

**Der Einfluss von Insulin auf *Epiphysis cerebri* und Leber
Typ 1-diabetischer Ratten**

Dissertation
zur Erlangung des
Doktorgrades der Ernährungswissenschaften (Dr. troph.)

der

Naturwissenschaftlichen Fakultät III
Agrar- und Ernährungswissenschaften,
Geowissenschaften und Informatik

der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

vorgelegt von

Diplom-Ernährungswissenschaftlerin Kathleen Biemann

Geb. am 24.03.1982 in Halle (Saale)

Gutachter: Professor Dr. Elmar Peschke
Professor Dr. Gabriele I. Stangl
Professor Dr. Anne Jörns

Verteidigung am: 12. 01.2015

Meinen Lieben

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis	III
Tabellenverzeichnis	VI
1. Einleitung	1
1.1 Diabetes mellitus	1
1.2 Die „innere Uhr“	1
1.3 Der zentrale circadiane Oszillator	2
1.4 <i>Epiphysis cerebri</i> – vom Licht zum Melatonin	3
1.5 Melatonin	4
1.6 Molekulare Grundlage der „inneren Uhr“	7
1.7 Der Insulin-Melatonin-Antagonismus	8
1.8 Periphere Oszillatoren	10
1.8.1 Periphere Oszillatoren und Diabetes mellitus	11
1.9 Die LEW.1AR1- <i>iddm</i> -Ratte – Modell des spontanen Typ 1-Diabetes	12
1.10 Zielstellung der Arbeit	13
2. Material	15
2.1 Chemikalien und Reagenzien	15
2.2 Systeme	16
2.3 Zubehör und Geräte	16
2.4 Gebrauchslösungen und Puffer	17
2.5 Analysensoftware	18
3. Methoden	19
3.1 Versuchsaufbau	19
3.1.1 Haltung und Fütterung der Versuchstiere	19
3.2 Insulinsubstitution der Typ 1-diabetischen Tiere	20
3.3 Probengewinnung	21
3.4 Bestimmung der Glukosekonzentration im Blut	21
3.5 Gewinnung des Blutplasmas	21
3.6 Radioimmunologische Analytik	22
3.6.1 Bestimmung der Melatoninkonzentration im Plasma	22
3.6.2 Bestimmung der Insulinkonzentration im Plasma	23
3.7 Enzyme-Linked Immunosorbent Assay	23
3.7.1 Bestimmung der Katecholaminkonzentration im Plasma	23

3.8	Molekularbiologische Analytik	25
3.8.1	RNA-Isolierung	25
3.8.2	RNA-Agarosegelelektrophorese	26
3.8.3	DNase-Verdau	27
3.8.4	Reverse Transkriptionsreaktion	27
3.8.5	Polymerasekettenreaktion	28
3.8.6	DNA-Agarosegelelektrophorese	31
3.9	Statistik	31
4.	Ergebnisse	32
4.1	Untersuchungen zur Bedeutung des Insulin-Melatonin-Antagonismus	32
4.1.1	Körpergewicht	32
4.1.2	Glukosekonzentration	32
4.1.3	Insulinkonzentration	33
4.1.4	Melatoninkonzentration	34
4.1.5	Katecholaminkonzentration	35
4.1.5.1	Adrenalinkonzentration	35
4.1.5.2	Noradrenalinkonzentration	36
4.1.6	Genexpression der Epiphyse	37
4.1.6.1	Gene der Melatoninsynthese	37
4.1.6.1.1	Expression der Aanat	37
4.1.6.1.2	Expression der Hiomt	38
4.1.6.2	Expression des Insr	39
4.1.6.3	Expression des Adrb1	39
4.1.6.4	Uhrengene	40
4.1.6.4.1	Expression des Per1	40
4.1.6.4.2	Expression des Bmal1	41
4.2	Untersuchungen zum Einfluss von Insulin auf die Genexpression der Leber Typ 1- diabetischer Ratten	42
4.2.1	Uhrengene	43
4.2.1.1	Expression des Per1	43
4.2.1.2	Expression des Per2	43
4.2.1.3	Expression des Bmal1	44
4.2.1.4	Expression des Clock	45
4.2.1.5	Expression des Cry1	46
4.2.1.6	Expression des Rev-erba	46

4.2.1.7	Expression des Rora	47
4.2.2	Uhren-gen-kontrollierte Gene	48
4.2.2.1	Expression des Dbp	48
4.2.2.2	Expression des E4bp4	49
4.2.2.3	Expression des Ppara	50
4.2.2.4	Expression des Ppar γ	50
5.	Diskussion	52
5.1	Charakterisierung von Tiermodell und Versuchsaufbau	52
5.2	Untersuchungen zum Insulin-Melatonin-Antagonismus	54
5.3	Wirkung des spontanen Typ 1-Diabetes mellitus auf die „innere Uhr“ der Leber	63
6.	Zusammenfassung	72
7.	Summary	74
8.	Literaturverzeichnis	76

Abkürzungsverzeichnis

Aanat	Arylalkyl- <i>N</i> -acetyltransferase
ADR	Adrenalin
Adrb1	β_1 -Adrenozeptor
BB	<i>BioBreeding</i>
Bmal1	<i>Brain and muscle aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator-like1</i>
bp	Basenpaare
bHLH	<i>basic helix-loop-helix</i>
cAMP	Zyklisches Adenosinmonophosphat
CCGs	Uhren-gen-kontrollierte Gene
cGMP	Zyklisches Guanosinmonophosphat
CK	Caseinkinase
Clock	<i>Circadian locomotor output cycle kaput</i>
C-Peptid	<i>Connecting peptide</i>
CREB	<i>cAMP response element binding protein</i>
Cry	Cryptochrome
CT	<i>Circadian time</i>
C _t	<i>Cycle threshold</i>
CYP	Cytochrom P450
Dbp	<i>D site albumin promoter binding protein</i>
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
E4bp4	<i>E4 promoter-binding protein 4</i>
E-Box	<i>Enhancer Box</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
GK	Goto-Kakizaki
Hiomt	Hydroxyindol- <i>O</i> -methyltransferase
Iddm	LEW.1AR1- <i>iddm</i> -Ratte
Iddm + Insulin	Insulin-substituierte LEW.1AR1- <i>iddm</i> -Ratte
IE	Internationale Einheiten
IMC	<i>Columna intermediolateralis</i>
Insr	Insulinrezeptor
L:D	Hell-Dunkel-Rhythmus
MAP	<i>Mitogen-activated protein</i>
MEL	Melatonin
MESOR	<i>Midline-estimating statistic of rhythm</i>
MOPS	3-(<i>N</i> -Morpholino)-propansulfonsäure
MT	Melatoninrezeptor
n	Stichprobenumfang
NA	Noradrenalin
NOD	<i>Non-obese-diabetic</i>
OLETF	<i>Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty</i>

P	Irrtumswahrscheinlichkeit
PAS	<i>Period-Arnt-Single-minded</i>
PCR	Polymerasekettenreaktion
Per	Period
PIN	<i>Pineal gland, Epiphysis cerebri</i> , Epiphyse
PNS	Photoneuroendokrines System
Ppar	<i>Peroxisome proliferator-activated receptor</i>
PVN	<i>Nucleus paraventricularis</i>
Rev-erba	<i>Reverse erythroblastosis virus-α</i>
Rora	<i>Retinoic acid-related orphan receptor-α</i>
RET	<i>Stratum ganglionare retinae</i>
RHT	<i>Tractus retinohypothalamicus</i>
RIA	<i>Radioimmunoassay</i>
RNA	<i>Ribonucleic acid</i>
ROREs	<i>Retinoic acid-related orphan receptor response elements</i>
RT	Raumtemperatur
SCG	<i>Ganglion cervicale superius</i>
SCN	<i>Nucleus suprachiasmaticus</i>
SEM	Standardfehler
SNP	<i>Single nucleotide polymorphism</i>
STZ	Streptozotocin
T1DM	Typ 1-Diabetes mellitus
T2DM	Typ 2-Diabetes mellitus
TAE	Tris-acetat-EDTA
Trp	Tryptophan
ZT	<i>Zeitgeber time</i>

Fremdsprachige Begriffe wurden durch Kursivsetzung hervorgehoben, Bezeichnungen von Genen und mRNA wurden in Kursivschrift gefasst, Proteine in Großbuchstaben dargestellt.

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Darstellung des photoneuroendokrinen Systems der Säuger.	4
Abb. 2: Schematische Darstellung der Melatoninsynthese.	6
Abb. 3: Schematische Darstellung des circadianen Uhrenmechanismus.	8
Abb. 4: Schematische Darstellung des Lichtregimes während des Versuches.	20
Abb. 5: Berechnung der Gesamt-RNA-Konzentration.	26
Abb. 6: Schematische Darstellung des Thermoprofils der <i>real-time</i> RT-PCR.	29
Abb. 7: Blutglukosekonzentration männlicher LEW.1AR1-Ratten (Kontrolle, ■), Typ 1-diabetischer LEW.1AR1- <i>iddm</i> -Ratten (Iddm, ▲) und Insulin-substituierter Typ 1-diabetischer Ratten (Iddm + Insulin, ●).	33
Abb. 8: Insulinkonzentration im Plasma männlicher LEW.1AR1-Ratten (Kontrolle, ■), Typ 1-diabetischer LEW.1AR1- <i>iddm</i> -Ratten (Iddm, ▲) und Insulin-substituierter Typ 1-diabetischer Ratten (Iddm + Insulin, ●).	34
Abb. 9: Melatoninkonzentration im Plasma männlicher LEW.1AR1-Ratten (Kontrolle, ■), Typ 1-diabetischer LEW.1AR1- <i>iddm</i> -Ratten (Iddm, ▲) und Insulin-substituierter Typ 1-diabetischer Ratten (Iddm + Insulin, ●).	35
Abb. 10: AdrenalinKonzentration im Plasma männlicher LEW.1AR1-Ratten (Kontrolle, ■), Typ 1-diabetischer LEW.1AR1- <i>iddm</i> -Ratten (Iddm, ▲) und Insulin-substituierter Typ 1-diabetischer Ratten (Iddm + Insulin, ●).	36
Abb. 11: NoradrenalinKonzentration im Plasma männlicher LEW.1AR1-Ratten (Kontrolle, ■), Typ 1-diabetischer LEW.1AR1- <i>iddm</i> -Ratten (Iddm, ▲) und Insulin-substituierter Typ 1-diabetischer Ratten (Iddm + Insulin, ●).	36
Abb. 12: Relative mRNA-Expression der <i>Arylalkylamin-N-acetyltransferase</i> (<i>Aanat</i>) in der Epiphyse männlicher LEW.1AR1-Ratten (Kontrolle, ■), Typ 1-diabetischer LEW.1AR1- <i>iddm</i> -Ratten (Iddm, ▲) und Insulin-substituierter Typ 1-diabetischer Ratten (Iddm + Insulin, ●).	38

- Abb. 13: Relative mRNA-Expression der *Hydroxyindol-O-methyltransferase (Hiomt)* in der Epiphyse männlicher LEW.1AR1-Ratten (Kontrolle, ■), Typ 1-diabetischer LEW.1AR1-*iddm*-Ratten (Iddm, ▲) und Insulin-substituierter Typ 1-diabetischer Ratten (Iddm + Insulin, ●). 38
- Abb. 14: Relative mRNA-Expression des *Insulinrezeptors (Insr)* in der Epiphyse männlicher LEW.1AR1-Ratten (Kontrolle, ■), Typ 1-diabetischer LEW.1AR1-*iddm*-Ratten (Iddm, ▲) und Insulin-substituierter Typ 1-diabetischer Ratten (Iddm + Insulin, ●). 39
- Abb. 15: Relative mRNA-Expression des β_1 -*Adrenozeptors (Adrb1)* in der Epiphyse männlicher LEW.1AR1-Ratten (Kontrolle, ■), Typ 1-diabetischer LEW.1AR1-*iddm*-Ratten (Iddm, ▲) und Insulin-substituierter Typ 1-diabetischer Ratten (Iddm + Insulin, ●). 40
- Abb. 16: Relative mRNA-Expression des Uhrengens *Period1 (Per1)* in der Epiphyse männlicher LEW.1AR1-Ratten (Kontrolle, ■), Typ 1-diabetischer LEW.1AR1-*iddm*-Ratten (Iddm, ▲) und Insulin-substituierter Typ 1-diabetischer Ratten (Iddm + Insulin, ●). 41
- Abb. 17: Relative mRNA-Expression des Uhrengens *Brain and muscle aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator-like1 (Bmal1)* in der Epiphyse männlicher LEW.1AR1-Ratten (Kontrolle, ■), Typ 1-diabetischer LEW.1AR1-*iddm*-Ratten (Iddm, ▲) und Insulin-substituierter Typ 1-diabetischer Ratten (Iddm + Insulin, ●). 41
- Abb. 18: Relative mRNA-Expression des Uhrengens *Period1 (Per1)* in der Leber männlicher LEW.1AR1-Ratten (Kontrolle, ■), Typ 1-diabetischer LEW.1AR1-*iddm*-Ratten (Iddm, ▲) und Insulin-substituierter Typ 1-diabetischer Ratten (Iddm + Insulin, ●). 43
- Abb. 19: Relative mRNA-Expression des Uhrengens *Period2 (Per2)* in der Leber männlicher LEW.1AR1-Ratten (Kontrolle, ■), Typ 1-diabetischer LEW.1AR1-*iddm*-Ratten (Iddm, ▲) und Insulin-substituierter Typ 1-diabetischer Ratten (Iddm + Insulin, ●). 44
- Abb. 20: Relative mRNA-Expression des Uhrengens *Brain and muscle aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator-like1 (Bmal1)* in der Leber männlicher LEW.1AR1-Ratten (Kontrolle, ■), Typ 1-diabetischer LEW.1AR1-*iddm*-Ratten (Iddm, ▲) und Insulin-substituierter Typ 1-diabetischer Ratten (Iddm + Insulin, ●). 45
- Abb. 21: Relative mRNA-Expression des Uhrengens *Circadian locomotor output cycles kaput (Clock)* in der Leber männlicher LEW.1AR1-Ratten (Kontrolle, ■), Typ 1-diabetischer LEW.1AR1-*iddm*-Ratten (Iddm, ▲) und Insulin-substituierter Typ 1-diabetischer Ratten (Iddm + Insulin, ●). 45

- Abb. 22: Relative mRNA-Expression des Uhrengens *Cryptochrome 1 (Cry1)* in der Leber männlicher LEW.1AR1-Ratten (Kontrolle, ■), Typ 1-diabetischer LEW.1AR1-*iddm*-Ratten (Iddm, ▲) und Insulin-substituierter Typ 1-diabetischer Ratten (Iddm + Insulin, ●). 46
- Abb. 23: Relative mRNA-Expression des Uhrengens *Reverse erythroblastosis virus- α (Rev-erba)* in der Leber männlicher LEW.1AR1-Ratten (Kontrolle, ■), Typ 1-diabetischer LEW.1AR1-*iddm*-Ratten (Iddm, ▲) und Insulin-substituierter Typ 1-diabetischer Ratten (Iddm + Insulin, ●). 47
- Abb. 24: Relative mRNA-Expression des Uhrengens *Retinoic acid-related orphan receptor- α (Rora)* in der Leber männlicher LEW.1AR1-Ratten (Kontrolle, ■), Typ 1-diabetischer LEW.1AR1-*iddm*-Ratten (Iddm, ▲) und Insulin-substituierter Typ 1-diabetischer Ratten (Iddm + Insulin, ●). 47
- Abb. 25: Relative mRNA-Expression des Uhrengen-kontrollierten Gens *D site of albumin promoter binding protein (Dbp)* in der Leber männlicher LEW.1AR1-Ratten (Kontrolle, ■), Typ 1-diabetischer LEW.1AR1-*iddm*-Ratten (Iddm, ▲) und Insulin-substituierter Typ 1-diabetischer Ratten (Iddm + Insulin, ●). 49
- Abb. 26: Relative mRNA-Expression des Uhrengen-kontrollierten Gens *E4 promoter-binding protein 4 (E4bp4)* in der Leber männlicher LEW.1AR1-Ratten (Kontrolle, ■), Typ 1-diabetischer LEW.1AR1-*iddm*-Ratten (Iddm, ▲) und Insulin-substituierter Typ 1-diabetischer Ratten (Iddm + Insulin, ●). 50
- Abb. 27: Relative mRNA-Expression des Uhrengen-kontrollierten Gens *Peroxisome proliferator-activated receptor α (Ppara)* in der Leber männlicher LEW.1AR1-Ratten (Kontrolle, ■), Typ 1-diabetischer LEW.1AR1-*iddm*-Ratten (Iddm, ▲) und Insulin-substituierter Typ 1-diabetischer Ratten (Iddm + Insulin, ●). 50
- Abb. 28: Relative mRNA-Expression des Uhrengen-kontrollierten Gens *Peroxisome proliferator-activated receptor γ (Ppar γ)* in der Leber männlicher LEW.1AR1-Ratten (Kontrolle, ■), Typ 1-diabetischer LEW.1AR1-*iddm*-Ratten (Iddm, ▲) und Insulin-substituierter Typ 1-diabetischer Ratten (Iddm + Insulin, ●). 51

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Reagenzien für die RNA-Agarosegelelektrophorese	26
Tabelle 2: Zusammensetzung des Ansatzes für die Reverse Transkription	27
Tabelle 3: Reaktionsansatz für die <i>real-time</i> RT-PCR	29
Tabelle 4: Eigenschaften der für die <i>real-time</i> RT-PCR-Untersuchungen verwendeten Primer	30
Tabelle 5: Ergebnisse der mittels Cosinor-Analyse ausgewerteten Blut- und Plasmawerte männlicher LEW.1AR1-Ratten (Kontrolle), Typ 1-diabetischer LEW.1AR1- <i>iddm</i> -Ratten (Iddm) und Insulin-substituierter Typ 1-diabetischer Ratten (Iddm + Insulin)	37
Tabelle 6: Ergebnisse der mittels Cosinor-Analyse ausgewerteten relativen mRNA-Expression ausgewählter Gene der Epiphyse männlicher LEW.1AR1-Ratten (Kontrolle), Typ 1-diabetischer LEW.1AR1- <i>iddm</i> -Ratten (Iddm) und Insulin-substituierter Typ 1-diabetischer Ratten (Iddm + Insulin)	42
Tabelle 7: Ergebnisse der mittels Cosinor-Analyse ausgewerteten relativen mRNA-Expressionen von Uhrengenen der Leber männlicher LEW.1AR1-Ratten (Kontrolle), Typ 1-diabetischer LEW.1AR1- <i>iddm</i> -Ratten (Iddm) und Insulin-substituierter Typ 1-diabetischer Ratten (Iddm + Insulin)	48
Tabelle 8: Ergebnisse der mittels Cosinor-Analyse ausgewerteten relativen mRNA-Expressionen Uhrengen-kontrollierter Gene der Leber männlicher LEW.1AR1-Ratten (Kontrolle), Typ 1-diabetischer LEW.1AR1- <i>iddm</i> -Ratten (Iddm) und Insulin-substituierter Typ 1-diabetischer Ratten (Iddm + Insulin)	51

1. Einleitung

1.1 Diabetes mellitus

Der Diabetes mellitus umfasst eine ätiologisch und pathogenetisch heterogene Gruppe chronischer Erkrankungen des Kohlenhydratstoffwechsels, wobei die Hyperglykämie das gemeinsame Charakteristikum bildet. Laut Definition der American Diabetes Association wird zwischen dem Typ 1- und Typ 2-Diabetes mellitus sowie einem Gestationsdiabetes und anderen spezifischen Diabetestypen unterschieden [1].

Aktuellen Studien zufolge leiden derzeit weltweit 366 Millionen Menschen an einem Diabetes mellitus [2]. Dabei entfallen 90% der Erkrankten auf den Typ 2-Diabetes mellitus (T2DM) und 5–10% auf die Insulin-abhängige Form, den Typ 1-Diabetes mellitus (T1DM) [3]. Folgeerkrankungen des Diabetes mellitus wie Bluthochdruck, diabetische Retinopathie und Neuropathie, kardiovaskuläre Krankheiten sowie Mikro- und Makroangiopathien stellen aufgrund der steigenden Prävalenz eine zunehmende Belastung der Gesellschaft und ihrer Gesundheitssysteme dar.

Der T2DM wird ausgelöst durch eine Insulinresistenz, welche meist mit einer Störung der Insulinsekretion einhergeht. Übergewicht und Bewegungsmangel sowie genetische Faktoren gelten als die wichtigsten Ursachen, um an einem T2DM zu erkranken [4]. Im Gegensatz dazu entsteht der T1DM durch eine autoimmunologische Zerstörung der pankreatischen β -Zelle. Dabei hat der T1DM ebenso wie der T2DM auch multifaktorielle Ursachen, welche sowohl genetische als auch umwelt- und ernährungsbedingte Faktoren einschließen. Beispielsweise sind mehr als 20 Regionen des humanen Genoms in die genetische Veranlagung des T1DM involviert. Neben Genen der HLA-Region des Chromosoms 6 spielen vor allem auch das *Ins*-Gen sowie das *Ctla-4*-Gen eine Rolle in der Genetik des T1DM [5]. Als Umweltfaktoren wurden Enteroviren wie das Coxsackie-Virus B [6] und die steigende Exposition mit Kuhmilchprotein in der frühkindlichen Ernährung [7] sowie ein Vitamin-D-Mangel identifiziert [8].

1.2 Die „innere Uhr“

Viele Vorgänge des menschlichen Körpers wie z. B. Schlaf-Wach-Verhalten, Nahrungsaufnahme, Körpertemperatur und Blutdruck aber auch Stoffwechselfunktionen wie die Sekretion von Hormonen unterliegen einem täglich wiederkehrenden Rhythmus [9,10]. Die Anpassung unseres Körpers an die tageszeitlich wechselnden Lichtverhältnisse stellt einen wichtigen Aspekt in der Evolution des Lebens dar.

Hauptcharakteristikum „innerer Uhren“ ist die Erzeugung eines endogenen Rhythmus, der unabhängig von äußeren Einflüssen (sogenannten „Zeitgebern“) vorliegt [11]. Dieser innere Rhythmus besitzt unter freilaufenden Bedingungen, z. B. konstanter Dunkelheit, eine Periodenlänge von ca. 24 h, und wird daher auch als „circadian“ (lat. *circa* „um (herum), ungefähr“ und *dies* „Tag“) bezeichnet [12]. Beim Menschen beträgt die Periodenlänge 24,5 bis 25 h [13], bei bestimmten Hamsterarten 22,5 h [14]. Verschiedene Zeitgeber korrigieren und synchronisieren diesen endogenen Rhythmus mit der geophysikalischen Tageslänge von genau 24 h, was als *Entrainment* bezeichnet wird [15]. Temperatur, soziale Signale und Melatonin stellen neben dem natürlichen Tag-Nacht-Lichtwechsel, als wichtigsten externen Reiz, einige weitere Synchronisatoren dar [16]. Ein auf diese Weise angepasster Rhythmus wird als „diurnal“ bezeichnet. Grundsätzlich sollte daher zwischen circadianen, freilaufenden (circadiane Zeit, *circadian time*, CT) und diurnalen, synchronisierten Abläufen (Zeitgeberzeit, *zeitgeber time*, ZT) unterschieden werden. Die Zeitgeberzeit diurnaler Rhythmen entspricht dabei den Versuchsbedingungen des Hell-Dunkel-Rhythmus (L:D). Bei einem Rhythmus von L:D = 12:12 bedeutet dies, dass mit ZT 0 die Hellphase beginnt und ZT 12 dem Beginn der Dunkelphase entspricht.

1.3 Der zentrale circadiane Oszillator

Nach heutiger Auffassung ist die „innere Uhr“ der Säugetiere, welche als photoneuroendokrines System (PNS) bezeichnet wird, aus drei Grundbausteinen zusammengesetzt [11]. Zuerst leiten Photorezeptoren des Auges Informationen aus der Umwelt an einen zentralen, den endogenen Rhythmus generierenden Schrittmacher (*Nucleus suprachiasmaticus*, SCN). Konsekutiv vermitteln neuronale und neuroendokrine Effektorzellen, z. B. Pinealocyten mittels Melatonin die Informationen weiter in die Peripherie.

Die oberste Steuereinheit und das neurologische Korrelat für die Generierung des endogenen circadianen Rhythmus befindet sich im paarig angelegten SCN des ventralen Hypothalamus [14,17] (Abb. 1). Der zentrale Schrittmacher wird auch als *master clock* oder *central pacemaker* bezeichnet [10]. Diese Ansammlung von Nervenzellen des SCN befindet sich oberhalb der Sehnervenkreuzung, *Chiasma opticum*, und besteht bei Ratten und Mäusen aus ca. 20.000 einzelnen Neuronen [18]. Jedes Neuron ist in der Lage, einen eigenen Rhythmus zu generieren und endogen mit einer Periode von etwa 24 h zu oszillieren [17]. Die Synchronisation der Aktivität des SCN an einen 24-stündigen Tag-Nacht-Rhythmus geschieht über photische Signale aus dem *Stratum ganglionare* der Retina. In der Retina befinden sich zum einen blaues Licht absorbierende Melanopsin-enthaltende Ganglienzellen und zum anderen grünes Licht

absorbierende Zapfen, welche zu den Neuronen des SCN projizieren [19-21]. Über eine multisynaptische Neurotransmission hat der SCN Anschluss an die *Epiphysis cerebri*, wo die Bildung und Freisetzung des Neurohormons Melatonin gesteuert wird [22]. Die Bindung von Melatonin an hochselektive Melatoninrezeptoren des SCN führt einerseits zur Aktivitätshemmung des SCN, andererseits besteht die Möglichkeit der Feineinstellung der circadianen Phase [23-25].

1.4 *Epiphysis cerebri* – vom Licht zum Melatonin

Die ersten Erwähnungen der *Epiphysis cerebri* (*Pineal gland*, *Glandula pinealis*, Epiphyse) gehen bis auf das 3. Jahrhundert zurück, wobei Erasistratos von Keos und Herophilos von Chalkedon, zwei Anatomen, spekulierten, die Epiphyse würde als ein Ventil agieren und so den Fluss unserer Gedanken kontrollieren [26]. Im 17. Jahrhundert war es Descartes, der die Epiphyse in einen Zusammenhang mit der Wahrnehmung von photischen Signalen aus der Umwelt brachte [22]. Anatomisch wird sie sowohl zum Epithalamus als auch zu den zirkumventrikulären Organen gerechnet, und liegt als kleine zapfenförmige Struktur an der Hinterwand des 3. Ventrikels über der Vierhügelplatte des Mittelhirns [27].

Als Effektor des PNS geschieht die Regulation der epiphysären Melatoninsynthese über zahlreiche neuronale, endokrine und parakrine Mechanismen, hauptsächlich jedoch über eine noradrenerge sympathische Erregung [22]. Während Pinealozyten niederer Wirbeltiere direkt lichtempfindlich sind, einen endogenen Rhythmus generieren und Melatonin als Ausgangssignal produzieren, wurden sie im Zuge der Phylogenese bei den Mammalia zu rein sekretorischen Zellen, deren circadiane Schrittmacher-Funktion vom SCN übernommen wurde [28].

Während der Hellphase aktiviert kurzweiliges, blaues Licht über eine retinohypothalamische Projektion (Glutamatsekretion) die Neurone des SCN, welche über die Ausschüttung von γ -Aminobuttersäure die Aktivität des hypothalamischen *Nucleus paraventricularis* (PVN) hemmen [29]. Infolgedessen wird die Melatoninsynthese gehemmt. Umgekehrt führt die während der Dunkelheit resultierende abnehmende Aktivität des SCN zu einer Glutamatvermittelten Aktivierung des PVN. Die konsekutive Ausschüttung von Noradrenalin (NA) aus postganglionären Neuronen des *Ganglion cervicale superius* (SCG) stimuliert die Melatoninsynthese. Bei tag- sowie nachtaktiven Säugetieren wirkt die Epiphyse als Vermittler circadianer Prozesse [24]. Über die Freisetzung von Melatonin passt sie den Organismus an die photoperiodisch wechselnden Verhältnisse des Tages an.

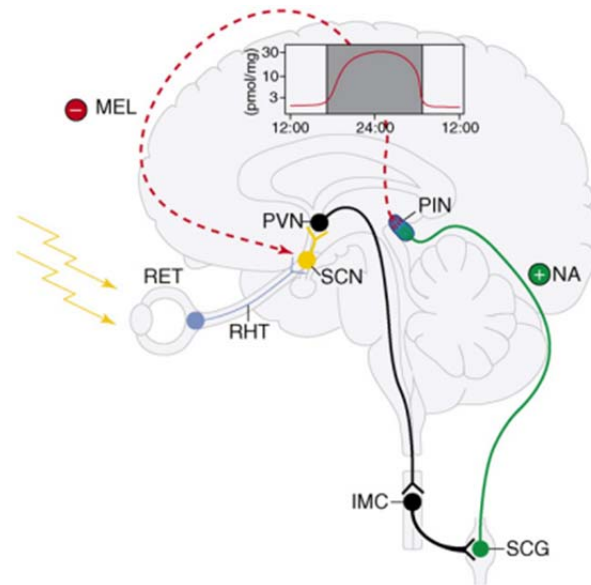


Abb. 1: Darstellung des photoneuroendokrinen Systems der Säuger. Über lichtempfindliche Ganglienzellen des *Stratum ganglionare retinae* (RET) gelangt Lichtinformation über den *Tractus retinohypothalamicus* (RHT) zum paarig angelegten *Nucleus suprachiasmaticus* (SCN) des Hypothalamus. Der SCN innerviert über eine kurze Bahn zum benachbarten *Nucleus paraventricularis* (PVN). Vom PVN projizieren lange Bahnen zu den sympathischen Neuronen der *Columna intermediolateralis* (IMC), welche mit präganglionären Fasern das *Ganglion cervicale superius* (SCG) innerviert. Postganglionäre Fasern des SCG enden unter anderem an der Epiphyse (PIN), und bewirken während der Dunkelheit durch die Freisetzung von Noradrenalin (NA) die Synthese und Sekretion von Melatonin (MEL). Über Melatoninrezeptoren wirkt Melatonin negativ rückkoppelnd auf den SCN. Die eingefügte Abbildung beschreibt die Schwankung der Melatoninkonzentration in der humanen Epiphyse über den Tag (angegeben als pmol/mg Protein, Abbildung nach Maronde und Stehle, 2007 [30]).

1.5 Melatonin

Melatonin (N-Acetyl-5-methoxytryptamin), das wichtigste Sekretionsprodukt der Epiphyse, ist ein sich von der essentiellen Aminosäure *L*-Tryptophan (Trp) ableitendes Indolamin [31]. Neben der Epiphyse wurde es in zahlreichen anderen Organen und Zellen wie dem Gastrointestinaltrakt, dem Knochenmark, in Leukozyten, im Innenohr, der Haut sowie anderen Regionen des zentralen Nervensystems und der Retina nachgewiesen [32]. Durch den hemmenden Einfluss auf die neuronale Aktivität des SCN synchronisiert Melatonin als humoraler Zeitgeber die „innere Uhr“ mit der tatsächlichen Tageszeit [33]. Neben seiner Funktion als Zeitgeberhormon hat Melatonin auch einen Einfluss auf die Reproduktion, das Schlafverhalten sowie die Entstehung von Krebs und Diabetes mellitus [29].

NA besitzt bei Säugetieren eine Schlüsselrolle für die Regulation der Melatoninsynthese [22]. Während der Nacht wird NA in einer bis zu 100-fach höheren Konzentration aus den Endigungen postsynaptischer Neurone des SCG in den perivaskulären Raum freigesetzt [34]. Die Bindung von NA an β_1 - und α_{1B} -adrenerge Rezeptoren der postsynaptischen Membran von Pinealozyten führt zur konsekutiven Aktivierung von Proteinkinasen. Diese wiederum beeinflussen sowohl auf Transkriptionsebene als auch auf Ebene der Enzymaktivität und -stabilität die Enzyme der

Melatoninsynthese und fördern die Melatoninproduktion. Über α_2 -adrenerge Rezeptoren kann NA aber auch hemmend auf die Synthese von Melatonin wirken [35,36].

Trp ist das Substrat für die Synthese von Melatonin, welches von den Pinealozyten aktiv über einen neutralen Aminosäuretransporter der Monocarboxylattransporter-Familie aufgenommen wird [37]. Die mitochondriale Tryptophanhydroxylase 1, welche durch NA stimuliert wird, katalysiert die Umwandlung von Trp zu 5-Hydroxytryptophan, welches anschließend durch die zytosolische Aromatische-*L*-Aminosäure-Decarboxylase zu Serotonin (5-Hydroxytryptamin) umgewandelt wird. Serotonin wird durch die Arylalkylamin-*N*-acetyltransferase (AANAT) zu *N*-Acetylserotonin umgesetzt. Die sich anschließende *O*-Methylierung durch die Hydroxyindol-*O*-methyltransferase (HIOMT), welche den Cofaktor *S*-Adenosyl-*L*-methionin benötigt, führt zur Bildung von Melatonin [29] (Abb. 2).

Die AANAT stellt das geschwindigkeitsbestimmendes Enzym der Melatoninsynthese dar [38]. Die Mechanismen, welche zum nächtlichen Anstieg der Melatoninkonzentration führen, weisen jedoch deutliche Spezies-spezifische Unterschiede auf. Die Regulation kann dabei sowohl auf Ebene der Transkription als auch auf Ebene der Enzymaktivität und -stabilität erfolgen [28]. Der nächtliche Anstieg der Melatoninsynthese ist bei Ratten und Mäusen beispielsweise hauptsächlich auf eine circadiane Erhöhung der *Aanat*-Transkription und in Konsequenz der AANAT-Aktivität zurückzuführen [22]. Zusätzlich konnte bei Ratten gezeigt werden, dass posttranslationale Mechanismen die *Aanat*-Transkription sowie das AANAT-Protein regulieren [28]. Beim Menschen wiederum führt die konstitutive Expression des *Aanat*-Transkripts zu einer konstanten Bildung des AANAT-Proteins, welches während der Hellphase unverzüglich proteasomal abgebaut wird [28].

Das stark lipophile Melatonin diffundiert direkt nach der Synthese in den perivaskulären Spalt und gelangt von dort ins Blut [22]. Seine Halbwertszeit im Blut beträgt in etwa 20 Minuten [39]. Beim Menschen steigt die Melatoninsynthese kurz nach Beginn der Dunkelheit an, erreicht ihren Höhepunkt in der Mitte der Nacht (10- bis 15-facher Anstieg), und fällt während der zweiten Hälfte der Nacht wieder ab [40]. Die Plasma-Melatoninkonzentrationen unterliegen zudem saisonalen Schwankungen, wobei es während der Wintermonate zu einer verlängerten Sekretionsdauer und erhöhten Werten kommt [41]. Außerdem schwankt die Plasma-Melatoninkonzentration in Abhängigkeit vom Alter [42]. So weisen bis zu drei Monate alte Säuglinge eine sehr geringe Sekretion von Melatonin auf, wohingegen die Sekretion im Kleinkindalter ansteigt, eine circadiane Rhythmik erhält und zwischen dem 4. und 7. Lebensjahr ihr Maximum erreicht (im Mittel 1400 pmol/l). Danach fällt sie um 10 - 15% pro Lebensdekade ab. Tag-Nacht-Unterschiede in der Melatoninsekretion fehlen bei älteren Menschen [42]. Bei

gesunden Jugendlichen konnten im Mittel Werte von 40 pmol/l während des Tages und 260 pmol/l während der Nacht gemessen werden [43]. Entsprechende Normwerte der Plasma-Melatoninkonzentration der Ratte sind 43 - 86 pmol/l am Tag und 344 - 430 pmol/l in der Nacht.

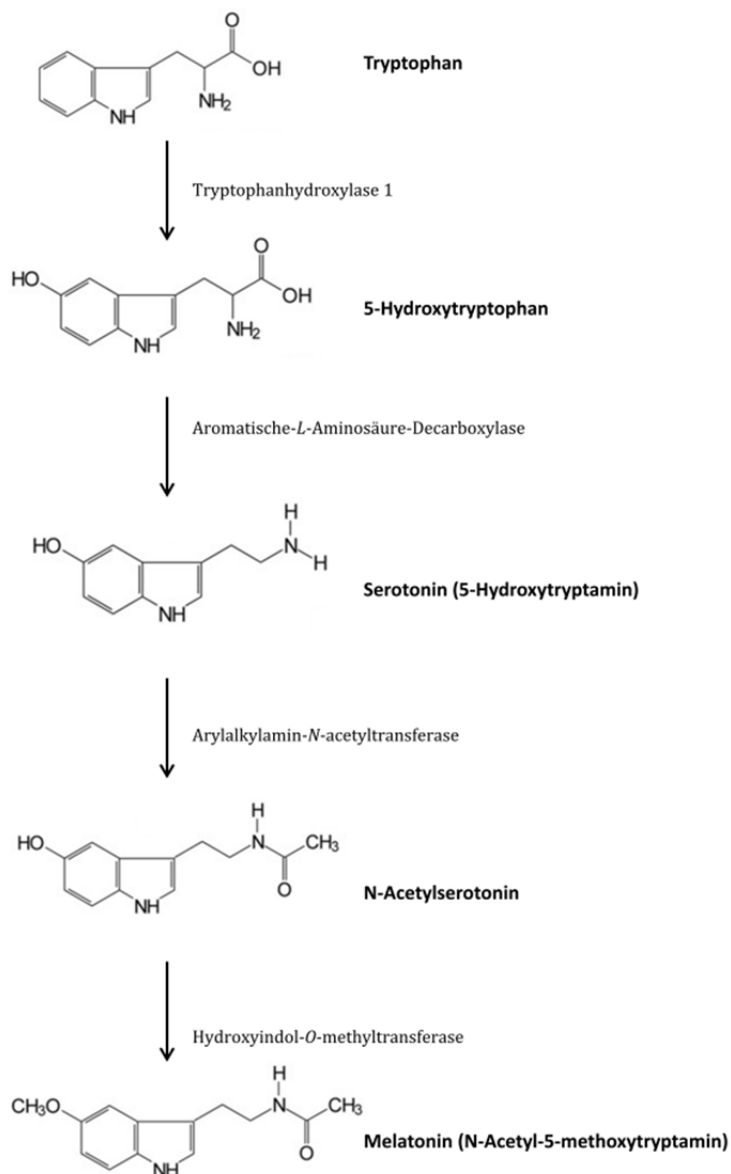


Abb. 2: Schematische Darstellung der Melatoninsynthese. Abbildung modifiziert nach Kleszczyński, 2012 [44].

Obwohl Melatonin membranängig ist, vermittelt es seine Hauptwirkung über zwei membranständige Melatoninrezeptor-Isoformen, die als Melatoninrezeptor MT_1 und MT_2 bezeichnet werden [45,46]. Dabei handelt es sich um Pertussistoxin-sensitive inhibitorische G-Protein-gekoppelte Membranrezeptoren. Sie wirken als Homodimere, möglicherweise auch als Heterodimere, und sind durch sieben Transmembran-Domänen gekennzeichnet [47]. Beide Rezeptortypen kommen in zahlreichen Organen und Geweben [48], einschließlich des Pankreas

[49,50], vor. Die Melatonin-vermittelte Aktivierung der Melatoninrezeptoren führt über eine Hemmung der Adenylatcyclase zur Senkung der Konzentration an zyklischem Adenosinmonophosphat (cAMP) [22]. Zudem sind Einflüsse auf die intrazelluläre Calcium-Konzentration über Pertussistoxin-insensitive $G_{q/11}$ -Proteine bekannt [51]. Der MT_2 -Rezeptor wiederum senkt zusätzlich über eine Hemmung der Guanylatcyclase die Konzentration des zyklischen Guanosinmonophosphats (cGMP) [48].

Der Abbau des im Blut zirkulierenden Melatonins erfolgt zu 92 - 97% in der Leber durch Monoxygenasen der Cytochrom P450-Familie CYP1A1, CYP1A2 und CYP1B1 [32]. Durch eine sich anschließende Konjugation können die Metabolite über den Urin ausgeschieden werden, davon 50 - 80% als sulfatiertes Derivat und 5 - 30% als Glukuronid [52].

1.6 Molekulare Grundlage der „inneren Uhr“

Für die Funktion der „inneren Uhr“ sind eine Reihe zentraler Uhrengene, die sogenannten „*core clock genes*“, welche in nahezu allen Zellen des Körpers aktiv sind, bedeutungsvoll. Die Proteinprodukte dieser Uhrengene funktionieren als sich gegenseitig beeinflussende Rückkopplungsschleifen, welche ihre eigene Transkription und Translation regulieren [10].

Im Zentrum des Uhrenmechanismus der Säuger stehen die beiden Uhrengene *Circadian locomotor output cycle kaput (Clock)* und *Brain and muscle aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator-like1 (Bmal1)* als aktivierender Teil der Uhr [53] (Abb. 3). Ihre Proteinprodukte stellen Transkriptionsfaktoren der *basic helix-loop-helix* (bHLH)-PAS-(*Period-Arnt-Single-minded*)-Familie dar. Über ihre PAS-Domäne bilden sie zu Beginn des subjektiven Tages Heterodimere, welche hochselektiv an spezifische DNA-Elemente, sogenannte *Enhancer*-Boxen mit der Nukleotidsequenz CACGTG, binden. *Bmal1* wird im SCN rhythmisch mit maximalen Werten während des Licht-Dunkel-Wechsels exprimiert [54]. Im Gegensatz dazu weist weder die mRNA-Expression noch die Proteinsynthese des Heterodimerpartners *Clock* im SCN tageszeitliche Schwankungen auf [55,56].

