

Untersuchungen zum Einfluss von Melatonin auf die Somatostatinsekretion der pankreatischen δ -Zelle

**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

Frau Zibolka, Juliane
Geb. am 28.11.1984 in Halberstadt

1. Gutachten: Prof. Dr. Elmar Peschke
Prof. Dr. Gabriele I. Stangl

2. Gutachten: Prof. Dr. Heidegard Hilbig

Verteidigung am: 19.10.2020

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	IV
Abbildungsverzeichnis	VII
Tabellenverzeichnis	IX
1 Einleitung	1
1.1 Biologische Rhythmen.....	1
1.2 Das photoneuroendokrine circadiane System	1
1.2.1 Die Verbindung zwischen dem zentralen Oszillator und der Epiphyse.....	2
1.2.2 Melatonin	4
1.3 Melatoninrezeptor-gekoppelte Signalkaskaden	6
1.4 Die Bedeutung von Melatonin für das endokrine Pankreas	8
1.4.1 Einfluss von Melatonin auf die Glucosehomöostase.....	8
1.4.2 Einfluss von Melatonin auf die Insulin- und Glukagonsekretion	10
1.5 Somatostatin	13
1.6 Die Rolle von Somatostatin in der Hormonsekretion der pankreatischen Insel	14
1.7 Zielstellung der Arbeit.....	17
2 Material	19
2.1 Feinchemikalien und Reagenzien.....	19
2.2 Verwendete Kits	21
2.3 Zubehör und Geräte	21
2.4 Analysensoftware	22
3 Methoden	23
3.1 Zellen und Gewebe	23
3.1.1 Die humane δ -Zelllinie QGP-1.....	23
3.1.2 Humane Langerhanssche Inseln.....	24
3.1.3 Humanes Pankreasgewebe	24
3.1.4 Isolierte humane RNA	25
3.2 Transiente Transfektion.....	25
3.2.1 Plasmide	25
3.2.2 Plasmidextraktion aus E. coli.....	26
3.2.3 Transfektion von QGP-1-Zellen	27
3.2.4 β -Galaktosidase-Assay	27
3.2.4.1 Qualitativer β -Galaktosidase-Nachweis	28
3.2.4.2 Quantitativer β -Galaktosidase-Nachweis	28
3.3 Molekularbiologische Methoden	29
3.3.1 RNA-Isolierung.....	29

3.3.2	DNase-Verdau	30
3.3.3	Reverse Transkription	31
3.3.4	<i>Real-time</i> RT-PCR	31
3.3.5	DNA-Agarosegelelektrophorese	33
3.3.6	Sequenzierung der PCR-Produkte	33
3.3.6.1	DNA-Extraktion aus dem Agarosegel.....	33
3.3.6.2	Sequenzierungs-PCR.....	33
3.4	Somatostatin-Radioimmunoassay	34
3.5	Immunzytochemie	35
3.6	Immunhistochemie	36
3.7	DNA-Bestimmung	39
3.8	Bestimmung der cAMP- und cGMP-Konzentration	39
3.8.1	cAMP-ELISA.....	40
3.8.2	cGMP-ELISA.....	40
3.9	Statistische Auswertung	40
4	Ergebnisse.....	41
4.1	Untersuchungen an der humanen δ -Zelllinie QGP-1	41
4.1.1	Charakterisierung der Zelllinie QGP-1	41
4.1.2	Nachweis der Melatoninrezeptoren in QGP-1-Zellen.....	43
4.1.3	Einfluss von Melatonin auf die Somatostatinsekretion in QGP-1-Zellen	44
4.1.4	Einfluss von cAMP und cGMP auf die Somatostatinsekretion	46
4.1.5	Untersuchung des rezeptorspezifischen Einflusses von Melatonin auf die Somatostatinsekretion.....	47
4.1.5.1	Melatoninrezeptorantagonisten.....	47
4.1.5.2	Transiente Überexpression der humanen Melatoninrezeptoren MT1 und MT2	48
4.1.6	Einfluss von Melatonin auf die Somatostatinsekretion unter verschiedenen Glucosekonzentrationen.....	51
4.2	Untersuchungen an humanem pankreatischen Gewebe	52
4.2.1	Immunhistochemische Untersuchungen im humanen Pankreas nicht-diabetischer und Typ2-diabetischer Patienten	52
4.2.1.1	Nachweis von Melatoninrezeptoren in den β -, α - und δ -Zellen der pankreatischen Insel.....	52
4.2.1.2	Vergleich der Melatoninrezeptorverteilung in Pankreata nicht-diabetischer und Typ2-diabetischer Patienten	54
4.2.2	Molekularbiologische Charakterisierung der humanen Pankreata nicht-diabetischer und Typ2-diabetischer Patienten	56

4.2.3	Einfluss von Melatonin auf die Somatostatinsekretion der pankreatischen Insel nicht-diabetischer und Typ2-diabetischer Patienten.....	57
5	Diskussion.....	59
5.1	Charakterisierung der humanen pankreatischen δ -Zelllinie QGP-1	59
5.2	Untersuchungen zum Einfluss von Melatonin auf die Somatostatinsekretion am Modell der humanen pankreatischen δ -Zelllinie QGP-1.....	64
5.2.1	Nachweis der Melatoninrezeptoren	64
5.2.2	<i>In vitro</i> -Untersuchung zur funktionellen Bedeutung von Melatonin auf die Somatostatinsekretion in Abhängigkeit von der Zeit	64
5.2.3	Untersuchung der Dosis-Wirkungsbeziehung von Melatonin auf die Somatostatinsekretion sowie zugrundeliegender Signaltransduktionsmechanismen.....	66
5.2.4	Untersuchung des rezeptorspezifischen Einflusses von Melatonin.....	71
5.2.5	Einfluss von Melatonin unter verschiedenen Glucosekonzentrationen	73
5.3	Untersuchungen an humanem pankreatischen Gewebe	74
5.3.1	Verteilung der Melatoninrezeptoren in der humanen Langerhansschen Insel..	74
5.3.2	Einfluss von Melatonin auf die Somatostatinsekretion der humanen Insel.....	79
6	Zusammenfassung.....	88
7	Summary.....	90
8	Literaturverzeichnis	92
9	Anhang.....	X
9.1	Plasmide	X
9.2	Primer	XI
9.3	Klinische Parameter der untersuchten Patienten.....	XIII
9.3.1	Humane Langerhanssche Inseln.....	XIII
9.3.2	Humanes Pankreasgewebe	XIII
	Lebenslauf	XIV
	Publikationsverzeichnis.....	XV
	Eidesstattliche Erklärung.....	XVI
	Danksagung.....	XVII

Abkürzungsverzeichnis

AANAT	Arylkylamin- <i>N</i> -acetyltransferase
AC	Adenylatcyclase
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
8-Br-cAMP	<i>8-Bromo</i> adenosine 3',5'-cyclic monophosphate
8-Br-cGMP	<i>8-Bromo</i> guanosine 3',5'-cyclic monophosphate
BSA	bovines Serumalbumin
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
cAMP-GEF	<i>cAMP-regulated guanine nucleotide exchange factor</i>
cDNA	<i>complementary deoxyribonucleic acid</i>
cGMP	cyclisches Guanosinmonophosphat
CHO	<i>Chinese hamster ovary</i>
CICR	<i>calcium-induced calcium release</i> , Calcium-induzierte Calciumfreisetzung
CMRL	<i>Connaught Medical Research Laboratories</i>
CMV	Humanes Cytomegalievirus
CNG-Kanäle	<i>cyclic nucleotide-gated channels</i> , nicht-selektive Kationenkanäle
CRE	<i>cAMP response element</i>
CREB	<i>cAMP response element-binding protein</i>
Crhr2 α	<i>corticotropin-releasing hormone receptor 2 α</i>
C _t	<i>Cycle threshold</i>
CYP	Cytochrom P450
DAG	Diacylglycerol
dbcAMP	Dibutyryl-cAMP
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i>
DPBS	<i>Dulbecco's phosphate buffered saline</i>
E. coli	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
Epac	<i>exchange protein directly activated by cAMP</i>
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERK1/ERK2	<i>extracellular signal-regulated kinases 1/2</i>
FKS	fetales Kälberserum
GABA	γ -Aminobuttersäure
GC	Guanylatcyclase
GCG	Glukagon
GCGR	Glukagonrezeptor

