (1978) 162-165
204. Peschke E, Frese T, Chankiewicz E, Peschke D, Preiss U, Schneyer U, Spessert R, Mühlbauer E: 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 (2006) 135-143
205. Liu T, Borjigin J: N-acetyltransferase is not the rate-limiting enzyme of melatonin synthesis at night. *J Pineal Res* 39 (2005) 91-96
206. Correia S, Carvalho C, Santos MS, Proenca T, Nunes E, Duarte AI, Monteiro P, Seica R, Oliveira CR, Moreira PI: Metformin protects the brain against the oxidative imbalance promoted by type 2 diabetes. *Med Chem* 4 (2008) 358-364
207. Herichova I, Zeman M, Stebelova K, Ravingerova T: Effect of streptozotocin-induced diabetes on daily expression of per2 and dbp in the heart and liver and melatonin rhythm in the pineal gland of Wistar rat. *Mol Cell Biochem* 270 (2005) 223-229
208. Lunenfeld B: Aging men--challenges ahead. *Asian J Androl* 3 (2001) 161-168
209. Murialdo G, Fonzi S, Torre F, Costelli P, Solinas G, Tosca P, Di Paolo E, Porro S, Zerbi F, Polleri A: Effects of pyridostigmine, corticotropin-releasing hormone and growth hormone-releasing hormone on the pituitary-adrenal axis and on growth hormone secretion in dementia. *Neuropsychobiology* 28 (1993) 177-183
210. Diaz B, Blazquez E: Effect of pinealectomy on plasma glucose, insulin and glucagon levels in the rat. *Horm Metab Res* 18 (1986) 225-229
211. Mellado C, Rodriguez V, de Diego JG, Alvarez E, Blazquez E: Effect of pinealectomy and of diabetes on liver insulin and glucagon receptor concentrations in the rat. *J Pineal Res* 6 (1989) 295-306

212. Rodriguez V, Mellado C, Alvarez E, De Diego JG, Blazquez E: Effect of pinealectomy on liver insulin and glucagon receptor concentrations in the rat. *J Pineal Res* 6 (1989) 77-88
213. Benson B, Miller CW, Sorrentino S, Jr.: Effects of blinding on blood glucose and serum insulin-like activity in rats. *Tex Rep Biol Med* 29 (1971) 513-525
214. Csaba G, Barath P: Are Langerhan's islets influenced by the pineal body? *Experientia* 27 (1971) 962
215. Csaba G, Nagy SU: The regulatory role of the pineal gland on the thyroid gland, adrenal medulla and islets of Langerhans. *Acta Biol Med Ger* 31 (1973) 617-619
216. Gorray KC, Quay WB, Ewart RB: Effects of pinealectomy and pineal incubation medium and sonicates on insulin release by isolated pancreatic islets in vitro. *Horm Metab Res* 11 (1979) 432-436
217. Quay WB, Gorray KC: Pineal effects on metabolism and glucose homeostasis: evidence for lines of humoral mediation of pineal influences on tumor growth. *J Neural Transm* 47 (1980) 107-120
218. Boden G, Ruiz J, Urbain JL, Chen X: Evidence for a circadian rhythm of insulin secretion. *Am J Physiol* 271 (1996) E246-252
219. Rasmussen DD, Boldt BM, Wilkinson CW, Yellon SM, Matsumoto AM: Daily melatonin administration at middle age suppresses male rat visceral fat, plasma leptin, and plasma insulin to youthful levels. *Endocrinology* 140 (1999) 1009-1012
220. Wolden-Hanson T, Mitton DR, McCants RL, Yellon SM, Wilkinson CW, Matsumoto AM, Rasmussen DD: Daily melatonin administration to middle-aged male rats suppresses body weight, intraabdominal adiposity, and plasma leptin and insulin independent of food intake and total body fat. *Endocrinology* 141 (2000) 487-497
221. Lyssenko V, Nagorny CL, Erdos MR, Wierup N, Jonsson A, Spiegel 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 JG, Jackson AU, Laakso M, Marchetti P, Watanabe RM, Mulder H, Groop L: Common variant in MTNR1B associated with increased risk of type 2 diabetes and impaired early insulin secretion. *Nat Genet* 41 (2009) 82-88
222. Cagnacci A, Arangino S, Renzi A, Paoletti AM, Melis GB, Cagnacci P, Volpe A: Influence of melatonin administration on glucose tolerance and insulin sensitivity of postmenopausal women. *Clin Endocrinol (Oxf)* 54 (2001) 339-346
223. Feldman JM, Lebovitz HE: Structural determinants of indole amine action on in vitro insulin release. *Endocrinology* 91 (1972) 809-816