CLOCK-BMAL1-Heterodimere führen zu einem Anstieg der circadianen Expression der Uhrengene *Period (Per1, Per2 und Per3)* sowie *Cryptochrome (Cry1 und Cry2)*, wobei sich die Expression antiphasisch, d. h. um 12 h verschoben, zu der des *Bmal1* verhält [57] (Abb. 3). PER und CRY fungieren als negativer Ast der Schleife, indem sie die Aktivität DNA-gebundener CLOCK-BMAL1-Komplexe sowie die eigene Transkription der *Per*- und *Cry*-Gene hemmen.

CLOCK-BMAL1-Heterodimere binden außerdem an E-Boxen im Promotor des Orphan-Rezeptors *Reverse erythroblastosis virus- α (Rev-erba)* sowie des *Retinoic acid-related orphan receptor- α*

(*Rora*) [58]. Deren Proteinprodukte bilden über die Bindung an *Retinoic acid-related orphan receptor response elements* (ROREs) eine zusätzliche transkriptional-translational regulierende Schleife und stabilisieren so den Uhrenmechanismus [59]. REV-ERB α führt als Repressor über seine Bindung im *Bmal1*-Promotor zu einer verminderten Transkription von *Bmal1*, während die Transkription von *Per* und *Cry* gefördert wird [58,60]. PER2 wiederum greift positiv in die Transkriptionskontrolle ein, indem es die Transkription von *Rev-erba* inhibiert [61]. Indem ROR α mit REV-ERB α um die Bindungsstellen des *Bmal1*-Promotors konkurriert, steigert er als Aktivator die Expression von *Bmal1* [62].

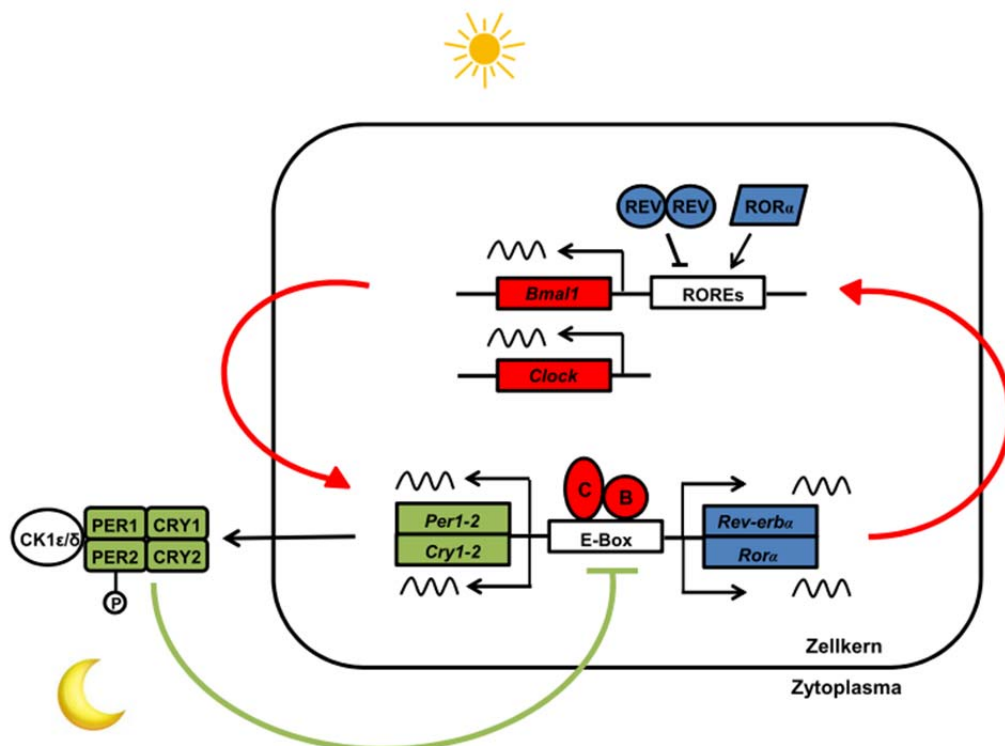


Abb. 3: Schematische Darstellung des circadianen Uhrenmechanismus. B, Bmal = *Brain and muscle aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator-like 1*; CK = Caseinkinase; C, Clock = *Circadian locomotor output cycle kaput*; Cry = Cryptochrome, E-Box = *Enhancer Box*; Per = *Period*; Rev-erba = *Reverse erythroblastosis virus- α* ; ROREs = *Retinoic acid-related orphan receptor response elements*; Rora = *Retinoic acid-related orphan receptor- α* (Abbildung modifiziert nach Reppert und Weaver, 2002 [10]).

1.7 Der Insulin-Melatonin-Antagonismus

Auch das Insulin zeigt beim Menschen eine diurnale Rhythmik, allerdings mit höheren Serumkonzentrationen während des Tages und abfallenden Werten in der Nacht [63,64]. Obwohl die Blutglukosekonzentration in Korrelation zur Nahrungsaufnahme steht, konnte bei nüchternen Ratten gezeigt werden, dass der diurnale Rhythmus der Insulinsekretion unabhängig von Veränderungen der Blutglukose aufrechterhalten bleibt [65]. Auch weisen sowohl die Glukosetoleranz als auch die Insulinsensitivität beim Menschen [66] und bei Nagern

[67] eine deutliche diurnale Rhythmizität auf. Dies lässt vermuten, dass außer des funktionalen Zusammenhangs zwischen Insulin und Glukose weitere Schrittmacher die diurnalen Variationen dieser beiden Merkmale hervorrufen.

Die Wechselwirkung zwischen Melatonin und Insulin sowie dem damit verbundenen Blutglukosespiegel wird kontrovers diskutiert [68]. Zum einen konnte gezeigt werden, dass eine chirurgische Entfernung der Epiphyse, Pinealektomie genannt, zu stark erniedrigten Plasma-Insulinkonzentrationen und erhöhten Blutglukosekonzentrationen führt [69]. Andererseits existieren jedoch auch Untersuchungen, in denen eine Pinealektomie einen Anstieg der Insulinkonzentration in Verbindung mit einem Abfall der Blutglukose nach sich zieht [70]. Bei Blinden wiederum waren hohe Serum-Melatoninkonzentrationen begleitet von erhöhten Blutglukosekonzentrationen [71]. Demgegenüber existieren Studien, die keinen Einfluss von Melatonin auf die Glukose-induzierte Insulinsekretion feststellen konnten [72,73].

Trotz der widersprüchlichen Datenlage hat sich die Auffassung des hemmenden Einflusses von Melatonin auf die pankreatische β -Zelle verstärkt [74,75]. Dieser hemmende Einfluss umfasst sowohl eine Erniedrigung des Insulinspiegels [63] als auch einen Abfall der Glukosetoleranz [76]. Grundsätzlich wird dabei von einer Senkung der stimulierten Insulinsekretion gesprochen [74,77,78], während andere auch eine Beeinflussung der basalen Insulinsekretion finden [79].

Zusätzlich wird jedoch auch die Wirkung von Insulin auf die Melatoninsynthese diskutiert. Während gezeigt wurde, dass eine Insulin-induzierte Hypoglykämie zu einem Anstieg der Aktivität der AANAT sowie des epiphysären Melatoningehaltes führt [80], wird in einer anderen Studie hingegen ein Abfall der Melatoninkonzentration nach Insulininjektion beschrieben [81]. Trotz gegensätzlicher Erkenntnisse wird ein funktioneller Zusammenhang zwischen Insulin und Melatonin bestehen. Zudem wird der Insulinrezeptor (*Insr*) sowohl in zahlreichen Gehirnregionen [82] als auch in der Epiphyse [64] exprimiert. Für eine Interaktion zwischen Insulin und Melatonin spricht ebenfalls die Feststellung, dass die Melatoninsynthese mit steigendem Alter sinkt, während die Synthese von Insulin und die Wahrscheinlichkeit an einem T2DM zu erkranken, ansteigt [83].

Interessanterweise kann der funktionale Zusammenhang zwischen Melatonin und Insulin auch beim Krankheitsbild des Diabetes mellitus beobachtet werden. So weisen diabetische Patienten eine gestörte Melatoninrhythmik auf [84]. Peschke *et al.* konnten zeigen, dass bei Typ 2-diabetischen Patienten und Typ 2-diabetischen *Goto-Kakizaki*(GK)-Ratten signifikant erhöhte Plasma-Insulinkonzentrationen mit erniedrigten Melatoninkonzentrationen koinzidieren [64]. Im Gegensatz dazu verursachte die Behandlung von Ratten mit dem Diabetogen Streptozotocin (STZ), welches die Entwicklung eines T1DM und folglich stark erniedrigte Insulinwerte nach

sich zieht, eine deutliche Erhöhung der Plasma-Melatoninkonzentration [85]. In einer Untersuchung an Typ 2-diabetischen *Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty*(OLETF)-Ratten konnte außerdem nachgewiesen werden, dass die Gabe von Melatonin die durch den T2DM erhöhte Plasma-Insulinkonzentration senkt [86].

Die Bedeutung von Störungen der „inneren Uhr“ im Zusammenhang mit der Genese des Diabetes mellitus konnte insofern untermauert werden, als Schichtarbeit das Risiko für die Entstehung eines T2DM erhöht [87]. Genomweite Assoziationsstudien haben außerdem gezeigt, dass Einzelnukleotid-Polymorphismen (*Single nucleotide polymorphisms*, SNPs), wie man sie auch im Gen des Melatoninrezeptor MT₂ (MTNR1B) gefunden hat, mit einem erhöhten Nüchtern-Blutglukosespiegel sowie einem höheren Risiko an einem T2DM zu erkranken, assoziiert sind [88-90].

Der Mechanismus, der hinter diesem Insulin-Melatonin-Antagonismus steht, ist weitgehend ungeklärt. Dabei wird vermutet, dass die Katecholamine Adrenalin (ADR) und NA den Insulin-Melatonin-Antagonismus kontrollieren. Es ist bekannt, dass Insulin die NA-vermittelte Synthese von Melatonin über posttranskriptionale Vorgänge verstärkt [91]. Interessanterweise ist der Einfluss von Insulin jedoch zeitabhängig, wie eine Untersuchung an *ex vivo*-kultivierten und mit NA-synchronisierten Epiphysen zeigte [92]. Während bestimmter Zeitfenster führte Insulin in dieser Studie jedoch auch zu einer verringerten Melatoninsynthese. Zudem haben Peschke *et al.* niedrige ADR- und NA-Konzentrationen im Plasma Typ 2-diabetischer GK-Ratten im Zusammenhang mit geringen Plasma-Melatoninkonzentrationen gefunden [93].

1.8 Periphere Oszillatoren

Der Mechanismus der „circadianen Uhr“ ist keinesfalls nur auf den SCN beschränkt. Vielmehr konnten zahlreiche neuronale und periphere Gewebe identifiziert werden, die eine circadiane Expression von Uhrengenen zeigen, und daher als periphere Oszillatoren bezeichnet werden [10].

Ex vivo-Kulturen isolierter peripherer Gewebe transgener Mäuse weisen einen circadianen Rhythmus von 2 - 7 Zyklen auf [94]. Die Phase „peripherer Uhren“ ist im Vergleich zu der des SCN um 3 - 9 h verzögert [95]. Dies verdeutlicht, dass „periphere Uhren“ synchronisierende Signale aus dem SCN erhalten müssen, da sie selbst nicht lichtempfindlich sind [96]. Eine Verletzung des SCN führt zu einer Dämpfung der peripheren Oszillation [97]. In einem hierarchischen Modell ist der SCN also der zentrale Stimulator, der seinen Rhythmus selbst generiert, und für das Funktionieren „peripherer Uhren“ unabdingbar ist. Für die Beibehaltung der peripheren circadianen Rhythmik ist der SCN aber nicht zwingend notwendig. Neue

Untersuchungen zeigen, dass isolierte Zellen aus peripheren Geweben einen sich selbst aufrechterhaltenden Rhythmus über mehr als 20 Zyklen aufweisen [98]. Der SCN koordiniert und synchronisiert vielmehr die „peripheren Uhren“ der Gewebe untereinander [98,99].

Wie der SCN mit den peripheren Geweben kommuniziert und diese synchronisiert, ist bisher weitgehend unbekannt. Zahlreiche Beobachtungen unterstützen die Hypothese, dass dies über neuronale Signale des autonomen Nervensystems in Kombination mit humoralen Faktoren wie Melatonin, Glukokortikoiden und Retinsäure vermittelt wird [100-102]. Obwohl Licht der Hauptstimulus des SCN ist, werden „periphere Uhren“ bestimmter Organe, wie beispielsweise die der Leber, sehr stark durch die Nahrung beeinflusst [103]. Zahlreiche Nahrungsfaktoren wie Glukose, Ethanol, Adenosin, Koffein und Thiamin synchronisieren die circadianen Rhythmen peripherer Organe [104]. Die Temperatur greift ebenfalls, unabhängig vom SCN, in das *Entrainment* „peripherer Uhren“ ein [105].

Genexpressionsuntersuchungen haben gezeigt, dass in Geweben, die eine rhythmische Uhrengenenexpression aufweisen (z. B. Leber, Fettgewebe, Skelettmuskulatur), 2 - 10% aller Transkripte circadian oszillieren [10]. Diese Gene verfügen im Promotor über E-Box-Elemente. So können sie durch CLOCK-BMAL1-Heterodimere direkt reguliert und kontrolliert werden. Man bezeichnet sie daher als Uhrengen-kontrollierte Gene (CCGs). Ein wichtiges CCG ist *D site albumin promoter binding protein (Dbp)*, welches als Transkriptionsfaktor in die rhythmische Transkription von Schlüsselenzymen zahlreicher metabolischer Abläufe der Leber involviert ist [106]. Ein weiterer wichtiger Transkriptionsfaktor ist *E4 promoter-binding protein 4 (E4BP4)*, dessen Expression antiphasisch zu der des *Dbp* ist [107], sowie die *Peroxisome proliferator-activated receptors (PPAR) α und γ* , welche in zahlreiche biologische Prozesse wie der Regulation des Lipid- und Energiestoffwechsels involviert sind [108]. Interessanterweise werden diese CCGs nicht nur über den zentralen Uhrenmechanismus reguliert, der Metabolismus beeinflusst umgekehrt auch die „circadiane Uhr“ [109].

1.8.1 Periphere Oszillatoren und Diabetes mellitus

Zusammen mit der weltweit steigenden Prävalenz des T2DM haben auch chronische Schlafstörungen über die letzten zwei bis drei Dekaden stark zugenommen [110]. Vor dem Hintergrund der oben beschriebenen Wechselwirkung zwischen Melatonin und Insulin kann ein Zusammenhang zwischen Störungen der „inneren Uhr“ und der Entstehung eines Diabetes mellitus vermutet werden. Im umgekehrten Sinne ist jedoch auch denkbar, dass der Diabetes mit seinen metabolischen Veränderungen den Mechanismus der „inneren Uhr“ stört. So zeigen Mäuse mit einer Mutation im *Clock*- und/oder *Bmal1*-Gen eine gestörte Glukosetoleranz, eine

veränderte Glukose-stimulierte Insulinsekretion sowie ein Defizit in der Größe pankreatischer Inseln [111-114]. Neueste Studien fanden zudem Polymorphismen im Uhrgenen *Bmal1*, die mit einem erhöhten Risiko für T2DM assoziiert sind [115]. Umgekehrt verändert ein T2DM die Expression von Uhrgenen in der Leber, im viszeralem Fettgewebe [116] sowie in Leukozyten [117]. STZ-behandelte diabetische Mäuse zeigen zudem eine stark verringerte circadiane Expression des Uhrgens *Per2*, wohingegen die Gabe von Insulin diesen Effekt aufhebt [118].

In zahlreichen Untersuchungen werden unter dem Krankheitsbild des T1DM Veränderungen der Leberfunktion, wie z. B. der Gallensäureproduktion [119], des Fremdstoffmetabolismus [120] sowie des Glukosemetabolismus [121] hervorgehoben. Gleichzeitig existieren Verbindungen zwischen Uhrgenen, CCGs sowie der Funktion der Leber [122,123]. Bislang existieren keine Studien, die den Effekt eines spontanen T1DM, vergleichbar mit dem Zustand im humanen System, auf die „circadiane Uhr“ der Leber beleuchten.

1.9 Die LEW.1AR1-*iddm*-Ratte – Modell des spontanen Typ 1-Diabetes

Untersuchungen zum Einfluss von Melatonin auf die Funktion der pankreatischen β -Zelle beschränken sich weitgehend auf Zellkulturmodelle, wie das der Insulin-produzierenden Ratteninsulinomazelle INS1 [74]. Tiermodelle bieten darüber hinaus eine Möglichkeit, die komplexen Wechselwirkungen zwischen Insulin und Melatonin im Gesamtorganismus zu betrachten. Dabei können sowohl die Epiphysen-Insel-Achse als auch die komplexen Auswirkungen eines Diabetes mellitus mit in die Untersuchungen einbezogen werden.

Grundsätzlich muss zwischen spontan und induzierten Typ 1-diabetischen Nagermodellen unterschieden werden. Zur Induktion eines T1DM werden die Chemikalien Alloxan und STZ genutzt [124]. Über die Bildung von Radikalen kommt es hierbei zur Nekrose der pankreatischen β -Zelle, wodurch ein absoluter Insulinmangel entsteht. Zu den spontan diabetischen Nagetiermodellen zählen die *Non-obese-diabetic*(NOD)-Maus, die *BioBreeding*(BB)-Ratte [125] und die LEW.1AR1-*iddm*-Ratte [126].

Durch eine Spontanmutation im congenen Inzuchtstamm LEW.1AR1 entstand 2001 die LEW.1AR1-*iddm* Ratte. Um den 60. Lebensstag entwickeln diese Tiere das Vollbild eines klassischen T1DM, hervorgerufen durch eine rasche autoimmunologische Zerstörung der β -Zelle. Zu den wichtigsten Charakteristika, der durch Rückkreuzung entstandenen Population, zählen eine schwere, progrediente Hyperglykämie (> 10 mmol/l), Gewichtsabnahme, Polydipsie, Polyurie, Glukosurie, Ketonurie und Ketoazidose [126]. Diese Merkmale prägen auch das klinische Bild eines unbehandelten humanen T1DM. Im Gegensatz zu vergleichbaren Versuchstiermodellen, wie der NOD-Maus oder der BB-Ratte, weist die LEW.1AR1-*iddm*-Ratte

jedoch weder eine Geschlechtspräferenz noch eine Lymphopenie auf, was ein weiterer Vorteil dieses Stammes ist [126]. Im Unterschied zu den Alloxan- oder STZ-induzierten Typ 1-diabetischen Modellen entwickelt sich der Untergang pankreatischer β -Zellen in diesem Modell aufgrund apoptotischer Prozesse [127]. Andere Organe wie Leber, Niere, Dünndarm, Milz, Thymus, Schilddrüse, Nebenniere und Speicheldrüsen sind durch den Gendefekt morphologisch nicht verändert [128].

1.10 Zielstellung der Arbeit

Zahlreiche Untersuchungen haben einen Zusammenhang zwischen Insulin und Melatonin zeigen können. Melatonin beeinflusst die Insulinsekretion der pankreatischen β -Zelle Melatoninrezeptor-vermittelt, während Insulin in die Melatoninsynthese des Pinealozyten regulierend eingreifen kann. Untersuchungen an hyperinsulinämischen Typ 2-diabetischen GK-Ratten konnten zeigen, dass ihre Plasma-Melatoninkonzentration stark erniedrigt waren [64]. Diese *in vivo*-Beobachtung ist jedoch noch kein Nachweis für einen funktionellen Zusammenhang dieser beiden Hormone. In einer weiterführenden Studie waren STZ-behandelte Typ 1-diabetische Wistar-Ratten von einer signifikant erhöhten Plasma-Melatoninkonzentration gekennzeichnet [85]. Mit Hilfe des Tiermodells der LEW.1AR1-*iddm*-Ratte, welches dem humanen T1DM sehr ähnelt, soll die vorliegende Arbeit die Hypothese eines bestehenden Insulin-Melatonin-Antagonismus untersuchen und einen möglichen Ansatz zur Übertragung auf den Menschen bieten.

Im ersten Teil dieser Arbeit wurde

- die Hypothese des Insulin-Melatonin-Antagonismus durch die diurnale Erfassung von Merkmalen wie der Blutglukosekonzentration, Melatonin- und Insulinkonzentration im Plasma anhand des spontan Typ 1-diabetischen Modells der LEW.1AR1-*iddm*-Ratte verfolgt.
- des Weiteren der Einfluss einer Insulinsubstitution auf diese Merkmale analysiert.
- mittels *real-time* RT-PCR-Untersuchungen an der Epiphyse die Expression von Enzymen der Melatoninsynthese, des *Insr* sowie des *Adrb1* einerseits und über die immunologische Bestimmung der ADR- und NA-Konzentration im Plasma andererseits Beiträge zur Aufklärung von Ursachen und Mechanismen des Insulin-Melatonin-Antagonismus geliefert.
- mittels *real-time* RT-PCR-Untersuchungen die pineale Expression der Uhrengene *Per1* und *Bmal1* im diurnalen Tagesgang charakterisiert, um mögliche Störungen der „zentralen Uhr“ zu erkennen.

Veränderungen und Störungen der „peripheren circadianen Uhr“ der Leber sind immer wieder im Zusammenhang mit einem Diabetes mellitus beobachtet wurden. Dennoch stützen sich auch diese Befunde weitgehend auf Typ 2-diabetische bzw. Alloxan- oder STZ-induzierte Typ 1-diabetische Tiermodelle.

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde daher

- der Einfluss eines spontanen T1DM auf die diurnale hepatische Expression wichtiger Uhrgene (*Per1*, *Per2*, *Bmal1*, *Clock*, *Rev-erba*, *Rora*) und CCGs (*Dbp*, *E4bp4*, *Ppara*, *Pparγ*) anhand des LEW.1AR1-*iddm*-Rattenmodells mittels *real-time* RT-PCR untersucht.
- ferner analysiert, inwieweit die durchgeführte Insulinsubstitution die Expression genannter Uhrgene und CCGs der Leber beeinflusst.

2. Material

2.1 Chemikalien und Reagenzien

Agarose	Promega, Mannheim, Deutschland
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Chloroform	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ethanol	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ethidiumbromid	Promega, Mannheim, Deutschland
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Fluoreszenzfarbstoff EvaGreen®	Biotum, Hayward, CA, USA
Formaldehyd	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Formamid	Promega, Mannheim, Deutschland
Glutathion, reduziert	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Glycerin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Heparin-Natrium	Ratiopharm, Ulm, Deutschland
Isofluran Forene®	Abbott, Wiesbaden, Deutschland
Isopropanol	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
3-(N-Morpholino)-propansulfonsäure (MOPS)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumacetat	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Nuklease-freies Wasser	Promega, Mannheim, Deutschland
Paraformaldehyd	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
PCR-Mastermix	Promega, Mannheim, Deutschland
Peq GOLD TriFast™	Peqlab, Erlangen, Deutschland
Povidon-Jod Braunol®	Ratiopharm, Ulm, Deutschland
Primer	Tib Molbiol, Berlin, Deutschland
Tris	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Insulinpellet Linplant®	LinShin, Toronto, ON, Kanada
BenchTop 100 bp DNA Ladder	Promega, Mannheim, Deutschland
Ultra Low Range DNA Ladder	Fermentas, St.-Leon-Rot, Deutschland

2.2 Systeme

DNase-Kit DNA-free™	Ambion, Austin, TX, USA
Insulin-RIA-Kit (Coat-A-Count® Insulin)	Siemens, Eschborn, Deutschland
Melatonin-RIA-Kit (Melatonin <i>rat</i> RIA)	Labor Diagnostika Nord, Nordhorn, Deutschland
AMV Reverse Transcriptase-Kit	Promega, Mannheim, Deutschland
Adrenalin- und Noradrenalin-ELISA-Kit (2-CAT (A-N) Research ELISA™)	Labor Diagnostika Nord, Nordhorn, Deutschland

2.3 Zubehör und Geräte

Autoklav SFE 500	Memmert, Schwabach, Deutschland
Blutzuckermessgerät (MediSense®Precision® Xtra)	Abbott, Wiesbaden, Deutschland
Blutzuckerteststreifen (MediSense®Precision® Xtra Plus)	Abbott, Wiesbaden, Deutschland
Einmalspritze	Braun, Melsungen, Deutschland
Elektrophoresekammern	Biometra, Göttingen, Deutschland
γ -Counter Multi Crystal LB 2111	Berthold Technologies, Bad Wildbad, Deutschland
Gelatineschwamm Gelaspon®	Chauvin ankerpharm, Berlin, Deutschland
Harnglukose-Teststreifen Biophan G	Kallies Feinchemie, Sebnitz, Deutschland
Kanüle	Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
Magnetrührer RCT basic	IKA-Werke, Staufen, Deutschland
Mikroplattenleser Spectra II	SLT Labinstruments, Crailsheim, Deutschland
pH-Meter 765 Calimatic	Knick, Berlin, Deutschland
Pipettenspitzen	Brand, Wertheim, Deutschland
Pipettenspitzen, gestopft	Peqlab, Erlangen, Deutschland
Reagenz- und Zentrifugenröhrchen	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Reaktionsgefäße, 1,5 ml, 2 ml	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Reaktionsgefäße, 0,2 ml, 0,1 ml	LTF Labortechnik, Wasserburg, Deutschland
Schüttler KS 15A	Edmund Bühler, Hechingen, Deutschland
Spannungsgeräte	Biometra, Göttingen, Deutschland
Spektrophotometer NanoVue™ Plus	GE Healthcare, München, Deutschland
Dispergiergerät T 25 basic Ultra-Turrax®	IKA-Werke, Staufen, Deutschland
Thermocycler Rotor-Gene™ 6000	Corbett Research, Mortlake, VIC, Australien
Thermomixer comfort 5355	Eppendorf, Hamburg, Deutschland

UV-Dokumentationseinrichtung CN 2000W	LTF Labortechnik, Wasserburg, Deutschland
Vortexer Vortex Genie 2	Scientific Industries, New York, NY, USA
Wasserbad W12	Prüfgeräte-Werk, Medingen, Deutschland
Zentrifugen	
Multifuge 4KR	Heraeus, Hanau, Deutschland
Biofuge primo R	Heraeus, Hanau, Deutschland
5415D	Eppendorf, Hamburg, Deutschland

2.4 Gebrauchslösungen und Puffer

Die verwendeten Lösungen und Puffer wurden, sofern nicht anders beschrieben, mit Wasser aus der Reinstwasseranlage EASYpure RF (Barnstead, Dubuque, IA, USA) hergestellt.

<u>DEPC-Wasser</u>	0,1% DEPC 24 h bei 37°C Autoklavieren
<u>10 x MOPS-Puffer</u>	200 mmol/l MOPS 50 mmol/l Natriumacetat 10 mmol/l EDTA pH 7,0 <i>ad</i> 1 l mit DEPC-Wasser
<u>10 x TAE-Puffer</u>	50 mmol/l Tris 50 mmol/l Natriumacetat 2 mmol/l EDTA pH 8,0
<u>Proben-Puffer</u>	87% Glycerin 0,05% Bromphenolblau 250 mmol/l EDTA pH 8,0

2.5 Analysensoftware

Bio1D

Vilber Lourmat, Eberhardzell, Deutschland

Easy WIN fitting

Tecan Deutschland, Crailshaim, Deutschland

Rotor-Gene™ 6000 Series Software 1.7

Corbett Research, Mortlake, VIC, Australien

Time Series Analysis Serial Cosinor 5.1

Expert Soft Technologie, Esvres, Frankreich

Statistiksoftware GraphPad Prism® 4.0

GraphPad Software, La Jolla, CA, USA

3. Methoden

3.1 Versuchsaufbau

Für die Untersuchungen wurden männliche normoglykämische LEW.1AR1-Ratten (congen, Medizinische Hochschule Hannover; im Folgenden als „Kontrolle“ bezeichnet), Typ 1-diabetische LEW.1AR1-*iddm*-Ratten (coisogen, Medizinische Hochschule Hannover; als „Iddm“ bezeichnet) sowie Insulin-substituierte Typ 1-diabetische LEW.1AR1-*iddm*-Ratten (als „Iddm + Insulin“ bezeichnet) herangezogen. Die Verpaarung des LEW.1AR1-Hintergrundstammes sowie des LEW.1AR1-*iddm*-Stammes erfolgte durch Inzucht. Wie beschrieben erkrankt die LEW.1AR1-*iddm*-Ratte mit einer Inzidenz von ca. 30% im Alter von etwa 60 Tagen an einem T1DM [126]. Die metabolische Stoffwechsellage würde innerhalb weniger Tage ohne eine adäquate Insulintherapie zum Tod der Tiere führen. Ab dem 45. Lebenstag erfolgte daher alle 48 h eine Bestimmung der Harnglukose mittels Harnglukose-Teststreifen. Positiv als Typ 1-diabetisch diagnostizierte Tiere wurden einem der beschriebenen Tageszeitpunkte zugeordnet (Kapitel 3.3). Zusätzlich wurden Typ 1-diabetische Ratten mit Insulin substituiert (Kapitel 3.2).

3.1.1 Haltung und Fütterung der Versuchstiere

Die Haltung der Versuchstiere in den genannten Gruppen erfolgte zu zweit oder zu dritt in durchsichtigen Polycarbonat-Käfigen (Makrolon, Typ III) auf einem staubfreien Weichholzgranulat in den Versuchstierlabors des Zentrums für Medizinische Grundlagenforschung der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg. Im Versuchstierraum wurde eine mittlere Temperatur von $22 \pm 1^\circ\text{C}$ und eine relative Luftfeuchtigkeit von 50 - 60% gewährleistet. Das Lichtregime des Versuchstierraumes entsprach einem durch Kunstlicht vorgegebenen Hell-Dunkel-Rhythmus von L:D = 12:12 h (Abb. 4). Die Versuchstiere erhielten ein kommerzielles, pelletiertes Standardfutter (Altromin 1314; Altromin, Lage, Deutschland). Wasser und Futter standen den Tieren *ad libitum* zur Verfügung. Die Haltung und Pflege der Versuchstiere erfolgte in Übereinkunft mit der Tierversuchsrichtlinie nach Maßgabe der Europäischen Union (Direktive 86/209/EEC).

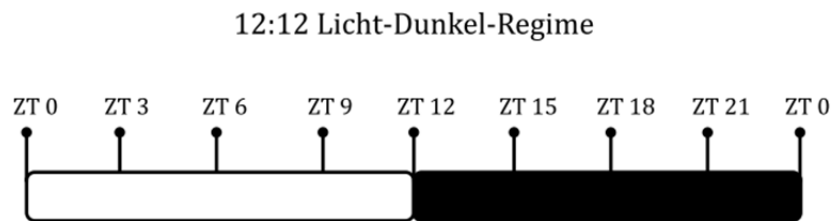


Abb. 4: Schematische Darstellung des Lichtregimes während des Versuchs. Die Versuchstiere wurden unter einem Licht-Dunkel-Regime von L:D = 12:12 h gehalten. Tötung der Tiere und Probegewinnung erfolgte in 3 h-Intervallen. ZT bezeichnet die Zeitgeberzeit. ZT 0 entspricht dem Zeitpunkt des Beginns der Lichtphase.

3.2 Insulinsubstitution der Typ 1-diabetischen Tiere

Alle tierexperimentellen Untersuchungen bzw. Eingriffe erfolgten nach Prüfung und Genehmigung durch die ansässige Tierversuchs-Ethik-Kommission des Landesverwaltungsamtes (Nr. 2-737 MLU). Diabetische Ratten wurden für die Insulinsubstitution kurzzeitig mit dem Inhalationsnarkotikum Isofluran betäubt. Der Eingriff erfolgte grundsätzlich während der Hellphase, um eine Beeinflussung des Melatoninrhythmus zu vermeiden. Durch Kappen der Schwanzspitze konnte Blut für die Bestimmung der peripheren Blutglukosekonzentration gewonnen werden, welche mit Hilfe eines kommerziellen Blutglukose-Messgeräts bestimmt wurde (Kapitel 3.4). Konzentrationen über 10 mmol/l wurden dabei als diabetisch eingestuft. Die Blutung der Schwanzspitze wurde mittels eines sterilen Gelatineschwammes gestillt. Die Insulinsubstitution erfolgte mit Hilfe eines Pellets, das laut Herstellerangaben innerhalb von 24 h zwei Internationale Einheiten (IE) Rinderinsulin freisetzt, eine Dosis, welche für bis zu 40 Tage garantiert wird. Für die Applikation des Insulinpellets wurden die Ratten in einen kurzen Isofluran-Rausch (Narkosestadium III) versetzt. Das Fell im Bereich des Nackens wurde vorsichtig entfernt und mit einer 10%igen Povidon-Jod-Lösung desinfiziert. Nach Vorstechen der Implantationsstelle mit einer sterilen Nadel wurde das Insulin-Implantat, mit Hilfe des zuvor desinfizierten Trokars und Mandrins, subkutan platziert. Die Einstichstelle wurde anschließend mit Povidon-Jod-Lösung gereinigt. Aufgrund des noch geringen Körpergewichtes zum Zeitpunkt der Manifestation des T1DM wurde den Tieren nur ein halbes Implantat verabreicht. Die Insulinsubstitution dauerte im Mittel zehn Tage. Die Kontrolle der Harnglukose erfolgte weiterhin im Abstand von 48 h, um eine metabolische Entgleisung trotz Insulingabe auszuschließen. Am Ende der zehntägigen Insulinsubstitution wurden die Tiere zu den entsprechenden Tageszeitpunkten (Abb. 4) durch Herzventrikelpunktion (Kapitel 3.3) getötet.

3.3 Probengewinnung

Für die Charakterisierung von Merkmalen im diurnalen Tagesgang wurden mindestens fünf Tiere der drei Versuchsgruppen ab Beginn der Hellphase (ZT 0, Abb. 4) im Abstand von 3 h getötet. Eine schematische Darstellung des Licht- sowie Probengewinnungsregimes sind in Abb. 4 dargestellt. Zur Vermeidung von Störungen des Melatoninhaushaltes wurde während der Dunkelphase, aufgrund reduzierter Wahrnehmung der Tiere für langwelliges Licht, mit einer Rotlichtlampe gearbeitet. Die Ratten wurden mit dem Inhalationsnarkotikum Isofluran betäubt, das Körpergewicht bestimmt, die Schwanzspitze gekappt und die periphere Blutglukosekonzentration ermittelt. Für die Durchführung der Herzventrikelpunktion und der Organentnahme wurden Bauch- und Brustraum eröffnet. Nach einer teilweisen Zertrennung des Zwerchfells und einer stumpfen Präparation des Herzens wurde zentralvenöses Blut mit Hilfe einer heparinisierten Einmalspritze durch Punktion des rechten Herzventrikels entnommen. Zur Gewinnung von Blutplasma wurde das Vollblut anschließend in Reaktionsröhrchen, die 250 µl 8%iges EDTA zur Gerinnungshemmung enthielten, überführt. Im Anschluss wurden Organe und Gewebeanteile (Leber, Niere, Darm, Pankreas, Muskulatur und Fettgewebe) entnommen und asserviert. Nach Dekapitation des Tieres erfolgte die Präparation und Gewinnung der Epiphyse. Die Gewebeproben wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C bis zur weiteren Aufarbeitung gelagert.

3.4 Bestimmung der Glukosekonzentration im Blut

Die Bestimmung der Blutglukosekonzentration erfolgte mit Hilfe eines kommerziell erhältlichen Blutglukose-Messgeräts mit Teststreifen, welches auf Basis der Glukose-Dehydrogenase-Methode funktioniert. Die Glukose wird dabei katalytisch durch die Glukose-Dehydrogenase zu Glukonolakton umgesetzt. Die dabei freiwerdenden Elektronen und die daraus resultierende Stromstärke, die zwischen Arbeits- und Referenzelektrode entsteht, kann amperometrisch gemessen werden.

3.5 Gewinnung des Blutplasmas

Für die Gewinnung des Plasmas wurde das entnommene Blut für 10 min bei $1.500 \times g$ und Raumtemperatur (RT) zentrifugiert und der Überstand bis zur weiteren analytischen Verwendung bei -80°C gelagert. Um eine Oxidation von Katecholaminen zu verhindern, wurde einem Aliquot Blutplasma (500 µl) 10 µl 0,3 mol/l Glutathion als Antioxidans zugesetzt.

3.6 Radioimmunologische Analytik

3.6.1 Bestimmung der Melatoninkonzentration im Plasma

Die quantitative Bestimmung der Melatoninkonzentration im Plasma erfolgte mit Hilfe eines kommerziell erhältlichen radioimmunologischen Kits [129]. Der *Radioimmunoassay* (RIA) ist eine durch Yalow und Berson entwickelte, immunchemische Methode zur quantitativen Bestimmung kleinster Substanzmengen an Hormonen, Enzymen und pharmakologischen Wirkstoffen, welche auf einer Antigen-Antikörper-Reaktion beruht [130].

Zunächst wurden 20 µl einer speziellen Ausgleichsmatrix auf den Boden von 5 ml Polypropylenröhrchen gegeben. Welp *et al.* verwenden diese spezielle Ausgleichsmatrix, um eine Beeinflussung der Messergebnisse aufgrund der differierenden Zusammensetzung zwischen Standards und Probenmatrix zu verringern [129]. Zu 50 µl Plasma wurden 25 µl einer pepsinhaltigen Enzymlösung hinzugefügt, gemischt und für 60 min bei RT inkubiert. Infolge dieser Reaktion wurde albumingebundenes Melatonin freigesetzt und konnte in die nachfolgende Messung einbezogen werden. Die Zugabe von 50 µl Assay-Puffer führte zur Inaktivierung des Pepsins. Im nächsten Schritt wurden dem Ansatz 25 µl Melatonin-Antiserum (polyklonal, Kaninchen) zugesetzt, gemischt und erneut für 60 min bei RT inkubiert. Nach Zugabe von 50 µl ¹²⁵J-markiertem Melatonin (Aktivität < 200 kBq) wurde der Ansatz für 20 - 24 h bei RT inkubiert. Das anschließende Hinzufügen von 1 ml eisgekühltem Präzipitationsreagenz (anti-Kaninchen IgG) für 20 min bei 2 - 8°C führte zum Ausfällen der Immunkomplexe. Nach einer 20-minütigen Zentrifugation bei 3.000 x g und 5°C wurden die Überstände vollständig dekantiert und die Radioaktivität der Immunkomplexe für 1 min im γ -Counter gemessen. Die Berechnung der Melatoninkonzentration erfolgte mit Hilfe der Software des γ -Counters auf der Grundlage einer gemäß des Kits erstellten Eichkurve, welche einen Messbereich zwischen 52 pmol/l und 17.220 pmol/l abdeckte. Die realen Werte der Melatoninmessungen lagen in einem Bereich von 48 pmol/l bis 15.080 pmol/l. Laut Hersteller betrug die analytische Sensitivität, d. h. die Nachweisgrenze, 31 pmol/l für Plasma. Das Antiserum des Melatonin-RIA zeichnet sich durch besonders niedrige Kreuzreaktivitäten gegenüber Substanzen wie Serotonin, DL-Tryptophan und 5-Hydroxy-L-tryptophan aus. Die Intra-Assay-Variabilität rangierte dabei zwischen 6,8% und 11,7%. Die Inter-Assay-Variabilität ergab Werte zwischen 5,4% und 11,2%. Die Messungen erfolgten jeweils in Doppelbestimmung.

3.6.2 Bestimmung der Insulinkonzentration im Plasma

Die quantitative Bestimmung der Insulinkonzentration im Plasma erfolgte mittels eines Festphasen-RIA, wobei ^{125}J -markiertes Insulin mit dem Insulin im Plasma um Antikörperbindungsstellen konkurriert. Dafür wurden 200 μl Plasma in die mit Insulin-Antikörpern beschichteten Röhrchen pipettiert und mit 1 ml Tracer für 18 - 24 h bei RT inkubiert. Der Überstand wurde dekantiert und die Radioaktivität der Immunkomplexe für 1 min im γ -Counter gemessen. Die dabei erhaltenen Zählereignisse pro Minute sind umgekehrt proportional zur Insulinkonzentration der Probe. Die Berechnung der Insulinkonzentration erfolgte mit Hilfe der Software des γ -Counters anhand einer Eichkurve. Diese Eichkurve wurde durch eine im Kit vorgegebene Insulin-Verdünnungsreihe erstellt, die einen Arbeitsbereich zwischen 41 pmol/l und 2807 pmol/l abdeckte. Die realen Werte der Insulinmessungen lagen in einem Bereich zwischen 2,57 pmol/l und 463 pmol/l. Laut Hersteller betrug die analytische Sensitivität 9 pmol/l für Serum. Das Antiserum des RIA ist hochspezifisch für Insulin und zeichnet sich durch besonders niedrige Kreuzreaktivitäten zu anderen ähnlichen Substanzen wie dem *Connecting peptide* (C-Peptid) und Glukagon aus. Die Intra-Assay-Variabilität rangierte zwischen 3,1% und 9,3%. Die Inter-Assay-Variabilität ergab Werte zwischen 4,9% und 10,0%. Die Messungen erfolgten jeweils in Doppelbestimmung.