G _i -Protein	inhibitorische α-Untereinheit des G-Proteins
GIRK	<i>G protein-coupled inwardly rectifying K⁺ channel</i>
GK	Goto-Kakizaki
Glc	Glucose
GLP-1	<i>Glucagon-like Peptide 1</i>
GLUT1 - 4	Glucosetransporter 1 - 4
G-Protein	Guaninnucleotid-bindendes Protein
GPR50	<i>G protein-coupled receptor 50</i>
G _q -Protein	α _q -Untereinheit des G-Proteins
G _s -Proteine	stimulatorische α-Untereinheit des G-Proteins
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HIOMT	Hydroxyindol-O-methyltransferase
HOMA-IR	<i>Homeostasis Model Assessment</i> der Insulinresistenz
IBMX	3-Isobutyl-1-methylxanthin
ICER	<i>inducible cAMP early repressor</i>
IMC	<i>Columna intermediolateralis</i>
INS	Insulin
INSR-A/B	Insulinrezeptor-Isoform A/B
IP ₃	Inositol-1,4,5-trisphosphat
JNK	c-Jun N-terminale Kinase
K _{ATP} -Kanäle	ATP-abhängige Kaliumkanäle
KO	<i>Knockout</i>
LB	<i>Lysogeny broth</i>
MEK1/MEK2	<i>mitogen-activated protein kinase kinases 1/2</i>
MEL	Melatonin
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MOPS	3-(N-Morpholino)-propansulfonsäure
mRNA	<i>messenger ribonucleic acid</i>
MT1	Melatoninrezeptor-Isoform 1
MT2	Melatoninrezeptor-Isoform 2
<i>MTNR1A</i>	<i>melatonin receptor 1A</i> (humanes Gen für den MT1)
<i>MTNR1B</i>	<i>melatonin receptor 1B</i> (humanes Gen für den MT2)
NA	Noradrenalin
NaCl	Natriumchlorid
NTC	<i>non template control</i>
P	Irrtumswahrscheinlichkeit
PACAP	<i>pituitary adenylate cyclase-activating peptide</i>
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
pCREB	phosphoCREB
PDE	Phosphodiesterase

PFA	Paraformaldehyd
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PIN	Pineal, <i>Epiphysis cerebri</i> , Epiphyse
PIP ₂	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
PKG	Proteinkinase G
PLC	Phospholipase C
4-P-PDOT	4-Phenyl-2-propionamidotetralin
PTX	Pertussis-Toxin
PVN	<i>Nucleus paraventricularis</i>
RET	<i>Stratum ganglionare</i> der Retina
RHT	retinohypothalamischer Trakt
RIA	Radioimmunoassay
RNA	<i>ribonucleic acid</i>
ROI	<i>Region of interest</i>
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
rRNA	ribosomale RNA
RT-PCR	Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
RYR-1 - 3	Ryanodinrezeptoren 1 - 3
SAMP8	<i>senescence-accelerated mouse prone 8</i>
SAMR1	<i>senescence-accelerated mouse resistant 1</i>
SCG	<i>Ganglion cervicale superius</i>
SCN	<i>Nucleus supraquiasmaticus</i>
SEM	Standardfehler, <i>standard error of the mean</i>
SNP	<i>single nucleotide polymorphism</i>
SST	Somatostatin
SSTR1 - 5	Somatostatinrezeptor Typ1 - 5
STZ	Streptozotocin
SV40	Semian-Virus 40
T2DM	Diabetes mellitus Typ2
UCN3	Urocortin-3
VGCC	<i>voltage-gated Ca²⁺ channels</i> , spannungsabhängige Calciumkanäle
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indoxyl-β-D-galaktopyranosid

Fremdsprachige Begriffe sowie Bezeichnungen von Genen wurden in Kursivschrift gefasst.

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Das photoneuroendokrine System der Säuger.	4
Abb. 2: Interaktion von α -, β - und δ -Zellen in der Langerhansschen Insel.	16
Abb. 3: Qualitativer β -Galaktosidase-Nachweis nach <i>in situ</i> -Färbung der mit pCMV-LacZ transfizierten QGP-1-Zellen mit X-Gal.	28
Abb. 4: Nachweis von Somatostatin und Melatoninrezeptoren in QGP-1-Zellen und humanem Gewebe.	43
Abb. 5: Expressionsvergleich der Melatoninrezeptoren in QGP-1-Zellen.	44
Abb. 6: Einfluss von Melatonin auf die Somatostatinsekretion der QGP-1-Zellen in Abhängigkeit von der Inkubationszeit.	45
Abb. 7: Einfluss steigender Melatoninkonzentrationen auf die Sekretion von Somatostatin sowie auf die gesamtzelluläre cAMP- und cGMP-Konzentration von QGP-1-Zellen.	46
Abb. 8: Einfluss von 8-Br-cAMP und 8-Br-cGMP auf die Somatostatinsekretion der QGP-1-Zellen.	47
Abb. 9: Einfluss von Melatonin und Melatoninrezeptorantagonisten auf die Somatostatinsekretion der QGP-1-Zellen.	48
Abb. 10: Nachweis der transienten Überexpression der humanen Melatoninrezeptoren MT1 und MT2 in QGP-1-Zellen.	49
Abb. 11: Einfluss von Melatonin auf die Somatostatinsekretion der QGP-1-Zellen nach transienter Transfektion mit den humanen Melatoninrezeptoren MT1 und MT2.	51
Abb. 12: Einfluss von Melatonin auf die Somatostatinsekretion der QGP-1-Zellen unter verschiedenen Glucosekonzentrationen.	52
Abb. 13: Immunhistochemische Darstellung von Insulin, Glukagon bzw. Somatostatin und des MT1-Rezeptors als Doppelmarkierung im humanen Pankreasgewebe.	53
Abb. 14: Immunhistochemische Darstellung von Insulin, Glukagon bzw. Somatostatin und des MT2-Rezeptors als Doppelmarkierung im humanen Pankreasgewebe.	54
Abb. 15: MT1- und MT2-Rezeptorverteilung in den β -, α - und δ -Zellen der Langerhansschen Insel nicht-diabetischer und Typ2-diabetischer Patienten.	55

Abb. 16: Vergleich der MT1- und MT2-Rezeptormarkierung in den β -, α - und δ -Zellen der Langerhansschen Insel nicht-diabetischer und Typ2-diabetischer Patienten.	56
Abb. 17: Relative mRNA-Expression der pankreatischen Hormone im Pankreas nicht-diabetischer und Typ2-diabetischer Patienten.	57
Abb. 18: Einfluss von Melatonin auf die Somatostatinsekretion pankreatischer Inseln eines nicht-diabetischen und Typ2-diabetischen Patienten.	58
Abb. 19: Modellvorstellung zur Somatostatinsekretion der pankreatischen δ -Zelle.	61
Abb. 20: Einfluss von Melatonin auf die pankreatische Hormonsekretion von β -, α - und δ -Zellen.	82
Abb. 21: Schema des Expressionsvektors pT-REx-DEST30.	X
Abb. 22: Schema des Expressionsvektors pCMV-LacZ.	XI

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Reagenzien für die RNA-Agarosegelelektrophorese	30
Tabelle 2: Reaktionsansatz für die Reverse Transkription	31
Tabelle 3: Reaktionsbedingungen der <i>real-time</i> RT-PCR	32
Tabelle 4: Reaktionsansatz für die <i>real-time</i> RT-PCR	33
Tabelle 5: Reaktionsansatz für die Sequenzierungs-PCR	34
Tabelle 6: Reaktionsbedingungen der Sequenzierungs-PCR	34
Tabelle 7: Spezifität der verwendeten Antikörper.....	36
Tabelle 8: Spezifität der verwendeten Antikörper.....	38
Tabelle 9: Expression ausgewählter Gene in humanem Pankreasgewebe, humanen Langerhansschen Inseln und QGP-1-Zellen zur Charakterisierung des δ -Zellmodells	42
Tabelle 10: Beschreibung des Expressionsvektors pT-REx-DEST30	X
Tabelle 11: Beschreibung des Expressionsvektors pCMV-LacZ.....	XI
Tabelle 12: Eigenschaften der für die <i>real-time</i> RT-PCR verwendeten Primer.....	XII
Tabelle 13: Klinische Parameter der Organspender	XIII
Tabelle 14: Klinische Parameter der untersuchten Patienten.....	XIII

1 Einleitung

1.1 Biologische Rhythmen

Im Laufe der Evolution haben die meisten Lebewesen ein internes circadianes System entwickelt, um den Organismus an die rhythmisch, durch die Erdrotation bedingten, täglich wiederkehrenden Veränderungen in der Umwelt anzupassen [1]. Das circadiane System in Säugetieren koordiniert nahezu alle physiologischen Prozesse, wie z. B. das Schlaf-Wach-Verhalten, die Körpertemperatur, den Puls und Blutdruck sowie den Metabolismus und endokrine Funktionen [1, 2]. Endogen, durch eine innere Uhr, wird ein Rhythmus erzeugt, der genetisch determiniert ist. Dieser Rhythmus besitzt unter konstanten Bedingungen und ohne zeitliche Signale aus der Umwelt eine Periodenlänge von ca. 24 h [2]. Er wird daher als circadian (lat. *circa* „ungefähr“ und *dies* „Tag“) bezeichnet [3]. Die Periodenlänge der circadianen Rhythmen ist bei unterschiedlichen Spezies verschieden [2]. Beim Menschen beträgt die Periodenlänge ca. 25 h [4]. Durch die Anpassung an tägliche Änderungen in der Photoperiode wird dieser Rhythmus mit der geophysikalischen Tageslänge von genau 24 h synchronisiert [1], was als *Entrainment* bezeichnet wird [5]. Reize aus der Umwelt werden als Zeitgeber bezeichnet [6], wobei der wichtigste Zeitgeber der Hell-Dunkel-Wechsel ist [2]. Der durch einen externen Rhythmus angepasste endogene circadiane Rhythmus wird als diurnaler Rhythmus bezeichnet [7].