224. Bizot-Espiard JG, Double A, Cousin B, Lesieur D, Guardiola-Lemaitre B, Delagrangé P, Ktorza A, Penicaud L: Lack of melatonin effects on insulin action in normal rats. *Horm Metab Res* 30 (1998) 711-716
225. Frankel BJ, Strandberg MJ: Insulin release from isolated mouse islets in vitro: no effect of physiological levels of melatonin or arginine vasotocin. *J Pineal Res* 11 (1991) 145-148
226. Nishida S, Sato R, Murai I, Nakagawa S: Effect of pinealectomy on plasma levels of insulin and leptin and on hepatic lipids in type 2 diabetic rats. *J Pineal Res* 35 (2003) 251-256
227. Anhe GF, Caperuto LC, Pereira-Da-Silva M, Souza LC, Hirata AE, Velloso LA, Cipolla-Neto J, Carvalho CR: In vivo activation of insulin receptor tyrosine kinase by melatonin in the rat hypothalamus. *J Neurochem* 90 (2004) 559-566
228. Hussain SA, Khadim HM, Khalaf BH, Ismail SH, Hussein KI, Sahib AS: Effects of melatonin and zinc on glycemic control in type 2 diabetic patients poorly controlled with metformin. *Saudi Med J* 27 (2006) 1483-1488
229. Kadhim HM, Ismail SH, Hussein KI, Bakir IH, Sahib AS, Khalaf BH, Hussain SA: Effects of melatonin and zinc on lipid profile and renal function in type 2 diabetic patients poorly controlled with metformin. *J Pineal Res* 41 (2006) 189-193
230. Stebelova K, Herichova I, Zeman M: Diabetes induces changes in melatonin concentrations in peripheral tissues of rat. *Neuro Endocrinol Lett* 28 (2007) 159-165
231. Champney TH, Brainard GC, Richardson BA, Reiter RJ: Experimentally-induced diabetes reduces nocturnal pineal melatonin content in the Syrian hamster. *Comp Biochem Physiol A* 76 (1983) 199-201
232. Champney TH, Holtorf AP, Craft CM, Reiter RJ: Hormonal modulation of pineal melatonin synthesis in rats and Syrian hamsters: effects of streptozotocin-induced diabetes and insulin injections. *Comp Biochem Physiol A* 83 (1986) 391-395
233. Garcia RA, Afeche SC, Scialfa JH, do Amaral FG, dos Santos SH, Lima FB, Young ME, Cipolla-Neto J: Insulin modulates norepinephrine-mediated melatonin synthesis in cultured rat pineal gland. *Life Sci* 82 (2008) 108-114
234. Man JR, Rustaeus S, Price DM, Chik CL, Ho AK: Inhibition of p38 mitogen-activated protein kinase enhances adrenergic-stimulated arylalkylamine N-acetyltransferase activity in rat pinealocytes. *Endocrinology* 145 (2004) 1167-1174
235. Peschke E, Wolgast S, Bazwinsky I, Pönicke K, Mühlbauer E: Increased melatonin synthesis in pineal glands of rats in streptozotocin induced type 1 diabetes. *J Pineal Res* 45 (2008) 439-448

9 Thesen

1. GK-Ratten der Halle'schen Kolonie zeigen im Vergleich zu metabolisch gesunden Wistar-Ratten bereits in frühem Lebensalter Hyperglykämie und Hyperinsulinulinämie.
2. Bei GK-Ratten zeigt sich frühzeitig eine gestörte Glukose-stimulierte Insulinsekretion. Diese wird durch die verminderte Funktion des Glukosetransporters 2 und der Glucokinase in den pankreatischen β -Zellen mitverursacht.
3. Glukosetransporter 2- und Glucokinase-mRNA werden in pankreatischen β -Zellen von Wistar- und GK-Ratten circadian rhythmisch exprimiert.
4. GK-Ratten weisen eine Insulinresistenz auf.
5. Die durch Insulinsekretionsstörung, Insulinresistenz, gestörte Glukosetoleranz und Hyperglykämie charakterisierte Stoffwechselstörung von GK-Ratten ist altersabhängig progredient.
6. GK-Ratten sind ein geeignetes Tiermodell für den humanen Diabetes mellitus Typ 2.
7. Analog zur Situation in Typ 2 diabetischen Patienten zeigen in sich bei diabetischen GK-Ratten im Vergleich zu metabolisch gesunden Wistar-Ratten verringerte Melatoninplasmakonzentrationen.
8. Die in GK-Ratten verringerten Melatoninplasmakonzentrationen sind auf eine verminderte pineale Melatoninsynthese zurückzuführen.
9. Die verminderte pineale Melatoninsynthese resultiert nicht aus einem pinealen Tryptophanmangel. Sie lässt sich auf eine verminderte Aktivität des Enzyms Tryptophan 5-Hydroxylase zurückführen.
10. Verminderte Melatoninplasmakonzentrationen verschlechtern eine ohnehin diabetische Stoffwechsellage bei Typ 2 diabetischen Individuen.