3.7 Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

Der *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) ist ein durch Engvall und Perlmann entwickeltes, hochspezifisches und sensitives Immunoassay-Verfahren, welches basierend auf einer immunologischen Reaktion dem Nachweis bzw. der Quantifizierung von Substanzen wie Proteinen, Viren aber auch niedermolekularen Verbindungen dient [131]. Die enzymatische Reaktion eines am Antikörper gekoppelten Enzyms wird dabei anhand eines Farbumschlages gemessen. Die Farbreaktion pro Zeit ist umgekehrt proportional zur Konzentration des Probenmoleküls.

3.7.1 Bestimmung der Katecholaminkonzentration im Plasma

Die Bestimmung der ADR- und NA-Konzentration im Plasma erfolgte unter Verwendung eines kommerziell erhältlichen kompetitiven indirekten ELISA-Kits. Da ADR und NA licht- und oxidationsempfindlich sind, wurde ein Stabilisator als Antioxidans zugesetzt. Hierfür wurden 500 μl des Blutplasmas mit je 10 μl 0,3 mol/l Glutathion versetzt.

Für die Extraktion der Katecholamine aus dem Plasma wurden 10 µl Probe mit jeweils 50 µl Assay-Puffer und 50 µl Extraktions-Puffer in ein *well* einer 96-*well*-Platte gegeben und für 60 min bei RT inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit je 1 ml Wasch-Puffer erfolgte eine Acylierungsreaktion, die der Stabilisierung der nachzuweisenden Verbindungen und damit der Erhöhung der Nachweisempfindlichkeit diente. Dies erfolgte durch Zugabe von 150 µl Acylierungs-Puffer sowie 25 µl Acylierungsreagenz und einer Inkubation für 20 min bei RT. Nach erneutem zweimaligen Waschen mit je 1 ml Wasch-Puffer wurden 150 µl 0,025 mol/l Salzsäure zugesetzt und für 10 min bei RT inkubiert. Für die sich anschließende enzymatische Konversion wurden 140 µl des Überstandes mit 50 µl einer Enzymlösung versetzt und für 2 h bei 37°C inkubiert. 90 µl des Überstandes wurden auf eine mit dem Antigen markierte Mikrotiterplatte gegeben und 50 µl des entsprechenden Antiserums für ADR oder NA zugesetzt. Es folgte eine Inkubation von 15 - 20 h bei 4°C und ein viermaliges Waschen mit je 300 µl Wasch-Puffer. Im nächsten Schritt wurden 100 µl des zweiten Meerrettich-Peroxidase-gekoppelten Antikörpers hinzugefügt und für 30 min bei RT inkubiert. Nach viermaligem Waschen konnte das Antigen detektiert und quantifiziert werden. Hierfür wurden 100 µl Substrat zugegeben und für 30 min bei RT inkubiert. Nach abschließender Zugabe von 100 µl Stopp-Reagenz konnte die Absorption bei 450 nm innerhalb von 10 min spektralphotometrisch gemessen werden. Die Bestimmung der Katecholaminkonzentration erfolgte mit Hilfe einer mitgeführten Standardreihe. Der Messbereich des ELISA lag für ADR zwischen 2,5 nmol/l und 245,7 nmol/l bzw. für NA zwischen 2,7 nmol/l und 266,0 nmol/l. Laut Hersteller betrug die analytische Sensitivität 1,64 nmol/l für ADR und 1,18 nmol/l für NA. Die Kreuzreaktivitäten für Dopamin, Metanephrin, Normetanephrene und 3-Methoxytyramin lagen bei Werten < 0,0009%. Die realen Konzentrationen dieser Messungen befanden sich zwischen 4,4 nmol/l und 173,1 nmol/l für ADR bzw. 6,5 nmol/l und 263,6 nmol/l für NA. Die Intra-Assay-Variabilität rangierte zwischen 9,3% und 17,1% für ADR, für NA zwischen 8,4% und 15,6%. Die Inter-Assay-Variabilität ergab Werte zwischen 11,2% und 16,3% für ADR bzw. 8,4% und 12,2% für NA. Die Messungen erfolgten jeweils in Doppelbestimmung.

3.8 Molekularbiologische Analytik

3.8.1 RNA-Isolierung

RNA ist prinzipiell sehr anfällig gegenüber der Degradation durch ubiquitär vorkommende RNasen. Um diesen Abbau weitgehend einzugrenzen, wurde ausschließlich mit autoklavierten Materialien sowie mit Nuklease-freiem Wasser gearbeitet.

Die Isolation der Gesamt-RNA erfolgte mittels TriFast™, einem stabilen Homogenat von Phenol und chaotropen Salzen wie Guanidiniumthiocyanat. Hierbei handelt es sich um eine Modifikation der Guanidiniumthiocyanat-Phenol-Chloroform-Extraktionsmethode nach Chomczynski und Sacchi [132]. Für die Extraktion wurde die gesamte Epiphyse bzw. Lebergewebe in 1 ml TriFast™ aufgenommen und mechanisch homogenisiert. Als nächstes wurden 200 µl eisgekühltes Chloroform zugegeben und durch mehrmaliges Schwenken gemischt. Nach einer Inkubationszeit von 3 min bei RT erfolgte eine 15-minütige Zentrifugation bei 10.000 x g und 4°C. Das Guanidiniumthiocyanat denaturiert Proteine einschließlich RNasen und separiert die ribosomale RNA von den Ribosomen. Daraus resultierten drei Schichten: eine obere, wässrig-farblose Phase, in der sich die gesamte RNA befindet, eine mittlere Interphase, die Proteine enthält und eine untere organische Phenol-Chloroform-Phase. Die obere Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die RNA durch Zugabe von 500 µl eisgekühltem Isopropanol gefällt und durch Zentrifugation für 15 min bei 4°C und 10.000 x g als Pellet gewonnen. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und verworfen. Nach dem Waschen des RNA-Pellets mit 1 ml eisgekühlten 70%igen Ethanol wurde erneut für 15 min bei 4°C und 10.000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und verworfen. Nach vollständigem Trocknen des RNA-Pellets wurde dieses in 50 µl Nuklease-freiem Wasser aufgenommen und über Nacht bei 4°C gelöst. Die isolierte RNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei -80°C asserviert.

Die Messung der RNA-Konzentration erfolgte spektralphotometrisch bei 260 nm. Das Prinzip der Konzentrationsbestimmung beruht auf der Tatsache, dass das Absorptionsmaximum der aromatischen Purin- und Pyrimidinringe der Nukleinsäurebasen bei 260 nm liegt [133]. Eine optische Dichte von 1,0 entspricht in diesem Fall einer RNA-Konzentration von 40 µg/ml (Abb. 5). Aussagen über die Reinheit der RNA-Präparation wurden anhand des Verhältnisses der optischen Dichte der Nukleinsäuren ($\lambda = 260$ nm) zur optischen Dichte von Protein ($\lambda = 280$ nm) getroffen. Das Verhältnis sollte sich dabei in einem Bereich von 1,8 bis 2,0 bewegen. Quotienten $\leq 1,8$ weisen auf eine Verunreinigung mit Proteinen oder Phenol, Werte über 2,0 auf Kontaminationen mit DNA hin.

$C_{\text{RNA}} = A_{260} \times 40$	
C_{RNA}	Konzentration an Gesamt-RNA ($\mu\text{g/ml}$)
A_{260}	Absorption bei 260 nm Wellenlänge
40	Multiplikationsfaktor für RNA

Abb. 5: Berechnung der Gesamt-RNA-Konzentration.

3.8.2 RNA-Agarosegelelektrophorese

Um die Integrität der isolierten RNA beurteilen zu können, wurde eine RNA-Agarosegelelektrophorese durchgeführt. Die einzelsträngige RNA neigt im Allgemeinen dazu, Sekundärstrukturen durch intramolekulare Basenpaarung auszubilden. Aus diesem Grund wurde die Elektrophorese unter denaturierenden Bedingungen durchgeführt, wobei Formaldehyd als Denaturierungsmittel verwendet wurde. Bei intakter eukaryotischer RNA wurden zwei scharfe Banden der ribosomalen RNA (rRNA), als 28S und 18S rRNA bezeichnet, nach Ethidiumbromidfärbung im Gel sichtbar.

Tabelle 1: Reagenzien für die RNA-Agarosegelelektrophorese

Reagenz	Ansatz
1 x MOPS-Puffer	100 ml 10 x MOPS-Puffer, 900 ml DEPC-Wasser
1,5%iges Agarosegel	2,25 g Agarose, 123,75 ml DEPC-Wasser, 17,5 ml MOPS-Puffer, 4,875 ml 37%iges Formaldehyd
RNA-Probe	6 μl RNA, 2,5 μl 10 x MOPS-Puffer, 12 μl Formamid, 4 μl Formaldehyd

Für die Herstellung des Agarosegels wurden Agarose und DEPC-Wasser aufgekocht, MOPS-Puffer sowie Formaldehyd hinzugefügt, gemischt und in den mit Kämmen vorbereiteten Gelschlitten gegossen (Tabelle 1). Nach dem Aushärten wurde das Gel für ca. 20 min in 1 x MOPS-Puffer äquilibriert.

Der entsprechend Tabelle 1 beschriebene Probenansatz wurde bei 55°C für 15 min denaturiert. Nach Zugabe von 4 μl Proben-Puffer wurden die aufgetragenen Proben bei einer Spannung von 80 V elektrophoretisch aufgetrennt. Anschließend wurde das Gel für 10 min im Ethidiumbromid-Bad (0,04% v/v) gefärbt und das überschüssige, nicht gebundene, Ethidiumbromid durch Waschen in Reinstwasser entfernt. Ethidiumbromid interkaliert zwischen den Basen der RNA und fluoresziert im ultravioletten Licht. Die Fluoreszenz wurde mittels UV-Dokumentationseinrichtung und dazugehöriger Software erfasst.

3.8.3 DNase-Verdau

Zur Entfernung möglicher DNA-Verunreinigungen wurde die isolierte RNA einer DNase-Behandlung mit DNase I unterzogen. Des Weiteren wurden durch diese Behandlung bivalente Kationen, wie Magnesium und Calcium, die eine RNA-Degradation bei RNA-Erhitzung katalysieren können, entfernt.

Zu 25 µl RNA wurden 2,5 µl 10 x DNase I-Puffer und 0,25 µl DNase I gegeben, gemischt und für 25 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden 2,5 µl des DNase Inaktivierungs-Reagenz hinzugegeben, gemischt und für 2 min bei RT inkubiert. Nach einer Zentrifugation bei 10.000 x g für 1 min und RT wurde der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die Lagerung der DNase-behandelten RNA erfolgte bis zur weiteren Verwendung bei -80°C.

3.8.4 Reverse Transkriptionsreaktion

Als Reverse Transkription bezeichnet man die Umschreibung der zuvor isolierten einzelsträngigen mRNA in die komplementäre DNA (cDNA). Dies erfolgte mit Hilfe des Enzyms AMV Reverse Transcriptase.

Ein µg der DNase-behandelten RNA wurde auf 9,5 µl mit Nuklease-freiem Wasser aufgefüllt und für 10 min bei 70°C inkubiert, um Sekundärstrukturen zu denaturieren. Anschließend wurden 10,5 µl des in Tabelle 2 beschriebenen Ansatzes zugesetzt. Die Synthese der cDNA erfolgte für 1 h bei 37°C im Wasserbad. Ein Erhitzen für 5 min bei 99°C inaktivierte das Enzym und trennte entstandene RNA-DNA-Hybridstränge. Die Proben wurden mit Nuklease-freiem Wasser auf 100 µl aufgefüllt und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

Tabelle 2: Zusammensetzung des Ansatzes für die Reverse Transkription

Reagenz	Menge
MgCl ₂ , 25 mmol/l	4 µl
Reverse Transkriptase-Puffer, 10-fach	2 µl
dNTP-Mix, 10 mmol/l	2 µl
Rekombinanter Ribonuklease-Inhibitor (RNasin)	0,5 µl
Oligo(dT) ₁₅ Primer (0,5 µg/µl)	1 µl
AMV Reverse Transcriptase (30 U/µl)	0,5 µl
Nuklease-freies Wasser	0,5 µl

3.8.5 Polymerasekettenreaktion

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) ist eine Methode zur Vervielfältigung definierter DNA-Abschnitte mittels spezifischer Oligonukleotide (Primer) durch eine DNA-Polymerase [134]. Dadurch ist es möglich, bereits kleinste Mengen DNA nachzuweisen.

Das Prinzip der PCR beruht auf der zyklischen Wiederholung dreier Schritte. Dafür wird DNA zunächst thermisch in zwei Einzelstränge aufgetrennt. Dieser Denaturierung folgt eine Anlagerung (*Annealing*) spezifischer Primerpaare an die Enden der zu amplifizierenden DNA-Abschnitte. Es schließt sich eine Polymerisierungsphase (*Elongation*) der DNA an, in der mit Hilfe einer thermostabilen DNA-Polymerase und Deoxyribonukleotiden der durch die Primer definierte DNA-Bereich amplifiziert wird. Durch mehrmaliges Wiederholen dieses Zyklus kommt es zu einer exponentiellen Vermehrung der DNA.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde zudem das Prinzip der *real-time* Reverse Transkriptase(RT)-PCR angewandt (Abb. 6), wodurch eine Quantifizierung der PCR-Produkte in Echtzeit möglich wurde. Die Quantifizierung erfolgte unter Einsatz eines Fluoreszenzfarbstoffes mittels Fluoreszenz-Messung am Ende der jeweiligen Elongationsphase. Die über eine hochauflösende Detektionseinheit des Cyclers gemessene Fluoreszenzintensität verhält sich proportional zur Menge an gebildeten PCR-Produkten. Als Fluoreszenzfarbstoff wurde EvaGreen® genutzt. Dieser Farbstoff lagert sich zwischen die gebildeten DNA-Doppelstränge und erzeugt Fluoreszenz in der Phase vorliegender DNA-Doppelstränge, d. h. am Ende der Elongationsphase. EvaGreen® zeichnet sich, verglichen mit dem üblicherweise verwendeten SYBR®Green, durch seine höhere Stabilität und Sensitivität aus [135]. Die Quantifizierung der mRNA-Expression erfolgte mittels der durch die Analysensoftware berechneten *Cycle threshold*(C_t)-Werte. Diese Größe entspricht der exponentiellen Zunahme der DNA, an dem das in Echtzeit aufgezeichnete Fluoreszenzsignal über einen definierten Schwellenwert (Hintergrundwert) in der exponentiellen Phase der Amplifikation ansteigt. Die am Ende jedes PCR-Laufs erstellte Schmelzkurve gibt Aufschluss über die Spezifität der gebildeten Produkte. Dazu wird die Temperatur kontinuierlich von 55°C auf 99°C erhöht. Wird die für das Produkt spezifische Schmelztemperatur erreicht, kommt es zur Auftrennung des Doppelstranges. Die Freisetzung des eingeschlossenen Farbstoffes wird als Fluoreszenzabnahme registriert. Spezifische Produkte weisen dabei einen höheren Schmelzpunkt als unspezifische Produkte oder Primerdimere auf. Außerdem gibt die Höhe des Peaks Auskunft über die Menge des gebildeten Amplikons. Zur Optimierung der *real-time* RT-PCR wurde mit einem *Touchdown*-PCR-Protokoll gearbeitet. Dadurch erhöht sich Spezifität, Sensitivität und Ausbeute der gebildeten Reaktionsprodukte, vor allem dann, wenn es sich um schwer zu amplifizierende Templates handelt [136]. Die Spezifität der Primerbindung wird dabei

durch eine Annäherung der *Annealing*-Temperatur an die zu erwartende Schmelztemperatur des Primers erhöht. Der Ablauf der durchgeführten *real-time* RT-PCR sowie die Zusammensetzung des Reaktionsansatzes sind in Abb. 6 sowie Tabelle 3 beschrieben. Eigenschaften der für die *real-time* RT-PCR eingesetzten Primer sind in Tabelle 4 dargestellt.

Phase	Temperatur	Dauer	
Initiale Denaturierung	95°C	120 s	
Denaturierung	94°C	30 s	} 40 Zyklen
<i>Annealing</i>	59°C (<i>Touchdown</i> von 64°C mit einer Verringerung von 1°C pro Zyklus)	30 s	
Elongation	72°C	30 s	
Fluoreszenzbestimmung	80°C	15 s	
Schmelzkurvenanalyse	55–95°C	5 s/ 1°C	

Abb. 6: Schematische Darstellung des Thermoprofils der *real-time* RT-PCR.

Als Negativkontrolle wurden anstatt des Templates 4 µl Nuklease-freies Wasser eingesetzt. Mit Hilfe der $\Delta\Delta C_T$ -Methode [137] und der durch die Gerätesoftware ermittelten C_T -Werte wurden die relativen Expressionen der untersuchten Gene berechnet. Zur Normalisierung der Expressionsergebnisse wurde β -Actin als konstitutiv exprimiertes Gen verwendet.

Tabelle 3: Reaktionsansatz für die *real-time* RT-PCR

Reagenzien	Menge
PCR-Mastermix	10 µl
EvaGreen®	0,25 µl
Vorwärtsprimer (25 µmol/l)	0,5 µl
Rückwärtsprimer (25 µmol/l)	0,5 µl
Nuklease-freies Wasser	4,75 µl
Template	4 µl

Tabelle 4: Eigenschaften der für die *real-time* RT-PCR-Untersuchungen verwendeten Primer

Gen		Primersequenz	Produktlänge (bp)	Genbank-Nr.
<i>Aanat</i>	For.	5' GAAGGGAGACAGCAGTTC 3'	144	NM 012818.2
	Rev.	5' GTCCTGGTCTTGCCTTTG 3'		
<i>Adrb1</i>	For.	5' GTAGTGGGCAACGTGTTGGT 3'	199	NM 012701.1
	Rev.	5' CGTCTACCGAAGTCCAGAGC 3'		
<i>β-Actin</i>	For.	5' ACTCCTACGTGGGCGACGAGG 3'	389	NM 031144.3
	Rev.	5' CAGGTCCAGACGCAGGATGGC 3'		
<i>Bmal1</i>	For.	5' AAATCACCCTGCTCAGGAT 3'	173	NM 024362.2
	Rev.	5' TTCCCTCGGTCACATCCTAC 3'		
<i>Clock</i>	For.	5' AAGTTAGGGCTGAAAGACGGCG 3'	173	NM 021856.1
	Rev.	5' TGAGCTTCTGGAGGAGGCAGAAG 3'		
<i>Cry1</i>	For.	5' AGTTCCTCCCTTTCTCTT 3'	101	NM 198750
	Rev.	5' GGGTCCCTTCCATTTGTCA 3'		
<i>Dbp</i>	For.	5' CCGTGGAGGTGCTAATGACCT 3'	105	NM 012543.2
	Rev.	5' CCTCTGAGAAGCGGTGCCT 3'		
<i>E4bp4</i>	For.	5' GTACGCCCAAGAAATCCAGA 3'	162	NM 053727.2
	Rev.	5' AGCGAGCTCTGAGGAGAGTG 3'		
<i>Hiomt</i>	For.	5' GCTGGTGACTTCTTCCGTTC 3'	218	NM 144759.2
	Rev.	5' TGCAGCATCATGTTGAGTGA 3'		
<i>Insr</i>	For.	5' TCAGAACCCGATGACCCTAC 3'	209	NM 017071.2
	Rev.	5' GGGATGCACTTGTGTGTG 3'		
<i>Per1</i>	For.	5' CCAGGCCCGGAGAACCCTTTT 3'	403	NM 001034125.1
	Rev.	5' CGAAGTTTGAGCTCCCGAAGT 3'		
<i>Per2</i>	For.	5' GCAGCCTTTCGATTATTCTC 3'	97	NM 031678.1
	Rev.	5' GCTCCACGGGTTGATGAAG 3'		
<i>Ppara</i>	For.	5' CCCGCTGGCCACAACCATT 3'	221	NM 013196.1
	Rev.	5' GAGCCCTCCGAGCCTGGACA 3'		
<i>Ppary</i>	For.	5' GCCTGCGGAAGCCCTTTGGT 3'	140	NM 013124.3
	Rev.	5' CAGCAAGCCTGGGCGGTCTC 3'		
<i>Rev-erba</i>	For.	5' ACAGCTGACACCACCAGATC 3'	101	NM 145775.2
	Rev.	5' CATGGGCATAGGTGAAGATTTCT 3'		
<i>Rora</i>	For.	5' GTCAGCAGCTTCTACCTGGAC 3'	360	NM 001106834.1
	Rev.	5' GTGTTGTTCTGAGAGTCAAAGGCACG 3'		

Aanat = Arylalkylamin-N-acetyltransferase, *Adrb1* = β_1 -Adrenozeptor, *Bmal1* = *Brain and muscle aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator-like1*, *Cry* = *Cryptochrome*, *Clock* = *Circadian locomotor output cycles kaput*, *Dbp* = *D site albumin promoter binding protein*, *E4bp4* = *E4 promoter binding-protein 4*, *Hiomt* = *Hydroxyindol-O-methyltransferase*, *Insr* = *Insulinrezeptor*, *Per* = *Period*, *Ppar* = *Peroxisomen proliferator-activated receptor*, *Rev-erba* = *Reverse erythroblastosis virus- α* , *Rora* = *Retinoic acid-related orphan receptor- α* .

3.8.6 DNA-Agarosegelelektrophorese

Die Qualität und Spezifität des gebildeten Amplikons wurden mittels Agarosegelelektrophorese überprüft. Zur Herstellung eines 1,5%igen Agarosegels wurden 2,25 g Agarose mit 15 ml 10 x TAE-Puffer und 135 ml Reinstwasser versetzt, unter vorsichtigem Aufkochen gelöst und nach Abkühlen in den mit einem Kamm zur Geltaschenbildung versehenen Gelschlitten gegossen. Je 10 µl Probe wurden mit 5 µl Proben-Puffer versetzt, gemischt und nach Entfernen des Kammes in die Taschen gegeben. Für die Bestimmung der Molekülgröße des PCR-Produktes und als Spezifitätsnachweis der Reaktion wurden 5 µl Molekulargewichtsstandard mit 5 µl Nuklease-freiem Wasser und 5 µl Proben-Puffer gemischt und ebenfalls aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte in einem 1 x TAE-Puffer bei einer angelegten Spannung von 80 V. Nach Beendigung wurde das Gel in einem Ethidiumbromid-Bad für 10 min gefärbt und in Reinstwasser für 30 min entfärbt. Mittels einer UV-Dokumentationseinrichtung und der dazugehörigen Software wurde die Größe des PCR-Produktes erfasst.

3.9 Statistik

Die statistische Auswertung erfolgte mittels GraphPad Prism® Software. Die Ergebnisse dieser Arbeit sind als Mittelwerte und dazugehörige Standardfehler (*Standard error of mean*, SEM) dargestellt. Die diurnalen Tagesgänge wurden mit Hilfe des Programmes Time Series Analysis Serial Cosinor ausgewertet. Bei der dabei angewandten Cosinor-Analyse wird anhand der Methode der kleinsten Quadrate schrittweise eine Cosinusfunktion mit einer vorgegebenen Periode, in diesem Fall 24 h, an die Messdaten angepasst [138]. Sie beschreibt die Rhythmicität der erfassten Rohdaten. Der ermittelte P-Wert entspricht der Wahrscheinlichkeit, bei welcher die errechnete Amplitude gleich Null ist und somit kein Rhythmus vorliegen würde. Auf Grundlage dieser Cosinusfunktion ergeben sich neben dem berechneten Rhythmus der zugrundeliegenden Zeitreihen weitere chronobiometrische Merkmale. Der *Midline-estimating statistic of rhythm* (MESOR) ist dabei als Mittelwert der Cosinusfunktion definiert. Da die Messdaten in dieser Untersuchung in äquidistanten Intervallen erhoben wurden, kann er auch mit dem 24 h-Mittelwert gleichgesetzt werden. Die ermittelte Amplitude bezeichnet die Differenz zwischen dem Mittelwert und dem Minimum bzw. Maximum der Cosinusfunktion. Unter der Phase versteht man die zeitliche Lage eines bestimmten Punktes, hier des Maximums (dann bezeichnet als Akrophase), auf der Cosinusfunktion in Bezug auf einen Referenzzeitpunkt (ZT 0). Mittelwertvergleiche bzw. Unterschiede hinsichtlich des MESOR bzw. der Amplitude wurden mit dem nicht-parametrischen Mann-Whitney-U-Test durchgeführt. Irrtumswahrscheinlichkeiten (P) kleiner als 5% wurden als statistisch signifikant angesehen. Die Stern-Symbolik kennzeichnet die Signifikanzen wie folgt: * P < 0,05, ** P < 0,01 und *** P < 0,001.

4. Ergebnisse

4.1 Untersuchungen zur Bedeutung des Insulin-Melatonin-Antagonismus

Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit wurde der funktionelle Zusammenhang zwischen Insulin und Melatonin anhand des spontan Typ 1-diabetischen Rattenmodells LEW.1AR1-*iddm* untersucht. Dafür wurden diurnale Tagesprofile der peripheren Blutglukosekonzentration, Insulin- und Melatoninkonzentration sowie ADR- und NA-Konzentration im Plasma männlicher, diabetischer Tiere und deren korrespondierenden normoglykämischen Kontrollen in einem zeitlichen Abstand von 3 h erhoben. In der Epiphyse wurde die Genexpression wichtiger Enzyme der Melatoninsynthese (*Aanat*, *Hiomt*), zweier zentraler Uhrengene (*Per1*, *Bmal1*) sowie des *Insr* und des *Adrb1* ermittelt. Des Weiteren wurden diabetische Tiere für zehn Tage durch ein subkutan platziertes Pellet mit Insulin substituiert, und die beschriebenen Merkmale ebenfalls im Tagesverlauf untersucht. Zur Auswertung der Tagesgangprofile wurden die beobachteten Merkmale anschließend einer Cosinor-Analyse unterzogen, um Veränderungen im diurnalen Rhythmus sowie den Einfluss des Insulins zu ermitteln.

4.1.1 Körpergewicht

Um die Auswirkungen der diabetischen Stoffwechselerkrankung bzw. der Insulinsubstitution zu erfassen, wurde zunächst das Körpergewicht der Versuchstiere bestimmt. Normoglykämische Kontrollen, Typ 1-diabetische und Insulin-substituierte Tiere waren zum Zeitpunkt der Datenerhebung 60 bis 70 Tage alt. Das mittlere Körpergewicht männlicher normoglykämischer LEW.1AR1-Ratten (Kontrolle) lag bei $271,0 \pm 2,61$ g. Typ 1-diabetische LEW.1AR1-*iddm*-Ratten (Iddm) wiesen ein statistisch signifikant niedrigeres Gewicht im Vergleich zur Kontrollgruppe auf ($229,5 \pm 3,86$ g; $P < 0,001$). Verglichen mit der diabetischen Gruppe führte eine zehntägige Insulinsubstitution (Iddm + Insulin) zu einer signifikanten Erhöhung des Körpergewichtes ($265,2 \pm 3,18$ g; $P < 0,001$).

4.1.2 Glukosekonzentration

Eines der wichtigsten Merkmale zur Charakterisierung des T1DM ist die Blutglukosekonzentration. Sie wurde erfasst, um einerseits eine genaue Zuordnung zur diabetischen Gruppe vornehmen zu können und andererseits, um die Wirkung des substituierten Insulins zu überprüfen. Im Vergleich zur normoglykämischen Kontrollgruppe war der MESOR der Blutglukosekonzentration Typ 1-diabetischer männlicher Ratten statistisch

signifikant erhöht (Abb. 7 A, Tabelle 5). Die Insulinsubstitution führte zu einer signifikanten Senkung der erhöhten Blutglukosekonzentration auf Werte signifikant oberhalb normoglykämischer Kontrolltiere. In der Kontrollgruppe wurde ein signifikanter diurnaler Rhythmus der Blutglukosekonzentration beobachtet (Abb. 7 B, Tabelle 5). Im Gegensatz dazu konnte bei den Typ 1-diabetischen und Insulin-behandelten Tieren kein Rhythmus nachgewiesen werden.

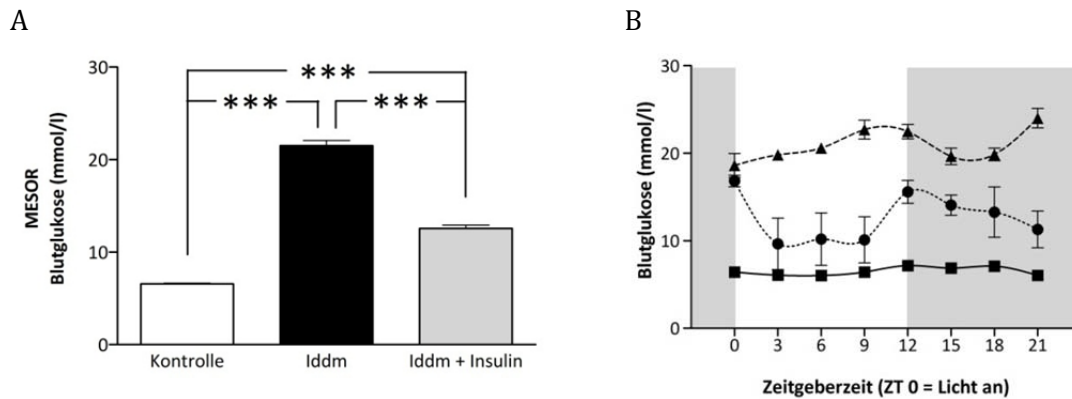


Abb. 7: Blutglukosekonzentration männlicher LEW.1AR1-Ratten (Kontrolle, ■), Typ 1-diabetischer LEW.1AR1-*iddm*-Ratten (Iddm, ▲) und Insulin-substituierter Typ 1-diabetischer Ratten (Iddm + Insulin, ●). (A) *Midline-estimating statistic of rhythm* (MESOR) dargestellt als Mittelwert \pm SEM mit $n = 40$ pro Gruppe. *** $P < 0,001$ (Mann-Whitney-U-Test). (B) Diurnales Tagesprofil, welches den Mittelwert \pm SEM mit $n = 5$ Tiere pro Tageszeitpunkt darstellt. Weiße bzw. graue Flächen charakterisieren die Hell- bzw. Dunkelphase des diurnalen Rhythmus.

4.1.3 Insulinkonzentration

Eine stark erniedrigte Insulinkonzentration des Plasmas stellt ein weiteres wichtiges Kennzeichen der autoimmunologischen Inselzerstörung des Pankreas beim T1DM dar. Zudem liefert die Bestimmung dieses Merkmals ein wichtiges Indiz für den Erfolg der Insulinbehandlung. Verglichen mit der Kontrollgruppe war der MESOR der Plasma-Insulinkonzentration Typ 1-diabetischer Tiere signifikant erniedrigt (Abb. 8 A, Tabelle 5). Die zehntägige Insulinsubstitution führte zu einer statistisch signifikanten Erhöhung des Plasma-Insulins, welches das Niveau der Kontrolltiere signifikant überschritt. Ein diurnaler Rhythmus der Insulinkonzentration war ausschließlich in den nicht-diabetischen Kontrollen nachweisbar (Abb. 8 B, Tabelle 5).

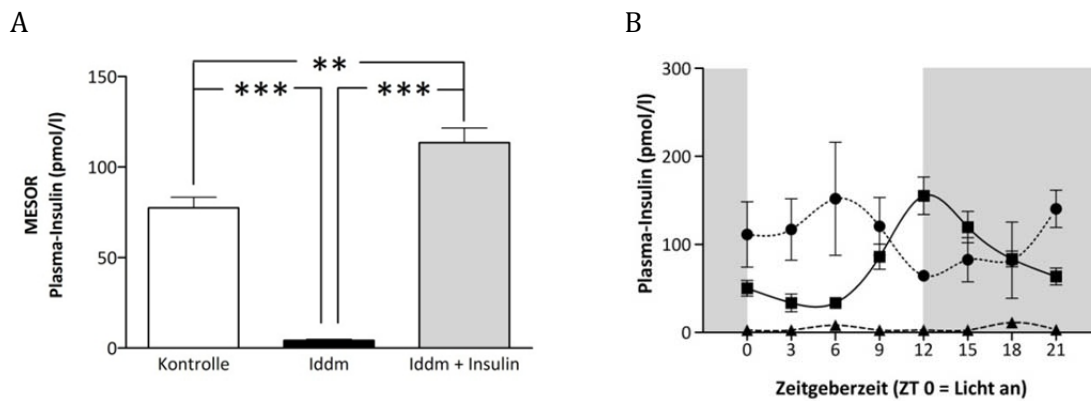


Abb. 8: Insulinkonzentration im Plasma männlicher LEW.1AR1-Ratten (Kontrolle, ■), Typ 1-diabetischer LEW.1AR1-*iddm*-Ratten (Iddm, ▲) und Insulin-substituierter Typ 1-diabetischer Ratten (Iddm + Insulin, ●). (A) *Midline-estimating statistic of rhythm* (MESOR) dargestellt als Mittelwert \pm SEM mit $n = 40$ pro Gruppe. ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$ (Mann-Whitney-U-Test). (B) Diurnales Tagesprofil, welches den Mittelwert \pm SEM mit $n = 5$ Tiere pro Tageszeitpunkt darstellt. Weiße bzw. graue Flächen charakterisieren die Hell- bzw. Dunkelphase des diurnalen Rhythmus.

4.1.4 Melatoninkonzentration

Im Vergleich zur nicht-diabetischen Kontrollgruppe war der MESOR des Plasma-Melatonins Typ 1-diabetischer männlicher Tiere statistisch signifikant erhöht. Durch die Substitution von Insulin wurden die Werte normalisiert (Abb. 9 A, Tabelle 5). Die Cosinor-Analyse berechnete für die nicht-diabetischen Kontrollen einen signifikanten diurnalen Rhythmus der Plasma-Melatoninkonzentration (Abb. 9 B, Tabelle 5). Dieser Rhythmus war bei den Typ 1-diabetischen Tieren nicht nachweisbar. Jedoch wurde der diurnale Rhythmus durch Insulinsubstitution wiederhergestellt. Bei den Kontrolltieren und Insulin-substituierten Tieren war ein Anstieg der Plasma-Melatoninkonzentration zu Beginn der Dunkelphase feststellbar, welcher gegen Ende dieser Periode auf das Niveau der Hellphase abfiel. Im Gegensatz dazu zeigten Typ 1-diabetische Tiere jedoch auch zu verschiedenen Zeitpunkten der Hellphase stark erhöhte Melatoninkonzentrationen. Hinsichtlich der Amplitude und der Akrophase konnten keine Unterschiede zwischen den normoglykämischen Kontrollen und den Insulin-substituierten Tieren beobachtet werden (Tabelle 5).

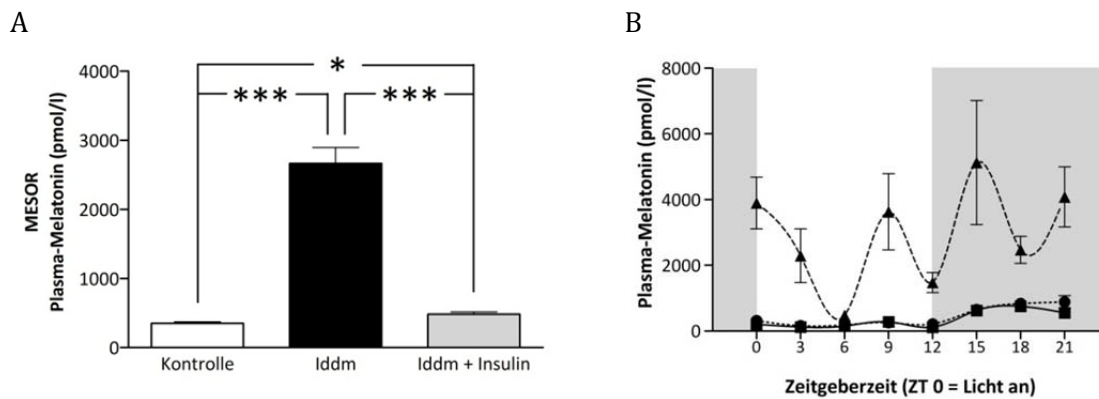


Abb. 9: Melatoninkonzentration im Plasma männlicher LEW.1AR1-Ratten (Kontrolle, ■), Typ 1-diabetischer LEW.1AR1-*iddm*-Ratten (Iddm, ▲) und Insulin-substituierter Typ 1-diabetischer Ratten (Iddm + Insulin, ●). (A) *Midline-estimating statistic of rhythm* (MESOR) dargestellt als Mittelwert \pm SEM mit $n = 40$ pro Gruppe. * $P < 0,05$, *** $P < 0,001$ (Mann-Whitney-U-Test). (B) Diurnales Tagesprofil, welches den Mittelwert \pm SEM mit $n = 5$ Tiere pro Tageszeitpunkt darstellt. Weiße bzw. graue Flächen charakterisieren die Hell- bzw. Dunkelphase des diurnalen Rhythmus.

4.1.5 Katecholaminkonzentration

Da die Katecholamine ADR und NA sowohl hemmend auf die Insulinsekretion als auch stimulierend auf die Melatonsynthese wirken, wurden sie im Rahmen dieser Arbeit ebenfalls untersucht.

4.1.5.1 Adrenalinkonzentration

Der MESOR der ADR-Konzentration im Plasma Typ 1-diabetischer Tiere war im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant erhöht (Abb. 10 A, Tabelle 5). Er wurde durch die Insulinsubstitution jedoch nicht signifikant verändert. Während in der Kontrollgruppe kein diurnaler Rhythmus der Plasma-ADR-Konzentration nachweisbar war, ergab die Cosinor-Analyse sowohl für die diabetischen als auch für die Insulin-substituierten Tiere einen statistisch signifikanten Rhythmus (Abb. 10 B, Tabelle 5). Diabetische und substituierte Tiere unterschieden sich nicht hinsichtlich der Amplitude (Tabelle 5). Die Akrophase der ADR-Konzentration des Plasmas diabetischer Tiere lag bei ZT 3 und wurde durch die Gabe von Insulin um 3 h nach ZT 0 verschoben (Tabelle 5).

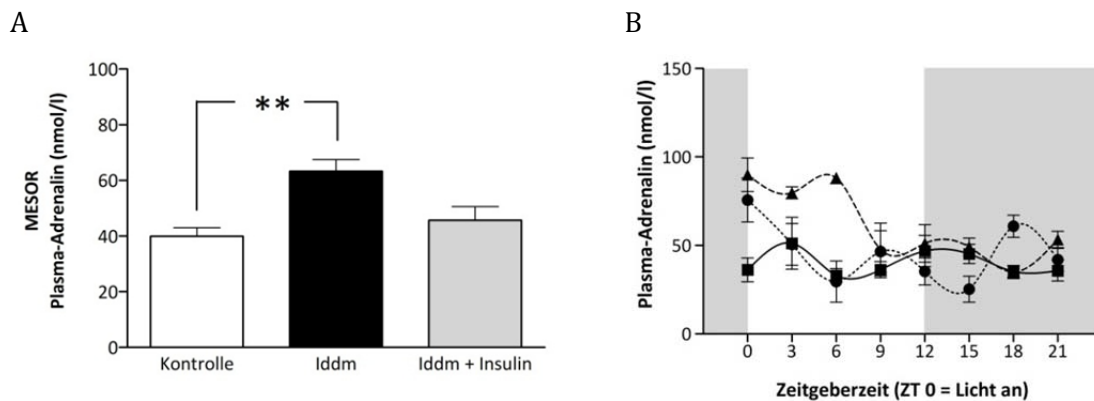


Abb. 10: Adrenalinkonzentration im Plasma männlicher LEW.1AR1-Ratten (Kontrolle, ■), Typ 1-diabetischer LEW.1AR1-*iddm*-Ratten (Iddm, ▲) und Insulin-substituierter Typ 1-diabetischer Ratten (Iddm + Insulin, ●). (A) *Midline-estimating statistic of rhythm* (MESOR) dargestellt als Mittelwert \pm SEM mit $n = 40$ pro Gruppe. ** $P < 0,01$ (Mann-Whitney-U-Test). (B) Diurnales Tagesprofil, welches den Mittelwert \pm SEM mit $n = 5$ Tiere pro Tageszeitpunkt darstellt. Weiße bzw. graue Flächen charakterisieren die Hell- bzw. Dunkelphase des diurnalen Rhythmus.

4.1.5.2 Noradrenalin

Im Vergleich zur Kontrolle war der MESOR der NA-Konzentration des Plasmas diabetischer Tiere nicht verändert (Abb. 11 A, Tabelle 5). Allerdings kam es infolge der Insulinsubstitution zu einer statistisch signifikanten Reduktion der NA-Werte. Während in der Kontrollgruppe kein diurnaler Rhythmus vorhanden war, ergab die Cosinor-Analyse sowohl bei den diabetischen als auch bei den substituierten Tieren einen signifikanten Rhythmus der Plasma-NA-Konzentration (Abb. 11 B, Tabelle 5). Diabetische und substituierte Tiere unterschieden sich nicht hinsichtlich der Amplitude (Tabelle 5). Die Akrophase der Typ 1-diabetischen Tiere (ZT 3) wurde durch die Insulinsubstitution um 6 h verschoben (ZT 21; Tabelle 5).