1.2 Das photoneuroendokrine circadiane System

Das System der inneren Uhren ist hierarchisch organisiert [1, 5]. Schlüsselkomponente ist ein endogener, autonom arbeitender Schrittmacher, der den circadianen Rhythmus generiert. Er ist verbunden mit Sinneszellen, die synchronisierende Reize aus der Umwelt vermitteln. Seine Signale werden über neuronale, neuroendokrine und endokrine Mechanismen an die Peripherie übermittelt [2].

Bei Säugetieren ist die zentrale innere Uhr im *Nucleus suprachiasmaticus* (SCN) des Hypothalamus lokalisiert, die täglich an die Länge der Photoperiode angepasst wird. Der SCN wiederum koordiniert über zahlreiche Signalwege zelluläre Uhren peripherer Organe in Abhängigkeit von der Nahrungsaufnahme, der Körpertemperatur und oszillierenden Hormonen sowie dem peripheren Nervensystem [1]. So finden sich auch außerhalb des SCN im Gehirn sowie in peripheren Organen circadiane Oszillatoren [5]. In nahezu jeder Zelle lassen sich selbsterhaltende, zellautonome circadiane Oszillatoren nachweisen. Da die Periodenlänge in individuellen Zellen allerdings variieren kann, ist eine Phasenanpassung durch rhythmische Signale, kontrolliert durch den SCN, wichtig, um eine Synchronisation der Rhythmen innerhalb eines Organs zu gewährleisten [1]. Die Synchronisation der peripheren Uhren erfolgt über neuronale Signale des SCN und des autonomen Nervensystems [5] in Kombination mit humoralen Faktoren wie Glukokortikoiden [8], Retinsäure [9] sowie über das

Pinealhormon Melatonin [10]. So konnte der SCN als Teil der neuralen sympathischen und parasympathischen Verbindungen zwischen dem Gehirn und peripher lokalisierten Organen, wie dem weißen und braunen Fettgewebe, der Schilddrüse, der Niere und Nebenniere, der Blase, der Milz, der Leber sowie dem Pankreas nachgewiesen werden [11]. Obwohl das Nahrungsverhalten indirekt über den Schlaf-Wach-Rhythmus gesteuert wird, stellt die periodische Nahrungsaufnahme einen weiteren wichtigen Zeitgeber peripherer Organe dar [1, 12]. Zudem scheinen auch Nahrungsfaktoren wie Glucose, Aminosäuren, Ethanol, Koffein und Thiamin circadiane Rhythmen in peripheren Organen bzw. im SCN zu beeinflussen [13]. Der vom SCN gesteuerte circadiane Rhythmus der Körpertemperatur greift ebenfalls in das *Entrainment* peripherer Uhren ein [14, 15].

Molekulare Grundlage der Rhythmusgenerierung bilden transkriptionelle/translationale Rückkopplungsschleifen zwischen Uhrengenen und ihren Produkten, die als Transkriptionsfaktoren fungieren [2]. Das Hauptziel des Uhrenmechanismus liegt in der rhythmischen Expression von Uhrengen-kontrollierten Genen, die den circadianen Rhythmus in Physiologie und Verhalten steuern. Durch Generierung verschiedener Phasen in der circadianen Genexpression von Uhrengenen und Uhrengen-kontrollierten Genen wird eine Koordination verschiedener biologischer Prozesse in bestimmten Zeitfenstern ermöglicht [1]. So kontrolliert die circadiane Uhr über die Regulation der Expression und/oder der Aktivität von Enzymen, die involviert sind in den Cholesterin-, Aminosäure-, Lipid-, Glykogen- und Glucosestoffwechsel, den Nährstoffmetabolismus sowie den Energiestoffwechsel. Zudem zeigen auch viele den Metabolismus regulierende Hormone wie Insulin, Glukagon, Adiponectin, Corticosteron, Leptin und Ghrelin circadiane Oszillationen [13].

1.2.1 Die Verbindung zwischen dem zentralen Oszillator und der Epiphyse

Der zentrale circadiane Rhythmusgenerator ist in den bilateral angeordneten suprachiasmatischen Kernen des Hypothalamus oberhalb der Sehnervenkreuzung lokalisiert [2]. Der SCN wird auch als *master clock* bezeichnet [5] und besteht aus einer Ansammlung von Neuronen [2]. Jedes einzelne Neuron ist in der Lage einen eigenen circadianen Rhythmus mit einer Periodenlänge von etwa 24 h zu generieren [16], die über den Neurotransmitter γ -Aminobuttersäure (GABA) synchronisiert werden können [17]. Über photische Signale aus dem *Stratum ganglionare* der Retina erfolgt die Synchronisation an einen 24-stündigen Tag-Nacht-Rhythmus [2]. Die Wahrnehmung von photischen Reizen erfolgt über direkt lichtempfindliche Melanopsin-enthaltende retinale Ganglienzellen, die zu den Neuronen des SCN projizieren [18, 19] und die Neurotransmitter Glutamat und *pituitary adenylate cyclase-activating peptide* (PACAP) enthalten [2, 5]. Die Zellen erhalten über synaptische Mechanismen auch Signale von den klassischen Photorezeptoren, den Stäbchen und Zapfen [20, 21]. Die Lichtinformation wird über eine Untereinheit des

Sehnerven, den retinohypothalamischen Trakt (RHT), zum SCN geleitet. Der SCN überträgt die rhythmischen Signale über neuronale/synaptische und neuroendokrine Mechanismen. Die Übertragung neuronaler/synaptischer Signale erfolgt über kurze Nervenbahnen, die in benachbarte Kerngebiete im Hypothalamus projizieren. Eine wichtige Schaltstation für die Anbindung an das autonome Nervensystem sind die bilateral angeordneten paraventriculären Kerne des Hypothalamus (*Nucleus paraventricularis*, PVN). Von hier ziehen lange absteigende Nervenbahnen zu den zentralen sympathischen Neuronen, den paarigen *Columnae intermediolaterales* im Rückenmark. Diese Neurone innervieren mit präganglionären Nervenfasern die *Ganglia cervicalia superiora* (SCG), die periphere sympathische Ganglienzellen enthalten. Von hieraus entspringen noradrenerge, postganglionäre Nervenfasern und ziehen in alle Bereiche des Gehirns. Teile dieser Nervenfasern bilden oberhalb des *Tentorium cerebelli* zwei eigenständige paarige Nerven, die als *Nervi conarii* zum Pinealorgan, eine wichtige Verbindung zwischen dem circadianen System und der *Epiphysis cerebri*, ziehen. In der Epiphyse enden die Noradrenalin(NA)-haltigen Nervenfasern als freie Nervenendigungen [2]. Die während der Dunkelheit abnehmende Aktivität des SCN führt zu einer Glutamat-vermittelten Aktivierung des PVN, verbunden mit einer konsekutiven Ausschüttung von NA aus den postganglionären Neuronen des SCG, wodurch die Bildung und Freisetzung von Melatonin stimuliert wird. Im Gegensatz dazu kommt es während der Hellphase durch die Aktivierung des SCN über den RHT zu einer Hemmung des PVN, vermittelt durch die Ausschüttung von GABA [22]. Sowohl bei tag- als auch nachtaktiven Säugetieren wirkt die Epiphyse als Vermittler circadianer Prozesse, indem sie über die nächtliche Freisetzung von Melatonin die Information Dunkelheit in die Peripherie vermittelt und damit den Organismus an die photoperiodisch wechselnden Verhältnisse des Tages anpasst. Zudem besteht im Sinne einer negativen Rückkopplung die Möglichkeit der Feineinstellung der circadianen Phase. So führt die Bindung von Melatonin an spezifische Melatoninrezeptoren des SCN in bestimmten Zeitfenstern zur Aktivitätshemmung des SCN und damit zu einer Veränderung der Phasenlage des circadianen Rhythmusgenerators [2, 23] (Abb. 1).