10 Danksagung

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

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

Mein Dank gilt den Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Peschke, allen voran Herrn Prof. Dr. Peschke und Frau Prof. Dr. Peschke für die Überlassung des Themas und der stets umfangreichen persönlichen Unterstützung bei der Bearbeitung der Aufgabenstellungen.

Dank für eine engagierte Betreuung und hilfreiche Diskussion gilt ferner Dr. Eckhard Mühlbauer. Dr. Erik Chankiewitz und Dr. Andreas Bach haben mir die Arbeit durch konstruktive Hinweise erleichtert.

Für die geleistete technische Assistenz bei den Versuchsdurchführungen bedanke ich mich bei den Dr. Liudmila Litvak und Dr. Ivonne Bazwinsky sowie Frau Candy Rothgänger und Frau Annika Jordan.

11 Lebenslauf

- 20.10.1980 in Rodewisch / Vogtland geboren
- 01.09.1987 Einschulung in die Polytechnische Oberschule „Sigmund Jähn“ in Klingenthal
- 03.09.1992 Wechsel an das spätere Ski- und Wintersportgymnasium in Klingenthal
- 09.07.1999 Bestehen des Abiturs und Auszeichnung mit dem Hyroniemus-Wohlrab-Preis
- 01.09.1999 Grundwehrdienst mit Verwendung im Stabs- und Sanitätsdienst
- 10.10.2000 Aufnahme des Studiums der Humanmedizin an der Martin-Luther-Universität
- 22.09.2002 Bestehen der Ärztlichen Vorprüfung
- 01.11.2002 Beginn der Arbeiten zur Promotion
- 28.08.2003 Bestehen des ersten Teils der Ärztlichen Prüfung
- 04.06.2004 Sachkundenachweis nach §4 des Tierschutzgesetzes
- 05.09.2005 Bestehen des zweiten Abschnitts der Ärztlichen Prüfung
- 17.04.2006 Beginn des Praktischen Jahres am Krankenhaus der Paul-Gerhardt-Stiftung in Wittenberg (Unfallchirurgie, Kinderheilkunde, Innere Medizin)
- 24.04.2007 Bestehen des dritten Abschnitts der Ärztlichen Prüfung
- 25.04.2007 Erteilung der ärztlichen Approbation
- 01.05.2007 Beginn der der Weiterbildung zum Facharzt für Allgemein- und Innere Medizin am Kreiskrankenhaus Herzberg/Elster (Chirurgie)
- 01.11.2007 Fortführung der Weiterbildung am Vogtlandklinikum Plauen (Innere Medizin)
- 01.11.2008 Fortführung der Weiterbildung Praxis Professor Sandholzer (Allgemeinmedizin)

12 Selbständigkeitserklärung und Erklärung über Promotionsversuche

Hiermit erkläre ich an Eides Statt, dass ich die vorliegende Dissertation selbst und ohne die Hilfe Dritter verfasst habe. Die aus anderen Quellen wörtlich oder inhaltlich übernommenen Daten und Konzepte sind von mir als solche kenntlich gemacht. Ich versichere, dass für die inhaltliche Erstellung der vorliegenden Arbeit keine entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- und Beratungsdiensten (Promotionsberater oder anderen Personen) in Anspruch genommen wurde. Es sind von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorliegenden Dissertation stehen, geleistet worden. Diese Arbeit ist in gleicher oder ähnlicher Form noch keiner Prüfungsbehörde in In- oder Ausland vorgelegt worden.

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

Halle (Saale), 16.02.2009

Thomas Frese

13 Publikationen

13.1 Originalpublikationen

PESCHKE E, FRESE T, CHANKIEWITZ E, PESCHKE D, PREIß U, SCHNEYER U, SPESSERT R, MÜHLBAUER E. 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 Pin Res* 2006; 40:135-143.

FRESE T, BAZWINSKY I, MÜHLBAUER E, PESCHKE E. Circadian and age-dependent expression patterns of GLUT 2 and glucokinase in the pancreatic β -cell of diabetic and non-diabetic rats. *Horm Met Res* 2007; 39:567-574.