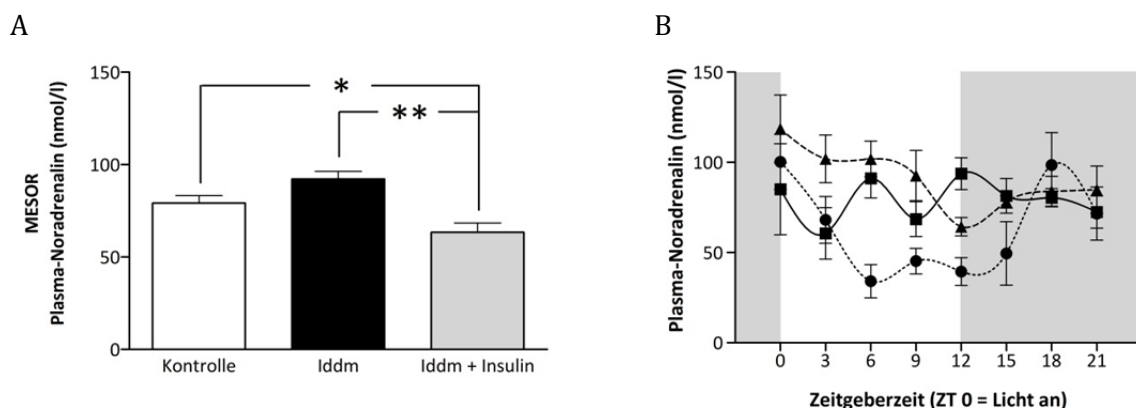


Abb. 11: Noradrenalinkonzentration im Plasma männlicher LEW.1AR1-Ratten (Kontrolle, ■), Typ 1-diabetischer LEW.1AR1-*iddm*-Ratten (Iddm, ▲) und Insulin-substituierter Typ 1-diabetischer Ratten (Iddm + Insulin, ●). (A) *Midline-estimating statistic of rhythm* (MESOR) dargestellt als Mittelwert \pm SEM mit $n = 40$ pro Gruppe. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ (Mann-Whitney-U-Test). (B) Diurnales Tagesprofil, welches den Mittelwert \pm SEM mit $n = 5$ Tiere pro Tageszeitpunkt darstellt. Weiße bzw. graue Flächen charakterisieren die Hell- bzw. Dunkelphase des diurnalen Rhythmus.

Tabelle 5: Ergebnisse der mittels Cosinor-Analyse ausgewerteten Blut- und Plasmawerte männlicher LEW.1AR1-Ratten (Kontrolle), Typ 1-diabetischer LEW.1AR1-*iddm*-Ratten (Iddm) und Insulin-substituierter Typ 1-diabetischer Ratten (Iddm + Insulin)

		Cosinor-Analyse			
		Rhythmus P-Wert	MESOR	Amplitude	Akrophase
Periphere Blutglukose [mmol/l]	Kontrolle	0,002	6,55 ± 0,08 ^a	0,85 ± 0,11	ZT 15
	Iddm	0,357	21,50 ± 0,57 ^b	/	/
	Iddm + Insulin	0,388	12,56 ± 0,35 ^c	/	/
Plasma- Insulin [pmol/l]	Kontrolle	< 0,001	77,46 ± 5,84 ^a	69,33 ± 11,9	ZT 15
	Iddm	0,907	4,21 ± 0,60 ^b	/	/
	Iddm + Insulin	0,308	113,50 ± 8,02 ^c	/	/
Plasma- Melatonin [pmol/l]	Kontrolle	< 0,001	350,80 ± 20,93 ^a	297,9 ± 52,82	ZT18
	Iddm	0,155	2664,00 ± 232,30 ^b	/	/
	Iddm + Insulin	< 0,001	481,60 ± 35,45 ^c	444,8 ± 67,6	ZT 18
Plasma- Adrenalin [nmol/l]	Kontrolle	0,893	39,90 ± 3,05 ^a	/	/
	Iddm	< 0,001	63,26 ± 4,25 ^b	23,18 ± 1,68	ZT 3
	Iddm + Insulin	0,032	45,65 ± 4,94 ^{ab}	17,92 ± 2,60	ZT 0
Plasma- Noradrenalin [nmol/l]	Kontrolle	0,702	79,10 ± 4,08 ^a	/	/
	Iddm	0,005	92,12 ± 4,17 ^a	25,10 ± 7,76	ZT 3
	Iddm + Insulin	< 0,001	63,28 ± 5,07 ^b	33,12 ± 4,42	ZT 21

MESOR = *Midline-estimating statistic of rhythm*. Die Daten repräsentieren Mittelwerte ± SEM mit n = 40 Tieren pro Gruppe bzw. n = 5 Tiere pro Tageszeitpunkt. Die statistische Überprüfung des Rhythmus erfolgte mittels Cosinor-Analyse (P < 0,05 statistisch signifikanter diurnaler Rhythmus). ^{a, b, c} Werte unterscheiden sich signifikant voneinander (P < 0,05; Mann-Whitney-U-Test).

4.1.6 Genexpression der Epiphyse

4.1.6.1 Gene der Melatonin synthese

Um Ursachen für die veränderten Melatoninkonzentrationen aufgrund der Typ 1-diabetischen Stoffwechsellage zu erfassen, wurde die relative mRNA-Expression der *Aanat* sowie der *Hiomt*, zwei wichtige Enzyme der Melatonin synthese, in der Epiphyse bestimmt.

4.1.6.1.1 Expression der *Aanat*

Hinsichtlich des MESOR der relativen *Aanat*-Expression in der Epiphyse wurden keine Unterschiede zwischen normoglykämischen Kontrollen und Typ 1-diabetischen Tieren beobachtet (Abb. 12 A, Tabelle 6). In Folge der Insulinsubstitution kam es jedoch zu einer statistisch signifikanten Erhöhung des MESOR. Für jede der drei Gruppen war ein signifikanter diurnaler Rhythmus der relativen *Aanat*-Expression nachweisbar (Abb. 12 B, Tabelle 6). Im Verlauf des diurnalen Tagesprofils kam es während der Dunkelphase in allen drei Gruppen zu einem Anstieg des Expressionsniveaus der *Aanat*. Ebenso wiesen Insulin-substituierte männliche Ratten eine statistisch signifikante Erhöhung der Amplitude der *Aanat*-Expression auf

(Tabelle 6). Weder die diabetische Stoffwechsellaage noch die Insulinsubstitution führten zu einer veränderten Akrophase der Expression dieses Gens (Tabelle 6).

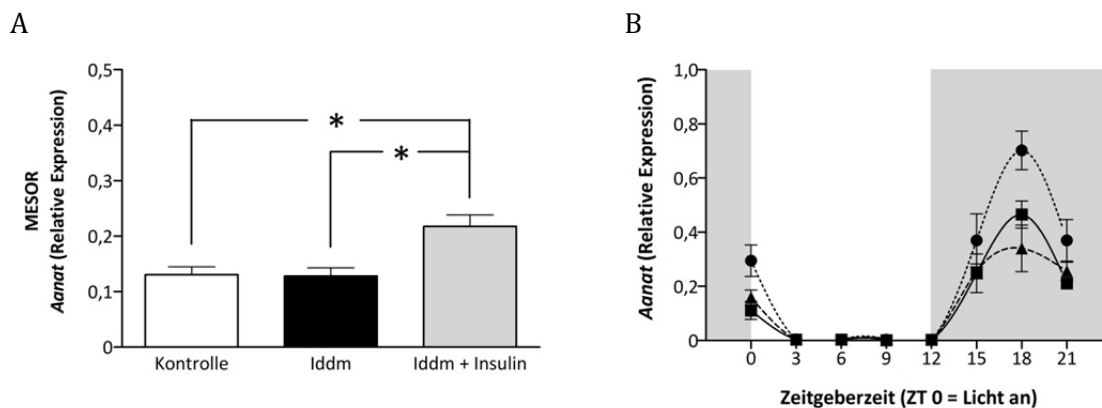


Abb. 12: Relative mRNA-Expression der *Arylalkylamin-N-acetyltransferase (Aanat)* in der Epiphyse männlicher LEW.1AR1-Ratten (Kontrolle, ■), Typ 1-diabetischer LEW.1AR1-*iddm*-Ratten (Iddm, ▲) und Insulin-substituierter Typ 1-diabetischer Ratten (Iddm + Insulin, ●). (A) *Midline-estimating statistic of rhythm (MESOR)* dargestellt als Mittelwert \pm SEM mit $n = 40$ pro Gruppe. * $P < 0,05$ (Mann-Whitney-U-Test). (B) Diurnales Tagesprofil, welches den Mittelwert \pm SEM mit $n = 5$ Tiere pro Tageszeitpunkt darstellt. Weiße bzw. graue Flächen charakterisieren die Hell- bzw. Dunkelphase des diurnalen Rhythmus.

4.1.6.1.2 Expression der *Hiomt*

Der MESOR der relativen Expression der *Hiomt* in der Epiphyse Typ 1-diabetischer männlicher Tiere unterschied sich nicht von dem normoglykämischer Kontrollen (Abb. 13 A, Tabelle 6). Verglichen mit den Kontrollen führte die Insulinsubstitution jedoch zu einem statistisch signifikanten Anstieg des MESOR der *Hiomt*-Genexpression. Die Tagesprofil-Analyse der relativen Expression der *Hiomt* ergab ausschließlich für die substituierten Tiere einen signifikanten diurnalen Rhythmus (Abb. 13 B, Tabelle 6).

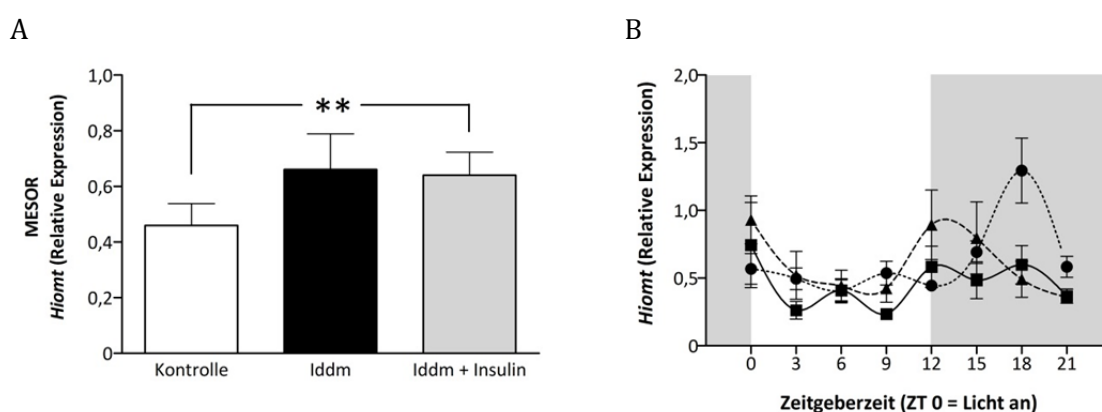


Abb. 13: Relative mRNA-Expression der *Hydroxyindol-O-methyltransferase (Hiomt)* in der Epiphyse männlicher LEW.1AR1-Ratten (Kontrolle, ■), Typ 1-diabetischer LEW.1AR1-*iddm*-Ratten (Iddm, ▲) und Insulin-substituierter Typ 1-diabetischer Ratten (Iddm + Insulin, ●). (A) *Midline-estimating statistic of rhythm (MESOR)* dargestellt als Mittelwert \pm SEM mit $n = 40$ pro Gruppe. ** $P < 0,01$ (Mann-Whitney-U-Test). (B) Diurnales Tagesprofil, welches den Mittelwert \pm SEM mit $n = 5$ Tiere pro Tageszeitpunkt darstellt. Weiße bzw. graue Flächen charakterisieren die Hell- bzw. Dunkelphase des diurnalen Rhythmus.

4.1.6.2 Expression des *Insr*

Zurückliegende Untersuchungen konnten zeigen [91,92], dass Insulin über den *Insr* die NA-medierte Melatoninsynthese der Epiphyse beeinflusst. Verglichen mit der normoglykämischen Kontrollgruppe war der MESOR der relativen *Insr*-Expression der Epiphyse Typ 1-diabetischer Ratten nicht signifikant erhöht ($P = 0,056$), während es durch die Insulinsubstitution zu einem signifikanten Anstieg dieses Merkmals kam (Abb. 14 A, Tabelle 6). Laut Cosinor-Analyse wiesen ausschließlich diabetische Tiere einen statistisch signifikanten diurnalen Rhythmus der relativen *Insr*-Expression auf (Abb. 14 B, Tabelle 6).

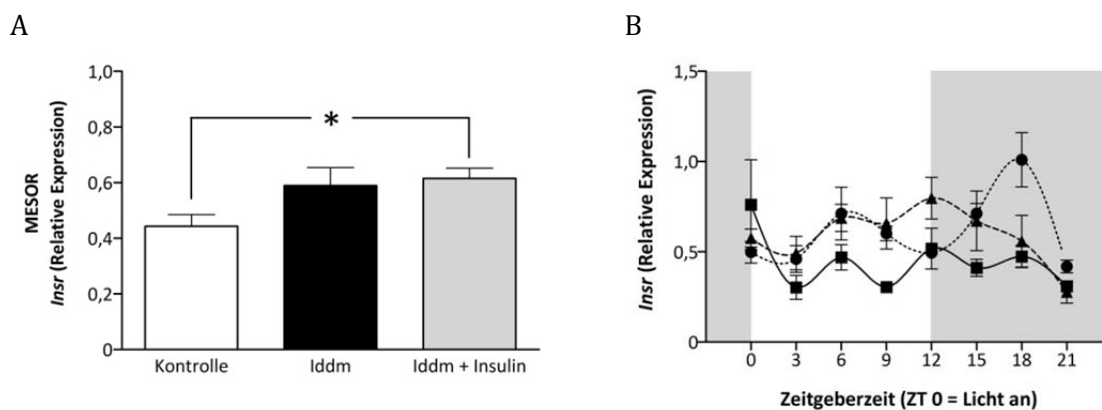


Abb. 14: Relative mRNA-Expression des *Insulinrezeptors* (*Insr*) in der Epiphyse männlicher LEW.1AR1-Ratten (Kontrolle, ■), Typ 1-diabetischer LEW.1AR1-*iddm*-Ratten (Iddm, ▲) und Insulin-substituierter Typ 1-diabetischer Ratten (Iddm + Insulin, ●). (A) *Midline-estimating statistic of rhythm* (MESOR) dargestellt als Mittelwert \pm SEM mit $n = 40$ pro Gruppe. * $P < 0,05$ (Mann-Whitney-U-Test). (B) Diurnales Tagesprofil, welches den Mittelwert \pm SEM mit $n = 5$ Tiere pro Tageszeitpunkt darstellt. Weiße bzw. graue Flächen charakterisieren die Hell- bzw. Dunkelphase des diurnalen Rhythmus.

4.1.6.3 Expression des *Adrb1*

Die Stimulation der epiphysären Melatoninsynthese wird in erster Linie über den *Adrb1* reguliert. Eine Beeinflussung der relativen Expression dieses Gens könnte somit auch mit einer veränderten Plasma-Melatoninkonzentration im Zusammenhang stehen. Verglichen mit der Kontrollgruppe wurde bei Typ 1-diabetischen Ratten keine Veränderung des MESOR der mRNA-Expression des *Adrb1* beobachtet (Abb. 15 A, Tabelle 6). Ebenso zeigte die Substitution von Insulin keinen Einfluss auf dieses Merkmal. Die Cosinor-Analyse wies lediglich für die Insulin-substituierten Tiere einen statistisch signifikanten diurnalen Rhythmus der relativen *Adrb1*-Expression auf (Abb. 15 B, Tabelle 6).

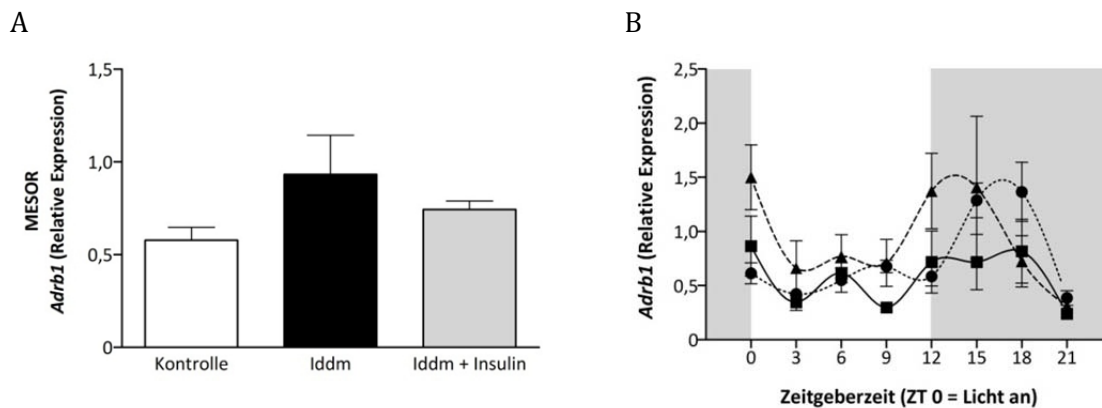


Abb. 15: Relative mRNA-Expression des β_1 -Adrenozeptors (*Adrb1*) in der Epiphyse männlicher LEW.1AR1-Ratten (Kontrolle, ■), Typ 1-diabetischer LEW.1AR1-*iddm*-Ratten (Iddm, ▲) und Insulin-substituierter Typ 1-diabetischer Ratten (Iddm + Insulin, ●). (A) *Midline-estimating statistic of rhythm* (MESOR) dargestellt als Mittelwert \pm SEM mit $n = 40$ pro Gruppe. (B) Diurnales Tagesprofil, welches den Mittelwert \pm SEM mit $n = 5$ Tiere pro Tageszeitpunkt darstellt. Weiße bzw. graue Flächen charakterisieren die Hell- bzw. Dunkelphase des diurnalen Rhythmus.

4.1.6.4 Uhrengene

Die epiphysäre mRNA-Expression der wichtigen Uhrengene *Per1* und *Bmal1* wurde bestimmt, um zu untersuchen, ob Störungen der circadianen Rhythmik mit einer veränderten Melatoninsynthese einhergehen.

4.1.6.4.1 Expression des *Per1*

Der MESOR der relativen *Per1*-mRNA-Expression Typ 1-diabetischer Ratten war im Vergleich zur Kontrollgruppe unverändert (Abb. 16 A, Tabelle 6). Die Insulinsubstitution führte jedoch zu einer statistisch signifikant erhöhten Expression von *Per1* verglichen mit der Kontrolle. Laut Cosinor-Analyse zeigte jede der drei Gruppen einen signifikanten diurnalen Rhythmus der *Per1*-Expression (Abb. 16 B, Tabelle 6). Die *Per1*-mRNA-Expression befand sich während der Hellphase an der Nachweisgrenze, stieg jedoch während der Dunkelphase stark an. Eine Veränderung der Akrophase der relativen mRNA-Expression von *Per1* war zwischen den drei Gruppen nicht zu beobachten (Tabelle 6).

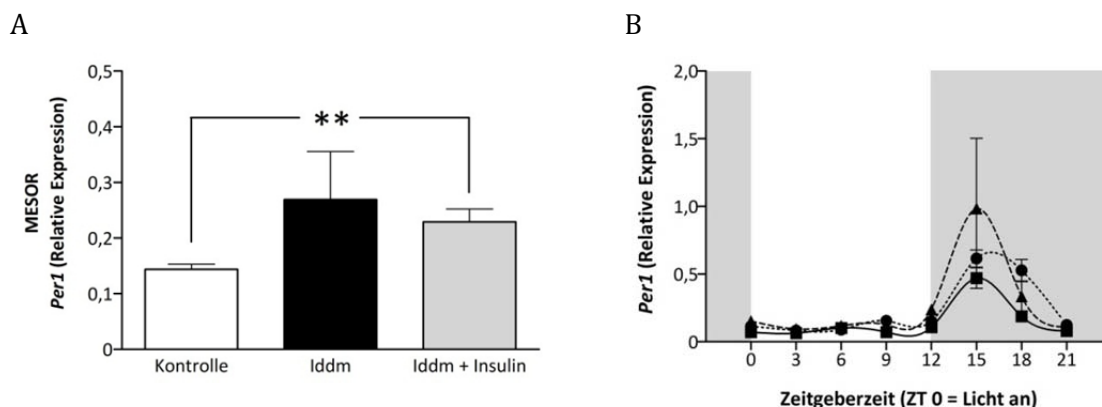


Abb. 16: Relative mRNA-Expression des Uhrgens *Period1* (*Per1*) in der Epiphyse männlicher LEW.1AR1-Ratten (Kontrolle, ■), Typ 1-diabetischer LEW.1AR1-*iddm*-Ratten (Iddm, ▲) und Insulin-substituierter Typ 1-diabetischer Ratten (Iddm + Insulin, ●). (A) *Midline-estimating statistic of rhythm* (MESOR) dargestellt als Mittelwert \pm SEM mit $n = 40$ pro Gruppe. ** $P < 0,01$ (Mann-Whitney-U-Test). (B) Diurnales Tagesprofil, welches den Mittelwert \pm SEM mit $n = 5$ Tiere pro Tageszeitpunkt darstellt. Weiße bzw. graue Flächen charakterisieren die Hell- bzw. Dunkelphase des diurnalen Rhythmus.

4.1.6.4.2 Expression des *Bmal1*

Im Vergleich zur Kontrollgruppe hatte weder der T1DM noch die Substitution von Insulin einen Einfluss auf den MESOR der relativen *Bmal1*-Expression (Abb. 17 A, Tabelle 6). Die Cosinoranalyse der relativen Expression zeigte für jede der Gruppen einen statistisch signifikanten diurnalen Rhythmus (Abb. 17 B, Tabelle 6). Die Akrophase der relativen mRNA-Expression der Kontrollgruppe lag bei ZT 0 (Tabelle 6). Durch den T1DM wurde sie um 3 h (ZT 3) verschoben. Die Substitution von Insulin (ZT 3) führte zu keiner Veränderung dieser Phasenlage.

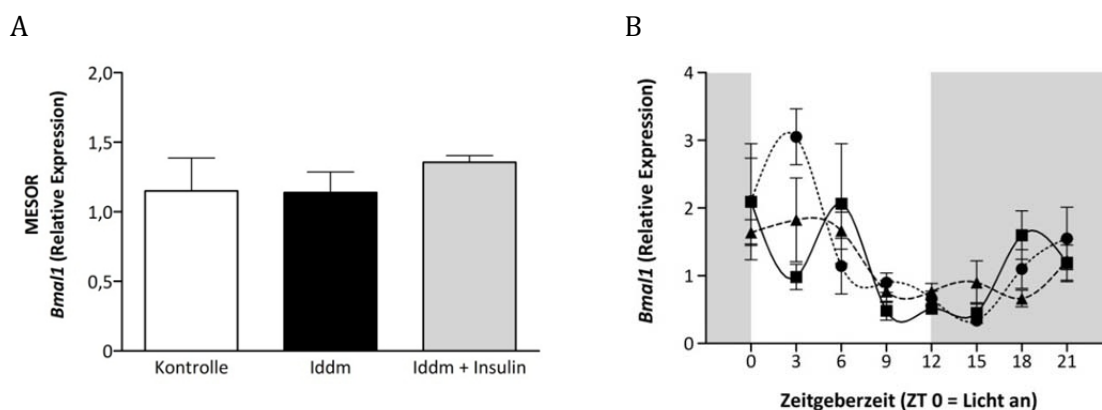


Abb. 17: Relative mRNA-Expression des Uhrgens *Brain and muscle aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator-like 1* (*Bmal1*) in der Epiphyse männlicher LEW.1AR1-Ratten (Kontrolle, ■), Typ 1-diabetischer LEW.1AR1-*iddm*-Ratten (Iddm, ▲) und Insulin-substituierter Typ 1-diabetischer Ratten (Iddm + Insulin, ●). (A) *Midline-estimating statistic of rhythm* (MESOR) dargestellt als Mittelwert \pm SEM mit $n = 40$ pro Gruppe. (B) Diurnales Tagesprofil, welches den Mittelwert \pm SEM mit $n = 5$ Tiere pro Tageszeitpunkt darstellt. Weiße bzw. graue Flächen charakterisieren die Hell- bzw. Dunkelphase des diurnalen Rhythmus.

Tabelle 6: Ergebnisse der mittels Cosinor-Analyse ausgewerteten relativen mRNA-Expression ausgewählter Gene der Epiphyse männlicher LEW.1AR1-Ratten (Kontrolle), Typ 1-diabetischer LEW.1AR1-*iddm*-Ratten (*Iddm*) und Insulin-substituierter Typ 1-diabetischer Ratten (*Iddm* + Insulin)

		Cosinor-Analyse			
		Rhythmus P-Wert	MESOR	Amplitude	Akrophase
<i>Aanat</i>	Kontrolle	< 0,001	0,131 ± 0,014 ^a	0,20 ± 0,02 ^a	ZT 18
	<i>Iddm</i>	< 0,001	0,128 ± 0,015 ^a	0,18 ± 0,02 ^a	ZT 18
	<i>Iddm</i> + Insulin	< 0,001	0,217 ± 0,021 ^b	0,31 ± 0,02 ^b	ZT 18
<i>Hiomt</i>	Kontrolle	0,348	0,460 ± 0,078 ^a	/	/
	<i>Iddm</i>	0,697	0,661 ± 0,128 ^{ab}	/	/
	<i>Iddm</i> + Insulin	0,001	0,640 ± 0,083 ^b	0,30 ± 0,05	ZT 18
<i>Insr</i>	Kontrolle	0,729	0,443 ± 0,042 ^a	/	/
	<i>Iddm</i>	0,017	0,590 ± 0,065 ^{ab}	0,19 ± 0,05	ZT 9
	<i>Iddm</i> + Insulin	0,072	0,615 ± 0,036 ^b	/	/
<i>Adrb1</i>	Kontrolle	0,579	0,577 ± 0,070	/	/
	<i>Iddm</i>	0,605	0,932 ± 0,211	/	/
	<i>Iddm</i> + Insulin	< 0,001	0,743 ± 0,045	0,43 ± 0,06	ZT 15
<i>Per1</i>	Kontrolle	< 0,001	0,144 ± 0,009 ^a	0,13 ± 0,02 ^a	ZT 15
	<i>Iddm</i>	0,030	0,269 ± 0,086 ^{ab}	0,28 ± 0,15 ^{ab}	ZT 15
	<i>Iddm</i> + Insulin	< 0,001	0,229 ± 0,023 ^b	0,20 ± 0,02 ^b	ZT 15
<i>Bmal1</i>	Kontrolle	0,050	1,151 ± 0,236	0,87 ± 0,22	ZT 0
	<i>Iddm</i>	< 0,001	1,139 ± 0,148	0,66 ± 0,19	ZT 3
	<i>Iddm</i> + Insulin	< 0,001	1,356 ± 0,048	1,11 ± 0,12	ZT 3

Aanat = Arylalkylamin-*N*-acetyltransferase, *Adrb1* = β_1 -Adrenozeptor, *Bmal1* = *Brain and muscle aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator-like1*, *Hiomt* = Hydroxyindol-*O*-methyltransferase, *Insr* = Insulinrezeptor, MESOR = *Midline-estimating statistic of rhythm*, *Per* = *Period*. Die Daten repräsentieren Mittelwerte ± SEM mit n = 40 Tieren pro Gruppe bzw. n = 5 Tiere pro Tageszeitpunkt. Die statistische Überprüfung des Rhythmus erfolgte mittels Cosinor-Analyse (P < 0,05 statistisch signifikanter diurnaler Rhythmus). ^{a, b} Werte unterscheiden sich signifikant voneinander (P < 0,05; Mann-Whitney-U-Test).

4.2 Untersuchungen zum Einfluss von Insulin auf die Genexpression der Leber Typ 1-diabetischer Ratten

Untersuchungen konnten zeigen, dass eine diabetische Stoffwechsellage zu Veränderungen der „inneren Uhr“ führen kann [117]. Im umgekehrten Sinne kann jedoch eine Störung der „inneren Uhr“ zur Entstehung eines Diabetes mellitus beitragen [111]. Daher wurde im zweiten Teil dieser Arbeit der Einfluss des T1DM sowie einer Insulinsubstitution auf die „periphere innere Uhr“ der Leber untersucht. Dafür wurde die relative mRNA-Expression zentraler Uhrengene (Kapitel 4.2.1) und CCGs (Kapitel 4.2.2) im Tagesgang in der Leber bestimmt.

4.2.1 Uhrengene

4.2.1.1 Expression des Per1

Weder die Typ 1-diabetische Stoffwechsellage noch die Insulinsubstitution beeinflussten den MESOR der mRNA-Expression von *Per1* in der Leber (Abb. 18 A, Tabelle 7). In allen drei untersuchten Gruppen war ein statistisch signifikanter diurnaler Rhythmus der hepatischen *Per1*-Expression nachweisbar, wobei die mRNA-Expression während der Hellphase des Tagesganges anstieg, und mit Beginn der subjektiven Nacht abfiel (Abb. 18 B, Tabelle 7). Ebenso blieb die Amplitude der mRNA-Expression von *Per1* unbeeinflusst (Tabelle 7). Der T1DM hatte im Vergleich zur Kontrolle keinen Einfluss auf die Lage der Akrophase (ZT 9), wohingegen die Substitution von Insulin zu einer Verschiebung der Akrophase (ZT 12) führte (Tabelle 7).

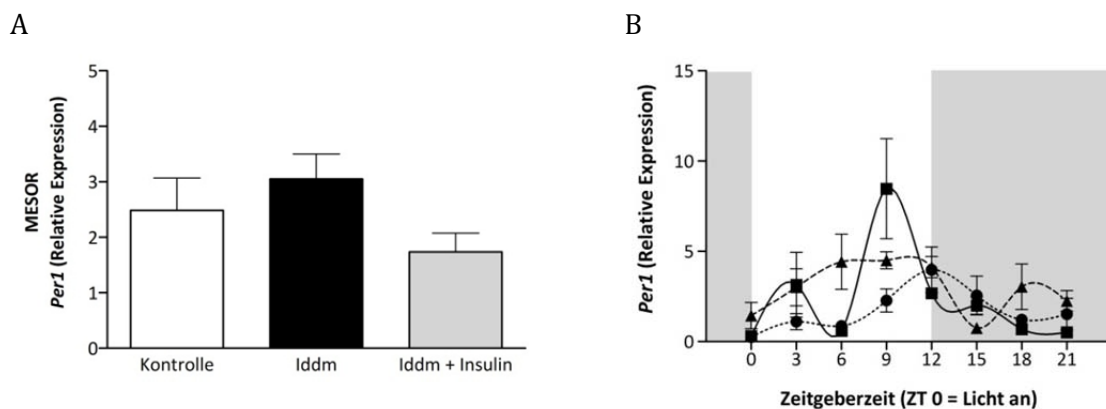


Abb. 18: Relative mRNA-Expression des Uhrengens *Period1* (*Per1*) in der Leber männlicher LEW.1AR1-Ratten (Kontrolle, ■), Typ 1-diabetischer LEW.1AR1-*iddm*-Ratten (Iddm, ▲) und Insulin-substituierter Typ 1-diabetischer Ratten (Iddm + Insulin, ●). (A) *Midline-estimating statistic of rhythm* (MESOR) dargestellt als Mittelwert \pm SEM mit $n = 40$ pro Gruppe. (B) Diurnales Tagesprofil, welches den Mittelwert \pm SEM mit $n = 5$ Tiere pro Tageszeitpunkt darstellt. Weiße bzw. graue Flächen charakterisieren die Hell- bzw. Dunkelphase des diurnalen Rhythmus.

4.2.1.2 Expression des Per2

Der MESOR der relativen *Per2*-Genexpression wurde durch den T1DM statistisch signifikant erniedrigt (Abb. 19 A, Tabelle 7). Die Insulinsubstitution hatte jedoch keinen normalisierenden Einfluss auf dieses Merkmal. Der diurnale Rhythmus des Uhrengens *Per2* war weder durch den T1DM noch durch die Substitution von Insulin verändert (Abb. 19 B, Tabelle 7). Im Tagesprofil wies die *Per2*-mRNA-Expression einen Anstieg gegen Ende der Hellphase auf, welcher zu Beginn der Dunkelphase abfiel. Die durch den T1DM verringerte Amplitude der *Per2*-Expression wurde durch die Substitution von Insulin auf ein Niveau der nicht-diabetischen Kontrollgruppe normalisiert (Tabelle 7). Hinsichtlich der Akrophase der Genexpression ergaben sich keine Unterschiede zwischen den drei Gruppen (Tabelle 7).

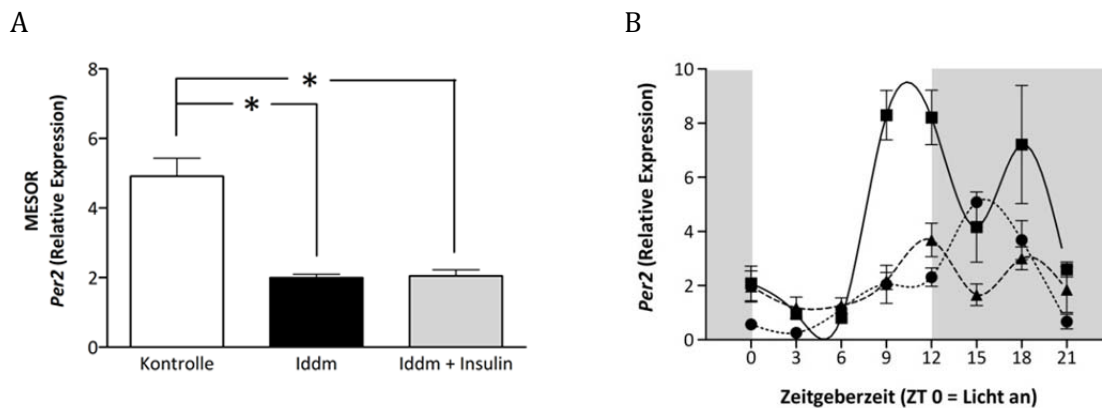


Abb. 19: Relative mRNA-Expression des Uhrgens *Period2* (*Per2*) in der Leber männlicher LEW.1AR1-Ratten (Kontrolle, ■), Typ 1-diabetischer LEW.1AR1-*iddm*-Ratten (Iddm, ▲) und Insulin-substituierter Typ 1-diabetischer Ratten (Iddm + Insulin, ●). (A) *Midline-estimating statistic of rhythm* (MESOR) dargestellt als Mittelwert \pm SEM mit $n = 40$ pro Gruppe. * $P < 0,05$ (Mann-Whitney-U-Test). (B) Diurnales Tagesprofil, welches den Mittelwert \pm SEM mit $n = 5$ Tiere pro Tageszeitpunkt darstellt. Weiße bzw. graue Flächen charakterisieren die Hell- bzw. Dunkelphase des diurnalen Rhythmus.

4.2.1.3 Expression des *Bmal1*

Der MESOR der *Bmal1*-mRNA-Expression wurde durch den T1DM statistisch signifikant erniedrigt (Abb. 20 A, Tabelle 7). Die Behandlung mit Insulin führte jedoch nicht zu einer Normalisierung dieses Merkmals. Entsprechend der Cosinor-Analyse zeigte jede der drei untersuchten Gruppen einen signifikanten diurnalen Rhythmus der *Bmal1*-Expression (Abb. 20 B, Tabelle 7). Das diurnale Tagesprofil wies ein Maximum der *Bmal1*-Expression während der Hellphase auf. Mit Beginn der Dunkelphase fiel die Expression ab, jedoch am Ende dieser Periode stieg sie wieder auf das Ausgangsniveau an. Auch die Amplitude der *Bmal1*-mRNA-Expression wurde durch den T1DM signifikant erniedrigt, wohingegen die Behandlung mit Insulin keinen Effekt hatte (Tabelle 7). Im Vergleich zur Kontrollgruppe (ZT 3) war die Akrophase der relativen *Bmal1*-Expression der Typ 1-diabetischen Tiere (ZT 21) deutlich verschoben, worauf die Substitution von Insulin jedoch lediglich einen leichten normalisierenden Einfluss hatte (ZT 0; Tabelle 7).

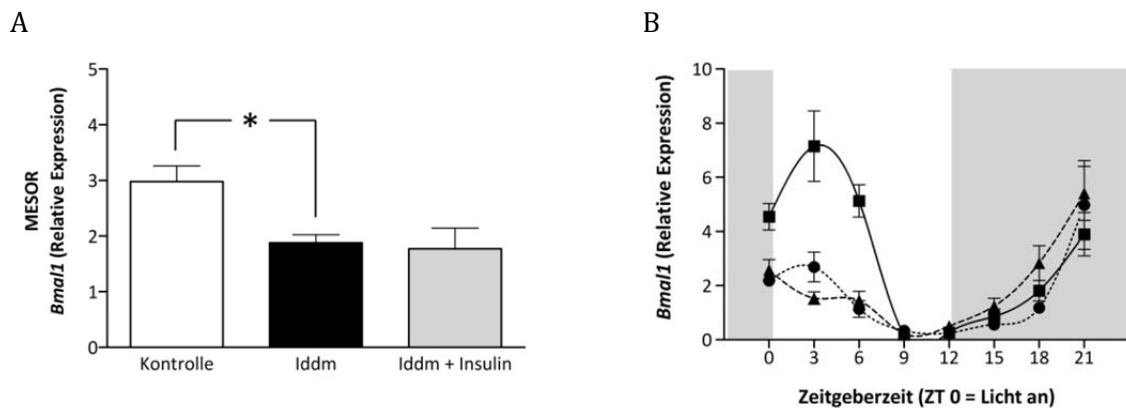


Abb. 20: Relative mRNA-Expression des Uhrgens *Brain and muscle aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator-like1 (Bmal1)* in der Leber männlicher LEW.1AR1-Ratten (Kontrolle, ■), Typ 1-diabetischer LEW.1AR1-*iddm*-Ratten (Iddm, ▲) und Insulin-substituierter Typ 1-diabetischer Ratten (Iddm + Insulin, ●). (A) *Midline-estimating statistic of rhythm (MESOR)* dargestellt als Mittelwerte \pm SEM mit $n = 40$ pro Gruppe. * $P < 0,05$ (Mann-Whitney-U-Test). (B) Diurnales Tagesprofil, welches den Mittelwert \pm SEM mit $n = 5$ Tiere pro Tageszeitpunkt darstellt. Weiße bzw. graue Flächen charakterisieren die Hell- bzw. Dunkelphase des diurnalen Rhythmus.

4.2.1.4 Expression des Clock

Der MESOR der *Clock*-mRNA-Expression Typ 1-diabetischer Tiere war im Vergleich zur Kontrollgruppe nicht verändert (Abb. 21 A, Tabelle 7). Jedoch war dieses Merkmal bei den Insulin-substituierten Tieren statistisch signifikant vermindert. Während in der Kontrollgruppe ein signifikanter diurnaler Rhythmus der *Clock*-Expression nachweisbar war, wiesen Typ 1-diabetische und Insulin-substituierte Tiere keine rhythmische mRNA-Expression dieses Uhrgens auf (Abb. 21 B, Tabelle 7). Die diurnale *Clock*-mRNA-Expression der Kontrollgruppe zeigte ein Maximum während der Hellphase auf, welches mit Beginn der Dunkelphase stark abfiel. Gegen Ende der Dunkelperiode erreichte die mRNA-Expression jedoch wieder das Ausgangsniveau.

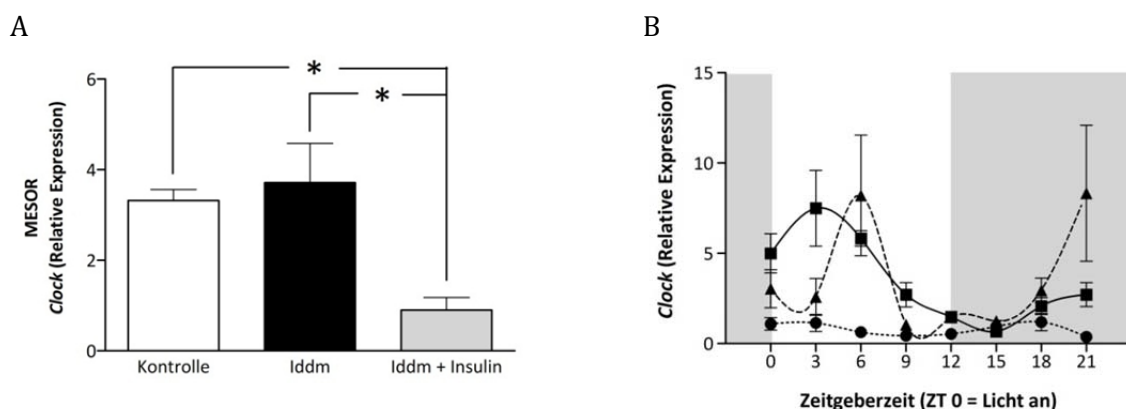


Abb. 21: Relative mRNA-Expression des Uhrgens *Circadian locomotor output cycles kaput (Clock)* in der Leber männlicher LEW.1AR1-Ratten (Kontrolle, ■), Typ 1-diabetischer LEW.1AR1-*iddm*-Ratten (Iddm, ▲) und Insulin-substituierter Typ 1-diabetischer Ratten (Iddm + Insulin, ●). (A) *Midline-estimating statistic of rhythm (MESOR)* dargestellt als Mittelwert \pm SEM mit $n = 40$ pro Gruppe. * $P < 0,05$ (Mann-Whitney-U-Test). (B) Diurnales Tagesprofil, welches den Mittelwert \pm SEM mit $n = 5$ Tiere pro Tageszeitpunkt darstellt. Weiße bzw. graue Flächen charakterisieren die Hell- bzw. Dunkelphase des diurnalen Rhythmus.