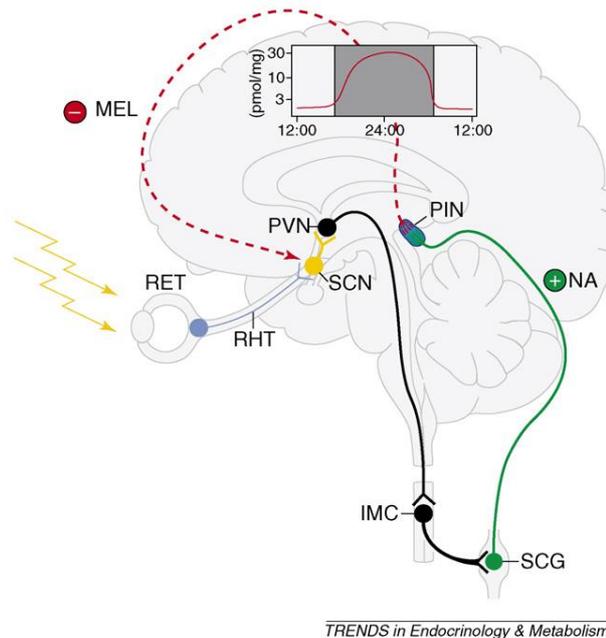


Abb. 1: Das photoneuroendokrine System der Säuger.

Über das *Stratum ganglionare* der Retina (RET) erfolgt die Wahrnehmung der Lichtinformation. Diese Signale werden über den retinohypothalamischen Trakt (RHT) zum paarig angelegten *Nucleus suprachiasmaticus* (SCN) übermittelt. Die neuronalen Signale des SCN gelangen über den *Nucleus paraventricularis* (PVN) des Hypothalamus und die *Columna intermediolateralis* (IMC) des Rückenmarks zum *Ganglion cervicale superius* (SCG). Die Freisetzung von Noradrenalin (NA) aus postganglionären sympathischen Fasern des SCG stimuliert die nächtliche Synthese von Melatonin (MEL) aus der Epiphyse (Pineal, PIN). Über eine negative Rückkopplung wirkt Melatonin auf den zentralen circadianen Rhythmusgenerator. Die eingefügte Abbildung zeigt die Schwankung der Melatoninkonzentration (in pmol/mg Protein) in der humanen Epiphyse in Abhängigkeit von der Uhrzeit (die Nacht ist grau gekennzeichnet). (Abbildung nach [3])

1.2.2 Melatonin

Melatonin gilt als wichtiges hormonelles Signal des circadianen Systems. Die Melatoninausschüttung folgt einem diurnalen Rhythmus mit hohen Konzentrationen in der Nacht. Auf diese Weise werden Zeitsignale an Zielgewebe vermittelt, die tägliche und jahreszeitliche Rhythmen von Physiologie und Verhalten beeinflussen [24].

Die Isolierung und Strukturaufklärung von Melatonin (*N*-Acetyl-5-methoxytryptamin) erfolgte durch Lerner et al. [25, 26]. Hauptsyntheseort ist die Epiphyse, obwohl es auch in extrapinealem Gewebe (wie z. B. in der Retina, in Zellen des Immunsystems und in der Darmmukosa) nachgewiesen werden kann, das allerdings nur einen geringen Einfluss auf Melatoninkonzentrationen im Plasma und *Liquor cerebrospinalis* hat [10].

Die Melatoninsynthese beginnt mit der pinealen Aufnahme der Aminosäure Tryptophan aus der Blutbahn, welche durch die Tryptophanhydroxylase am 5'-Ende hydroxyliert wird. Durch Decarboxylierung entsteht aus 5-Hydroxytryptophan Serotonin (5-Hydroxytryptamin), das durch die Arylalkylamin-*N*-acetyltransferase (AANAT) zu *N*-Acetylserotonin umgewandelt wird. Der letzte Schritt ist die Umwandlung in Melatonin durch die Hydroxyindol-*O*-methyltransferase (HIOMT). Die AANAT fungiert als Schlüsselenzym in

der Melatoninbiosynthese. Ihre Regulation weist jedoch Spezies-spezifische Unterschiede auf. So wird zum einen die Expression des Enzyms sowohl durch transkriptionelle als auch durch posttranslationale Steuerungsmechanismen kontrolliert und zum anderen kann die Aktivität des Enzyms durch Phosphorylierung und Protein-Protein-Interaktionen beeinflusst werden [2].

Zu Beginn der Dunkelheit werden aus den sympathischen Nervenendigungen im Pinealorgan große Mengen des Neurotransmitters NA freigesetzt [27]. NA stimuliert über die Aktivierung von α_1 - und β_1 -adrenergen Rezeptoren die Melatoninbiosynthese in den Pinealozyten. Hierbei kommt es über die β_1 -Rezeptoren zu einer Aktivierung des G_s -Proteins, verbunden mit einer Stimulation der Adenylatcyclase (AC) und einer Erhöhung der intrazellulären cyclischen Adenosinmonophosphat(cAMP)-Konzentration. Die gleichzeitige Bindung von NA an α_1 -adrenerge Rezeptoren verstärkt die β_1 -adrenerge Signalkaskade. Sie führt über eine Aktivierung der Phospholipase C (PLC) zur Bildung von Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP_3) und somit zu einer Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration und einer Aktivierung der Proteinkinase C (PKC) [2].

Bei den Rodentia ist der nächtliche Anstieg der Melatoninsynthese hauptsächlich auf die diurnale Erhöhung der *Aanat*-Transkription zurückzuführen [3, 28]. Über eine cAMP-abhängige Aktivierung der Proteinkinase A (PKA) kommt es zu einer Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors *cAMP response element-binding protein* (CREB) am Serin 133 [29–31]. Die Bindung von phosphoCREB (pCREB) an *cyclic AMP response elements* (CREs) im Promotorbereich des *Aanat*-Gens führt zur Expression des Enzyms [32]. Der Anstieg der *Aanat*-mRNA-Konzentration geht mit einem Anstieg des Proteingehaltes und einer Stimulation der Melatoninsynthese einher [28]. Zum Ende der Nacht kommt es wiederum zu einem starken Abfall der *Aanat*-mRNA und der Enzymaktivität [28, 33]. Bedingt durch das Absinken der NA-Konzentration zum Ende der Nacht [27] und der Desensitivierung adrenerger Rezeptoren [2] kommt es zur Dephosphorylierung von pCREB durch Serin/Threonin-Proteinphosphatasen [34]. Ein weiterer wichtiger Faktor für die Hemmung der *Aanat*-Expression bildet der inhibitorisch wirkende Transkriptionsfaktor *inducible cAMP early repressor* (ICER), dessen Expression cAMP-abhängig stimuliert wird [28]. Daneben gibt es posttranslationale Steuerungsmechanismen, die die *Aanat*-Proteinkonzentration und -Aktivität regulieren. So kommt es durch das Absinken der cAMP-Konzentration in den Pinealozyten zur Ubiquitylierung der *Aanat* und folglich zum proteosomalen Abbau [35].

Bei Ungulaten und Primaten spielen die transkriptionellen Steuerungsmechanismen keine Rolle. Die Expression des *AANAT*-Gens erfolgt konstant [36]. Auch beim Menschen führt eine konstitutive Expression des *AANAT*-Transkripts zu einer konstanten Bildung des *AANAT*-Proteins [36, 37]. Hier wird die Enzymaktivität über den *AANAT*-Proteingehalt durch

proteasomale Proteolyse [38] und durch Protein-Protein-Interaktionen gesteuert [39]. Die NA-induzierte cAMP-Erhöhung führt zur Phosphorylierung der AANAT durch die PKA. Über die konsekutive Bindung von phospho-AANAT an 14-3-3 Proteine wird die Aktivität gesteigert und der proteosomale Abbau des Enzyms verhindert [40, 41].