FRESE T, VOIGT R, VOIGT S, SANDHOLZER H. Epidemiology of Diabetes mellitus in German General Practitioners' Consultation - Results of the SESAM 2-study. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 2008; 116:326-328.

FRESE T, BACH AG, MÜHLBAUER E, BRÖMME HJ, PESCHKE E. Diabetes-dependent alterations of pineal melatonin synthesis in rats. *J Neuroendocrinology* (submitted).

WOCKENFUß R, FRESE T, HERRMANN K, CLAUßNITZER M, SANDHOLZER H: Three- and four-digit ICD-10 is not a reliable classification system in primary care. *Scan J Prim Health* (submitted).

13.2 Übersichtsarbeiten

FRESE T, SANDHOLZER H. Diabetes und Bluthochdruck: Carvedilol ist der optimale β -Blocker. *Dtsch Med Wochenschr* 2007; 132:2330-2333.

SANDHOLZER H, HERRMANN C, FRESE T: Palpitationen, Thoraxschmerz, Schwindel, Todesangst. *MMW Fortschr Med* 2008; 150:31-34.

13.3 Falldarstellungen

SCHENCKING M, FRESE T, SANDHOLZER H: Behandlung einer Radikulopathie bei ossärer Metastasierung der Lendenwirbelsäule durch Infrarot-A-Ganzkörperhyperthermie *Forsch Komplementmed* 2008; 15:273-276.

13.4 Kongressbeiträge

CHANKIEWITZ E, PREIß U, FRESE T, SCHNEYER U, MÜHLBAUER E, PESCHKE D, PESCHKE E: Melatonin-Tagesprofile bei stoffwechselgesunden und diabetischen Versuchstieren sowie Patienten. Verh Anat Ges 2005; 187(Suppl.):249.

FRESE T, CHANKIEWITZ E, MÜHLBAUER E, SPESSERT R, PESCHKE E: Diabetische Goto-Kakizaki-Ratten zeigen erniedrigte Melatoninplasmaspiegel und erhöhte MT₁-Rezeptorexpression in der pankreatischen β -Zelle. Arbeitstagung Dt Anat Ges, Würzburg, 2005.

FRESE T, WOLGAST S, BAZWINSKY I, MÜHLBAUER E, PESCHKE E: Expression und Lokalisation von GLUT2 in der pankreatischen β -Zelle diabetischer Goto-Kakizaki-Ratten. Arbeitstagung Dt Anat Ges, Würzburg, 2005.

FRESE T, CHANKIEWITZ E, BAZWINSKY I, MÜHLBAUER E, PESCHKE E: Does insulin reduce melatonin synthesis via an insulin receptor mediated pathway? Jahrestagung Dt Anat Ges, Freiburg, 2006.

FRESE T, MÜHLBAUER E, PESCHKE E: The influence of insulin and glucose on norepinephrine stimulated pineal melatonin secretion. J Exp Clin Diab 2006 ; 114(Suppl.):467.

FRESE T, BAZWINSKY I, MÜHLBAUER E, PESCHKE E: Characterisation of the β -cell glucose sensor in diabetic Goto Kakizaki-rats regarding ontogenetic and circadian variations. J Exp Clin Diab 2007 ; 115(Suppl. 1):S65.

BATULEVICIUS D, FRESE T, PESCHKE E, BATULEVICIENE V, PAUZA DH: Structure of the cardiac autonomic nervous system in diabetic Goto Kakizaki rats. J Exp Clin Diab 2007 ; 115(Suppl. 1) : S63.

BATULEVICIUS D, FRESE T, PESCHKE E, BATULEVICIENE V, PAUZA DH: Intracardiac nerves and ganglia in diabetic Goto Kakizaki rats. Jahrestagung Dt Anat Ges, Gießen, 2007.

BATULEVICIUS D, FRESE T, PESCHKE E, BATULEVICIENE V, PAUZA DH: Reduced number of the intracardiac neurons in diabetic Goto Kakizaki rats. Jahrestagung Dt Anat Ges, Innsbruck, 2008.

PESCHKE E, FRESE T, WOLGAST S, BAZWINSKY I, MÜHLBAUER E: Melatonin--insulin relationships in rats and humans. Endocrine Abstracts 2008; 16:S183.

13.5 Stipendien

2006: Reisekostenstipendium der DGE (Tagung der Sektion Neuroendokrinologie - Tübingen)

2007: Reisekostenstipendium der DGE (DGE-Jahrestagung - Salzburg)