4.2.1.5 Expression des *Cry1*

Im Vergleich zur Kontrollgruppe wurde der MESOR der relativen mRNA-Expression des Uhrengens *Cry1* weder durch den T1DM noch unter dem Einfluss der Insulinsubstitution verändert (Abb. 22 A, Tabelle 7). In jeder der drei Gruppen war ein statistisch signifikanter diurnaler Rhythmus der relativen *Cry1*-mRNA-Expression der Leber nachweisbar (Abb. 22 B, Tabelle 7), wobei ein Maximum der *Cry1*-Expression während der Dunkelphase beobachtet wurde. Ebenso ergaben sich hinsichtlich der Amplitude keine Unterschiede zwischen den untersuchten Gruppen (Tabelle 7). Im Vergleich zur Kontrollgruppe (ZT 21) war die Akrophase der relativen hepatischen *Cry1*-mRNA-Expression diabetischer Tiere um 6 h verschoben (ZT 15). Die Substitution von Insulin erbrachte eine Normalisierung (ZT 21; Tabelle 7).

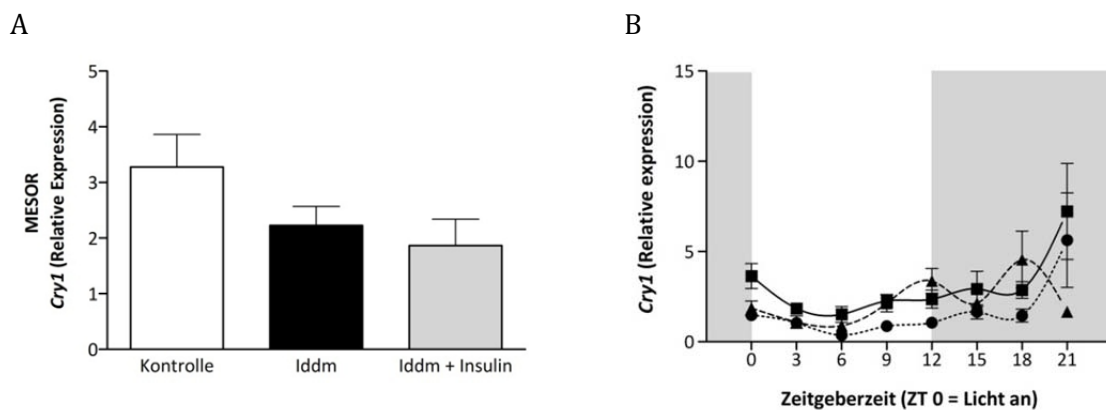


Abb. 22: Relative mRNA-Expression des Uhrengens *Cryptochrome 1 (Cry1)* in der Leber männlicher LEW.1AR1-Ratten (Kontrolle, ■), Typ 1-diabetischer LEW.1AR1-*iddm*-Ratten (Iddm, ▲) und Insulin-substituierter Typ 1-diabetischer Ratten (Iddm + Insulin, ●). (A) *Midline-estimating statistic of rhythm* (MESOR) dargestellt als Mittelwerte \pm SEM mit $n = 40$ pro Gruppe. (B) Diurnales Tagesprofil, welches den Mittelwert \pm SEM mit $n = 5$ Tiere pro Tageszeitpunkt darstellt. Weiße bzw. graue Flächen charakterisieren die Hell- bzw. Dunkelphase des diurnalen Rhythmus.

4.2.1.6 Expression des *Rev-erba*

Der MESOR der hepatischen *Rev-erba*-mRNA-Expression Typ 1-diabetischer Ratten war im Vergleich zur Kontrollgruppe statistisch signifikant erhöht (Abb. 23 A, Tabelle 7). Dieser wurde in Folge der Insulinsubstitution signifikant auf Werte unterhalb des Niveaus der Kontrolltiere gesenkt. In jeder der drei untersuchten Gruppen zeigte sich einen signifikanten diurnalen Rhythmus der hepatischen *Rev-erba*-mRNA-Expression (Abb. 23 B, Tabelle 7), welcher ein Maximum in der Hellphase aufwies. Die Amplitude der *Rev-erba*-mRNA-Expression wurde durch die Insulinsubstitution vermindert (Tabelle 7). Im Vergleich zur Kontrollgruppe (ZT 9) war die Akrophase durch den T1DM um 3 h (ZT 6) verschoben und wurde durch die Insulinsubstitution wieder normalisiert (ZT 9; Tabelle 7).

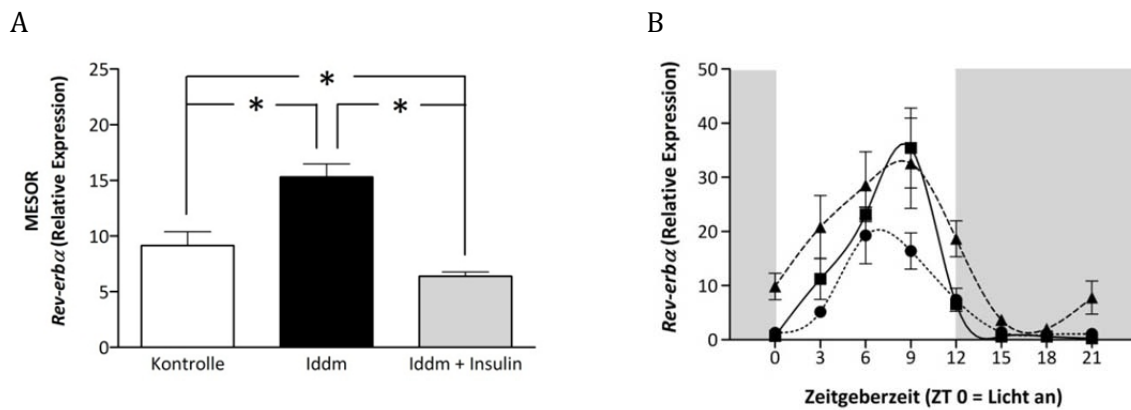


Abb. 23: Relative mRNA-Expression des Uhrengens *Reverse erythroblastosis virus-α* (*Rev-erbα*) in der Leber männlicher LEW.1AR1-Ratten (Kontrolle, ■), Typ 1-diabetischer LEW.1AR1-*iddm*-Ratten (Iddm, ▲) und Insulin-substituierter Typ 1-diabetischer Ratten (Iddm + Insulin, ●). (A) *Midline-estimating statistic of rhythm* (MESOR) dargestellt als Mittelwert ± SEM mit n = 40 pro Gruppe. * P < 0,05 (Mann-Whitney-U-Test). (B) Diurnales Tagesprofil, welches den Mittelwert ± SEM mit n = 5 Tiere pro Tageszeitpunkt darstellt. Weiße bzw. graue Flächen charakterisieren die Hell- bzw. Dunkelphase des diurnalen Rhythmus.

4.2.1.7 Expression des *Rora*

Im Vergleich zur nicht-diabetischen Kontrollgruppe führte der T1DM zu keiner Veränderung des MESOR der hepatischen *Rora*-mRNA-Expression (Abb. 24 A, Tabelle 7). Ebenso hatte die Substitution von Insulin keinen Einfluss auf die Expression dieses Uhrengens. Ein diurnaler Rhythmus der hepatischen *Rora*-mRNA-Expression war in keiner Gruppe nachweisbar (Abb. 24 B, Tabelle 7).

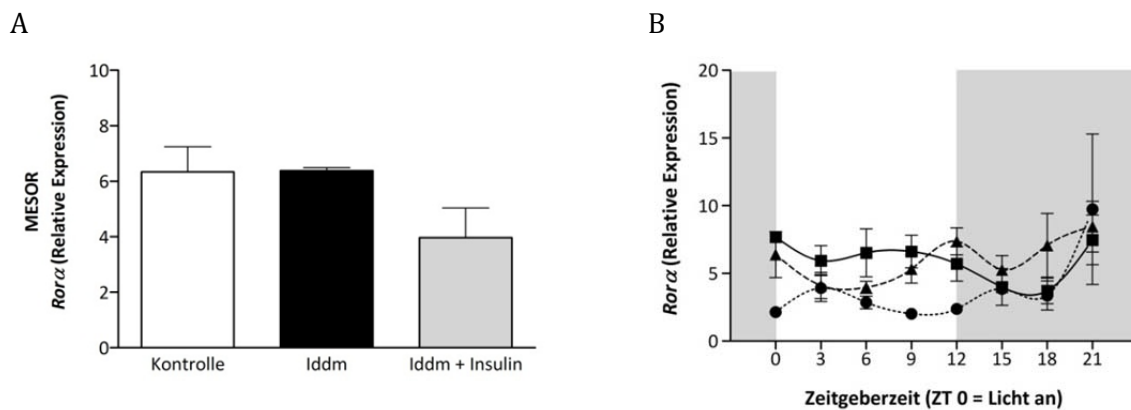


Abb. 24: Relative mRNA-Expression des Uhrengens *Retinoic acid-related orphan receptor-α* (*Rora*) in der Leber männlicher LEW.1AR1-Ratten (Kontrolle, ■), Typ 1-diabetischer LEW.1AR1-*iddm*-Ratten (Iddm, ▲) und Insulin-substituierter Typ 1-diabetischer Ratten (Iddm + Insulin, ●). (A) *Midline-estimating statistic of rhythm* (MESOR) dargestellt als Mittelwert ± SEM mit n = 40 pro Gruppe. (B) Diurnales Tagesprofil, welches den Mittelwert ± SEM mit n = 5 Tiere pro Tageszeitpunkt darstellt. Weiße bzw. graue Flächen charakterisieren die Hell- bzw. Dunkelphase des diurnalen Rhythmus.

Tabelle 7: Ergebnisse der mittels Cosinor-Analyse ausgewerteten relativen mRNA-Expressionen von Uhrengenen der Leber männlicher LEW.1AR1-Ratten (Kontrolle), Typ 1-diabetischer LEW.1AR1-*iddm*-Ratten (*Iddm*) und Insulin-substituierter Typ 1-diabetischer Ratten (*Iddm* + Insulin)

		Cosinor-Analyse			
		Rhythmus P-Wert	MESOR	Amplitude	Akrophase
<i>Per1</i>	Kontrolle	0,019	2,52 ± 0,64	2,57 ± 0,87	ZT 9
	<i>Iddm</i>	0,044	3,10 ± 0,36	1,35 ± 0,50	ZT 9
	<i>Iddm</i> + Insulin	0,006	1,81 ± 0,28	1,35 ± 0,41	ZT 12
<i>Per2</i>	Kontrolle	< 0,001	4,68 ± 0,50 ^a	3,67 ± 0,72 ^a	ZT 15
	<i>Iddm</i>	0,048	1,99 ± 0,20 ^b	0,73 ± 0,28 ^b	ZT 15
	<i>Iddm</i> + Insulin	< 0,001	2,01 ± 0,20 ^b	1,89 ± 0,27 ^a	ZT 15
<i>Bmal1</i>	Kontrolle	< 0,001	2,98 ± 0,26 ^a	3,11 ± 0,37 ^a	ZT 3
	<i>Iddm</i>	< 0,001	1,90 ± 0,21 ^b	1,79 ± 0,30 ^b	ZT 21
	<i>Iddm</i> + Insulin	0,001	1,76 ± 0,31 ^{ab}	1,79 ± 0,45 ^{ab}	ZT 0
<i>Clock</i>	Kontrolle	< 0,001	3,50 ± 0,35 ^a	2,96 ± 0,51	ZT 3
	<i>Iddm</i>	0,232	3,54 ± 0,86 ^a	/	/
	<i>Iddm</i> + Insulin	0,305	0,88 ± 0,13 ^b	/	/
<i>Cry1</i>	Kontrolle	0,036	3,26 ± 0,42	1,61 ± 0,58	ZT 21
	<i>Iddm</i>	0,013	2,23 ± 0,26	1,16 ± 0,37	ZT 15
	<i>Iddm</i> + Insulin	0,040	1,86 ± 0,45	1,76 ± 0,63	ZT 21
<i>Rev-erba</i>	Kontrolle	< 0,001	9,00 ± 1,30 ^a	13,5 ± 1,80 ^a	ZT 9
	<i>Iddm</i>	< 0,001	14,8 ± 1,81 ^b	12,9 ± 2,53 ^{ab}	ZT 6
	<i>Iddm</i> + Insulin	< 0,001	6,38 ± 0,85 ^c	8,16 ± 1,20 ^b	ZT 9
<i>Rora</i>	Kontrolle	0,428	6,26 ± 0,53	/	/
	<i>Iddm</i>	0,167	6,38 ± 0,54	/	/
	<i>Iddm</i> + Insulin	0,139	4,18 ± 0,91	/	/

Bmal1 = Brain and muscle aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator-like1, *Clock* = Circadian locomotor output cycles kaput, *Cry* = Cryptochrome; MESOR = Midline-estimating statistic of rhythm, *Per* = Period, *Rev-erba* = Reverse erythroblastosis virus- α , *Rora* = Retinoic acid-related orphan receptor- α . Die Daten repräsentieren Mittelwerte \pm SEM mit n = 40 Tieren pro Gruppe bzw. n = 5 Tiere pro Tageszeitpunkt. Die statistische Überprüfung des Rhythmus erfolgte mittels Cosinor-Analyse (P < 0,05 statistisch signifikanter diurnaler Rhythmus). ^a, ^b, ^c Werte unterscheiden sich signifikant voneinander (P < 0,05; Mann-Whitney-U-Test).

4.2.2 Uhrengen-kontrollierte Gene

4.2.2.1 Expression des *Dbp*

Im Vergleich zur normoglykämischen Kontrollgruppe wiesen Typ 1-diabetische Tiere einen statistisch signifikant erhöhten MESOR der hepatischen *Dbp*-mRNA-Expression auf (Abb. 25 A, Tabelle 8). In Folge der Insulinsubstitution kam es zu einer Senkung dieses Merkmals auf Werte, die mit denen nicht-diabetischer Kontrolltiere korrespondierten. In jeder der drei untersuchten Gruppen wurde ein signifikanter diurnaler Rhythmus der relativen *Dbp*-mRNA-Expression beobachtet (Abb. 25 B, Tabelle 8). Das Maximum der mRNA-Expression zeigte sich gegen Ende der Hellphase und fiel mit Beginn der Dunkelphase ab. Ebenso war die Amplitude der *Dbp*-Expression statistisch signifikant erhöht und wurde durch Substitution von Insulin auf das

Niveau der Kontrollgruppe normalisiert (Tabelle 8). Auf die Akrophase der diurnalen *Dbp*-mRNA-Expression hatte weder der T1DM noch die Insulinsubstitution einen Einfluss (Tabelle 8).

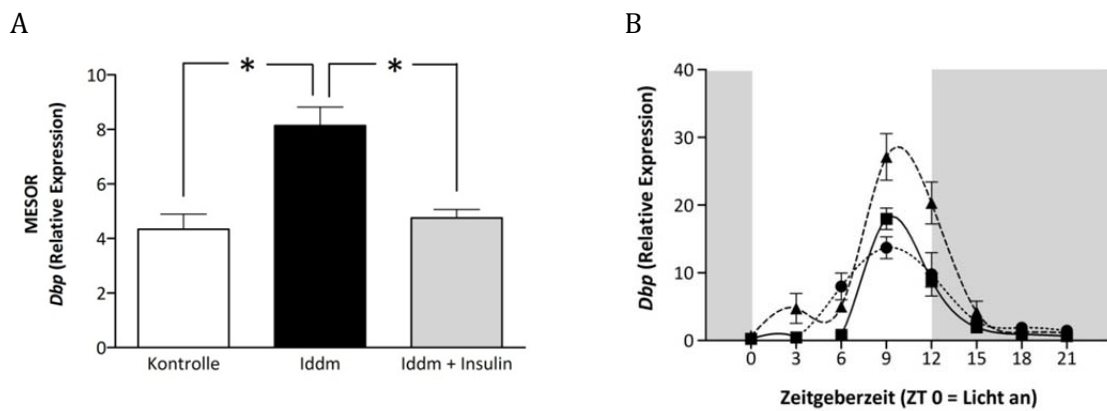


Abb. 25: Relative mRNA-Expression des Uhrengen-kontrollierten Gens *D site of albumin promoter binding protein (Dbp)* in der Leber männlicher LEW.1AR1-Ratten (Kontrolle, ■), Typ 1-diabetischer LEW.1AR1-*iddm*-Ratten (Iddm, ▲) und Insulin-substituierter Typ 1-diabetischer Ratten (Iddm + Insulin, ●). (A) *Midline-estimating statistic of rhythm* (MESOR) dargestellt als Mittelwert \pm SEM mit $n = 40$ pro Gruppe. * $P < 0,05$ (Mann-Whitney-U-Test). (B) Diurnales Tagesprofil, welches den Mittelwert \pm SEM mit $n = 5$ Tiere pro Tageszeitpunkt darstellt. Weiße bzw. graue Flächen charakterisieren die Hell- bzw. Dunkelphase des diurnalen Rhythmus.

4.2.2.2 Expression des *E4bp4*

Im Vergleich zur Kontrolle war der MESOR der hepatischen *E4bp4*-mRNA-Expression diabetischer Tiere statistisch signifikant erhöht (Abb. 26 A, Tabelle 8). Die Substitution von Insulin hob diesen Effekt auf. Der Einfluss des T1DM auf die hepatische *E4bp4*-mRNA-Expression sowie die Normalisierung in Folge der Insulinsubstitution waren besonders während der Dunkelphase nachweisbar (Abb. 26 B). Bei Typ 1-diabetischen Tieren kam es zu einem Verlust des diurnalen Rhythmus der hepatischen *E4bp4*-mRNA-Expression, welcher durch die Substitution von Insulin wiederhergestellt wurde (Abb. 26 B, Tabelle 8). Im Vergleich zur Kontrollgruppe (ZT 3) kam es nach Insulinsubstitution zu einer Verschiebung der Akrophase um 6 h (ZT 21; Tabelle 8).

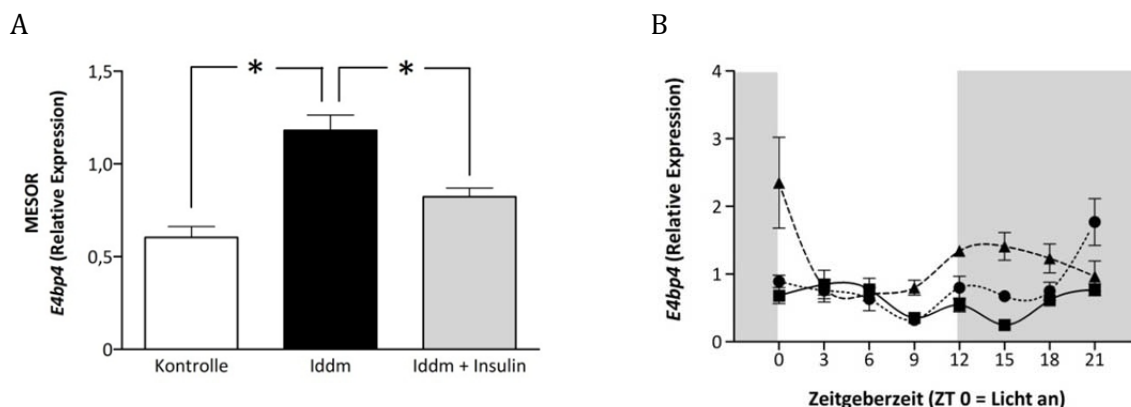


Abb. 26: Relative mRNA-Expression des Uhren-gen-kontrollierten Gens *E4 promoter-binding protein 4* (*E4bp4*) in der Leber männlicher LEW.1AR1-Ratten (Kontrolle, ■), Typ 1-diabetischer LEW.1AR1-*iddm*-Ratten (Iddm, ▲) und Insulin-substituierter Typ 1-diabetischer Ratten (Iddm + Insulin, ●). (A) *Midline-estimating statistic of rhythm* (MESOR) dargestellt als Mittelwert \pm SEM mit $n = 40$ pro Gruppe. * $P < 0,05$ (Mann-Whitney-U-Test). (B) Diurnales Tagesprofil, welches den Mittelwert \pm SEM mit $n = 5$ Tiere pro Tageszeitpunkt darstellt. Weiße bzw. graue Flächen charakterisieren die Hell- bzw. Dunkelphase des diurnalen Rhythmus.

4.2.2.3 Expression des *Ppara*

Im Vergleich zur Kontrollgruppe hatte weder der T1DM noch die Substitution von Insulin einen Einfluss auf den MESOR der hepatischen *Ppara*-mRNA-Expression (Abb. 27 A, Tabelle 8). Ein statistisch signifikanter diurnaler Rhythmus konnte in keiner der drei Gruppen beobachtet werden (Abb. 27 B, Tabelle 8).

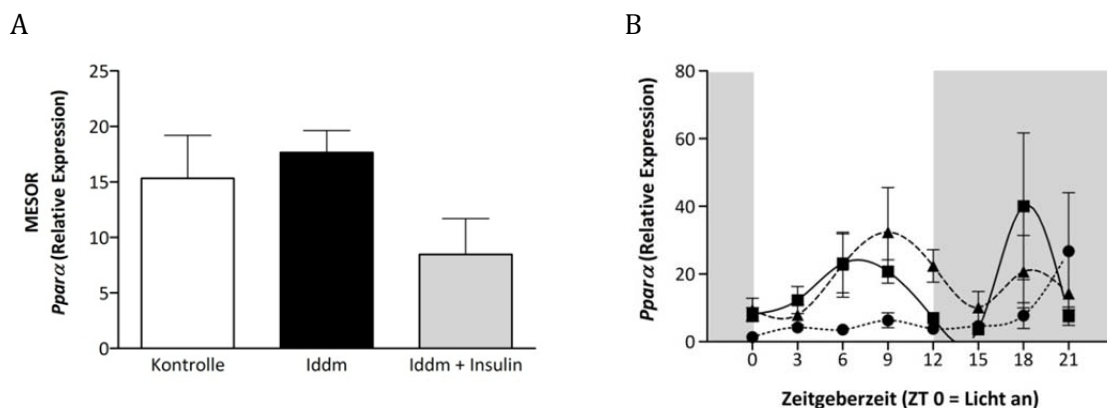


Abb. 27: Relative mRNA-Expression des Uhren-gen-kontrollierten Gens *Peroxisome proliferator-activated receptor α* (*Ppara*) in der Leber männlicher LEW.1AR1-Ratten (Kontrolle, ■), Typ 1-diabetischer LEW.1AR1-*iddm*-Ratten (Iddm, ▲) und Insulin-substituierter Typ 1-diabetischer Ratten (Iddm + Insulin, ●). (A) *Midline-estimating statistic of rhythm* (MESOR) dargestellt als Mittelwert \pm SEM mit $n = 40$ pro Gruppe. (B) Diurnales Tagesprofil, welches den Mittelwert \pm SEM mit $n = 5$ Tiere pro Tageszeitpunkt darstellt. Weiße bzw. graue Flächen charakterisieren die Hell- bzw. Dunkelphase des diurnalen Rhythmus.

4.2.2.4 Expression des *Ppary*

Im Vergleich mit der normoglykämischen Kontrollgruppe führte die Typ 1-diabetische Stoffwechsellaage zu einer statistisch signifikanten Erniedrigung des MESOR der hepatischen *Ppary*-mRNA-Expression (Abb. 28 A, Tabelle 8). Die erniedrigte Expression wurde durch die

Substitution von Insulin nicht beeinflusst. Dieser Effekt zeigte sich am deutlichsten während der Hellphase (Abb. 28 B). Der T1DM führte außerdem zu einem Verlust des signifikanten diurnalen Rhythmus der *Pparγ*-Expression, welcher durch die Insulinsubstitution nicht wiederhergestellt wurde (Abb. 28 B, Tabelle 8).

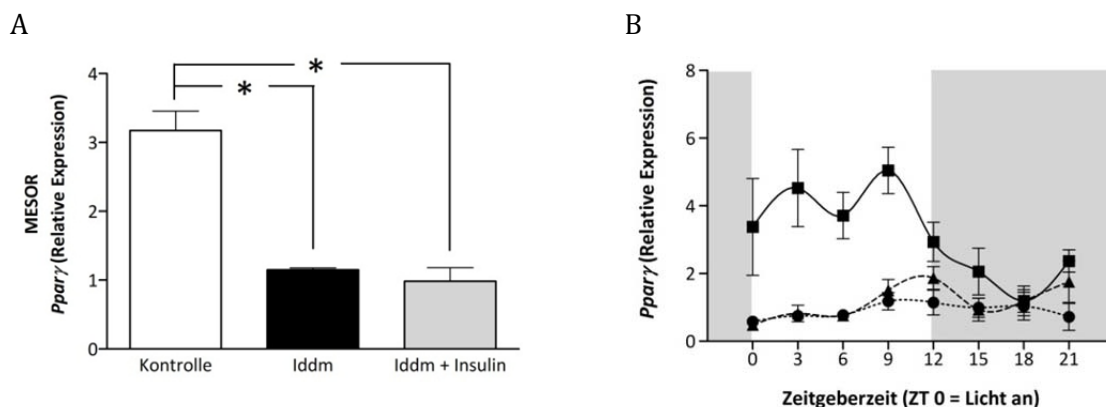


Abb. 28: Relative mRNA-Expression des Uhrengen-kontrollierten Gens *Peroxisome proliferator-activated receptor γ* (*Pparγ*) in der Leber männlicher LEW.1AR1-Ratten (Kontrolle, ■), Typ 1-diabetischer LEW.1AR1-*iddm*-Ratten (Iddm, ▲) und Insulin-substituierter Typ 1-diabetischer Ratten (Iddm + Insulin, ●). (A) *Midline-estimating statistic of rhythm* (MESOR) dargestellt als Mittelwert \pm SEM mit $n = 40$ pro Gruppe. * $P < 0,05$ (Mann-Whitney-U-Test). (B) Diurnales Tagesprofil, welches den Mittelwert \pm SEM mit $n = 5$ Tiere pro Tageszeitpunkt darstellt. Weiße bzw. graue Flächen charakterisieren die Hell- bzw. Dunkelfphase des diurnalen Rhythmus.

Tabelle 8: Ergebnisse der mittels Cosinor-Analyse ausgewerteten relativen mRNA-Expressionen Uhrengen-kontrollierter Gene der Leber männlicher LEW.1AR1-Ratten (Kontrolle), Typ 1-diabetischer LEW.1AR1-*iddm*-Ratten (Iddm) und Insulin-substituierter Typ 1-diabetischer Ratten (Iddm + Insulin)

		Cosinor-Analyse			
		Rhythmus P-Wert	MESOR	Amplitude	Akrophase
<i>Dbp</i>	Kontrolle	< 0,001	4,09 \pm 0,78 ^a	6,01 \pm 1,12 ^a	ZT 9
	Iddm	< 0,001	8,15 \pm 1,07 ^b	10,9 \pm 1,52 ^b	ZT 9
	Iddm + Insulin	< 0,001	4,76 \pm 0,63 ^a	6,06 \pm 0,90 ^a	ZT 9
<i>E4bp4</i>	Kontrolle	0,006	0,60 \pm 0,05 ^a	0,24 \pm 0,07	ZT 3
	Iddm	0,202	1,21 \pm 0,15 ^b	/	/
	Iddm + Insulin	0,008	0,82 \pm 0,09 ^a	0,42 \pm 0,12	ZT 21
<i>Ppara</i>	Kontrolle	0,991	15,32 \pm 3,87	/	/
	Iddm	0,122	17,66 \pm 1,98	/	/
	Iddm + Insulin	0,219	8,47 \pm 3,22	/	/
<i>Pparγ</i>	Kontrolle	0,003	3,17 \pm 0,28 ^a	1,50 \pm 0,40	ZT 3
	Iddm	0,141	1,14 \pm 0,13 ^b	/	/
	Iddm + Insulin	0,070	0,95 \pm 0,10 ^b	/	/

Dbp = D site of albumin promoter binding protein, *E4bp4* = E4 promoter-binding protein 4, MESOR = *Midline-estimating statistic of rhythm*, *Ppar* = *Peroxisome proliferator-activated receptor*. Die Daten repräsentieren Mittelwerte \pm SEM mit $n = 40$ Tieren pro Gruppe bzw. $n = 5$ Tiere pro Tageszeitpunkt. Die statistische Überprüfung des Rhythmus erfolgte mittels Cosinor-Analyse ($P < 0,05$ statistisch signifikanter diurnaler Rhythmus). ^{a, b} Werte unterscheiden sich signifikant voneinander ($P < 0,05$; Mann-Whitney-U-Test).

5. Diskussion

Derzeit sind weltweit ca. 366 Millionen Menschen an einem Diabetes mellitus erkrankt [2], wobei die Prävalenz in Deutschland bei 7,2% liegt [139]. Laut Schätzungen der *International Diabetes Federation* wird die Anzahl der an Diabetes Erkrankten auf der Welt in 20 Jahren auf über 592 Millionen angewachsen sein. Dieser weltweite Anstieg der Diabetesprävalenz stellt eine zunehmende finanzielle und auch sozioökonomische Belastung der öffentlichen Gesundheitssysteme dar. Zur Prävention und Therapie dieser Erkrankung ist es notwendig, die zugrundeliegenden Pathomechanismen genauer zu verstehen.

So wurde bereits nachgewiesen, dass das Indolamin Melatonin die Insulinsekretion der pankreatischen β -Zelle beeinflusst [99]. Ebenso wurde gezeigt, dass Insulin vermutlich die Synthese und damit Sekretion von Melatonin reguliert [64]. Ziel dieser Arbeit war es daher, diesen Insulin-Melatonin-Zusammenhang anhand eines spontan Typ 1-diabetischen Tiermodells vor und nach einer zehntägigen Insulinsubstitution zu charakterisieren.

Neben der zentralen „inneren Uhr“, welche ihren Sitz im SCN hat, weisen zahlreiche Organe wie z. B. Pankreas [99] und Leber [98] eigene „periphere Uhren“ auf, welche durch Stoffwechselerkrankungen wie den Diabetes mellitus gestört werden können [140,141]. Umgekehrt wurde nachgewiesen, dass Veränderungen des Uhrenmechanismus Störungen des Kohlenhydratstoffwechsels zur Folge haben [111,112,142]. Da Melatonin eine Schlüsselfunktion in der Regulation der circadianen Rhythmik einnimmt, wurde im zweiten Teil dieser Arbeit untersucht, ob die „circadiane Uhr“ der Leber durch den spontanen T1DM dieses Tiermodells verändert wird und inwieweit eine Insulinsubstitution zur Normalisierung führt. Ein genaues Verständnis über die Wechselwirkungen zwischen circadianen Rhythmen und Diabetes mellitus ermöglicht neue therapeutische Ansätze, um dieser sich weltweit ausbreitenden Erkrankung entgegen zu wirken.

5.1 Charakterisierung von Tiermodell und Versuchsaufbau

Für tierexperimentelle Untersuchungen zum T1DM stehen zahlreiche Modelle zur Verfügung, wobei Maus- und Rattenmodelle am weitesten verbreitet sind. Typ 1-diabetische Nagetiermodelle werden in spontan diabetische und induzierte Modelle untergliedert [125]. Bei den eingesetzten Chemikalien, die einen experimentellen Diabetes induzieren, stehen Alloxan und STZ im Vordergrund [124]. Die zytotoxische Wirkung dieser beiden Agenzien wird über die Generierung von reaktiven Sauerstoffspezies vermittelt [124]. Alloxan induziert die Zerstörung der β -Zelle über die Bildung von Hydroxylradikalen sowie einem massiven Anstieg der

zytosolischen Calciumkonzentration. STZ hingegen gelangt über den Glukosetransporter 2 in die β -Zelle [124]. Es wirkt stark alkylierend, induziert DNA-Strangbrüche und beeinflusst den Glukosetransport sowie die Funktion der Glukokinase. Beiden Substanzen gemein ist, dass Zellnekrosen schließlich die Ursache für den Untergang pankreatischer β -Zellen und den daraus resultierenden Diabetes mellitus darstellen [124].

Eine weitere Möglichkeit, experimentelle Untersuchungen zum Diabetes mellitus durchzuführen, besteht in der Nutzung spontan Typ 1-diabetischer Tiermodelle, allen voran die NOD-Maus und die BB-Ratte [125]. Nachteil dieser Tiermodelle ist jedoch, dass die Inzuchtstämme über mehrere Generationen entstanden sind. Neben diabetisch relevanten treten dadurch auch zahlreiche weitere Genveränderungen auf, welche für die genannten Tiermodelle charakteristisch, jedoch ohne Relevanz für die Pathophysiologie des T1DM, sind. Beispielsweise ist die BB-Ratte durch die Ausbildung einer T-Zell-Lymphopenie charakterisiert [143].

Aus diesen Gründen wurde im Rahmen dieser Arbeit das Modell der LEW.1AR1-*iddm*-Ratte gewählt. Hierbei handelt es sich um einen von der LEW.1AR1-Ratte abstammenden, spontan Typ 1-diabetischen Inzuchtstamm, ohne Geschlechtsspezifität oder andere Begleiterkrankungen [126,144]. Um den 60. Lebensstag entwickeln diese Tiere mit einer Inzidenz von 20% das klassische Bild eines T1DM mit Hyperglykämie, Glukosurie, Ketonurie und Polyurie. Der Untergang pankreatischer β -Zellen beruht auf autoimmunologisch vermittelten apoptotischen Prozessen, von welchen nur die β -Zellen, nicht aber α - und δ -Zellen betroffen sind [126,145]. Auch sind bisher keine morphologischen Veränderungen an weiteren Organsystemen beobachtet worden [128]. Da die Entstehung des T1DM in diesem Tiermodell nicht geschlechtsspezifisch ist, und um den Einfluss des Östrus auf die untersuchten Merkmale vernachlässigen zu können, wurde in der vorliegenden Arbeit ausschließlich mit männlichen Tieren gearbeitet.

Über ein Screening der Harnglukose wurden Tiere ab dem 45. Lebensstag untersucht und diabetische Tiere in die Studie eingeschlossen. Das mittlere Alter von Tieren der vorliegenden Studie lag um den 60. bis 70. Lebensstag. Die Einbeziehung einer Kontrollgruppe aus dem LEW.1AR1-*iddm*-Stamm war nicht möglich, da nicht ausgeschlossen werden konnte, dass es nach dem 100. Lebensstag zur Entwicklung eines T1DM gekommen wäre und so möglicherweise prädiabetische Tiere in die Untersuchung eingeschlossen worden wären. Des Weiteren konnte keine Gruppe diabetischer Tiere generiert werden, welche nicht mit Insulin behandelt wurden, da der absolute Insulinmangel innerhalb weniger Tage zum Tod der Tiere geführt hätte. Aus diesen Gründen dienten 60 Tage alte Tiere des Hintergrundstammes LEW.1AR1 als normoglykämische Kontrollgruppe. Die Typ 1-diabetischen und somit Insulin-defizienten Tiere wurden hinsichtlich metabolischer, circadianer und Uhren-gen-spezifischer Marker mit den

Kontrollen verglichen. Um den Einfluss des Insulins auf die veränderten Merkmale zu untersuchen, wurden die diabetischen Tiere zudem einer zehntägigen Insulinsubstitution unterzogen, wobei den Tieren ein Pellet appliziert wurde, welches nach Herstellerangaben gleichbleibend 2 IE Insulin pro 24 h über einen Zeitraum von bis zu 40 Tagen freisetzt. Diese Angaben konnten von uns bestätigt werden.

Mindestens fünf Stichproben je Zeitpunkt wurden während eines Zeitraumes von 24 h unter Berücksichtigung äquidistanter Abstände von 3 h erhoben. Dies bedeutet, dass in den Gruppen „Kontrolle“, diabetische „Iddm“ und Insulin-substituierte „Iddm + Insulin“ jeweils 8 Zeitpunkte und mindestens 40 Tiere berücksichtigt wurden. Die so erhaltenen Daten ermöglichten eine Auswertung der Tagesprofile mittels der eigens für die Auswertung chronobiologischer Fragestellungen entwickelten Software Cosinor. Das Programm analysiert die Daten mit Hilfe einer durch lineare Regression berechneten Cosinusfunktion. Hierdurch kann ein Rückschluss auf eine diurnale Rhythmik der erhobenen Tagesprofile erfolgen. Um Unterschiede zwischen den Gruppen, unabhängig von der Tagesrhythmik, zu bewerten, wurde der chronobiologische Parameter MESOR genutzt. Der MESOR ist als Mittelwert der Cosinusfunktion zu verstehen, und kann in etwa dem 24 h-Mittelwert, unter der Voraussetzung einer äquidistanten Probenerhebung, gleichgesetzt werden. Im Unterschied zum einfachen Mittelwert beschreibt der MESOR chronobiologische Funktionen. Die Datenanalyse mittels Cosinor erlaubt somit Rückschlüsse auf chronobiologische Veränderungen.

5.2 Untersuchungen zum Insulin-Melatonin-Antagonismus

Zahlreiche Studien haben bereits nachgewiesen, dass Melatonin die Insulinsekretion sowie das endokrine Pankreas beeinflusst [64,146]. Eine weitere Studie zeigte, dass Pinealektomie bei Ratten zu einer schweren Hyperinsulinämie führt [147]. Die meisten Studien gehen dabei von einem hemmenden Einfluss der Epiphyse auf die pankreatische β -Zelle aus, da Melatonin die Insulinsekretion vermindert [83,148]. Dies führt zu einer Glukosetoleranzstörung, da die Insulin-vermittelte Aufnahme der Blutglukose verringert ist [76]. Außerdem wurde gezeigt, dass Insulin wiederum eine Wirkung auf die Epiphyse sowie die Melatoninsekretion hat [81]. Die Hypothese eines zugrundeliegenden Insulin-Melatonin-Antagonismus wird gestützt durch die Beobachtung, dass hohe nächtliche Melatoninwerte beim Menschen mit geringen Insulinwerten assoziiert sind [63]. *Vice versa* findet man am Tag, wenn die Melatoninkonzentration stark erniedrigt ist, eine Erhöhung des Plasma-Insulins. Im Gegensatz zum Menschen gehen bei der nachtaktiven Ratte hohe nächtliche Melatoninkonzentrationen mit hohen Plasma-Insulinkonzentrationen einher. Jedoch wurde auch beim Modell der Ratte beobachtet, dass die

abnehmende Melatoninsekretion im Alter mit einer Zunahme der Leptin- und Insulinkonzentration assoziiert ist [83]. Diese Untersuchungen weisen darauf hin, dass zwischen den Hormonen Insulin und Melatonin ein funktioneller Antagonismus besteht.

In vitro- sowie tierexperimentelle Untersuchungen der Arbeitsgruppe Peschke konnten den Nachweis erbringen, dass Melatonin die Forskolin- und Glukose-stimulierte Insulinsekretion der β -Zelle hemmt [49,74,99]. Übereinstimmend damit zeigen Studien, dass Melatonin, über das Trinkwasser verabreicht, eine senkende Wirkung auf die Plasma-Insulinkonzentration hat [83,148,149]. Die Wirkung von Melatonin wird dabei durch die Bindung an die β -Zellspezifischen, membranständigen G-Protein-gekoppelten Rezeptoren MT_1 [49,74,150] und MT_2 [50,78,146] vermittelt. Konsekutiv kommt es zur Verminderung der intrazellulären Konzentration von cAMP [74] und cGMP [151,152]. Die Ergebnisse mehrerer genomweiter Assoziationsstudien belegen zudem, dass genetische Varianten des humanen MT_1 - [153] und MT_2 -Rezeptors [88-90,154-156] mit erhöhten Nüchtern-Blutglukosespiegeln, einer pathologisch veränderten Insulinsekretion sowie einem erhöhten T2DM-Risiko assoziiert sind [88-90].

Als Voraussetzung für die gegenseitige Beeinflussung von Epiphyse und β -Zelle wurde von Peschke *et al.* der Nachweis erbracht, dass der Pinealozyt den *Insr* exprimiert [64]. Jedoch sind die Untersuchungen zum Einfluss von Insulin auf die Melatoninsekretion der Epiphyse widersprüchlich und weisen Spezies-spezifische Unterschiede auf. Während ein experimentelles Überangebot von Insulin zu einer Erhöhung des epiphysären Melatoningehaltes bei Ratten führt, wurde das Gegenteil beim Hamster beobachtet [81]. Andere Studien mit Ratten haben dagegen weder Effekte eines T1DM noch von Insulin auf die epiphysäre Aktivität von Enzymen der Melatoninsynthese erbracht [157,158].

Mittels der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass Typ 1-diabetische Iddm-Ratten ein signifikant niedrigeres Körpergewicht als Tiere der normoglykämischen Kontrollgruppe aufwiesen. Diese Beobachtung kann als Konsequenz des starken Insulinmangels angesehen werden [85,159,160]. Die zehntägige Insulinsubstitution führte zu einer Normalisierung des Körpergewichts, was durch die normalisierte Stoffwechsellage, die anabole Funktion des Insulins sowie die natürliche Gewichtszunahme der Tiere innerhalb des Behandlungszeitraumes erklärt werden kann.