Das lipophile Hormon Melatonin wird nicht in den Pinealozyten gespeichert, sondern direkt in die Blutbahn abgegeben [2]. Beim Menschen steigt die Melatoninsynthese kurz nach Beginn der Dunkelheit an, erreicht ihren Höhepunkt in der Mitte der Nacht (zwischen 2 und 4 Uhr) und fällt dann wieder ab [37, 42]. Die Halbwertszeit im Blut beträgt ca. 45 min [43]. Die Ausschüttung von Melatonin unterliegt saisonalen Schwankungen mit einer verlängerten Sekretionsdauer und erhöhten Plasmakonzentrationen unter kürzeren Photoperioden in den Wintermonaten [44, 45]. Zudem schwankt die Plasmakonzentration in Abhängigkeit des Alters. In Säuglingen kann erst um den 6. Lebensmonat ein Anstieg der nächtlichen Melatoninsekretion beobachtet werden (0,12 nM). In der frühen Kindheit erreicht die Melatoninsekretionsrate ihren Höhepunkt (1,43 nM), wobei es mit Beginn der Pubertät zu einem Abfall der Plasmamelatoninkonzentration kommt. Hierbei nimmt die Sekretion mit steigendem Alter bisphasisch ab. So fällt sie bis zum 15. - 20. Lebensjahr auf nächtliche Werte von 0,27 nM stark ab und sinkt noch einmal moderat bis zum 70. - 90. Lebensjahr auf Werte um 0,13 nM [46, 47]. Bei älteren Menschen fehlen oft Tag-Nacht-Unterschiede in der Melatoninsekretion [47]. Der Abbau von Melatonin erfolgt hauptsächlich in der Leber durch Monoxygenasen der Cytochrom P450-Familie (CYP1A1, CYP1A2 und CYP1B1) [48]. Durch die Umwandlung in 6-Hydroxymelatonin wird sulfatiertes bzw. glukuronidiertes Derivat mit dem Urin ausgeschieden [24].

1.3 Melatoninrezeptor-gekoppelte Signalkaskaden

Obwohl das lipophile Hormon Melatonin membrangängig ist [24], wird bei Mammalia die Wirkung im Wesentlichen über zwei membranständige Rezeptorisoformen vermittelt, die als Melatoninrezeptoren MT1 und MT2 bezeichnet werden [49, 50]. Sie gehören zur Familie der G-Protein-gekoppelten Membranrezeptoren, die durch sieben Transmembrandomänen gekennzeichnet sind [24]. Neuere Untersuchungen diskutieren eine Vermittlung ihrer Wirkung über eine Dimerisierung beider Rezeptoren als Homo- und Heterodimere [51, 52]. Eine dritte Melatoninbindungsstelle in Säugetieren stellt das Enzym Chinonreduktase 2 dar, das im Zusammenhang mit dem antioxidativen Effekt von Melatonin steht. Zudem konnte bei verschiedenen Spezies, einschließlich dem Menschen, ein Melatonin-verwandter Rezeptor identifiziert werden (*G protein-coupled receptor 50*, GPR50). Dieser Orphanrezeptor besitzt zwar keine Bindungsstelle für Melatonin, kann allerdings die Melatoninrezeptorfunktion des MT1 beeinflussen [53].

Die beiden Rezeptorisoformen MT1 und MT2 lassen sich in zahlreichen neuronalen und nicht-neuronalen Geweben nachweisen. Im Säugetiergehirn können beide Rezeptoren u. a. in verschiedenen Regionen des Cortex, Thalamus, Hypothalamus, einschließlich des SCN, Hippocampus sowie der Retina nachgewiesen werden. Zudem kann der MT1-Rezeptor auch in der *Pars tuberalis* der Hypophyse lokalisiert werden [54, 55].

Peripher wird der MT1- und/oder der MT2-Rezeptor im kardiovaskulären System, Immunsystem, Gastrointestinaltrakt, weißem Fettgewebe sowie in den Testes, Ovarien, Brustdrüsen und in der Haut, Leber, Niere, Nebenniere, Plazenta, Milz und dem Pankreas exprimiert. Das ubiquitäre Vorkommen der Melatoninrezeptoren verdeutlicht, dass Melatonin nicht nur den circadianen Rhythmus sondern auch zahlreiche biologische Funktionen beeinflusst [56], wie z. B. den Schlaf, die saisonale Fortpflanzung sowie verschiedene metabolische Prozesse, die mit der Energiebilanz assoziiert sind [10].

Ihre zelluläre Wirkung wird über eine Bindung der Transmembranrezeptoren an heterotrimere Guaninnucleotid-bindende Proteine (G-Proteine), bestehend aus einer α - und $\beta\gamma$ -Untereinheit, vermittelt. Insbesondere die Bindung an verschiedene α -Untereinheiten resultiert in einer Aktivierung unterschiedlicher Signaltransduktionsmechanismen innerhalb der Zelle [57].

Der MT1-Rezeptor kann sowohl Pertussis-Toxin (PTX)-sensitive inhibitorische G-Proteine (G_i) als auch PTX-insensitive G-Proteine ($G_{q/11}$) aktivieren. Über die Stimulation PTX-sensitiver $G_{i\alpha 2}$ - und $G_{i\alpha 3}$ -Proteine hemmt der MT1-Rezeptor die Aktivität der AC, wodurch es zu einer Senkung der *second messenger*-Konzentration von cAMP kommt [58]. Diese Senkung ist verbunden mit einer reduzierten Aktivität der PKA und einer verminderten Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors CREB [59, 60]. Die Aktivierung des PTX-insensitiven $G_{q/11\alpha}$ -Proteins hingegen führt zu einer Stimulation der PLC, die Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP_2) in Diacylglycerol (DAG) und IP_3 spaltet. Die IP_3 -Bildung führt über eine Ca^{2+} -Freisetzung aus intrazellulären Speichern zu einer Erhöhung der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration. Zudem kommt es durch DAG zu einer Aktivierung der PKC [58]. Daneben kann auch über die $\beta\gamma$ -Untereinheit des G_i -gekoppelten MT1-Rezeptors eine Aktivierung der PLC beobachtet werden [61]. Darüber hinaus kann die Aktivität von *mitogen-activated protein kinase kinases* (MEK1 und MEK2), *extracellular signal-regulated kinases* (ERK1 und ERK2) [62] sowie der c-Jun N-terminalen Kinase (JNK) über PTX-sensitive und -insensitive G-Proteine durch Phosphorylierung reguliert werden [63].

Zudem können über den MT1-Rezeptor verschiedene Ionenkanäle beeinflusst werden. Über eine Aktivierung PTX-sensitiver G-Proteine wird bspw. der Einstrom von Ca^{2+} über spannungsabhängige Calciumkanäle in neonatalen Hypophysenzellen der Ratte reduziert [64]. Auch ein Einfluss von Melatonin auf die zelluläre K^+ -Leitfähigkeit ist in der Literatur beschrieben. So führt die Aktivierung des G_i -gekoppelten MT1-Rezeptors in glatten

Muskelzellen über eine Senkung der cAMP/PKA-abhängigen Phosphorylierung von Calcium-aktivierten Kaliumkanälen zu einer Hemmung dieser Kanäle und somit zu einer Beeinflussung der Vasokonstriktion [24, 65, 66]. In kultivierten Zellen aus dem Myometrium der Ratte hingegen können sowohl PTX-sensitive, hemmende als auch PTX-insensitive, stimulatorische Effekte von Melatonin auf die Aktivität dieser Kanäle beobachtet werden [67]. Zudem können über die $\beta\gamma$ -Untereinheit des PTX-sensitiven G_i -gekoppelten MT1-Rezeptors die einwärts gleichrichtenden Kaliumkanäle Kir3 aktiviert werden. Diese Aktivierung ist verbunden mit einer erhöhten Leitfähigkeit für Kaliumionen, über die Melatonin bspw. die elektrische Aktivität in Neuronen des SCN inhibiert [68, 69].

Auch der MT2-Rezeptor kann PTX-sensitive G_i -Proteine aktivieren und dadurch die Forskolin-stimulierte cAMP-Bildung hemmen [50]. Zudem kommt es durch den MT2-Rezeptor zu einer Senkung der IBMX(3-Isobutyl-1-methylxanthin)-stimulierten cGMP-Konzentration, die durch die lösliche Guanylatcyclase (GC) beeinflusst wird [57, 70]. Darüber hinaus kann Melatonin auch über den MT2-Rezeptor die PIP₂-Hydrolyse stimulieren [71] und dadurch die DAG-medierte Aktivität der PKC erhöhen [54]. Solche Effekte erfolgen möglicherweise durch eine Stimulation der PLC über die $\beta\gamma$ -Untereinheit des PTX-sensitiven G_i -gekoppelten Rezeptors und führen zur Phasenverschiebung des circadianen Rhythmus im SCN [54, 72]. Des Weiteren werden auch für den MT2-Rezeptor Einflüsse auf die Phosphorylierung von JNK [63] sowie ERK1/2 [73] beschrieben.