Trotz der Normalisierung des Körpergewichts wiesen Typ 1-diabetische Insulin-substituierte Iddm-Ratten erhöhte Blutglukosewerte (> 10 mmol/l) auf, welche auf eine diabetische Stoffwechsellage hindeuten. Dies ist hervorzuheben, da die Plasma-Insulinkonzentration der substituierten Tiere höher war als die der Kontrollen. Ein Mangel an Insulin kann daher nicht als

Ursache für die erhöhten Blutglukosewerte angesehen werden. Aufgrund der gleichbleibenden Insulinsubstitution durch die applizierten Pellets kann es innerhalb des zehntägigen Substitutionszeitraumes jedoch zur Entwicklung einer Insulinresistenz gekommen sein. Dies würde die erhöhten Blutglukosekonzentrationen erklären, da eine zunehmende Insulinresistenz auch bei Typ 1-Diabetikern beobachtet wurde [161].

Die Kontrollgruppe der vorliegenden Untersuchung zeigte sowohl für die Blutglukosekonzentration und als auch für die Plasma-Insulinwerte eine diurnale Rhythmik, welche bei den Typ 1-diabetischen Tieren unter Insulinmangel verloren ging und durch die gleichbleibende Insulinsubstitution mittels Pellet nicht wiederhergestellt werden konnte. Der in der Kontrollgruppe beobachtete starke Anstieg der Insulinkonzentration am Ende der Hellphase, was dem Ende der Schlafphase entspricht, kann mit der gesteigerten Nahrungsaufnahme mit Beginn der Aktivitätsperiode, also postprandial, erklärt werden.

Die Steuerung der circadianen Rhythmik der basalen Blutglukosekonzentration sowie der Melatoninkonzentration erfolgt ausgehend vom SCN über ähnliche Mechanismen [29,162,163]. Das Zeitgeberhormon Melatonin wird dabei mit einer deutlichen diurnalen Rhythmik von der Epiphyse synthetisiert und zeitgleich sezerniert [28]. Beim tagaktiven Mensch koinzidiert der erhöhte Sympathikotonus während der Hellphase mit niedrigen Melatoninkonzentrationen [24]. Das Gegenteil wird bei nachtaktiven Tieren wie Ratten und Mäusen beobachtet. Anhand isolierter pankreatischer Inseln der Ratte haben Peschke und Peschke 1998 nachgewiesen, dass auch die basale Insulinsekretion einer circadianen Rhythmik folgt [99,164]. Die Autoren vermuten dabei die Existenz eines endogenen Oszillators in der pankreatischen β -Zelle, der die circadiane Insulinsekretion reguliert [99]. Der Antagonismus zwischen Melatonin und Insulin zeigte sich ebenfalls bei Typ 2-diabetischen Patienten und GK-Ratten, bei denen erhöhte Plasma-Insulinkonzentrationen mit verminderten Konzentrationen des Plasma-Melatonins sowie epiphysärer Melatonin-Vorstufen einhergingen [36,64,165]. Bei Insulin-defizienten Typ 1-diabetischen Ratten wurden dagegen stark erhöhte Melatoninkonzentrationen beobachtet [85]. Übereinstimmend damit wiesen auch die in dieser Arbeit untersuchten Typ 1-diabetischen Iddm-Ratten eine Erhöhung der Melatoninkonzentration im Plasma auf. Das erhöhte Plasma-Melatonin wurde in Folge der Insulinsubstitution gesenkt, war jedoch signifikant höher als in den korrespondierenden, nicht-diabetischen Kontrolltieren. Außerdem zeigte sich, dass die deutliche diurnale Rhythmik der Plasma-Melatoninkonzentration, welche bei den Kontrolltieren nachweisbar war, bei Typ 1-diabetischen Ratten verloren ging. Vergleichbare Studien aus zurückliegenden Untersuchungen STZ-behandelter Typ 1-diabetischer Wistar-Ratten sowie

weiblicher LEW.1AR1-*iddm*-Ratten ließen jedoch einen erhaltenen diurnalen Rhythmus erkennen [85,160].

Die Aussagen zum Einfluss von Insulin auf die Melatoninsynthese sind sehr kontrovers [80,85,91,166]. Die Gruppe um Champney beobachtete keinen modulierenden Einfluss von Insulin auf die Melatoninsynthese [167], wohingegen Untersuchungen von Peschke *et al.* belegen, dass Insulin hemmend auf die Melatoninsynthese der Epiphyse wirkt [85]. Dabei wurde mittels Superfusionsuntersuchungen an explantierten Epiphysen gezeigt, dass die Stimulation mit NA und gleichzeitige Inkubation mit Insulin, die Melatoninsekretion der Pinealozyten hemmt. In einer weiterführenden Studie der Arbeitsgruppe [160] sowie in dieser Arbeit wurde außerdem gezeigt, dass erhöhte Plasma-Melatoninkonzentrationen Typ 1-diabetischer Ratten durch Insulinsubstitution gesenkt und die verlorengegangene Rhythmik wiederhergestellt werden konnte. Es kann daher davon ausgegangen werden, dass der hemmende Insulineffekt auf die Melatoninsekretion stärker ist als die stimulierende Wirkung von NA. Dennoch existieren Arbeiten, welche unter veränderten experimentellen Bedingungen, wie Konzentration und Dauer der Gabe von NA und Insulin, eine Steigerung der epiphysären Melatoninsekretion feststellen konnten [91]. Die Autoren diskutieren, dass Insulin über eine Phosphoinositid-3-Kinase-abhängige Signalkaskade die NA-vermittelte Melatoninsynthese fördert [92]. In ihrer Studie wurde die Epiphysen jedoch *ex vivo* inkubiert, während die in der Superfusion verwendeten Bedingungen eher der *in vivo*-Situation entsprechen [168]. In einer erst kürzlich erschienenen Arbeit identifizierten jedoch auch Peliciari-Garcia *et al.* gewisse Zeitfenster, in denen Insulin die NA-synchronisierte Melatoninsekretion ebenfalls hemmte [92]. Zusammenfassend ist festzuhalten, dass anhand der Beobachtungen der vorliegenden Arbeit die Existenz eines Insulin-Melatonin-Antagonismus auch innerhalb des verwendeten spontan Typ 1-diabetischen Tiermodells bestätigt werden konnte, wobei Insulin hemmend auf die Melatoninsynthese wirkte.

Aufgrund der fehlenden Blut-Hirn-Schranke und des reich fenestrierten Endothels gelangt Insulin vermutlich ungehindert an membranständige Insulinrezeptoren des Pinealozyten [64,85,160]. Dabei zeigte sich, dass hyperinsulinämische Typ 2-diabetische GK-Ratten, welche durch erniedrigte Plasma-Melatoninkonzentrationen gekennzeichnet sind, eine verringerte *Insr*-Expression sowie eine verminderte epiphysäre AANAT-Aktivität aufwiesen [64]. Anhand der Daten der vorliegenden Arbeit sowie weiterer Studien [85,160] konnte gezeigt werden, dass bei Typ 1-diabetischen Ratten die epiphysäre mRNA-Expression des *Insr* unter Insulinmangel leicht erhöht ist. In der gesteigerten Expression des *Insr* kann eine Art Gegenregulation vermutet werden, um der verringerten Konzentration des Insulins entgegen zu wirken. Die

Insulinsubstitution der hier untersuchten männlichen Typ 1-diabetischen Iddm-Ratten hatte jedoch keinen Einfluss auf die erhöhte epiphysäre *Insr*-Expression, wohingegen bei weiblichen Tieren des selben Stammes das Gegenteil beobachtet wurde [160]. Warum die Insulinsubstitution keine Wirkung auf die epiphysäre *Insr*-Expression männlicher diabetischer Tiere hatte, kann nicht beantwortet werden. Andererseits kann die fehlende Herabregulation jedoch auch mit einer zunehmenden Insulinresistenz durch die gleichbleibend hohe Insulinsubstitution erklärt werden. Diese Hypothese wird gestützt durch die vorherigen Ergebnisse dieser Untersuchung.

Anhand von Studien der Arbeitsgruppe Peschke kann vermutet werden, dass eine wechselseitige Beeinflussung des noradrenergen und Insulin-vermittelten Signalweges auf die Melatoninsynthese der Epiphyse besteht [160,169], da NA die Insulinsekretion über mehrere Mechanismen hemmt [170]. So zeigten Studien an Typ 2-diabetischen, hyperinsulinämischen GK-Ratten, dass neben Melatonin auch NA in Epiphyse und Plasma stark erniedrigt waren [165,169]. Typ 1-diabetische Tiere der vorliegenden Arbeit wiesen einen deutlichen Anstieg der Konzentration des Plasma-ADR jedoch nicht des Plasma-NA auf. Das Ergebnis der gesteigerten Katecholaminkonzentration bei Typ 1-diabetischen Ratten bestätigt die Befunde zahlreicher anderer Autoren [171-174]. Als Ursache für die Erhöhung der ADR-Konzentration im Plasma könnten Veränderungen des catecholaminergen Metabolismus angesehen werden [175]. So wurde bei STZ-behandelten diabetischen Ratten beispielsweise ein verminderter Katecholaminkatabolismus beschrieben [176]. Die erhöhten Katecholaminkonzentrationen sind wiederum als Ursache einer gesteigerten Melatoninsynthese zu sehen. So haben Dagnino-Subiabre *et al.* nachgewiesen, dass die Stress-induzierte Katecholaminerhöhung bei Ratten, vermittelt durch β_1 -adrenerge Rezeptoren, zu einem Anstieg der Melatoninsynthese führt [177].

Weiterhin ist bekannt, dass die epiphysäre Katecholaminkonzentration einer circadianen Rhythmik folgt, und bei der Ratte höhere Werte während der Dunkelphase nachweisbar sind [178], was einer gesteigerten nächtlichen Melatoninsynthese entspricht [29]. Die Bestimmung der Plasma-Katecholaminkonzentration bei nicht-diabetischen Kontrolltieren ergab jedoch keinen circadianen Rhythmus. Bei Typ 1-diabetischen Ratten war ein diurnaler Rhythmus der erhöhten ADR-Konzentration des Plasmas nachweisbar, welcher auch unter Insulinsubstitution erhalten blieb. Auch hier kann mit einer Insulinresistenz argumentiert werden, welche einer Normalisierung der Werte nach Insulinsubstitution entgegenwirkte. Die Plasma-Katecholaminkonzentration spiegelt möglicherweise nicht den Zustand in der Epiphyse wider. Da keine Werte über die epiphysären Katecholaminkonzentrationen vorliegen, kann die Frage, ob die Plasma-Katecholamine die Melatoninsynthese direkt beeinflussen, nicht abschließend

beantwortet werden. Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass Plasma-ADR und -Melatonin bei Typ 1-diabetischen Tieren erhöht sind und durch Insulinsubstitution normalisiert werden. Aufgrund dessen kann vermutet werden, dass Insulin die noradrenerg-stimulierte Melatoninsynthese moduliert und sich ein möglicher Zusammenhang zwischen Insulin, Plasma-Katecholaminen und Melatonin herleiten lässt. Weiterführende Untersuchungen des Katecholaminstoffwechsels der Epiphyse sollten perspektivisch eine Rolle spielen.

Um dennoch Rückschlüsse auf die Vorgänge in der Epiphyse treffen zu können, wurde im weiteren Verlauf der Studie die epiphysäre Expression des β_1 -Adrenozeptors sowie wichtiger Gene der Melatoninsynthese untersucht. Die Freisetzung von NA aus postganglionären Nervenendigungen führt bei Rodentia über die Bindung an β_1 - und α_1 -adrenerge Rezeptoren zu einer gesteigerten Transkription und Translation von Enzymen der Melatoninsynthese [25]. In zurückliegenden Arbeiten wurde gezeigt, dass die epiphysäre Expression des β_1 -Adrenozeptors STZ-behandelter Wistar-Ratten sowie weiblicher Typ 1-diabetischer LEW.1AR1-*iddm*-Ratten signifikant erhöht und das Gen tageszeitabhängig unterschiedlich stark exprimiert war [85,160].

Die Daten der vorliegenden Untersuchung zeigen jedoch keine Veränderung und keinen diurnalen Rhythmus der epiphysären mRNA-Expression des β_1 -Adrenozeptors bei Typ 1-diabetischen männlichen *Iddm*-Ratten. Die Abweichung zur vorausgegangenen Untersuchung mit weiblichen LEW.1AR1-*iddm*-Ratten kann durch geschlechtsspezifische Unterschiede bedingt sein und auf Unterschieden in der Datenauswertung beruhen [160]. Zusammenfassend kann an dieser Stelle festgestellt werden, dass die beobachtete Erhöhung der Plasma-Melatoninkonzentration bei männlichen Typ 1-diabetischen *Iddm*-Ratten nicht mit Veränderungen der epiphysären mRNA-Expression des β_1 -Adrenozeptors korreliert. Weitere adrenerge Rezeptoren, welche auf der Pinealozytenmembran lokalisiert sind und die Synthese bzw. Freisetzung von Melatonin beeinflussen, sind der ADR-sensitive β_2 -Adrenozeptor sowie der NA-sensitive α_2 -Adrenozeptor [22,179]. Die Aktivierung des β_2 -Adrenozeptors resultiert in einer gesteigerten Bereitstellung von cAMP sowie einer Erhöhung der Aktivität der AANAT, dem Schlüsselenzym der Melatoninsynthese. Als Hinweis für eine Wechselwirkung dieses Rezeptors mit Insulin kann angesehen werden, dass bei STZ-behandelten diabetischen Ratten eine erhöhte Expression des β_2 -Adrenozeptor im Skelettmuskel nachweisbar ist [180]. Im Rahmen der eigenen Untersuchung wurde die Expression des β_2 -Adrenozeptors jedoch nicht bestimmt. Dennoch könnte die erhöhte Konzentration an ADR über die Stimulation des β_2 -adrenergen Rezeptors zur Erhöhung der Melatoninsynthese beigetragen haben.

Eine der Hauptfunktionen der Epiphyse ist die Umsetzung des vom SCN generierten circadianen Rhythmus in eine rhythmische Freisetzung von Melatonin. Der nächtliche Anstieg der

Melatoninsynthese geschieht über eine Verknüpfung der umgebenden Lichtverhältnisse an die Expression der *Aanat* [181]. Allgemein wird die AANAT als das geschwindigkeitsbestimmende Enzym angesehen [22]. Dennoch wurde jüngst auch vermutet, dass bei Ratten die HIOMT das geschwindigkeitsbestimmende Enzym der nächtlichen Melatoninsynthese darstellt [182]. Die *Aanat*-Expression wird vorwiegend durch eine NA-stimulierte Phosphorylierung des *cAMP response element-binding protein* (CREB) kontrolliert [181], da die Phosphorylierung von CREB der entscheidenden Faktor in der transkriptionalen Aktivierung der *Aanat* über ein *cAMP response element* ist [183]. Im Gegensatz zum Menschen, bei dem die Regulation der AANAT posttranskriptional verläuft, kommt es bei der Ratte innerhalb von 2 h nach Beginn der Dunkelheit zu einem etwa 100-fachen Anstieg der Transkription der *Aanat* [28]. Kurze Zeit später steigen AANAT-Proteinmenge und auch die AANAT-Aktivität. Während die *Aanat* circadian exprimiert wird, zeigt sich hinsichtlich der *Hiomt* eine konstitutive Expression [22,184]. Die mRNA-Expression der *Hiomt* steigt über die Stimulation β_1 -adrenerger Rezeptoren während der Dunkelphase nur um das Zweifache [184]. Die Aktivität der HIOMT wird im Gegensatz zur AANAT posttranslational, vermutlich unabhängig vom β_1/α_1 -adrenergen Weg, über nicht-noradrenerge Transmitter wie Neuropeptid Y reguliert [184].

In zurückliegenden Untersuchungen wurde gezeigt, dass hyperinsulinämische Typ 2-diabetische GK-Ratten eine signifikante Erhöhung der epiphysären mRNA-Expression der *Aanat* aufweisen, die epiphysäre AANAT-Aktivität jedoch vermindert war [64]. Die verminderte Melatoninkonzentration diabetischer Tiere war somit auf eine verminderte Aktivität eines Enzyms der Melatoninsynthese zurückzuführen. STZ-behandelte Typ 1-diabetische Ratten, welche durch eine Erhöhung der Plasma-Melatoninkonzentration gekennzeichnet sind, zeigten eine Erhöhung des epiphysären Transkriptniveaus von *Aanat* und *Hiomt* [85]. Im Gegensatz dazu wurde bei den Typ 1-diabetischen Iddm-Ratten der vorliegenden Untersuchung kein Unterschied der epiphysären mRNA-Expression von *Aanat* und *Hiomt* beobachtet. In einer Voruntersuchung mit weiblichen Typ 1-diabetischen LEW.1AR1-*iddm*-Ratten wurde jedoch eine Erhöhung der mRNA-Transkription von *Aanat* und *Hiomt* nachgewiesen [160]. Geschlechtsspezifische Unterschiede könnten eine Erklärung liefern, dass obwohl es sich um den gleichen Ratten-Stamm handelt. Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten somit darauf hin, dass die erhöhten Melatoninkonzentrationen nicht auf eine gesteigerte epiphysäre Transkription von *Aanat* und *Hiomt* zurückzuführen sind. Möglicherweise sind es posttranslationale Prozesse, wie z. B. die Inhibierung des Abbaus der AANAT, welche regulierend in die Melatoninsynthese des Pinealozyten eingreifen [28].

In Übereinstimmung mit vorherigen Untersuchungen der Arbeitsgruppe Peschke [85,160] zeigten die Typ 1-diabetischen Iddm-Ratten eine diurnale Expression der *Aanat*, während die *Hiomt* nicht diurnal exprimiert wurde. Daher kann vermutet werden, dass die fehlende Rhythmik der Melatoninkonzentration des Plasmas diabetischer Tiere nicht auf eine Veränderung der diurnalen Rhythmik der *Aanat*-Expression zurückzuführen ist. Diese diurnale Rhythmizität der *Aanat*-Transkription blieb auch unter der Insulinsubstitution diabetischer Iddm-Ratten erhalten. Im Gegensatz dazu fand eine Studie an weiblichen LEW.1AR1-*iddm*-Ratten eine Normalisierung der erhöhten Transkriptmengen von *Aanat* und *Hiomt* [160]. Auch hier müssen geschlechtsspezifische Unterschiede in Betracht gezogen werden.

Neben der NA-vermittelten Steigerung der *Aanat*-Transkription existieren zahlreiche weitere Signalwege, welche direkt regulierend oder modulierend auf die AANAT wirken [181]. Der *Mitogen-activated protein*(MAP)-Kinase(MAPK)-Signalweg soll dabei einen modulierenden Einfluss auf die Aktivierung der AANAT haben [181]. Dabei wird vermutet, dass es über die NA-vermittelte Signalkaskade zu einer gesteigerten Phosphorylierung der p42/44 MAPK kommt, welche eine Induktion der AANAT während der frühen Dunkelphase vermittelt [181]. Sugimoto *et al.* konnten in ihrer Studie an STZ-behandelten diabetischen Ratten eine gesteigerte Proteinexpression der p42/44 MAPK peripherer Nerven finden, welche durch Insulintherapie normalisiert wurde [185]. Diese Beobachtung könnte einen weiteren Erklärungsansatz für die erhöhten Melatoninkonzentrationen diabetischer Ratten der eigenen Untersuchung liefern. Zusammenfassend konnten die erhöhten Melatoninkonzentrationen des Plasmas Typ 1-diabetischer Tiere nicht auf eine gesteigerte Transkription der Melatonin-synthetisierenden Enzyme *Aanat* und *Hiomt* zurückgeführt werden. Ob und wie Insulin in mögliche posttranslationale Mechanismen eingreift, sollte durch weitere Untersuchungen geklärt werden.

Die Epiphyse produziert Melatonin in einem circadianen Rhythmus, welcher unter der noradrenergen Kontrolle des SCN steht [28,96]. Der endogene Rhythmus des SCN basiert auf positiven und negativen Rückkopplungsschleifen der Transkription und Translation verschiedener Uhrengene, welche auch in der Epiphyse exprimiert werden [29]. Das Uhrengen *Per1*, als Teil der negativen Schleife, wird circadian rhythmisch in der Epiphyse exprimiert [186] und zeigt sein Maximum 2 h früher als das der *Aanat* [22]. Es gibt Hinweise, dass der Rhythmus des nächtlichen Anstiegs der *Per1*-Expression sich ebenfalls NA-vermittelt vollzieht [187]. Im Gegensatz dazu wird *Bmal1*, welches einen Teil der positiven Rückkopplungsschleife bildet, nach dieser Studie unabhängig vom noradrenergen Signal des SCN in der Epiphyse exprimiert.

In einer zurückliegenden Untersuchung mit STZ-behandelten Typ 1-diabetischen Ratten konnte eine signifikante Erhöhung der epiphysären mRNA-Expression der Uhrengene *Per1* und *Bmal1*

nachgewiesen werden [85]. Die chronobiologische Auswertung der Daten der vorliegenden Untersuchung ergibt für die beiden Uhrengene *Per1* und *Bmal1* eine diurnale epiphysäre mRNA-Expression jedoch ohne signifikante Veränderungen des MESOR bei männlichen Typ 1-diabetischen Iddm-Ratten. Bei weiblichen diabetischen LEW.1AR1-*iddm*-Ratten wurde hingegen ein Anstieg der epiphysären Expression von *Per1* und *Bmal1* beobachtet [160]. Die Expression von *Per1* und *Bmal1* zeigt ein typisches antiphasisches Expressionsprofil [188]. Dies wurde in jeder der drei untersuchten Gruppen der vorliegenden Untersuchung festgestellt. Auch Wu *et al.* konnten zeigen, dass die Uhrengengenexpression der Epiphyse durch den T1DM nicht beeinflusst wird [189].

Der Verlust der diurnalen Rhythmik der Melatoninsynthese Typ 1-diabetischer Iddm-Ratten kann somit nicht durch Veränderungen der diurnalen mRNA-Expression von *Per1* und *Bmal1* erklärt werden. Die Epiphyse ist im Gegensatz zu vielen anderen peripheren Organen stark an die Signale des SCN gekoppelt [190]. Fehlende oder gestörte Signale des SCN könnten zum Verlust der rhythmischen Uhrengengenexpression der Epiphyse führen [191]. Zusammenfassend kann gefolgert werden, dass die durch den T1DM bedingte Beeinträchtigung der Melatonin-Rhythmik nicht durch einen veränderten Uhrengengenmechanismus der Epiphyse erklärt werden kann. Auch konnte bisher in keiner Studie gezeigt werden, dass Veränderungen des Uhrenmechanismus des SCN einer gestörten Melatoninsynthese zugrunde liegen [118,192]. Dem widerspricht auch der Befund eines intakten Rhythmus der *Aanat*-Expression bei Typ 1-diabetischen Tieren, woraus ein intakter Rhythmus des SCN abgeleitet werden kann.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass anhand des genutzten Typ 1-diabetischen Tiermodells die Existenz eines Insulin-Melatonin-Antagonismus nachgewiesen wurde. Niedrige Insulinkonzentrationen Typ 1-diabetischer Tiere koinzidieren dabei mit stark erhöhten Melatoninkonzentrationen, welche durch Insulinsubstitution auf das Niveau normoglykämischer Kontrollen gesenkt wurden. Unter Insulintherapie wurde auch die durch die schweren metabolischen Veränderungen verlorengegangene diurnale Rhythmik des Melatonins wiederhergestellt. Es kann außerdem vermutet werden, dass Katecholamine Vermittler der antagonistischen Beziehung dieser beider Hormone darstellen, da die erhöhte ADR-Konzentration im Plasma diabetischer Tiere mit den erhöhten Melatoninwerten korreliert. Weiterführende Studien müssen untersuchen, ob auch Veränderungen der epiphysären Katecholaminkonzentrationen stattgefunden haben. Die Funktionalität des circadianen Uhrengengenmechanismus der Epiphyse wurde durch den T1DM auf Ebene der Genexpression regulatorischer Schlüsselenzyme und Schrittmacher nicht verändert. Um die Ursachen der

veränderten Melatoninkonzentration aufzuklären, sind Proteinexpressionuntersuchungen bzw. Aktivitätsuntersuchungen der Melatonin-synthetisierenden Enzyme von großer Bedeutung.

5.3 Wirkung des spontanen Typ 1-Diabetes mellitus auf die „innere Uhr“ der Leber

Tierexperimentelle Studien legen nahe, dass Veränderungen und Störungen der circadianen Rhythmik zur Entwicklung eines Diabetes mellitus beitragen [111,112,114,193]. So wurde gezeigt, dass genetische Polymorphismen der Uhrgene *Clock* und *Bmal1* zur Entstehung von T2DM und Gestationsdiabetes beitragen [115,194,195].

Der Uhrenmechanismus besteht aus positiven und negativen Rückkopplungsschleifen der Transkription und Translation von Uhrgenen [196]. Im Zentrum dieses Mechanismus stehen die beiden Transkriptionsfaktoren CLOCK und BMAL1. Das CLOCK-BMAL1-Heterodimer bindet an definierte Sequenzabschnitte der DNA im Promotorbereich der Uhrgene *Per* und *Cry*, sogenannte E-Boxen. Die PER- und CRY-Proteine fungieren als negative Schleife des molekularen Uhrenmechanismus, indem sie zeitversetzt die Transkription von *Clock* und *Bmal1* hemmen, aber auch ihre eigene Expression.

Uhrgene werden neben dem SCN, welcher als übergeordneter zentraler Rhythmusgenerator das wichtigste Steuerorgan circadianer Rhythmen peripherer Gewebe darstellt, in nahezu allen peripheren Geweben exprimiert [10]. Neuronale Projektionen des autonomen Nervensystems, welche vom SCN zu Organen wie Pankreas, Leber und Fettgewebe ziehen [196], ermöglichen die Koordinierung und Kontrolle „peripherer Uhren“. Eine Zerstörung des SCN führt zur Desynchronisation peripherer Gewebe, während die circadiane Rhythmik der Expression von *Per2* erhalten bleibt [98]. Im Gegensatz zum SCN, dessen stärkster Synchronisator das Licht ist, werden „periphere Uhren“ wie die der Leber, durch andere Signale wie die Nahrungsaufnahme, beeinflusst [197]. Außerdem wirken humorale Faktoren wie Glukokortikoide und Retinsäure oder aber auch die Temperatur regulierend auf das *Entrainment* der „peripheren Uhr“ der Leber [198]. Der SCN beeinflusst periphere Oszillatoren außerdem über einen indirekten Weg, indem er Aktivitäts- und Ruhephasen synchronisiert und somit auch den Zeitpunkt der Nahrungsaufnahme beeinflusst [196]. Eine Einschränkung der Nahrungsaufnahme bei nachtaktiven Tieren auf zeitlich limitierte Perioden während der Lichtphase führt zu Phasenverschiebungen der Uhrgenexpression im SCN und peripheren Organen wie der Leber bis hin zur vollständigen Umkehr der Phasen [197]. Interessanterweise wirkt auch Insulin sowohl *in vitro* als auch *in vivo* als potenter Zeitgeber der „inneren Uhr“ der Leber [199]. Hormonrezeptoren des SCN für Ghrelin, Leptin und Insulin weisen darauf hin, dass zwischen der

„inneren Uhr“ und der Nahrungsaufnahme bzw. der Energieversorgung eine ständige Rückkopplung besteht [196]. Im Gegensatz dazu schließt eine Studie an STZ-behandelten Ratten eine Wirkung von Insulin als regulierendes Signal für die „innere Uhr“ der Leber aus [200].

Studien zum Einfluss eines T1DM auf die Uhrengenenexpression der Leber stellen eine Seltenheit dar [201,202], weswegen dem Einsatz des spontan Typ 1-diabetischen Tiermodells der vorliegenden Arbeit eine besondere Bedeutung zugemessen werden muss. Anhand der vorliegenden Daten kann gezeigt werden, dass die Uhrengenenexpression der Leber einem circadianen Muster folgt [197]. So wurden die untersuchten Uhrengene *Per1*, *Per2*, *Bmal1*, *Clock* und *Cry1* in der normoglykämischen Kontrollgruppe diurnal exprimiert. Bei Typ 1-diabetischen Tieren kam es zum Verlust der diurnalen Rhythmik der mRNA-Expression von *Clock*, während die Expression der übrigen Uhrengene erhalten blieb. Im Gegensatz dazu wurde in einer vorangegangenen Untersuchung mit STZ-behandelten diabetischen Ratten keine Veränderung des diurnalen Rhythmus der hepatischen *Clock*-Expression beobachtet [202]. Die hier dargestellte gestörte Rhythmik der *Clock*-Expression wurde durch die Insulinsubstitution nicht wiederhergestellt, was für permanente nicht reversible Veränderungen spricht.

Per1 und *Per2* zählen nach der Auffassung von Balsalobre *et al.* zusammen mit *c-fos* zur Gruppe der „unmittelbar“ frühen Gene [203], deren Transkription auf eine Vielzahl zellulärer Stimuli schnell und vorübergehend aktiviert wird, bevor andere Proteine synthetisiert werden. Untersuchungen an Rat-1-Fibroblasten haben gezeigt, dass diese Gene unmittelbar nach einer Stimulation mittels Serum-Schock transkribiert und circadian exprimiert werden [203]. Diese Gene reagieren entsprechend sehr sensitiv auf Veränderungen zirkulierender Faktoren wie Kortikosteroide oder Insulin [204]. Zudem wurden genetische Varianten des humanen *Per2*-Gens identifiziert, die mit einer erhöhten Nüchtern-Blutglukosekonzentration assoziiert sind [205].

In der eigenen Arbeit wurde der MESOR der hepatischen mRNA-Expression des Uhrengens *Per1* weder durch den T1DM noch durch die Insulinsubstitution verändert. Eine Studie an STZ-behandelten diabetischen Mäusen fand hingegen eine gesteigerte hepatische Expression von *Per1* [159]. Ebenso zeigt die vorliegende Studie, dass die diurnale Rhythmik im verwendeten Tiermodell des T1DM erhalten bleibt. Sowohl diabetische Iddm-Ratten der eigenen Studie als auch Untersuchungen an STZ-behandelten Mäusen ergaben starke Senkungen von MESOR und Amplitude der mRNA-Expression von *Per2* [118,159,192]. Es existieren jedoch auch Untersuchungen, die lediglich Phasenverschiebungen bzw. keine Effekte auf die Expression von *Per2* bei STZ-behandelten Ratten beschreiben [199,202]. In Übereinstimmung mit der Literatur wurde in der vorliegenden Arbeit gezeigt, dass die Akrophase der hepatischen Expression von

Per1 und *Per2* phasenverschoben war [206]. Diese Differenzen wurden von Ogawa *et al.* in einem Modell der positiven transkriptionalen Autoregulation durch PER1 und PER2 erklärt, die eine Verzögerung der *Per2*-Expression hervorruft [207].

Die Insulinsubstitution diabetischer Iddm-Ratten führte zur Normalisierung der verringerten Amplitude der hepatischen *Per2*-mRNA-Expression, während der MESOR unverändert blieb. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass Insulin im verwendeten spontan diabetischen Tiermodell regulierend auf die Expression von *Per2* wirkt. Diese Hypothese wird gestützt von weiteren Arbeiten, die beschreiben, dass Insulin einen wichtigen Zeitgeber der „peripheren Uhr“ der Leber darstellt, und dass PER2 als wichtiger Faktor der „Glukosehomöostase“ fungiert [118,208]. In diesen Zusammenhang wurde auch nachgewiesen, dass Glukose als Regulator der Expression von *Per1* und *Per2* wirkt [209].

Auch die Uhrengene *Bmal1* und *Clock* spielen eine wichtige Rolle in der Regulation der „Glukosehomöostase“. So wurde gezeigt, dass eine Inaktivierung dieser beiden zentralen Komponenten der „circadianen Uhr“ bei Mäusen zum Verlust der diurnalen Rhythmik des Glukosespiegels führt [142]. Eine Leber-spezifische Deletion von *Bmal1* führt außerdem zu einer veränderten Regulation wichtiger Gene des Glukosestoffwechsels [210]. Weiterhin wurden eine gestörte Glukosetoleranz, verminderte Insulinsekretion sowie Veränderungen der Größe und Proliferation pankreatischer Inseln beobachtet [112]. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass die *Bmal1*-mRNA-Expression bei Typ 1-diabetischen Iddm-Ratten vermindert und phasenverschoben ist. Außerdem wurde beobachtet, dass es zum Verlust der diurnalen Rhythmik der *Clock*-mRNA-Expression kam, welche durch Insulinsubstitution nicht wiederhergestellt wurde. Untersuchungen zum Einfluss des T1DM auf die hepatische *Clock*-Expression sind jedoch sehr widersprüchlich. Während die vorliegenden Ergebnisse mit den Resultaten anderer Autoren übereinstimmen [202,211], fand eine Studie bei STZ-behandelten Ratten keine Veränderung der hepatischen *Clock*-Expression [202]. Eine andere Studie wiederum beschreibt einen Anstieg des *Clock*-Transkriptniveaus [212]. Die Ergebnisse, dass eine Insulinsubstitution diabetischer Iddm-Ratten nicht zur Wiederherstellung des diurnalen Rhythmus von *Clock* und der Genexpression von *Bmal1* führt, deuten darauf hin, dass Insulin und/oder Glukose nicht allein in die hepatische Regulation dieser beiden Uhrengene eingreifen. Vermutlich sind andere, beispielsweise humorale Faktoren, trotz der Wiederherstellung des normoglykämischen Zustandes weiterhin verändert, was zur dauerhaften Störung der hepatischen Uhrengenenexpression führt. Es kann vermutet werden, dass der Einfluss anderer Faktoren somit von größerer Bedeutung sein muss, als der des Insulins. Andererseits kann vermutet werden, dass der spontane T1DM dieses Tiermodells zu permanenten Veränderungen

des Uhrenmechanismus der Leber führt, welche auch durch eine Insulinsubstitution nicht restituiert werden.

Charakteristisch für die mRNA-Expression von *Per1* und *Bmal1* ist ein antiphasisches Profil [188,213], welches anhand der vorliegenden Daten in jeder der drei untersuchten Gruppen beobachtet werden konnte. Aufgrund der Aufrechterhaltung dieses antiphasischen Rhythmus liegt es nahe, dass ein funktionierender diurnaler Uhrenmechanismus sowie eine stabile Uhrengenenexpression bestehen. Ähnliche Beobachtungen wurden auch in Studien an STZ-behandelten Wistar-Ratten [85] sowie diabetischen LEW.1AR1-*iddm*-Ratten gemacht [160].

Das CLOCK-BMAL1-Heterodimer stimuliert über die Bindung an E-Box-Elemente im Promotor die Transkription zusätzlicher regulatorischer Schleifen von nukleären Rezeptoren wie *Rev-erba* und *Rora*. Diese Transkriptionsfaktoren binden an ROREs im Promotorbereich verschiedener Gene [214,215], so beispielsweise *RORα* im Promotorbereich des *Fibroblast growth factor (Fgf21)*, der für den Lipid- und Glukosestoffwechsel in Hepatozyten von Bedeutung ist [216]. Auch der Promotorbereich von *Bmal1* enthält zwei dieser ROREs [58]. Während REV-ERBα die Expression von *Bmal1* hemmt, führt *RORα* zur Aktivierung, indem es mit REV-ERBα um die RORE-Bindungsstellen im *Bmal1*-Promotor konkurriert und somit eine Rückkopplungsschleife bildet [62].

Die hepatische mRNA-Expression von *Rev-erba* erfolgt circadian rhythmisch [213]. Außerdem ist bekannt, dass eine hepatische Überexpression von *Rev-erba* zu einer verminderten Expression des Lebertranskriptoms führt [217]. Übereinstimmend mit einer Studie an STZ-behandelten diabetischen Ratten [202] kann in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass der T1DM keinen Einfluss auf den diurnalen Rhythmus der hepatischen *Rev-erba*-mRNA-Expression hat. Allerdings kam es zum Anstieg der Expression von *Rev-erba*, welche durch Insulinsubstitution auf das Niveau der normoglykämischen Kontrolle normalisiert wurde. Eine Untersuchung an STZ-behandelten Ratten führte zu keiner veränderten Expression dieses Gens [202]. Anhand dieser Beobachtung kann gefolgert werden, dass beim Tiermodell des spontanen T1DM die Expression von *Rev-erba* gestört ist und durch Insulin wiederhergestellt wird. Dies wird gestützt durch die Tatsache, dass Insulin die hepatische Expression von *Rev-erba* senkt [218]. Möglich ist dies, indem Insulin hemmend auf die Glykogensynthase-Kinase-3 wirkt [219], welche einen wichtigen Stabilisator von REV-ERBα darstellt [220]. Vermutlich kommt es als Folge des Insulinmangels zu einer verringerten REV-ERBα-Degradation, woraufhin die Expression von *Bmal1* fällt. Der bei Typ 1-diabetischen Ratten beobachtete Abfall der *Bmal1*-Expression kann daher als Konsequenz des Anstiegs der *Rev-erba*-Expression verstanden werden.

Als Gegenspieler von REV-ERB α spielt auch ROR α eine wichtige transkriptionale Rolle in der Regulation des circadianen Rhythmus sowie des Metabolismus [221]. Dabei wurde *Bmal1* als ein direktes Zielgen von ROR α identifiziert [222]. Die Datenlage bezüglich der hepatischen Expression von *Rora* ist jedoch sehr widersprüchlich [222-224]. In der vorliegenden Arbeit wurde in keiner der untersuchten Gruppen eine diurnale Rhythmik der *Rora*-mRNA-Expression festgestellt, was die Ergebnisse anderer Studien bestätigt [222,223]. Auch hatte der Insulinmangel keinen Einfluss auf die hepatische mRNA-Expression von *Rora*. Im Gegensatz dazu zeigte sich jedoch in einer Voruntersuchung bei STZ-behandelten Ratten eine Erhöhung der hepatischen *Rora*-Expression [202]. Möglicherweise sind die Unterschiede der hepatischen *Rora*-Expression der STZ-vermittelten experimentellen Induktion des T1DM geschuldet. Im vorliegenden Modell des spontanen T1DM kann jedoch gezeigt werden, dass die diabetischen Veränderungen die hepatische *Rora*-Expression nicht beeinflussen.

Auch das Uhrgen *Cry* spielt eine Rolle in der Pathogenese des T2DM. So wurde nachgewiesen, dass Polymorphismen des *Cry1*-Gens mit einem erhöhten Risiko, an T2DM zu erkranken, in Verbindung gebracht werden können [225]. In vorliegender Untersuchung wurde bei diabetischen Ratten eine Phasenverschiebung der hepatischen *Cry1*-Expression beobachtet, welche durch Insulinsubstitution auf das Niveau der Kontrollen normalisiert wurde. Dieser Befund deckt sich mit Ergebnissen an STZ-behandelten Ratten, bei denen in Leber und Herz veränderte Akrophasen beobachtet wurden [202,206]. Im Gegensatz zu den übrigen untersuchten Uhrgenen konnte der Nachweis erbracht werden, dass die hepatische Expression von *Cry1* maßgeblich von der Plasma-Insulinkonzentration abhängig ist.

Zusammenfassend kann gezeigt werden, dass die diurnale Expression von Uhrgenen im verwendeten spontan Typ 1-diabetischen Tiermodell auf sehr unterschiedliche Weise durch Insulin beeinflusst wird. Dabei führt der T1DM zu einer veränderten hepatischen Uhrgenexpression (*Per2*, *Bmal1*, *Clock*, *Cry1*, *Rev-erba*). Außerdem kommt es zu veränderten diurnalen Rhythmen, welche auch nach Erreichen eines normoglykämischen Zustandes unter Insulinsubstitution nicht wiederhergestellt werden (*Clock*). Andere Uhrgene wurden dagegen durch Insulin normalisiert (*Cry1*, *Rev-erba*) oder wurden durch den T1DM nicht beeinflusst (*Per1*, *Rora*). Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten darauf hin, dass Insulin als Zeitgeber der „peripheren Uhr“ der Leber wirkt, und dass der hepatische Uhrenmechanismus durch metabolische Typ 1-diabetische Veränderungen gestört wird.

Microarray-Untersuchungen haben gezeigt, dass 9% von 2000 untersuchten Genen des Leber-Transkriptoms circadian exprimiert werden und womöglich unter der Kontrolle des SCN stehen [226]. 10 - 15% aller Transkripte verschiedener Gewebe sollen circadian reguliert sein [59]. Da

viele dieser Gene E-Boxen in ihren Promotoren enthalten, können sie direkt durch das CLOCK-BMAL1-Heterodimer reguliert werden [227].