1.4 Die Bedeutung von Melatonin für das endokrine Pankreas

1.4.1 Einfluss von Melatonin auf die Glucosehomöostase

Melatonin steht im Zusammenhang mit der Regulation der Glucosehomöostase. Der Einfluss auf metabolische Prozesse erfolgt zum einen über die Modulation der circadianen Aktivität des SCN und zum anderen über einen direkten Einfluss auf periphere Organe, wie das endokrine Pankreas [10]. Die Insulinsekretion beim Menschen zeigt eine diurnale Rhythmik, mit steigenden Plasmakonzentrationen während des Tages und abfallenden Werten in der Nacht [74]. Demgegenüber steht ein diurnaler Rhythmus der Melatoninsekretion mit erhöhten Werten in der Nacht [75]. Auch bei nachtaktiven Mäusen, in denen die Melatoninsekretion ebenfalls auf die Dunkelphase beschränkt ist [23], zeigt die 24 h-Periodik der Insulinkonzentration im Serum unter nüchternen Bedingungen ein Sekretionsmaximum für Insulin am Ende der Hellphase [76]. Ebenso konnte eine circadiane Rhythmik der Insulinsekretion in isolierten Inseln der Ratte nachgewiesen werden, in denen es durch Melatonin zu Phasenverschiebungen kommt [77]. Obwohl die Plasmaglukose und die Insulinsekretion in enger Korrelation zur Nahrungsaufnahme stehen, konnte bei nüchternen Ratten gezeigt werden, dass beide Parameter einem diurnalen Rhythmus folgen. Zudem bleibt der diurnale Rhythmus der Insulinsekretion unabhängig von Veränderungen der

Blutglucose erhalten [78]. Auch die Glucosetoleranz von Ratte und Mensch unterliegt einer diurnalen Rhythmizität [79–81]. Zudem zeigt die Insulinsensitivität beim Menschen diurnale Veränderungen [82, 83]. So scheinen die diurnalen Veränderungen beider Parameter durch endogene Schrittmacher beeinflusst zu werden. Die Wechselwirkung zwischen Melatonin als Zeitgeber und Insulin sowie dem Blutglucosespiegel wird kontrovers diskutiert. Erste Untersuchungen zum Einfluss von Melatonin auf den Glucosestoffwechsel gehen auf Constantin I. Parhon und Mitarbeiter zurück, die das pineale Hormon als Insulin-ähnlich, hypoglykämisierend mit anaboler Wirkung charakterisierten [84]. So konnte gezeigt werden, dass Melatonin die Glucosetoleranz erhöhte, während eine Pinealektomie hingegen die Insulinsekretion und die Glucosetoleranz erniedrigte und zu erhöhten Blutglucosespiegeln führte [85–87]. Andererseits existieren Untersuchungen, in denen eine Pinealektomie verbunden war mit einem Anstieg der Insulinsekretion [88] und einem Abfall der Blutglucosekonzentration [89]. Wiederum andere Studien konnten keinen Einfluss von Melatonin auf die Insulinsekretion feststellen [90, 91]. Trotz der widersprüchlichen Datenlage belegt die Mehrzahl der Studien mit Tiermodellen einen hemmenden Einfluss von Melatonin auf die Insulinsekretion der pankreatischen β -Zelle. So konnte bei der Ratte gezeigt werden, dass eine Gabe von Melatonin zu einer Abnahme der Plasmainsulinkonzentration führt [92, 93]. Zudem kam es bei Kaninchen zu einem Abfall der Glucosetoleranz nach Melatoningabe [94]. Oft wird hierbei von einer Senkung der stimulierten Insulinsekretion gesprochen. *In vitro*-Untersuchungen zeigten, dass Melatonin die Glucose-stimulierte Insulinsekretion von isolierten Inseln der Maus und Pankreata der Ratte senkt [95]. In Superfusionsexperimenten mit isolierten pankreatischen Inseln der Ratte sowie mit der Ratten-Insulinomazelllinie INS-1 konnte gezeigt werden, dass Melatonin die Glucose-, KCl- und Forskolin-stimulierte Insulinsekretion senkt [96–100]. Auch in „Pseudoinseln“ aus der murinen Insulinomazelllinie MIN6 wurde die Glucose-stimulierte Insulinsekretion durch Melatonin gehemmt [101]. Neben dem Einfluss auf die Insulinsekretion konnte auch ein Einfluss von Melatonin auf die pankreatische Glukagonsekretion beobachtet werden. So wurde in Wistarratten durch eine orale Melatoningabe der Plasmainsulinspiegel gesenkt [102], während der Plasma-glukagonspiegel anstieg [103]. Untersuchungen an der murinen pankreatischen α -Zelllinie α TC1.9 zeigten zudem, dass Melatonin die Expression und Sekretion von Glukagon erhöht [103]. Ebenso stimulierte eine Melatonininkubation die Glukagonsekretion isolierter Inseln von Ratte [104] und Mensch [101].

Eine funktionelle Interaktion zwischen Melatonin und Insulin kann auch beim Krankheitsbild des Diabetes mellitus beobachtet werden. So zeigt sich mit steigendem Alter eine abnehmende Melatoninsynthese, während die Plasmainsulinkonzentration zunimmt [92]. Gleichzeitig steigt im höheren Alter die Wahrscheinlichkeit an einem Diabetes mellitus Typ2 (T2DM) zu erkranken [84]. Zudem weisen Typ2-diabetische Patienten eine veränderte

Melatoninrhythmik auf [105], die verbunden ist mit einer verringerten nocturnalen Ausschüttung von Melatonin [106, 107]. Peschke et al. [75] konnten an Typ2-diabetischen Patienten sowie Typ2-diabetischen Goto-Kakizaki(GK)-Ratten zeigen, dass erhöhte Plasma-insulinkonzentrationen mit erniedrigten Melatoninkonzentrationen einhergehen. Gleichzeitig konnte hier eine erhöhte Expression der Melatoninrezeptoren im Pankreas beobachtet werden [75, 102, 108]. Weitere Untersuchungen zeigten, dass die pineale Melatonsynthese bei GK-Ratten gestört ist [109, 110]. Zudem konnte an der GK- [102] und der Typ2-diabetischen *Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty*-Ratte [111] gezeigt werden, dass durch die Gabe von Melatonin die Diabetes-bedingte erhöhte Plasmainsulinkonzentration gesenkt werden kann. Ein gegensätzliches Bild zeigt sich beim Diabetes mellitus Typ1 [112]. In der spontan Typ1-diabetischen LEW.1AR1-*iddm*-Ratte sowie der induzierten Typ1-diabetischen STZ-Ratte, die mit dem Diabetogen Streptozotocin (STZ) behandelt wurde, koinzidierten erniedrigte Insulinwerte mit erhöhten Melatoninkonzentrationen im Plasma [113, 114].

Der Zusammenhang zwischen Melatonin und Diabetes zeigt sich auch in Störungen der inneren Uhr. So führen Abweichungen vom circadianen Rhythmus zu erhöhten Glucose- und Insulinspiegeln [115]. Zudem sind Schichtarbeit und Schlafstörungen mit einem gesteigerten Risiko für die Entstehung von T2DM assoziiert [116–120]. *Ex vivo*-Untersuchungen mit humanen Inseln zeigten, dass eine Störung der circadianen Uhr verbunden ist mit einer Abnahme der Insulin- und Glukagonsekretion [121, 122]. Genomweite Assoziationsstudien haben außerdem gezeigt, dass verschiedene, häufig vorkommende *single nucleotide polymorphisms* (SNPs) im Gen des MT2-Rezeptors (*MTNR1B*) assoziiert sind mit erhöhten Nüchtern-Blutglucosespiegeln, einer veränderten Insulinsekretion nach einem Glucosetoleranztest sowie einem erhöhten Risiko an einem T2DM zu erkranken [123–128]. Zudem zeigten auch seltene *Loss-of-Function*-Mutationen in der *coding region* des *MTNR1B*-Gens, die mit einem Verlust der MT2-Rezeptorfunktion einhergehen, eine Assoziation mit einem gesteigerten T2DM-Risiko [129]. Für den MT1-Rezeptor (*MTNR1A*) sind solche Zusammenhänge bisher nicht belegt [10]. Allerdings zeigte sich bei Patienten mit einem Polyzystischen Ovarsyndrom eine Assoziation zwischen einem SNP im *MTNR1A*-Gen und erhöhten Nüchtern-Blutglucosespiegeln sowie einer erhöhten Insulinsekretion nach einem Glucosetoleranztest und einer Zunahme des HOMA-IR (*Homeostasis Model Assessment* der Insulinresistenz) [130].

1.4.2 Einfluss von Melatonin auf die Insulin- und Glukagonsekretion

Die Langerhansschen Inseln wurden erstmalig 1869 durch ihren Namensgeber Paul Langerhans beschrieben. Als Mikroorgane, bestehend aus verschiedenen endokrinen Zellen, sind sie eingebettet in das Parenchym des Pankreas und spielen eine wichtige Rolle in der

Glucosehomöostase. Den Hauptanteil der endokrinen Zellen bilden die Insulin- und Glukagon-produzierenden β - und α -Zellen [131].