DBP gehört zur Familie der *PAR-leucin-zipper*-Transkriptionsfaktoren und reguliert die Transkription zahlreicher Gene der Leber [106]. Die Expression von *Dbp* der Leber erfolgt diurnal rhythmisch [192,213], was durch die vorliegenden Ergebnisse bestätigt werden kann. Hervorzuheben ist, dass dieser Rhythmus, in Übereinstimmung mit früheren Studien [192,202,206], in jeder der drei untersuchten Gruppen deutlich nachweisbar war. Bei Typ 1-diabetischen Iddm-Ratten der vorliegenden Arbeit wurde jedoch ein Anstieg von MESOR und Amplitude der hepatischen Expression von *Dbp* beobachtet, welcher bei STZ-behandelten Tieren nicht nachgewiesen wurde [202]. Interessanterweise wurde in einer Voruntersuchung gezeigt, dass der T1DM auch in der Epiphyse zu einer gesteigerten Expression von *Dbp* unter Erhalt der diurnalen Rhythmik führt [85]. Bei Insulin-substituierten Tieren der vorliegenden Arbeit kam es zu einer Normalisierung der erhöhten hepatischen *Dbp*-Expression. Ein Befund, der darauf hinweist, dass *Dbp* durch den Einfluss von Insulin reguliert wird. DBP stimuliert seinerseits, über die Bindung an D-Box-Elemente, gemeinsam mit CLOCK-BMAL1 die Transkription von *Per1* und beeinflusst den zentralen Uhrenmechanismus [228]. Die gesteigerte hepatische Expression von *Dbp* bei diabetischen Iddm-Ratten der vorliegenden Arbeit hatte jedoch keine Erhöhung der *Per1*-Expression zur Folge.

E4BP4 ist ein weiterer *Leucin-zipper*-Transkriptionsfaktor, dessen DNA-Bindungsdomäne mit der des DBP verwandt ist [107]. Dadurch entsteht eine Konkurrenz zwischen diesen beiden Transkriptionsfaktoren im Bereich eines transkriptional-sensitiven Bereichs von Zielgenen, der D-Box [229], wobei E4BP4 im Gegensatz zum DBP jedoch hemmend auf die Transkription von Zielgenen wirkt [107]. In Voruntersuchungen wurde bereits nachgewiesen, dass die mRNA-Expression von *E4bp4* der Leber normoglykämischer Kontrolltiere circadian rhythmisch erfolgt [213]. In Übereinstimmung mit der Literatur [107] konnte in der vorliegenden Untersuchung gezeigt werden, dass die hepatische mRNA-Expression von *E4bp4* in entgegengesetzter Phase zu der des *Dbp* verläuft. Bei Typ 1-diabetischen Iddm-Ratten wurde außerdem ein Verlust der diurnalen Rhythmik bei gleichzeitig erhöhter *E4bp4*-Expression der Leber beobachtet. Die Insulinsubstitution normalisierte sowohl die gestörte Rhythmik als auch die erhöhte Expression von *E4bp4* auf den Zustand normoglykämischer Kontrollen. Im Gegensatz dazu beeinflusste ein durch STZ-Behandlung experimentell hervorgerufener T1DM die Expression von *E4bp4* nicht [202]. Aufgrund der vorliegenden Daten kann vermutet werden, dass die hepatische Expression dieses Gens im Modell des spontanen T1DM durch Insulin kontrolliert wird. Diese Hypothese wird gestützt durch die Arbeiten von Tong *et al.*, welche zeigen, dass Insulin die *E4bp4*-

Expression reguliert [230]. Da E4BP4 als Repressor die Transkription von *Per2* hemmt [231], kann die bei Typ 1-diabetischen Tieren beobachtete verminderte hepatische Expression von *Per2* mit der erhöhten *E4bp4*-Expression erklärt werden. Die Insulinsubstitution diabetischer Iddm-Ratten führte einerseits zur Wiederherstellung der gestörten *E4bp4*-Rhythmik, andererseits wurde die Amplitude der *Per2*-Expression auf das Niveau der Kontrollen heraufreguliert. Die vorliegenden Ergebnisse deuten an, dass es in diesem Tiermodell des spontanen T1DM eine regulatorische Verbindung zwischen *E4bp4* und *Per2* gibt.

Als wichtige Regulatoren des Kohlenhydrat- und Fettstoffwechsels sowie der Energiehomöostase sind die nukleären Rezeptoren der PPAR-Familie zu nennen [232]. Die Verknüpfung von „circadianer Uhr“ und Metabolismus wird deutlich am Beispiel der rhythmischen Expression von *Ppara* [223,233], welcher durch CLOCK reguliert wird [234]. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit weisen jedoch in keiner der untersuchten Gruppen eine diurnale Expression von *Ppara* auf. Auch hatten weder der T1DM noch die Insulinsubstitution einen Einfluss auf die mRNA-Expression von *Ppara*. Ähnliches war auch in einer Studie an STZ-behandelten Mäusen beobachtet worden, deren hepatische *Ppara*-Expression zwar rhythmisch war, jedoch nicht durch einen Insulinmangel beeinflusst wurde [234]. Mögliche Spezies-spezifische Unterschiede könnten für diese Befunde verantwortlich sein. Die circadiane Expression von *Ppara* wird maßgeblich durch CLOCK reguliert [234]. So weist *Ppara* im zweiten Intron eine E-Box-reiche Region für die Transaktivierung durch das CLOCK-BMAL1-Heterodimer auf [234]. Darüber hinaus existieren Hinweise, dass PPAR α seinerseits die „circadiane Uhr“ der Leber beeinflusst [235]. So ist PPAR α unabdingbar mit der circadianen Expression von *Bmal1* in der Leber verknüpft. Aufgrund der fehlenden diurnalen Rhythmik der *Ppara*-Expression im verwendeten Tiermodell sowie des ausgebliebenen Einflusses des T1DM auf die *Ppara*-Expression kann eine Wirkung auf die Uhrgene *Clock* und *Bmal1* nicht bestätigt werden. Innerhalb des verwendeten spontan Typ 1-diabetischen Tiermodells greift Insulin nicht in die transkriptionale Regulation von *Ppara* ein.

Neben PPAR α gilt auch PPAR γ als wichtiger Regulator des Energiestoffwechsels sowie der „molekularen Uhr“ [236,237]. Eine fehlende Expression von *Ppary* führt bei Mäusen zum Verlust der rhythmischen Expression von *Bmal1* sowie der *Per*- und *Cry*-Gene [236,237]. Auch aus den Daten der vorliegenden Untersuchung wird deutlich, dass die hepatische Expression von *Ppary* diurnal rhythmisch erfolgt [223]. Dieser Rhythmus geht bei Typ 1-diabetischen Tieren jedoch verloren und wird durch Insulinsubstitution nicht wiederhergestellt. Der Verlust der diurnalen Rhythmik der hepatischen *Ppary*-Expression wurde auch bei diabetischen mit STZ-behandelten Ratten beobachtet [202]. Eine mögliche Ursache für den Verlust der circadianen Rhythmik ergibt

sich aus der Regulation der *Ppary*-Transkription durch die Uhrengen-kontrollierten Transkriptionsfaktoren DBP und E4BP4 [238]. Möglicherweise führt der Verlust des diurnalen Rhythmus der *E4bp4*-Expression zu den beobachteten Veränderungen der *Ppary*-Expression. Während es unter Insulinsubstitution jedoch zur Wiederherstellung der *E4bp4*-Rhythmik kam, blieb die *Ppary*-Expression weiterhin verändert.

Neben dem Verlust der diurnalen Rhythmik von *Ppary* führte der T1DM zu einer Erniedrigung der mRNA-Expression von *Ppary*, welche im Gegensatz zu einer anderen Studie [239] durch Insulinsubstitution nicht normalisiert wurde. Die hier dargestellten Veränderungen von *Ppary* sind beim Modell des spontanen T1DM permanent und werden durch Insulintherapie nicht beeinflusst. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass es bei Typ 1-diabetischen Tieren zu einer gestörten Regulation der *Ppary*-Expression kommt, was weitreichende Folgen für den Stoffwechsel nach sich ziehen könnte. In weiterführenden Studien sollte daher untersucht werden, ob sich die nachgewiesenen Veränderungen auf Proteinebene bestätigen lassen.

Im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass beim Tiermodell des spontanen T1DM Störungen des Uhrenmechanismus der Leber entstehen. Es bildet sich ein sehr inhomogenes Bild der Uhrengenexpression, deren Expression auf unterschiedliche Weise durch Insulin beeinflusst ist. Es kann daher vermutet werden, dass Teile des Uhrengenmechanismus empfindlich auf Insulin und Typ 1-diabetische Veränderungen reagieren, andere Stellglieder unabhängig von Insulin funktionieren. Auch die CCGs reagierten sehr differenziert auf den T1DM sowie die Insulinsubstitution. Oftmals zeigte sich eine Wirkung der Insulinsubstitution, während andere Gene trotz einer Normalisierung des metabolischen Zustandes gestört blieben. Überraschenderweise hatte die nicht reversible gestörte Rhythmik von *Clock* keinen Effekt auf die diurnale Expression der übrigen untersuchten Uhrengene. Ob der Verlust der diurnalen Rhythmik der *Ppary*-Expression im Zusammenhang mit der gestörten Expression von *Clock* steht, sollte in nachfolgenden Untersuchungen analysiert werden. Zudem sollten weitere Studien klären, ob und inwiefern andere Faktoren regulierend auf die Expression der untersuchten Uhrengene und CCGs wirken. So ist bekannt, dass der T1DM auch zu veränderten Plasmakonzentrationen von Leptin [240], Kortikosteron [241] sowie des Wachstumshormons [242] führt. Interessanterweise wurde in einer Untersuchung an Melatoninrezeptor-*knockout*-Mäusen nachgewiesen, dass Melatonin neben seiner synchronisierenden Bedeutung für die pankreatische β -Zelle auch die „periphere Uhr“ der Leber beeinflusst [213]. Die Ausschaltung des MT₁- bzw. MT₂-Rezeptors führte zu veränderten Amplituden und Phasen der diurnalen Expression hepatischer Uhrengene und CCGs. Die im ersten Teil dieser Arbeit beobachteten Veränderungen der Plasma-Melatoninkonzentration könnten somit auch Einfluss auf die

„periphere Uhr“ der Leber haben. Zudem sollte untersucht werden, ob im verwendeten Modell des spontanen T1DM eine veränderte Uhrengenenexpression des SCN als zentraler Schrittmacher zugrunde liegt, und dieser womöglich modulierend auf die Expression der Leber wirkt.

Kritisch anzumerken ist, dass die Versuchsgestaltung eine genaue Differenzierung zwischen transkriptionalen Effekten des Insulins oder der Glukose nicht erlaubt. Die gleichbleibende Insulinabgabe durch die applizierten Pellets führte zu erhöhten Plasma-Insulinkonzentrationen, welche mit erniedrigten Blutglukosekonzentrationen einhergingen. Dennoch bestand ein mild hyperglykämischer Zustand, welcher vermutlich auf eine Insulinresistenz zurückführbar ist. Ein spezifischer Insulin-induzierter Effekt auf die Uhrengenenexpression wird möglicherweise durch die gleichbleibende zehntägige Insulinapplikation maskiert.

Ein mittels STZ experimentell ausgelöster T1DM führt zu Veränderungen der metabolischen Funktion der Leber wie z. B. der Gallensäurebiosynthese, des Fremdstoffmetabolismus sowie des Glukosestoffwechsels [119-121]. Andererseits konnte Untersuchungen belegen, dass es Verknüpfungen zwischen Uhrengenen und CCGs sowie der Funktion der Leber gibt [122,123]. Im Modell des T1DM dieser Arbeit entstanden teilweise nicht reversible Veränderungen des hepatischen Uhrenmechanismus sowie Schrittmachergene des Energiestoffwechsels. Weiterführende Untersuchungen müssen klären, ob dieser gestörte Uhrenmechanismus die metabolische Funktionsweise der Leber beeinträchtigt und ob die beobachteten Effekte auch auf Proteinebene nachweisbar sind.

6. Zusammenfassung

Derzeit leiden in Deutschland etwa 6 Millionen Menschen an einem Diabetes mellitus, wobei 90% auf einen Typ 2-Diabetes und 300.000 auf den Typ 1-Diabetes entfallen. Die Erforschung und das Verständnis pathophysiologischer Grundlagen des Diabetes mellitus gewinnen somit zunehmend an Bedeutung.

In zahlreichen *in vitro*- und *in vivo*-Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass das Indolamin Melatonin die Insulinsekretion hemmt, und dass Insulin die epiphysäre Melatoninsekretion reguliert. Die Existenz dieses funktionellen Insulin-Melatonin-Antagonismus konnte *in vivo* sowohl anhand von Untersuchungen bei Typ 2-diabetischen Goto-Kakizaki-Ratten als auch bei Typ 2-diabetischen Patienten nachgewiesen werden. Für den Typ 1-Diabetes wurde dieser Zusammenhang jedoch lediglich im Tiermodell beschrieben und Ansätze zur Übertragung des funktionellen Insulin-Melatonin-Antagonismus auf das humane System fehlen bisher.

Zahlreiche tierexperimentelle Studien deuten außerdem darauf hin, dass es bei der Entstehung eines Diabetes mellitus zu Veränderungen der „inneren Uhr“ der Leber, dem zentralen Organ des Glukosemetabolismus, kommt. Die zugrundeliegenden Mechanismen sind bisher jedoch kaum bekannt und deshalb weitgehend unverstanden.

Ziel dieser Arbeit war es, die Hypothese des Insulin-Melatonin-Antagonismus, den Einfluss einer Insulin-Substitution auf diesen Zusammenhang sowie den circadianen Uhrenmechanismus der Leber anhand eines spontan Typ 1-diabetischen Tiermodells zu charakterisieren. Die in dieser Arbeit verwendeten LEW.1AR1-*iddm*-Ratten, welche sich durch ihre besondere Nähe zum humanen System auszeichnen, entwickeln um den 60. Lebensstag, aufgrund einer progredienten Autoimmunzerstörung der pankreatischen β -Zelle, das Vollbild eines Typ 1-Diabetes mellitus.

Zur Charakterisierung diurnaler Rhythmen wurden Epiphysen sowie Leberproben Typ 1-diabetischer Ratten des Stammes LEW.1AR1-*iddm* sowie normoglykämischer Kontrollen des Hintergrundstammes LEW.1AR1 alle drei Stunden im Tagesgang gewonnen. In einem weiteren experimentellen Ansatz wurden diabetische LEW.1AR1-*iddm*-Ratten durch ein subkutan platziertes Pellet mit Insulin substituiert. Am zehnten Tag der Insulinsubstitution wurden auch hier Epiphysen sowie Leberproben alle drei Stunden im Tagesgang gewonnen.

Bei hypoinsulinämischen, spontan Typ 1-diabetischen Tieren kam es zur Erhöhung der Plasma-Melatonin-Konzentration, welche mit einem Verlust der diurnalen Rhythmik dieses Merkmals einherging. Die Insulinsubstitution führte bei den diabetischen Tieren zur Normalisierung der metabolischen Entgleisung, sowie zur Wiederherstellung der diurnalen Rhythmik und der Konzentration des Plasma-Melatonins. Diese Beobachtung bestätigt die Hypothese eines

zugrundeliegenden Insulin-Melatonin-Antagonismus. Die Erhöhung der Melatoninkonzentration Typ 1-diabetischer Tiere war jedoch nicht auf eine veränderte rhythmische mRNA-Expression der *Aanat*, einem wichtigen Enzym der Melatoninsynthese, zurückführbar. Auch blieb trotz der schweren metabolischen Entgleisung die rhythmische Expression der Uhrengene *Per1* und *Bmal1* in der Epiphyse Typ 1-diabetischer Tiere erhalten.

Die epiphysäre Melatoninsynthese wird maßgeblich über die Freisetzung des Katecholamins Noradrenalin reguliert. Als eine mögliche Ursache für die veränderte Plasma-Melatoninkonzentration ist demnach der Ausfall der hemmenden Wirkung des Insulins auf die Noradrenalin-medierte Melatoninsynthese zu nennen. In diesem Zusammenhang wurde in der vorliegenden Arbeit beobachtet, dass spontan Typ 1-diabetische Ratten eine Erhöhung der Plasma-Katecholamine aufwiesen.

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde der Einfluss eines spontanen Typ 1-Diabetes mellitus sowie einer anschließenden Insulinsubstitution auf die Expression von Uhrengenen und Uhrengenkontrollierten Genen der Leber untersucht. Dabei wurde beobachtet, dass es bei Typ 1-diabetischen Tieren zu einer veränderten mRNA-Expression der Uhrengene *Per2*, *Bmal1*, *Clock*, *Cry1* und *Rev-erba* kam. Außerdem wurde ein Verlust der circadianen Rhythmik des Uhrengens *Clock* beobachtet, welcher durch die Insulinsubstitution nicht wiederhergestellt wurde. Hingegen führte die Insulinbehandlung zu einer Normalisierung der veränderten hepatischen mRNA-Expressionen der Uhrengene *Per2*, *Cry1* und *Rev-erba*, was darauf hindeutet, dass Insulin bestimmte Faktoren der peripheren „inneren Uhr“ der Leber reguliert. Die normalisierende Wirkung von Insulin zeigte sich auch auf Ebene der Uhrengenkontrollierten Gene *Dbp* und *E4bp4*, deren erhöhte mRNA-Expression nach Insulinsubstitution auf ein Niveau, vergleichbar mit dem normoglykämischer Kontrollen, gesenkt wurde. Bei den Typ 1-diabetischen Tieren wurde außerdem ein Verlust der rhythmischen mRNA-Expression von *Ppary*, einem weiteren Uhrengenkontrolliertes Gen, beobachtet, welche durch Insulinsubstitution nicht restituiert werden konnte.

Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit erstmalig gezeigt werden, dass sich der Insulin-Melatonin-Antagonismus auch anhand des spontan Typ 1-diabetischen LEW.1AR1-*iddm*-Rattenmodells bestätigt. Ferner konnte in diesem Modell gezeigt werden, dass ein spontaner Typ 1-Diabetes mellitus zu Veränderungen der hepatischen Expression von Uhrengenen und Uhrengenkontrollierten Genen der Leber führt und dass diese Veränderungen durch Insulinsubstitution nur teilweise normalisiert werden. In nachfolgenden Untersuchungen ist zu analysieren, welchen Einfluss dieser veränderte Uhrenmechanismus auf die metabolische Funktion der Leber hat.

7. Summary

In Germany approximately six million people suffer from diabetes mellitus, the majority of 90% accounts for type 2-diabetes and only 5% for type 1-diabetes. The investigation and understanding of the underlying pathophysiological mechanisms which lead to the development of diabetes mellitus is of fundamental importance for the control and treatment of that disease.

Numerous *in vitro* and *in vivo* investigations have shown that the indoleamine melatonin reduces the stimulated insulin secretion, whereas in turn, insulin influences the secretion of melatonin from the pineal gland. The existence of a functional insulin-melatonin-antagonism was shown in type 2-diabetic Goto-Kakizaki rats and type 2-diabetic patients. An autoregulatory mechanism that may also play a role under type 1-diabetic conditions. However, studies regarding the influence of a functional insulin-melatonin-antagonism within the pathogenesis of type 1-diabetes are still sparse. Data addressing this relationship related to the human system are missing. Various animal experiments suggest that the development of diabetes mellitus interferes with the circadian clock of the liver, the central organ of glucose metabolism and the underlying mechanisms still need to be clarified.

Using a spontaneous type 1-diabetic animal model, which is comparable to the human pathophysiology of that disease, the aim of the present study was to investigate the hypothesis of an insulin-melatonin-antagonism. Furthermore, the influence of an insulin substitution as well as the impact on the diurnal clock mechanisms of the liver was analysed.

Due to an autoimmune destruction of pancreatic β -cells, LEW.1AR1-*iddm* rats develop a spontaneous type 1-diabetes mellitus around the age of 60 days. To investigate diurnal rhythms, type 1-diabetic animals as well as normoglycaemic control rats of the strain LEW.1AR1 were sacrificed in 3 hour intervals during a 24 hour period. Diabetic rats were additionally treated with a subcutaneously implanted insulin pellet for ten days.

Type 1-diabetic rats with severe hypoinsulinaemia exhibited a significant increase in plasma melatonin together with a loss of its diurnal rhythm. Substitution of insulin normalised the metabolic disturbances of diabetic animals and led to diurnal plasma melatonin concentrations comparable to normoglycaemic controls. This observation confirms that diabetes mellitus-induced metabolic alterations interfere with the insulin-melatonin-antagonism. The catecholamine norepinephrine acts as the main stimulator of the melatonin synthesis in the pineal gland. It can be hypothesised that the loss of the inhibiting impact of insulin on the norepinephrine-mediated melatonin synthesis accounts for the elevated plasma melatonin levels

under type 1-diabetic conditions. In accordance, increased plasma catecholamine concentrations in type 1-diabetic animals were observed.

Of note, the increased plasma melatonin levels were not attributed to an alteration in rhythmic mRNA expression of *Aanat*, a crucial enzyme of melatonin synthesis. In this context, the observed loss of diurnal rhythms of plasma melatonin in type 1-diabetic rats was not related to an impaired diurnal pineal expression of clock genes *Per1* and *Bmal1*. This latter rhythm remained intact despite severe metabolic disturbances.

In the second part of this study the impact of spontaneous type 1-diabetes as well as subsequent insulin substitution on the hepatic circadian expression of clock genes and clock-controlled genes was investigated. Altered mRNA expressions of clock genes *Per2*, *Bmal1*, *Clock*, *Cry1* and *Rev-erba* under diabetic conditions were observed. Furthermore, a loss of diurnal rhythmicity of *Clock* expression, which was not recovered by insulin substitution, was demonstrated. In contrast, insulin treatment led to normalised mRNA expression levels of *Per2*, *Cry1* and *Rev-erba*, suggesting that insulin regulates specific components of the hepatic clock. Also elevated mRNA expression levels of clock-controlled genes *Dbp* and *E4bp4* were normalised after insulin treatment to levels comparable with normoglycaemic control animals. However, type 1-diabetic conditions also led to a loss of diurnal rhythmicity of mRNA expression of the clock-controlled gene *Ppary*, which persisted even after insulin substitution.

In summary, the present study confirmed the existence of an insulin-melatonin-antagonism in an animal model of spontaneous type 1-diabetes mellitus. Furthermore, spontaneous type 1-diabetes leads to changes in hepatic expression of clock genes and clock-controlled genes, which was only partially recovered due to insulin substitution. Subsequent studies are necessary to investigate the full impact of alterations in the hepatic circadian clock mechanism and on metabolic liver functions.

8. Literaturverzeichnis

1. American Diabetes Association (1997) Report of the Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care* 20: 1183-1197.
2. Whiting DR, Guariguata L, Weil C, Shaw J (2011) IDF diabetes atlas: global estimates of the prevalence of diabetes for 2011 and 2030. *Diabetes Res Clin Pract* 94: 311-321.
3. American Diabetes Association (2009) Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 32 Suppl 1: S62-67.
4. Hussain A, Claussen B, Ramachandran A, Williams R (2007) Prevention of type 2 diabetes: a review. *Diabetes Res Clin Pract* 76: 317-326.
5. Anjos S, Polychronakos C (2004) Mechanisms of genetic susceptibility to type I diabetes: beyond HLA. *Mol Genet Metab* 81: 187-195.
6. Hyoty H, Hiltunen M, Lonnrot M (1998) Enterovirus infections and insulin dependent diabetes mellitus--evidence for causality. *Clin Diagn Virol* 9: 77-84.
7. Vaarala O, Knip M, Paronen J, Hamalainen AM, Muona P, et al. (1999) Cow's milk formula feeding induces primary immunization to insulin in infants at genetic risk for type 1 diabetes. *Diabetes* 48: 1389-1394.
8. Dahlquist G, Patterson C, Soltesz G (1999) Vitamin D supplement in early childhood and risk for Type I (insulin-dependent) diabetes mellitus. The EURODIAB Substudy 2 Study Group. *Diabetologia* 42: 51-54.
9. Panda S, Hogenesch JB, Kay SA (2002) Circadian rhythms from flies to human. *Nature* 417: 329-335.
10. Reppert SM, Weaver DR (2002) Coordination of circadian timing in mammals. *Nature* 418: 935-941.
11. Korf HW, Schomerus C, Stehle JH (1998) The pineal organ, its hormone melatonin, and the photoneuroendocrine system. *Adv Anat Embryol Cell Biol* 146: 1-100.
12. Halberg F (1963) Circadian (about twenty-four-hour) rhythms in experimental medicine. *Proc R Soc Med* 56: 253-257.
13. Aschoff J (1965) Circadian Rhythms in Man. *Science* 148: 1427-1432.
14. Ralph MR, Foster RG, Davis FC, Menaker M (1990) Transplanted suprachiasmatic nucleus determines circadian period. *Science* 247: 975-978.
15. Aschoff J (1954) Zeitgeber der tierischen Tagesperiodik. *Naturwissenschaften* 41: 49-56.
16. Roenneberg T, Merrow M (2007) Entrainment of the human circadian clock. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 72: 293-299.

17. Welsh DK, Logothetis DE, Meister M, Reppert SM (1995) Individual neurons dissociated from rat suprachiasmatic nucleus express independently phased circadian firing rhythms. *Neuron* 14: 697-706.
18. Van den Pol AN (1980) The hypothalamic suprachiasmatic nucleus of rat: intrinsic anatomy. *J Comp Neurol* 191: 661-702.
19. Berson DM, Dunn FA, Takao M (2002) Phototransduction by retinal ganglion cells that set the circadian clock. *Science* 295: 1070-1073.
20. Gooley JJ, Rajaratnam SM, Brainard GC, Kronauer RE, Czeisler CA, et al. (2010) Spectral responses of the human circadian system depend on the irradiance and duration of exposure to light. *Sci Transl Med* 2: 31ra33.
21. Lall GS, Revell VL, Momiji H, Al Enezi J, Altimus CM, et al. (2010) Distinct contributions of rod, cone, and melanopsin photoreceptors to encoding irradiance. *Neuron* 66: 417-428.
22. Simonneaux V, Ribelayga C (2003) 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: 325-395.
23. Pevet P, Agez L, Bothorel B, Saboureau M, Gauer F, et al. (2006) Melatonin in the multi-oscillatory mammalian circadian world. *Chronobiol Int* 23: 39-51.
24. Challet E (2007) Minireview: Entrainment of the suprachiasmatic clockwork in diurnal and nocturnal mammals. *Endocrinology* 148: 5648-5655.
25. Hardeland R (2008) Melatonin, hormone of darkness and more: occurrence, control mechanisms, actions and bioactive metabolites. *Cell Mol Life Sci* 65: 2001-2018.
26. Lopez-Munoz F, Rubio G, Molina JD, Alamo C (2011) Sadness as a passion of the soul: a psychopathological consideration of the Cartesian concept of melancholy. *Brain Res Bull* 85: 42-53.
27. Ulfing N (2008) *Kurzlehrbuch Neuroanatomie*. Thieme Verlagsgruppe DOI: 10.1055/b-002-54082.
28. Stehle JH, Saade A, Rawashdeh O, Ackermann K, Jilg A, et al. (2011) A survey of molecular details in the human pineal gland in the light of phylogeny, structure, function and chronobiological diseases. *J Pineal Res* 51: 17-43.
29. Borjigin J, Zhang LS, Calinescu AA (2012) Circadian regulation of pineal gland rhythmicity. *Mol Cell Endocrinol* 349: 13-19.
30. Maronde E, Stehle JH (2007) The mammalian pineal gland: known facts, unknown facets. *Trends Endocrinol Metab* 18: 142-149.
31. Lerner AB, Case JD, Takahashi Y (1960) Isolation of melatonin and 5-methoxyindole-3-acetic acid from bovine pineal glands. *J Biol Chem* 235: 1992-1997.

32. Hardeland R (2012) Melatonin in aging and disease -multiple consequences of reduced secretion, options and limits of treatment. *Aging Dis* 3: 194-225.
33. Cassone VM (1990) Effects of melatonin on vertebrate circadian systems. *Trends Neurosci* 13: 457-464.
34. Drijfhout WJ, van der Linde AG, de Vries JB, Grol CJ, Westerink BH (1996) Microdialysis reveals dynamics of coupling between noradrenaline release and melatonin secretion in conscious rats. *Neurosci Lett* 202: 185-188.
35. Mustanoja SM, Hatonen T, Alila-Johansson A, Laakso M (2000) Evidence for central alpha(2)-adrenergic modulation of rat pineal melatonin synthesis. *Brain Res* 887: 174-177.
36. Bach AG, Mühlbauer E, Peschke E (2010) Adrenoceptor expression and diurnal rhythms of melatonin and its precursors in the pineal gland of type 2 diabetic goto-kakizaki rats. *Endocrinology* 151: 2483-2493.
37. Gutierrez CI, Urbina M, Obregon F, Glykys J, Lima L (2003) Characterization of tryptophan high affinity transport system in pinealocytes of the rat. Day-night modulation. *Amino Acids* 25: 95-105.
38. Klein DC (1985) Photoneural regulation of the mammalian pineal gland. *Ciba Found Symp* 117: 38-56.
39. Gibbs FP, Vriend J (1981) The half-life of melatonin elimination from rat plasma. *Endocrinology* 109: 1796-1798.
40. Grivas TB, Savvidou OD (2007) Melatonin the "light of night" in human biology and adolescent idiopathic scoliosis. *Scoliosis* 2: 6.
41. Wehr TA (1991) The durations of human melatonin secretion and sleep respond to changes in daylength (photoperiod). *J Clin Endocrinol Metab* 73: 1276-1280.
42. Karasek M (2004) Melatonin, human aging, and age-related diseases. *Exp Gerontol* 39: 1723-1729.
43. Lynch HJ, Wurtman RJ, Moskowitz MA, Archer MC, Ho MH (1975) Daily rhythm in human urinary melatonin. *Science* 187: 169-171.
44. Kleszczynski K, Fischer TW (2012) Melatonin and human skin aging. *Dermatoendocrinol* 4: 245-252.
45. Reppert SM, Weaver DR, Ebisawa T (1994) Cloning and characterization of a mammalian melatonin receptor that mediates reproductive and circadian responses. *Neuron* 13: 1177-1185.
46. Reppert SM, Godson C, Mahle CD, Weaver DR, Slaugenhaupt SA, et al. (1995) Molecular characterization of a second melatonin receptor expressed in human retina and brain: the Mel1b melatonin receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92: 8734-8738.

47. Jockers R, Maurice P, Boutin JA, Delagrangé P (2008) Melatonin receptors, heterodimerization, signal transduction and binding sites: what's new? *Br J Pharmacol* 154: 1182-1195.
48. Dubocovich ML, Delagrangé P, Krause DN, Sugden D, Cardinali DP, et al. (2010) International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXV. Nomenclature, classification, and pharmacology of G protein-coupled melatonin receptors. *Pharmacol Rev* 62: 343-380.
49. Peschke E, Fauteck JD, Musshoff U, Schmidt F, Beckmann A, et al. (2000) Evidence for a melatonin receptor within pancreatic islets of neonate rats: functional, autoradiographic, and molecular investigations. *J Pineal Res* 28: 156-164.
50. Mühlbauer E, Peschke E (2007) Evidence for the expression of both the MT1- and in addition, the MT2-melatonin receptor, in the rat pancreas, islet and beta-cell. *J Pineal Res* 42: 105-106.
51. Brydon L, Petit L, de Coppet P, Barrett P, Morgan PJ, et al. (1999) Polymorphism and signalling of melatonin receptors. *Reprod Nutr Dev* 39: 315-324.
52. Ma X, Chen C, Krausz KW, Idle JR, Gonzalez FJ (2008) A metabolomic perspective of melatonin metabolism in the mouse. *Endocrinology* 149: 1869-1879.
53. Vitaterna MH, King DP, Chang AM, Kornhauser JM, Lowrey PL, et al. (1994) Mutagenesis and mapping of a mouse gene, *Clock*, essential for circadian behavior. *Science* 264: 719-725.
54. Oishi K, Fukui H, Ishida N (2000) Rhythmic expression of *BMAL1* mRNA is altered in *Clock* mutant mice: differential regulation in the suprachiasmatic nucleus and peripheral tissues. *Biochem Biophys Res Commun* 268: 164-171.
55. Shearman LP, Zylka MJ, Reppert SM, Weaver DR (1999) Expression of basic helix-loop-helix/PAS genes in the mouse suprachiasmatic nucleus. *Neuroscience* 89: 387-397.
56. Kovacicová Z, Sladek M, Bendová Z, Illnerová H, Sumová A (2006) Expression of clock and clock-driven genes in the rat suprachiasmatic nucleus during late fetal and early postnatal development. *J Biol Rhythms* 21: 140-148.
57. Lowrey PL, Takahashi JS (2004) Mammalian circadian biology: elucidating genome-wide levels of temporal organization. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 5: 407-441.
58. Preitner N, Damiola F, Lopez-Molina L, Zakany J, Duboule D, et al. (2002) The orphan nuclear receptor REV-ERB α controls circadian transcription within the positive limb of the mammalian circadian oscillator. *Cell* 110: 251-260.
59. Bellet MM, Sassone-Corsi P (2010) Mammalian circadian clock and metabolism - the epigenetic link. *J Cell Sci* 123: 3837-3848.
60. Ueda HR, Chen W, Adachi A, Wakamatsu H, Hayashi S, et al. (2002) A transcription factor response element for gene expression during circadian night. *Nature* 418: 534-539.
61. Shearman LP, Sriram S, Weaver DR, Maywood ES, Chaves I, et al. (2000) Interacting molecular loops in the mammalian circadian clock. *Science* 288: 1013-1019.

62. Sato TK, Panda S, Miraglia LJ, Reyes TM, Rudic RD, et al. (2004) A functional genomics strategy reveals Rora as a component of the mammalian circadian clock. *Neuron* 43: 527-537.
63. Boden G, Ruiz J, Urbain JL, Chen X (1996) Evidence for a circadian rhythm of insulin secretion. *Am J Physiol* 271: E246-252.
64. Peschke E, Frese T, Chankiewitz E, Peschke D, Preiss U, et al. (2006) Diabetic Goto Kakizaki rats as well as type 2 diabetic patients show a decreased diurnal serum melatonin level and an increased pancreatic melatonin-receptor status. *J Pineal Res* 40: 135-143.
65. Bizot-Espiard JG, Double A, Guardiola-Lemaitre B, Delagrangé P, Ktorza A, et al. (1998) Diurnal rhythms in plasma glucose, insulin, growth hormone and melatonin levels in fasted and hyperglycaemic rats. *Diabetes Metab* 24: 235-240.
66. Jarrett RJ, Keen H (1970) Further observations on the diurnal variation in oral glucose tolerance. *Br Med J* 4: 334-337.
67. Lima FB, Machado UF, Bartol I, Seraphim PM, Sumida DH, et al. (1998) Pinealectomy causes glucose intolerance and decreases adipose cell responsiveness to insulin in rats. *Am J Physiol* 275: E934-941.
68. Peschke E, Bähr I, Mühlbauer E (2013) Melatonin and Pancreatic Islets: Interrelationships between Melatonin, Insulin and Glucagon. *Int J Mol Sci* 14: 6981-7015.
69. Diaz B, Blazquez E (1986) Effect of pinealectomy on plasma glucose, insulin and glucagon levels in the rat. *Horm Metab Res* 18: 225-229.
70. Gorray KC, Quay WB, Ewart RB (1979) Effects of pinealectomy and pineal incubation medium and sonicates on insulin release by isolated pancreatic islets in vitro. *Horm Metab Res* 11: 432-436.
71. Benson B, Miller CW, Sorrentino S, Jr. (1971) Effects of blinding on blood glucose and serum insulin-like activity in rats. *Tex Rep Biol Med* 29: 513-525.
72. Frankel BJ, Strandberg MJ (1991) Insulin release from isolated mouse islets in vitro: no effect of physiological levels of melatonin or arginine vasotocin. *J Pineal Res* 11: 145-148.
73. Bizot-Espiard JG, Double A, Cousin B, Lesieur D, Guardiola-Lemaitre B, et al. (1998) Lack of melatonin effects on insulin action in normal rats. *Horm Metab Res* 30: 711-716.
74. Peschke E, Mühlbauer E, Musshoff U, Csernus VJ, Chankiewitz E, et al. (2002) Receptor (MT(1)) mediated influence of melatonin on cAMP concentration and insulin secretion of rat insulinoma cells INS-1. *J Pineal Res* 33: 63-71.
75. Picinato MC, Haber EP, Cipolla-Neto J, Curi R, de Oliveira Carvalho CR, et al. (2002) Melatonin inhibits insulin secretion and decreases PKA levels without interfering with glucose metabolism in rat pancreatic islets. *J Pineal Res* 33: 156-160.
76. Dhar M, Dayal SS, Ramesh Babu CS, Arora SR (1983) Effect of melatonin on glucose tolerance and blood glucose circadian rhythm in rabbits. *Indian J Physiol Pharmacol* 27: 109-117.

77. Peschke E, Peschke D, Hammer T, Csernus V (1997) Influence of melatonin and serotonin on glucose-stimulated insulin release from perfused rat pancreatic islets in vitro. *J Pineal Res* 23: 156-163.
78. Mühlbauer E, Albrecht E, Hofmann K, Bazwinsky-Wutschke I, Peschke E (2011) Melatonin inhibits insulin secretion in rat insulinoma beta-cells (INS-1) heterologously expressing the human melatonin receptor isoform MT2. *J Pineal Res* 51: 361-372.
79. Kemp DM, Ubeda M, Habener JF (2002) Identification and functional characterization of melatonin Mel 1a receptors in pancreatic beta cells: potential role in incretin-mediated cell function by sensitization of cAMP signaling. *Mol Cell Endocrinol* 191: 157-166.
80. Lynch HJ, Eng JP, Wurtman RJ (1973) Control of pineal indole biosynthesis by changes in sympathetic tone caused by factors other than environmental lighting. *Proc Natl Acad Sci U S A* 70: 1704-1707.
81. Champney TH, Steger RW, Christie DS, Reiter RJ (1985) Alterations in components of the pineal melatonin synthetic pathway by acute insulin stress in the rat and Syrian hamster. *Brain Res* 338: 25-32.
82. Kar S, Chabot JG, Quirion R (1993) Quantitative autoradiographic localization of [125I]insulin-like growth factor I, [125I]insulin-like growth factor II, and [125I]insulin receptor binding sites in developing and adult rat brain. *J Comp Neurol* 333: 375-397.
83. Rasmussen DD, Boldt BM, Wilkinson CW, Yellon SM, Matsumoto AM (1999) Daily melatonin administration at middle age suppresses male rat visceral fat, plasma leptin, and plasma insulin to youthful levels. *Endocrinology* 140: 1009-1012.
84. O'Brien IA, Lewin IG, O'Hare JP, Arendt J, Corrall RJ (1986) Abnormal circadian rhythm of melatonin in diabetic autonomic neuropathy. *Clin Endocrinol (Oxf)* 24: 359-364.
85. Peschke E, Wolgast S, Bazwinsky I, Pönicke K, Mühlbauer E (2008) Increased melatonin synthesis in pineal glands of rats in streptozotocin induced type 1 diabetes. *J Pineal Res* 45: 439-448.
86. Nishida S, Segawa T, Murai I, Nakagawa S (2002) 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: 26-33.
87. Morikawa Y, Nakagawa H, Miura K, Soyama Y, Ishizaki M, et al. (2005) Shift work and the risk of diabetes mellitus among Japanese male factory workers. *Scand J Work Environ Health* 31: 179-183.
88. Bouatia-Naji N, Bonnefond A, Cavalcanti-Proenca C, Sparso T, Holmkvist J, et al. (2009) A variant near MTNR1B is associated with increased fasting plasma glucose levels and type 2 diabetes risk. *Nat Genet* 41: 89-94.
89. Lyssenko V, Nagorny CL, Erdos MR, Wierup N, Jonsson A, et al. (2009) Common variant in MTNR1B associated with increased risk of type 2 diabetes and impaired early insulin secretion. *Nat Genet* 41: 82-88.

90. Prokopenko I, Langenberg C, Florez JC, Saxena R, Soranzo N, et al. (2009) Variants in MTNR1B influence fasting glucose levels. *Nat Genet* 41: 77-81.
91. Garcia RA, Afeche SC, Scialfa JH, do Amaral FG, dos Santos SH, et al. (2008) Insulin modulates norepinephrine-mediated melatonin synthesis in cultured rat pineal gland. *Life Sci* 82: 108-114.
92. Peliciari-Garcia RA, Marcal AC, Silva JA, Carmo-Buonfiglio D, Amaral FG, et al. (2010) Insulin temporal sensitivity and its signaling pathway in the rat pineal gland. *Life Sci* 87: 169-174.
93. Peschke E, Mühlbauer E (2007) Funktionelle Beziehungen zwischen Melatonin und Insulin - Untersuchungsergebnisse an stoffwechselgesunden und diabetischen Versuchstieren und Patienten. In: Peschke E: *Endokrinologie III, Vorträge im Rahmen des Projekts „Zeitstrukturen endokriner Systeme“* Verlag Sächs Akad Wiss Stuttgart/Leipzig 64: 103-118.
94. Yamazaki S, Numano R, Abe M, Hida A, Takahashi R, et al. (2000) Resetting central and peripheral circadian oscillators in transgenic rats. *Science* 288: 682-685.
95. Zylka MJ, Shearman LP, Weaver DR, Reppert SM (1998) Three period homologs in mammals: differential light responses in the suprachiasmatic circadian clock and oscillating transcripts outside of brain. *Neuron* 20: 1103-1110.
96. Dibner C, Schibler U, Albrecht U (2010) The mammalian circadian timing system: organization and coordination of central and peripheral clocks. *Annu Rev Physiol* 72: 517-549.
97. Sakamoto K, Nagase T, Fukui H, Horikawa K, Okada T, et al. (1998) Multitissue circadian expression of rat period homolog (rPer2) mRNA is governed by the mammalian circadian clock, the suprachiasmatic nucleus in the brain. *J Biol Chem* 273: 27039-27042.
98. Yoo SH, Yamazaki S, Lowrey PL, Shimomura K, Ko CH, et al. (2004) PERIOD2::LUCIFERASE real-time reporting of circadian dynamics reveals persistent circadian oscillations in mouse peripheral tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 5339-5346.
99. Peschke E, Peschke D (1998) Evidence for a circadian rhythm of insulin release from perfused rat pancreatic islets. *Diabetologia* 41: 1085-1092.
100. von Gall C, Garabette ML, Kell CA, Frenzel S, Dehghani F, et al. (2002) Rhythmic gene expression in pituitary depends on heterologous sensitization by the neurohormone melatonin. *Nat Neurosci* 5: 234-238.
101. Antle MC, Silver R (2005) Orchestrating time: arrangements of the brain circadian clock. *Trends Neurosci* 28: 145-151.
102. Green CB, Takahashi JS, Bass J (2008) The meter of metabolism. *Cell* 134: 728-742.
103. Stokkan KA, Yamazaki S, Tei H, Sakaki Y, Menaker M (2001) Entrainment of the circadian clock in the liver by feeding. *Science* 291: 490-493.

104. Froy O (2007) The relationship between nutrition and circadian rhythms in mammals. *Front Neuroendocrinol* 28: 61-71.
105. Roenneberg T, Merrow M (2005) Circadian clocks - the fall and rise of physiology. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6: 965-971.
106. Müller CR, Maire P, Schibler U (1990) DBP, a liver-enriched transcriptional activator, is expressed late in ontogeny and its tissue specificity is determined posttranscriptionally. *Cell* 61: 279-291.
107. Mitsui S, Yamaguchi S, Matsuo T, Ishida Y, Okamura H (2001) Antagonistic role of E4BP4 and PAR proteins in the circadian oscillatory mechanism. *Genes Dev* 15: 995-1006.
108. Desvergne B, Wahli W (1999) Peroxisome proliferator-activated receptors: nuclear control of metabolism. *Endocr Rev* 20: 649-688.
109. Froy O (2010) Metabolism and circadian rhythms--implications for obesity. *Endocr Rev* 31: 1-24.
110. Knutson KL, Spiegel K, Penev P, Van Cauter E (2007) The metabolic consequences of sleep deprivation. *Sleep Med Rev* 11: 163-178.
111. Turek FW, Joshu C, Kohsaka A, Lin E, Ivanova G, et al. (2005) Obesity and metabolic syndrome in circadian Clock mutant mice. *Science* 308: 1043-1045.
112. Marcheva B, Ramsey KM, Buhr ED, Kobayashi Y, Su H, et al. (2010) Disruption of the clock components CLOCK and BMAL1 leads to hypoinsulinaemia and diabetes. *Nature* 466: 627-631.
113. Gale JE, Cox HI, Qian J, Block GD, Colwell CS, et al. (2011) Disruption of circadian rhythms accelerates development of diabetes through pancreatic beta-cell loss and dysfunction. *J Biol Rhythms* 26: 423-433.
114. Lee J, Kim MS, Li R, Liu VY, Fu L, et al. (2011) Loss of Bmal1 leads to uncoupling and impaired glucose-stimulated insulin secretion in beta-cells. *Islets* 3: 381-388.
115. Woon PY, Kaisaki PJ, Braganca J, Bihoreau MT, Levy JC, et al. (2007) Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator-like (BMAL1) is associated with susceptibility to hypertension and type 2 diabetes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 14412-14417.
116. Ando H, Yanagihara H, Hayashi Y, Obi Y, Tsuruoka S, et al. (2005) Rhythmic messenger ribonucleic acid expression of clock genes and adipocytokines in mouse visceral adipose tissue. *Endocrinology* 146: 5631-5636.
117. Ando H, Takamura T, Matsuzawa-Nagata N, Shima KR, Eto T, et al. (2009) Clock gene expression in peripheral leucocytes of patients with type 2 diabetes. *Diabetologia* 52: 329-335.
118. Kuriyama K, Sasahara K, Kudo T, Shibata S (2004) Daily injection of insulin attenuated impairment of liver circadian clock oscillation in the streptozotocin-treated diabetic mouse. *FEBS Lett* 572: 206-210.

119. Ishida H, Yamashita C, Kuruta Y, Yoshida Y, Noshiro M (2000) Insulin is a dominant suppressor of sterol 12 alpha-hydroxylase P450 (CYP8B) expression in rat liver: possible role of insulin in circadian rhythm of CYP8B. *J Biochem* 127: 57-64.
120. Sindhu RK, Koo JR, Sindhu KK, Ehdaie A, Farmand F, et al. (2006) Differential regulation of hepatic cytochrome P450 monooxygenases in streptozotocin-induced diabetic rats. *Free Radic Res* 40: 921-928.
121. Iynedjian PB, Gjinovci A, Renold AE (1988) Stimulation by insulin of glucokinase gene transcription in liver of diabetic rats. *J Biol Chem* 263: 740-744.
122. Kang HS, Angers M, Beak JY, Wu X, Gimble JM, et al. (2007) Gene expression profiling reveals a regulatory role for ROR alpha and ROR gamma in phase I and phase II metabolism. *Physiol Genomics* 31: 281-294.
123. Le Martelot G, Claudel T, Gatfield D, Schaad O, Kornmann B, et al. (2009) REV-ERBalpha participates in circadian SREBP signaling and bile acid homeostasis. *PLoS Biol* 7: e1000181.
124. Szkudelski T (2001) The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas. *Physiol Res* 50: 537-546.
125. Novikova L, Smirnova IV, Rawal S, Dotson AL, Benedict SH, et al. (2013) Variations in rodent models of type 1 diabetes: islet morphology. *J Diabetes Res* 2013: 965832.
126. Lenzen S, Tiedge M, Elsner M, Lortz S, Weiss H, et al. (2001) The LEW.1AR1/Ztm-iddm rat: a new model of spontaneous insulin-dependent diabetes mellitus. *Diabetologia* 44: 1189-1196.
127. Jörns A, Gunther A, Hedrich HJ, Wedekind D, Tiedge M, et al. (2005) Immune cell infiltration, cytokine expression, and beta-cell apoptosis during the development of type 1 diabetes in the spontaneously diabetic LEW.1AR1/Ztm-iddm rat. *Diabetes* 54: 2041-2052.
128. Jörns A, Kubat B, Tiedge M, Wedekind D, Hedrich HJ, et al. (2004) 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: 183-189.
129. Welp A, Manz B, Peschke E (2010) Development and validation of a high throughput direct radioimmunoassay for the quantitative determination of serum and plasma melatonin (N-acetyl-5-methoxytryptamine) in mice. *J Immunol Methods* 358: 1-8.
130. Yalow RS, Berson SA (1960) Immunoassay of endogenous plasma insulin in man. *J Clin Invest* 39: 1157-1175.
131. Engvall E, Perlmann P (1971) Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry* 8: 871-874.
132. Chomczynski P, Sacchi N (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162: 156-159.

133. Kaiser AD, Hogness DS (1960) The transformation of *Escherichia coli* with deoxyribonucleic acid isolated from bacteriophage lambda-dg. *J Mol Biol* 2: 392-415.
134. Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, et al. (1986) Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 51 Pt 1: 263-273.
135. Wang W, Chen K, Xu C (2006) DNA quantification using EvaGreen and a real-time PCR instrument. *Anal Biochem* 356: 303-305.
136. Korbie DJ, Mattick JS (2008) Touchdown PCR for increased specificity and sensitivity in PCR amplification. *Nat Protoc* 3: 1452-1456.
137. Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻($\Delta\Delta C(T)$) Method. *Methods* 25: 402-408.
138. Refinetti R, Lissen GC, Halberg F (2007) Procedures for numerical analysis of circadian rhythms. *Biol Rhythm Res* 38: 275-325.
139. Heidemann C, Du Y, Schubert I, Rathmann W, Scheidt-Nave C (2013) Prevalence and temporal trend of known diabetes mellitus: results of the German Health Interview and Examination Survey for Adults (DEGS1). *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz* 56: 668-677.
140. Ando H, Ushijima K, Yanagihara H, Hayashi Y, Takamura T, et al. (2009) Clock gene expression in the liver and adipose tissues of non-obese type 2 diabetic Goto-Kakizaki rats. *Clin Exp Hypertens* 31: 201-207.
141. Bostwick J, Nguyen D, Cornelissen G, Halberg F, Hoogerwerf WA (2010) Effects of acute and chronic STZ-induced diabetes on clock gene expression and feeding in the gastrointestinal tract. *Mol Cell Biochem* 338: 203-213.
142. Rudic RD, McNamara P, Curtis AM, Boston RC, Panda S, et al. (2004) BMAL1 and CLOCK, two essential components of the circadian clock, are involved in glucose homeostasis. *PLoS Biol* 2: e377.
143. Poussier P, Nakhoda AF, Falk JA, Lee C, Marliss EB (1982) Lymphopenia and abnormal lymphocyte subsets in the "BB" rat: relationship to the diabetic syndrome. *Endocrinology* 110: 1825-1827.
144. Weiss H, Bleich A, Hedrich HJ, Kolsch B, Elsner M, et al. (2005) Genetic analysis of the LEW.1AR1-iddm rat: an animal model for spontaneous diabetes mellitus. *Mamm Genome* 16: 432-441.
145. Jörns A, Arndt T, Meyer zu Vilsendorf A, Klempnauer J, Wedekind D, et al. (2014) Islet infiltration, cytokine expression and beta cell death in the NOD mouse, BB rat, Komeda rat, LEW.1AR1-iddm rat and humans with type 1 diabetes. *Diabetologia* 57: 512-521.
146. Peschke E, Stumpf I, Bazwinsky I, Litvak L, Dralle H, et al. (2007) Melatonin and type 2 diabetes - a possible link? *J Pineal Res* 42: 350-358.

147. Nishida S, Sato R, Murai I, Nakagawa S (2003) Effect of pinealectomy on plasma levels of insulin and leptin and on hepatic lipids in type 2 diabetic rats. *J Pineal Res* 35: 251-256.
148. Peschke E, Schucht H, Mühlbauer E (2010) Long-term enteral administration of melatonin reduces plasma insulin and increases expression of pineal insulin receptors in both Wistar and type 2-diabetic Goto-Kakizaki rats. *J Pineal Res* 49: 373-381.
149. Wolden-Hanson T, Mitton DR, McCants RL, Yellon SM, Wilkinson CW, et al. (2000) 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: 487-497.
150. Mühlbauer E, Albrecht E, Bazwinsky-Wutschke I, Peschke E (2012) Melatonin influences insulin secretion primarily via MT(1) receptors in rat insulinoma cells (INS-1) and mouse pancreatic islets. *J Pineal Res* 52: 446-459.
151. Stumpf I, Mühlbauer E, Peschke E (2008) Involvement of the cGMP pathway in mediating the insulin-inhibitory effect of melatonin in pancreatic beta-cells. *J Pineal Res* 45: 318-327.
152. Stumpf I, Bazwinsky I, Peschke E (2009) Modulation of the cGMP signaling pathway by melatonin in pancreatic beta-cells. *J Pineal Res* 46: 140-147.
153. Li C, Shi Y, You L, Wang L, Chen ZJ (2011) Melatonin receptor 1A gene polymorphism associated with polycystic ovary syndrome. *Gynecol Obstet Invest* 72: 130-134.
154. Staiger H, Machicao F, Schafer SA, Kirchhoff K, Kantartzis K, et al. (2008) Polymorphisms within the novel type 2 diabetes risk locus MTNR1B determine beta-cell function. *PLoS One* 3: e3962.
155. Chambers JC, Zhang W, Zabaneh D, Sehmi J, Jain P, et al. (2009) Common genetic variation near melatonin receptor MTNR1B contributes to raised plasma glucose and increased risk of type 2 diabetes among Indian Asians and European Caucasians. *Diabetes* 58: 2703-2708.
156. Bonnefond A, Clement N, Fawcett K, Yengo L, Vaillant E, et al. (2012) Rare MTNR1B variants impairing melatonin receptor 1B function contribute to type 2 diabetes. *Nat Genet* 44: 297-301.
157. Cardinali DP, Nagle CA, Rosner JM (1976) Gonadotrophin- and prolactin-induced increase of rat pineal hydroxyindole-O-methyl transferase: involvement of the sympathetic nervous system. *J Endocrinol* 68: 341-342.
158. Cardinali DP (1981) Hormone effects on the pineal gland. In *The Pineal Gland, Vol I, Anatomy and Biochemistry* (Edited by Reiter RJ) 243-272.
159. Oishi K, Kasamatsu M, Ishida N (2004) Gene- and tissue-specific alterations of circadian clock gene expression in streptozotocin-induced diabetic mice under restricted feeding. *Biochem Biophys Res Commun* 317: 330-334.

160. Peschke E, Hofmann K, Bähr I, Streck S, Albrecht E, et al. (2011) The insulin-melatonin antagonism: studies in the LEW.1AR1-iddm rat (an animal model of human type 1 diabetes mellitus). *Diabetologia* 54: 1831-1840.
161. Nadeau KJ, Regensteiner JG, Bauer TA, Brown MS, Dorosz JL, et al. (2010) Insulin resistance in adolescents with type 1 diabetes and its relationship to cardiovascular function. *J Clin Endocrinol Metab* 95: 513-521.
162. La Fleur SE, Kalsbeek A, Wortel J, Buijs RM (1999) A suprachiasmatic nucleus generated rhythm in basal glucose concentrations. *J Neuroendocrinol* 11: 643-652.
163. Kalsbeek A, Foppen E, Schaliij I, Van Heijningen C, van der Vliet J, et al. (2008) Circadian control of the daily plasma glucose rhythm: an interplay of GABA and glutamate. *PLoS One* 3: e3194.
164. Delattre E, Cipolla-Neto J, Boschero AC (1999) Diurnal variations in insulin secretion and K⁺ permeability in isolated rat islets. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 26: 505-510.
165. Frese T, Bach AG, Mühlbauer E, Pönicke K, Brömme HJ, et al. (2009) Pineal melatonin synthesis is decreased in type 2 diabetic Goto-Kakizaki rats. *Life Sci* 85: 526-533.
166. Namboodiri MA, Favilla JT, Klein DC (1981) Pineal N-acetyltransferase is inactivated by disulfide-containing peptides: insulin is the most potent. *Science* 213: 571-573.
167. Champney TH, Holtorf AP, Craft CM, Reiter RJ (1986) Hormonal modulation of pineal melatonin synthesis in rats and Syrian hamsters: effects of streptozotocin-induced diabetes and insulin injections. *Comp Biochem Physiol A Comp Physiol* 83: 391-395.
168. Csernus VJ, Hammer T, Peschke D, Peschke E (1998) Dynamic insulin secretion from perfused rat pancreatic islets. *Cell Mol Life Sci* 54: 733-743.
169. Peschke E, Hofmann K, Pönicke K, Wedekind D, Mühlbauer E (2012) Catecholamines are the key for explaining the biological relevance of insulin-melatonin antagonisms in type 1 and type 2 diabetes. *J Pineal Res* 52: 389-396.
170. Straub SG, Sharp GW (2012) Evolving insights regarding mechanisms for the inhibition of insulin release by norepinephrine and heterotrimeric G proteins. *Am J Physiol Cell Physiol* 302: C1687-1698.
171. Trulsson ME, Himmel CD (1985) Effects of insulin and streptozotocin-induced diabetes on brain norepinephrine metabolism in rats. *J Neurochem* 44: 1873-1876.
172. Ostenson CG, Hjemdahl P, Efendic S (1993) Release of catecholamines is increased but does not contribute to the impaired insulin secretion in the perfused pancreata of diabetic rats. *Pancreas* 8: 34-38.
173. Ramakrishnan R, Namasivayam A (1995) Norepinephrine and epinephrine levels in the brain of alloxan diabetic rats. *Neurosci Lett* 186: 200-202.

174. Zhang L, Xiong XQ, Fan ZD, Gan XB, Gao XY, et al. (2012) Involvement of enhanced cardiac sympathetic afferent reflex in sympathetic activation in early stage of diabetes. *J Appl Physiol* 113: 47-55.
175. Bitar MS, Koulu M, Rapoport SI, Linnoila M (1987) Adrenal catecholamine metabolism and myocardial adrenergic receptors in streptozotocin diabetic rats. *Biochem Pharmacol* 36: 1011-1016.
176. Wang JP, Liu IM, Tzeng TF, Cheng JT (2002) Decrease in catechol-O-methyltransferase activity in the liver of streptozotocin-induced diabetic rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 29: 419-422.
177. Dagnino-Subiabre A, Orellana JA, Carmona-Fontaine C, Montiel J, Diaz-Veliz G, et al. (2006) Chronic stress decreases the expression of sympathetic markers in the pineal gland and increases plasma melatonin concentration in rats. *J Neurochem* 97: 1279-1287.
178. Ahlers I, Pastorova B, Solar P, Ahlersova E (1999) Daily rhythm in rat pineal catecholamines. *Physiol Res* 48: 231-234.
179. Suh BC, Chae HD, Chung JH, Kim KT (1999) Pharmacological characterization of beta2-adrenoceptor in PGT-beta mouse pineal gland tumour cells. *Br J Pharmacol* 126: 399-406.
180. Xavier S, Sadanandan J, George N, Paulose CS (2012) beta(2)-adrenoceptor and insulin receptor expression in the skeletal muscle of streptozotocin induced diabetic rats: antagonism by vitamin D(3) and curcumin. *Eur J Pharmacol* 687: 14-20.
181. Ho AK, Chik CL (2010) Modulation of Aanat gene transcription in the rat pineal gland. *J Neurochem* 112: 321-331.
182. Liu T, Borjigin J (2005) N-acetyltransferase is not the rate-limiting enzyme of melatonin synthesis at night. *J Pineal Res* 39: 91-96.
183. Burke Z, Wells T, Carter D, Klein D, Baler R (1999) Genetic targeting: the serotonin N-acetyltransferase promoter imparts circadian expression selectively in the pineal gland and retina of transgenic rats. *J Neurochem* 73: 1343-1349.
184. Ribelayga C, Gauer F, Calgari C, Pevet P, Simonneaux V (1999) Photoneural regulation of rat pineal hydroxyindole-O-methyltransferase (HIOMT) messenger ribonucleic acid expression: an analysis of its complex relationship with HIOMT activity. *Endocrinology* 140: 1375-1384.
185. Sugimoto K, Baba M, Suzuki S, Yagihashi S (2013) The impact of low-dose insulin on peripheral nerve insulin receptor signaling in streptozotocin-induced diabetic rats. *PLoS One* 8: e74247.
186. Simonneaux V, Poirel VJ, Garidou ML, Nguyen D, Diaz-Rodriguez E, et al. (2004) Daily rhythm and regulation of clock gene expression in the rat pineal gland. *Brain Res Mol Brain Res* 120: 164-172.

187. Wongchitrat P, Felder-Schmittbuhl MP, Phansuwan-Pujito P, Pevet P, Simonneaux V (2009) Endogenous rhythmicity of Bmal1 and Rev-erb alpha in the hamster pineal gland is not driven by norepinephrine. *Eur J Neurosci* 29: 2009-2016.
188. Oishi K, Sakamoto K, Okada T, Nagase T, Ishida N (1998) Antiphase circadian expression between BMAL1 and period homologue mRNA in the suprachiasmatic nucleus and peripheral tissues of rats. *Biochem Biophys Res Commun* 253: 199-203.
189. Wu T, ZhuGe F, Sun L, Ni Y, Fu O, et al. (2012) Enhanced effect of daytime restricted feeding on the circadian rhythm of streptozotocin-induced type 2 diabetic rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 302: E1027-1035.
190. Wu T, Jin Y, Kato H, Fu Z (2008) Light and food signals cooperate to entrain the rat pineal circadian system. *J Neurosci Res* 86: 3246-3255.
191. Takekida S, Yan L, Maywood ES, Hastings MH, Okamura H (2000) Differential adrenergic regulation of the circadian expression of the clock genes Period1 and Period2 in the rat pineal gland. *Eur J Neurosci* 12: 4557-4561.
192. Herichova I, Zeman M, Stebelova K, Ravingerova T (2005) 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: 223-229.
193. Kennaway DJ, Owens JA, Voultsios A, Boden MJ, Varcoe TJ (2007) Metabolic homeostasis in mice with disrupted Clock gene expression in peripheral tissues. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 293: R1528-1537.
194. Scott EM, Carter AM, Grant PJ (2008) Association between polymorphisms in the Clock gene, obesity and the metabolic syndrome in man. *Int J Obes (Lond)* 32: 658-662.
195. Pappa KI, Gazouli M, Anastasiou E, Iliodromiti Z, Antsaklis A, et al. (2013) The major circadian pacemaker ARNT-like protein-1 (BMAL1) is associated with susceptibility to gestational diabetes mellitus. *Diabetes Res Clin Pract* 99: 151-157.
196. Delezie J, Challet E (2011) Interactions between metabolism and circadian clocks: reciprocal disturbances. *Ann N Y Acad Sci* 1243: 30-46.
197. Damiola F, Le Minh N, Preitner N, Kornmann B, Fleury-Olela F, et al. (2000) Restricted feeding uncouples circadian oscillators in peripheral tissues from the central pacemaker in the suprachiasmatic nucleus. *Genes Dev* 14: 2950-2961.
198. Balsalobre A (2002) Clock genes in mammalian peripheral tissues. *Cell Tissue Res* 309: 193-199.
199. Yamajuku D, Inagaki T, Haruma T, Okubo S, Kataoka Y, et al. (2012) Real-time monitoring in three-dimensional hepatocytes reveals that insulin acts as a synchronizer for liver clock. *Sci Rep* 2: 439.
200. Davidson AJ, Stokkan KA, Yamazaki S, Menaker M (2002) Food-anticipatory activity and liver per1-luc activity in diabetic transgenic rats. *Physiol Behav* 76: 21-26.

201. Hung MS, Avner P, Rogner UC (2006) Identification of the transcription factor ARNTL2 as a candidate gene for the type 1 diabetes locus Idd6. *Hum Mol Genet* 15: 2732-2742.
202. Hofmann K, Schönerstedt U, Mühlbauer E, Wedekind D, Peschke E (2013) Clock Gene Expression in the Liver of Streptozotocin-induced and Spontaneous Type 1 Diabetic Rats. *Horm Metab Res* 45: 629-639.
203. Balsalobre A, Damiola F, Schibler U (1998) A serum shock induces circadian gene expression in mammalian tissue culture cells. *Cell* 93: 929-937.
204. Balsalobre A, Marcacci L, Schibler U (2000) Multiple signaling pathways elicit circadian gene expression in cultured Rat-1 fibroblasts. *Curr Biol* 10: 1291-1294.
205. Englund A, Kovanen L, Saarikoski ST, Haukka J, Reunanen A, et al. (2009) NPAS2 and PER2 are linked to risk factors of the metabolic syndrome. *J Circadian Rhythms* 7: 5.
206. Young ME, Wilson CR, Razeghi P, Guthrie PH, Taegtmeier H (2002) Alterations of the circadian clock in the heart by streptozotocin-induced diabetes. *J Mol Cell Cardiol* 34: 223-231.
207. Ogawa Y, Koike N, Kurosawa G, Soga T, Tomita M, et al. (2011) Positive autoregulation delays the expression phase of mammalian clock gene Per2. *PLoS One* 6: e18663.
208. Carvas JM, Vukolic A, Yepuri G, Xiong Y, Popp K, et al. (2012) Period2 gene mutant mice show compromised insulin-mediated endothelial nitric oxide release and altered glucose homeostasis. *Front Physiol* 3: 337.
209. Hirota T, Okano T, Kokame K, Shirotani-Ikejima H, Miyata T, et al. (2002) Glucose down-regulates Per1 and Per2 mRNA levels and induces circadian gene expression in cultured Rat-1 fibroblasts. *J Biol Chem* 277: 44244-44251.
210. Lamia KA, Storch KF, Weitz CJ (2008) Physiological significance of a peripheral tissue circadian clock. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 15172-15177.
211. Wu T, Zhuge F, Zhu Y, Wang N, Jiang Q, et al. (2013) Effects of light on the circadian rhythm of diabetic rats under restricted feeding. *J Physiol Biochem*.
212. Kim JH, Shim CS, Won JY, Park YJ, Park SK, et al. (2009) Molecular analysis of growth factor and clock expression in the livers of rats with streptozotocin-induced diabetes. *Reprod Dev Biol* 33: 163-169.
213. Mühlbauer E, Gross E, Labucay K, Wolgast S, Peschke E (2009) Loss of melatonin signalling and its impact on circadian rhythms in mouse organs regulating blood glucose. *Eur J Pharmacol* 606: 61-71.
214. Jetten AM (2009) Retinoid-related orphan receptors (RORs): critical roles in development, immunity, circadian rhythm, and cellular metabolism. *Nucl Recept Signal* 7: e003.
215. Jetten AM, Kang HS, Takeda Y (2013) Retinoic acid-related orphan receptors alpha and gamma: key regulators of lipid/glucose metabolism, inflammation, and insulin sensitivity. *Front Endocrinol (Lausanne)* 4: 1.

216. Wang Y, Solt LA, Burris TP (2010) Regulation of FGF21 expression and secretion by retinoic acid receptor-related orphan receptor alpha. *J Biol Chem* 285: 15668-15673.
217. Kornmann B, Schaad O, Bujard H, Takahashi JS, Schibler U (2007) System-driven and oscillator-dependent circadian transcription in mice with a conditionally active liver clock. *PLoS Biol* 5: e34.
218. Tahara Y, Otsuka M, Fuse Y, Hirao A, Shibata S (2011) Refeeding after fasting elicits insulin-dependent regulation of Per2 and Rev-erbalpha with shifts in the liver clock. *J Biol Rhythms* 26: 230-240.
219. Cross DA, Alessi DR, Cohen P, Andjelkovich M, Hemmings BA (1995) Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. *Nature* 378: 785-789.
220. Yin L, Wang J, Klein PS, Lazar MA (2006) Nuclear receptor Rev-erbalpha is a critical lithium-sensitive component of the circadian clock. *Science* 311: 1002-1005.
221. Solt LA, Kojetin DJ, Burris TP (2011) The REV-ERBs and RORs: molecular links between circadian rhythms and lipid homeostasis. *Future Med Chem* 3: 623-638.
222. Akashi M, Takumi T (2005) The orphan nuclear receptor RORalpha regulates circadian transcription of the mammalian core-clock Bmal1. *Nat Struct Mol Biol* 12: 441-448.
223. Yang X, Downes M, Yu RT, Bookout AL, He W, et al. (2006) Nuclear receptor expression links the circadian clock to metabolism. *Cell* 126: 801-810.
224. Venegas C, Garcia JA, Doerrier C, Volt H, Escames G, et al. (2012) Analysis of the daily changes of melatonin receptors in the rat liver. *J Pineal Res.*
225. Kelly MA, Rees SD, Hydrie MZ, Shera AS, Bellary S, et al. (2012) Circadian gene variants and susceptibility to type 2 diabetes: a pilot study. *PLoS One* 7: e32670.
226. Akhtar RA, Reddy AB, Maywood ES, Clayton JD, King VM, et al. (2002) Circadian cycling of the mouse liver transcriptome, as revealed by cDNA microarray, is driven by the suprachiasmatic nucleus. *Curr Biol* 12: 540-550.
227. Bozek K, Relogio A, Kielbasa SM, Heine M, Dame C, et al. (2009) Regulation of clock-controlled genes in mammals. *PLoS One* 4: e4882.
228. Yamaguchi S, Mitsui S, Yan L, Yagita K, Miyake S, et al. (2000) Role of DBP in the circadian oscillatory mechanism. *Mol Cell Biol* 20: 4773-4781.
229. Ueda HR, Hayashi S, Chen W, Sano M, Machida M, et al. (2005) System-level identification of transcriptional circuits underlying mammalian circadian clocks. *Nat Genet* 37: 187-192.
230. Tong X, Muchnik M, Chen Z, Patel M, Wu N, et al. (2010) Transcriptional repressor E4-binding protein 4 (E4BP4) regulates metabolic hormone fibroblast growth factor 21 (FGF21) during circadian cycles and feeding. *J Biol Chem* 285: 36401-36409.
231. Ohno T, Onishi Y, Ishida N (2007) A novel E4BP4 element drives circadian expression of mPeriod2. *Nucleic Acids Res* 35: 648-655.

232. Michalik L, Auwerx J, Berger JP, Chatterjee VK, Glass CK, et al. (2006) International Union of Pharmacology. LXI. Peroxisome proliferator-activated receptors. *Pharmacol Rev* 58: 726-741.
233. Lemberger T, Saladin R, Vazquez M, Assimacopoulos F, Staels B, et al. (1996) Expression of the peroxisome proliferator-activated receptor alpha gene is stimulated by stress and follows a diurnal rhythm. *J Biol Chem* 271: 1764-1769.
234. Oishi K, Shirai H, Ishida N (2005) CLOCK is involved in the circadian transactivation of peroxisome-proliferator-activated receptor alpha (PPARalpha) in mice. *Biochem J* 386: 575-581.
235. Canaple L, Rambaud J, Dkhissi-Benyahya O, Rayet B, Tan NS, et al. (2006) Reciprocal regulation of brain and muscle Arnt-like protein 1 and peroxisome proliferator-activated receptor alpha defines a novel positive feedback loop in the rodent liver circadian clock. *Mol Endocrinol* 20: 1715-1727.
236. Wang N, Yang G, Jia Z, Zhang H, Aoyagi T, et al. (2008) Vascular PPARgamma controls circadian variation in blood pressure and heart rate through Bmal1. *Cell Metab* 8: 482-491.
237. Yang G, Jia Z, Aoyagi T, McClain D, Mortensen RM, et al. (2012) Systemic PPARgamma Deletion Impairs Circadian Rhythms of Behavior and Metabolism. *PLoS One* 7: e38117.
238. Takahashi S, Inoue I, Nakajima Y, Seo M, Nakano T, et al. (2010) A promoter in the novel exon of hPPARgamma directs the circadian expression of PPARgamma. *J Atheroscler Thromb* 17: 73-83.
239. Vidal-Puig A, Jimenez-Linan M, Lowell BB, Hamann A, Hu E, et al. (1996) Regulation of PPAR gamma gene expression by nutrition and obesity in rodents. *J Clin Invest* 97: 2553-2561.
240. Havel PJ, Uriu-Hare JY, Liu T, Stanhope KL, Stern JS, et al. (1998) Marked and rapid decreases of circulating leptin in streptozotocin diabetic rats: reversal by insulin. *Am J Physiol* 274: R1482-1491.
241. Velasco A, Huerta I, Marin B (1988) Plasma corticosterone, motor activity and metabolic circadian patterns in streptozotocin-induced diabetic rats. *Chronobiol Int* 5: 127-135.
242. Ortiz-Caro J, Gonzalez C, Jolin T (1984) Diurnal variations of plasma growth hormone, thyrotropin, thyroxine, and triiodothyronine in streptozotocin-diabetic and food-restricted rats. *Endocrinology* 115: 2227-2232.

Lebenslauf

Name Kathleen Biemann geb. Hofmann
Geburtsdatum 24. März 1982
Familienstand Verheiratet mit Ronald Biemann, 1 Sohn (2 Jahre)
Nationalität Deutsch

Schulbildung **bis 2000**
Gymnasium am Reileck, Halle (Saale)
Allgemeine Hochschulreife

Studium **10/2000 – 09/2003**
Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
Studiengang Biochemie (*Vordiplom Note: 2,2*)

10/2003 – 03/2009
Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
Studiengang Ernährungswissenschaften
Dipl.-Ernährungswissenschaftlerin (Note: 1,1)
Thema der Diplomarbeit: *In vivo*- und *in vitro*-Untersuchungen zur Wirkung von Lupinenprotein auf die Expression ausgewählter Gene des Lipidstoffwechsels beim Menschen (*Note: 1,1*)
Institut für Agrar- und Ernährungswissenschaften
Professor Dr. Gabriele Stangl
Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

04/2009 –
Promotion
Institut für Anatomie und Zellbiologie
Prof. Dr. Elmar Peschke
Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

10/2013 –
Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg
Studiengang Humanmedizin

Halle (Saale), den

Kathleen Biemann

Eigene wissenschaftliche Arbeiten

Peer-reviewed Arbeiten

Biemann K, Schönerstedt U, Albrecht E, Mühlbauer E, Peschke E (2014) Influence of insulin on the hepatic diurnal expression of clock genes and clock-controlled genes in spontaneous type-1 diabetic rats. In: Peschke E (Hrsg.): Endokrinologie V, Vorträge im Rahmen des Projekts „Zeitstrukturen endokriner Systeme“. Abh Sächs Akad Wiss Math-nat Kl, Band 66, Heft 1, S. 116-120, Hirzel, Stuttgart/Leipzig 2014.

Mühlbauer E, Albrecht E, **Biemann K**, Bazwinsky-Wutschke I, Peschke E (2014) Heterologous expression of the human melatonin receptor MT2 and its functional importance in the rat insulinoma β -cell line INS1. In: Peschke E (Hrsg.): Endokrinologie V, Vorträge im Rahmen des Projekts „Zeitstrukturen endokriner Systeme“. Abh Sächs Akad Wiss Math-nat Kl, Band 66, Heft 1, S. 85-88, Hirzel, Stuttgart/Leipzig 2014.

Schönerstedt U, **Biemann K**, Wolgast S, Mühlbauer E, Peschke E (2014) Aging-associated changes in the rhythmic gene expression profile of streptozotocin-induced diabetic rat liver. In: Peschke E (Hrsg.): Endokrinologie V, Vorträge im Rahmen des Projekts „Zeitstrukturen endokriner Systeme“. Abh Sächs Akad Wiss Math-nat Kl, Band 66, Heft 1, S. 121-125, Hirzel, Stuttgart/Leipzig 2014.

Hofmann K, Schönerstedt U, Mühlbauer E, Wedekind D, Peschke E (2013) Clock gene expression in the liver of streptozotocin-induced and spontaneous type 1 diabetic rats. Horm Metab Res 45: 629-639.

Bähr I, Bazwinsky-Wutschke I, Wolgast S, **Hofmann K**, Streck S, Mühlbauer E, Wedekind D, Peschke E (2012) GLUT4 in the endocrine pancreas--indicating an impact in pancreatic islet cell physiology? Horm Metab Res 44: 442-450.

Peschke E, **Hofmann K**, Pönicke K, Wedekind D, Mühlbauer E (2012) Catecholamines are the key for explaining the biological relevance of insulin-melatonin antagonisms in type 1 and type 2 diabetes. J Pineal Res 52: 389-396.

Albrecht E, Mühlbauer E, Bazwinsky-Wutschke I, **Hofmann K**, Peschke E (2011) Einfluss des humanen MT2-Rezeptors auf die Insulinsekretion der pankreatischen β -Zelle. In: Peschke E: Chronobiologie. Nova Acta Leopoldina NF 114: 191-195.

Hofmann K, Bähr I, Streck S, Mühlbauer E, Albrecht E, Wolgast S, Wedekind D, Peschke E (2011) Melatonin-Insulin-Interaktionen bei Typ 1-diabetischen Ratten. In: Peschke E.: Chronobiologie. Nova Acta Leopoldina 2011; NF 114: 221-226.

Mühlbauer E, Albrecht E, **Hofmann K**, Bazwinsky-Wutschke I, Peschke E (2011) Melatonin inhibits insulin secretion in rat insulinoma β -cells (INS-1) heterologously expressing the human melatonin receptor isoform MT2. J Pineal Res 51: 361-372.

Peschke E, **Hofmann K**, Bähr I, Streck S, Albrecht E, Wedekind D, Mühlbauer E (2011) The insulin-melatonin antagonism: studies in the LEW.1AR1-iddm rat (an animal model of human type 1 diabetes mellitus). Diabetologia 54: 1831-1840.

Weisse K, Brandsch C, Zernsdorf B, Nkengfack Nembongwe GS, **Hofmann K**, Eder K, Stangl GI (2010) Lupin protein compared to casein lowers the LDL cholesterol:HDL cholesterol-ratio of hypercholesterolemic adults. Eur J Nutr 49: 65-71.

Posterbeiträge

Albrecht E, Mühlbauer E, Wolgast S, **Hofmann K**, Peschke E (2011) Signalwege des humanen MT2-Rezeptors in der pankreatischen β -Zelle. 46. Jahrestagung der Deutschen Diabetes Gesellschaft 1.-4. Juni 2011, Leipzig, Diabetologie und Stoffwechsel 6: P292.

Hofmann K, Bähr I, Albrecht E, Streck S, Wedekind D, Mühlbauer E, Peschke E (2011) Influence of an insulin substitution to a type 1-diabetic rat model on an existing insulin-melatonin-antagonism. 24. Bilaterales Symposium Halle-Posznan, 20.-22. Mai 2011, Halle (Saale).

Hofmann K, Bähr I, Albrecht E, Streck S, Wedekind D, Mühlbauer E, Peschke E (2011) Plasma melatonin concentration and expression of melatonin synthesizing enzymes are compensated by insulin administration to spontaneously type 1-diabetic rats. 54. Symposium der Deutschen Gesellschaft für Endokrinologie, 30. März-2. April 2011, Hamburg, Abstraktbuch.

Hofmann K, Schönerstedt U, Wedekind D, Mühlbauer E, Peschke E (2011) Uhrengene und Uhrengen-beeinflusste Gene in der Leber von spontan Typ 1-diabetischen Ratten. 46. Jahrestagung der Deutschen Diabetes Gesellschaft 1.-4. Juni, Leipzig 2011, Diabetologie und Stoffwechsel 6: P293.

Hofmann K, Bähr I, Streck S, Albrecht E, Wedekind D, Mühlbauer E, Peschke E (2010) Insulin treatment of type 1-diabetic rats normalizes both the plasma melatonin and the expression of melatonin synthesizing enzymes. 4. Herbsttagung der Deutschen Diabetes Gesellschaft und 26. Jahrestagung der Deutschen Adipositas Gesellschaft, 4.-6. November 2010, Berlin, Obes Facts 3 (Suppl. 1): 42.

Hofmann K, Streck S., Mühlbauer E, Wedekind D, Peschke E (2010) Typ1-diabetische Ratten zeigen einen Melatonin-Insulin-Antagonismus. 45. Jahrestagung der Deutschen Diabetes Gesellschaft, 12.-15. Mai 2010, Stuttgart, Diabetologie und Stoffwechsel 3: P311.

Peschke E, Stumpf I, **Hofmann K**, Streck S, Albrecht E, Wolgast S, Wedekind D, Mühlbauer E (2010) Melatonin-insulin interactions in type 1 diabetic rats. Chronobiologie Symposium der Leopoldina, 19. März 2010, Halle (Saale), Klin Neuro 41 ID24: 45.

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre an Eides statt, dass ich die Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst, keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Halle (Saale), den

Kathleen Biemann

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich all jenen danken, die mich bei der Anfertigung dieser Promotionsarbeit unterstützt haben.

Herrn Prof. Dr. Dr. Bernd Fischer danke ich für die Möglichkeit meine Doktorarbeit am Institut für Anatomie und Zellbiologie anzufertigen.

Mein aufrichtiger Dank gilt meinem Doktorvater, **Herrn Prof. Dr. Elmar Peschke**, für die Vergabe dieses interessanten Themas und der Möglichkeit es unter hervorragenden Bedingungen eigenverantwortlich durchführen zu dürfen. Für die sehr gute und vor allem herzliche Betreuung während meiner gesamten Doktorandenzeit, die angenehme Zusammenarbeit, die konstruktiven Anregungen beim Schreiben von Publikationen sowie dieser Dissertation danke ich ihm ebenso wie für seine stets aufmunternden Worte.

Besonders danken möchte ich weiter **Herrn Dr. Eckhard Mühlbauer** für die vielen anregenden Gespräche und Diskussionen, seine fachliche Unterstützung und Motivation, die ebenfalls ganz entscheidend zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Ein großer Dank gilt der gesamten Arbeitsgruppe Peschke für die freundliche Zusammenarbeit und Unterstützung. Dabei möchte ich vor allem **Herrn Sebastian Streck** meinen Dank für die gemeinsame Durchführung der tierexperimentellen und labortechnischen Arbeiten aussprechen. Die gemeinsame Nutzung der Blutplasma-Daten hat entscheidend zum Verständnis und der Interpretation der eigenen Daten beigetragen. Ebenso standen mir **Frau Candy Rothgänger** und **Frau Beate Heydel** in labortechnischen Angelegenheiten stets tatkräftig und sehr gewissenhaft zur Seite.

Frau Dr. Ina Bähr und **Frau Dr. Elke Albrecht** danke ich für die gemeinsame, vor allem schöne und erfahrungsreiche Zeit am Institut für Anatomie, die freundschaftliche Zusammenarbeit und ihrer Unterstützung bei tierexperimentellen Untersuchungen bei Tag- und Nachtzeit.

Ein ganz besonderer Dank geht an alle Mitdoktoranden, allen voran **Frau Ulrike Schönerstedt** und **Frau Juliane Zibolka**.

Meiner Familie, insbesondere meinen Eltern, danke ich für ihre liebevolle Unterstützung während meiner Promotionszeit.

Abschließend möchte ich mich bei meinem Mann **Ronald Biemann** für all die motivierenden Worte, seine Kreativität und Engelsgeduld bedanken.

Der **Deutschen Diabetes-Stiftung** danke ich für die finanzielle Unterstützung dieser Arbeit.