Grundlage des Zusammenhangs zwischen Melatonin und der pankreatischen Hormonsekretion ist der Nachweis von Melatoninrezeptoren im endokrinen Pankreas. Erste funktionelle und autoradiographische Untersuchungen erbrachten den Nachweis des Vorkommens in der pankreatischen Insel der Ratte und deuteten mittels molekularbiologischer Analyse auf eine Expression des MT1-Rezeptors im Pankreas hin [97]. Anschließend wiesen Kemp et al. [132] und Peschke et al. [98] die Expression des MT1 in einer Insulinomazelllinie der Ratte, INS-1 nach. Später gelang auch der Nachweis des MT2 in den INS-1-Zellen [133]. Mittels Immunmarkierung wurde der Nachweis der beiden Melatoninrezeptoren in der INS-1-Zelle auch auf Proteinebene erbracht [134, 135]. Zudem konnte in der murinen β -Zelllinie MIN6 [101] sowie der α -Zelllinie α TC1.9 [103] die Genexpression beider Rezeptoren gezeigt werden. Weitere Untersuchungen bestätigten das Vorkommen beider Rezeptorisoformen auf Transkriptebene in der isolierten pankreatischen Insel von Ratte [101, 133], Maus [103, 136, 137] und Mensch [101, 108, 126]. Immunhistochemische Untersuchungen an Pankreata belegten den Nachweis des MT1- und MT2-Rezeptors auch auf Proteinebene in der Insel von Rodentia [126, 137] und Mensch [108, 126]. Allerdings existieren in der Literatur kontroverse Auffassungen hinsichtlich der relativen Expression beider Rezeptoren sowie dem Zelltyp-spezifischen Vorkommen der beiden Rezeptorisoformen in der nativen Insel. So ist in der pankreatischen Insel der Ratte die MT1-Expression gegenüber der mRNA-Konzentration des MT2 erhöht [133]. Dieser Zusammenhang zeigte sich auch in Untersuchungen am humanen Pankreas [108] sowie an humanen Inseln [101]. Eine Studie von Lyssenko et al. [126] hingegen deutete auf ein annähernd gleiches Expressionslevel beider Rezeptorisoformen in der humanen Insel. Hinsichtlich der Zelltyp-spezifischen Expression konnten Ramracheya et al. [101] die Expression des MT1-Rezeptors auf Transkriptebene in den humanen α -Zellen, jedoch nicht in den β -Zellen nachweisen. Andere zeigten die Expression sowohl des MT1- als auch des MT2-Rezeptors in der humanen pankreatischen β -Zelle [124, 138]. Auf Proteinebene zeigten immunhistochemische Untersuchungen an Pankreata von Mäusen eine MT1-spezifische Lokalisation in α -Zellen, während der MT2-Rezeptor in β -Zellen nachweisbar war [137]. Auch Lyssenko et al. [126] zeigten eine MT2-Rezeptor-spezifische Kolokalisation in der β -Zelle der pankreatischen Insel von Mensch und Nagern. Zudem konnte der MT1-Rezeptor in dieser Studie, wenn auch nur in geringer Menge, in peripher lokalisierten β -Zellen nachgewiesen werden.

Die Bedeutung der Melatoninrezeptoren in den verschiedenen Zelltypen des Pankreas belegen Untersuchungen auf Ebene der Signaltransduktion an Zellkulturmodellen. Untersuchungen an der INS-1-Zelle zeigten, dass an der Vermittlung der Melatoninwirkung

auf die Insulinsekretion verschiedene Signalwege involviert sind. Studien der Arbeitsgruppe Peschke belegen, dass der inhibitorische Einfluss von Melatonin über eine Kopplung der Melatoninrezeptoren an G_i -Proteine und der nachfolgenden Hemmung der AC-cAMP-Signalkaskade vermittelt wird. Über eine Inhibierung der AC und folglich Abnahme der cAMP-Konzentration kommt es zu einer Hemmung der stimulierten Insulinsekretion [98, 100, 134, 135]. Kemp et al. [132] untermauern diese Theorie und zeigten in der INS-1-Zelle eine Abnahme der Insulin- und CRE-Promotor-medierten Forskolin- und *Glucagon-like Peptide 1* (GLP-1)-stimulierten Luciferase-Reportergenaktivität nach Melatoninbehandlung. Auch Bazwinsky-Wutschke et al. [139, 140] zeigten Einflüsse von Melatonin auf die Genexpression in INS-1-Zellen der Ratte. So kam es durch Melatonininkubation der Zellen zu einer Abnahme der Forskolin- bzw. IBMX-induzierten Phosphorylierung von CREB, verbunden mit einer verminderten Expression der Calcium/Calmodulin-abhängigen Kinasen Camk2d und CamkIV, die die Insulinexpression und -sekretion modulieren. Die Effekte von Melatonin auf die Insulinsekretion [100] sowie die CRE-Promotoraktivität [132] konnten durch Vorbehandlung der Zellen mit dem $G_{i\alpha}$ -Inhibitor PTX aufgehoben werden. Dies verdeutlicht eine Rolle von PTX-sensitiven G_i -Proteinen für die Vermittlung der Melatoninwirkung in der β -Zelle. In Bezug auf die Rezeptorspezifität wurde zunächst angenommen, dass der Einfluss von Melatonin auf die β -Zelle über den MT1-Rezeptor vermittelt wird, da es durch den unspezifischen Rezeptorantagonisten Luzindol zu einer Blockierung der Melatoninwirkung in der INS-1-Zelle kam [98, 132]. Weiterfolgende Untersuchungen mit dem selektiven MT2-Rezeptorantagonisten 4-Phenyl-2-propionamidotetralin (4-P-PDOT) zeigten allerdings, dass ein inhibitorischer Effekt von Melatonin auf die Insulinsekretion auch über den MT2-Rezeptor vermittelt werden kann. Hier kam es in der INS-1-Zelle über eine Hemmung der löslichen GC zu einer Abnahme der cGMP-Konzentration, die verbunden war mit einer verminderten Ausschüttung von Insulin [141, 142]. Zudem scheint auch der MT2-Rezeptor über die AC/cAMP-Signalkaskade die Insulinsekretion zu modulieren. So belegen Untersuchungen an der INS-1-Zelllinie, die mit dem humanen MT2-Rezeptor transfiziert wurden, dass sich der cAMP-senkende Effekt von Melatonin verstärkte. Im Vergleich zu den unveränderten INS-1-Zellen kam es in den MT2-überexprimierenden Zellen zu einer Steigerung des Insulin-senkenden Einflusses. Zudem konnte der Melatonineinfluss durch eine Vorinkubation mit PTX aufgehoben werden. Folglich scheint auch der MT2-Rezeptor an inhibitorische G-Proteine in der β -Zelle gekoppelt zu sein [134]. Diesen Untersuchungen zum inhibitorischen Einfluss von Melatonin steht ein stimulatorischer Einfluss auf die Insulinsekretion gegenüber, der nach Blockierung der inhibitorischen PTX-sensitiven G-Proteine erfasst werden kann [100]. So zeigten Inkubationsversuche mit INS-1-Zellen eine dosisabhängige Stimulation der IP_3 -Bildung durch Melatonin, ein Effekt der durch Luzindol

aufgehoben wurde. Folglich wird eine MT1-spezifische Aktivierung der G_q /PLC/IP₃-Kaskade vermutet, die über eine Stimulation zellulärer IP₃-Rezeptoren am Endoplasmatischen Retikulum (ER) zu einer Freisetzung von Ca^{2+} führt [100, 143].

Der Einfluss von Melatonin auf die Glukagonsekretion der pankreatischen α -Zelle ist weniger gut untersucht. Alle bisherigen *in vitro*-Befunde deuten auf eine stimulatorische Rolle hin, vermittelt über die G_q /PLC/IP₃-Kaskade sowie über den Phosphoinositid-3-Kinase(PI3K)-Weg. So zeigten Inkubationsversuche mit der murinen α -Zelllinie α TC1.9 eine Melatonin-vermittelte Stimulation der Glukagonsekretion [103], die durch eine Vorinkubation mit dem PLC-Inhibitor U-73122 und dem PI3K-Inhibitor Wortmannin aufgehoben werden konnte [104]. Zudem konnte der Melatonineinfluss auf die Glukagonsekretion nicht durch PTX aufgehoben werden und eine Veränderung der cAMP-Konzentration war nach Melatonininkubation nicht sichtbar. Daher wurde eine Kopplung der Melatoninrezeptoren an G_i - bzw. G_s -Proteine in der α -Zelle ausgeschlossen. Die Aufhebung des Einflusses sowohl durch den unspezifischen Rezeptorantagonisten Luzindol als auch durch den MT2-spezifischen Antagonisten 4-P-PDOT deutet auf eine Beteiligung des MT2-Rezeptors an der Vermittlung des Melatonineffektes in der α TC1.9-Zelllinie hin [104]. Eine andere Studie zeigte ebenfalls eine stimulatorische Rolle von Melatonin auf die Glukagonsekretion in der humanen pankreatischen Insel. Unter Melatonin kam es in der humanen Insel zu einer erhöhten Ausschüttung, die verbunden war mit einem Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration. Eine Veränderung der cAMP-Konzentration war auch in dieser Studie nicht zu verzeichnen. Hinsichtlich der Rezeptorspezifität wird hier allerdings die Beteiligung des MT1-Rezeptors vermutet [101].

1.5 Somatostatin

Somatostatin, auch bekannt als *somatotropin release-inhibiting factor*, wurde 1973 ursprünglich als hypothalamisches Neuropeptid entdeckt, das die Freisetzung des Wachstumshormons aus der Hypophyse hemmt [144]. Neben dem Vorkommen im zentralen Nervensystem wird Somatostatin auch peripher vor allem von den sekretorischen Zellen im Gastrointestinaltrakt sowie den δ -Zellen des Pankreas gebildet [145]. Dabei scheint der Gastrointestinaltrakt, mit einem Anteil von 65%, den größten Anteil an der Konzentration von Somatostatin im Blut zu haben. Demgegenüber beträgt der Anteil des zentralen Nervensystems 30% und der der pankreatischen δ -Zelle nur 5% am Gesamtsomatostatin im Körper [146]. Allerdings besitzt zirkulierendes Somatostatin im Blut nur eine geringere Halbwertszeit (1 - 3 min), da es durch ubiquitär vorkommende Peptidasen schnell abgebaut wird [147]. So fungiert Somatostatin im Körper als Neurotransmitter und Neuromodulator sowie als endokrines Hormon und parakriner Faktor lokal in dem Gewebe in dem es auch exprimiert wird [145]. Generell wird Somatostatin eine inhibitorische Funktion zugeschrieben,

mit antisekretorischen, antiproliferativen und antiangiogenetischen Effekten [147]. Vermittelt werden diese Effekte durch fünf verschiedene G-Protein-gekoppelte Somatostatinrezeptoren (SSTR1 - 5) [145]. Im Körper liegt Somatostatin als zyklisches Peptid in zwei aktiven Isoformen vor, dem Somatostatin-14 und Somatostatin-28. Beide stammen von dem Vorläufer Pre-Prosomatostatin (116 Aminosäuren) ab, der wiederum in das Prosomatostatin (92 Aminosäuren) gespalten wird. Durch eine C-terminale Prozessierung wird Prosomatostatin posttranslational in Somatostatin-14 oder Somatostatin-28, mit einer Verlängerung am N-terminalen Ende, umgewandelt [145, 146, 148]. Während Somatostatin-28 hauptsächlich im Intestinaltrakt gebildet wird, produziert die pankreatische δ -Zelle Somatostatin-14 [149].

1.6 Die Rolle von Somatostatin in der Hormonsekretion der pankreatischen Insel

Die Somatostatin-produzierenden δ -Zellen stellen neben den Insulin- und Glukagon-produzierenden β - und α -Zellen den dritthäufigsten Zelltyp in der Langerhansschen Insel dar. Im Mittel liegt der Anteil der β - und α -Zellen in der humanen Insel bei 50 - 70% bzw. bei 20 - 40%, der Anteil von δ -Zellen liegt bei ca. 10% [150–152]. Dabei weisen alle Zelltypen in der pankreatischen Insel eine charakteristische Anordnung auf, die eine komplexe Interaktion zwischen den einzelnen Zelltypen in der Regulation der Blutglucose ermöglicht [148, 153]. In diesem Prozess spielt die Kontrolle der Hormonsekretion von Insulin und Glukagon eine wichtige Rolle. Die Sekretion beider Hormone verläuft gegensätzlich. Während und kurz nach der Nahrungsaufnahme dominiert die Insulinsekretion, um eine Aufnahme von Glucose und Fetten in Leber, Skelettmuskulatur und Fettgewebe zu stimulieren. Im Gegensatz dazu wird unter katabolen Phasen die Insulinsekretion gehemmt und die Glukagonsekretion gesteigert, wodurch eine Mobilisierung von Glucose und freien Fettsäuren ermöglicht wird [153, 154]. Dadurch wird der Körper vor einer Hypoglykämie geschützt und die Energieversorgung sichergestellt. Obwohl die β - und α -Zellen direkt auf die Veränderung der Blutglucose reagieren, wird ihre Sekretion durch parakrine, neurale und endokrine Einflüsse präzise koordiniert, um eine konstante Blutglucosekonzentration aufrechtzuerhalten. Der bedeutendste parakrine Einfluss bildet hierbei das von der pankreatischen δ -Zelle ausgeschüttete Hormon Somatostatin [153], indem es als inhibitorischer Regulator sowohl die Insulin- als auch die Glukagonsekretion hemmt [146, 153, 155–157]. Vermittler dieser inhibitorischen Wirkung ist in der humanen Insel im Wesentlichen der SSTR2 [157–159]. Dabei kommt es zu einer Aktivierung von G-Protein-gekoppelten einwärts gleichrichtenden K^+ -Kanälen (*G protein-coupled inwardly rectifying K^+ channel*, GIRK), die verbunden ist mit einer Hyperpolarisation und einer Abnahme der elektrischen Aktivität sowie einer Abnahme des Ca^{2+} -Einstroms und einer

Hemmung der Exozytose [157]. Einflüsse auf die Exozytose können auch über die G_i-Protein-gekoppelte Hemmung der AC und einer subsequenten Abnahme der cAMP-Konzentration erfolgen [160].

Die drei Zelltypen beeinflussen sich über einen komplexen Feedbackmechanismus, um die Blutglucosekonzentration in engen Grenzen konstant zu halten. Unter einer Hypoglykämie wird die Insulinsekretion der pankreatischen β -Zelle gehemmt und die Glukagonsekretion der α -Zelle gesteigert [161]. Gleichzeitig kann die Somatostatinsekretion durch Glukagon gesteigert werden [162–167]. Speziell in der humanen Insel wird zudem ein weiterer Regulationsmechanismus zwischen der α - und δ -Zelle diskutiert. So kann in der humanen α -Zelle das Peptid Urocortin-3 (UCN3) nachgewiesen werden. Untersuchungen an der murinen und humanen Insel zeigten, dass UCN3 über die Bindung an den spezifisch auf der δ -Zelle vorkommenden *corticotropin-releasing hormone receptor 2 α* (Crhr2 α) die Somatostatinsekretion stimuliert [168]. Durch die Glukagon-medierte Stimulation von Somatostatin wird ein negativer Feedbackmechanismus ermöglicht [159], wodurch die α -Zelle einer tonischen Inhibition durch die pankreatische δ -Zelle unter geringen Blutglucosekonzentrationen unterliegt [161, 167, 169, 170]. Steigt die Glukosekonzentration im Blut, kommt es zu einer Abnahme der Glukagonsekretion und zu einem Anstieg der Somatostatin- und Insulinsekretion [153, 154, 169]. Dabei haben sowohl Somatostatin [155, 171] als auch von der β -Zelle ausgeschüttete Faktoren, wie Insulin [166, 172], Zn²⁺ [173] und GABA [174] einen inhibitorischen Einfluss auf die α -Zelle [153]. Ein weiterer wichtiger Feedbackmechanismus zeigt sich hierbei zwischen der β - und der δ -Zelle. So wird die Glucose-stimulierte Somatostatinsekretion β -Zell-abhängig amplifiziert, um die Aktivität der β -Zelle unter Hyperglykämie zu kontrollieren. Vermittler ist hierbei entweder Insulin selbst [167, 175], GABA [176] oder ebenfalls das Peptid UCN3 [168]. Ähnlich wie in der humanen α -Zelle kann UCN3 sowohl in der murinen als auch in der humanen β -Zelle nachgewiesen werden. Über eine parakrine Stimulation der Somatostatinsekretion bildet es eine wichtige negative Rückkopplungsschleife zwischen der β - und der δ -Zelle. So wird UCN3 zusammen mit Insulin von der pankreatischen β -Zelle ausgeschüttet [168], wodurch es unter Hyperglykämie mit einer zeitlichen Verzögerung zu einem weiteren Anstieg der Somatostatinsekretion in der pankreatischen Insel kommt [153]. Andere Untersuchungen zeigten in der murinen Insel eine direkte Kopplung von β - und δ -Zellen über *Gap junctions*, wodurch die elektrische Aktivität in der δ -Zelle und die Somatostatinsekretion gesteigert wird [171]. Ziel des β/δ -Feedbacks ist es eine überschießende Glucose-stimulierte Insulinsekretion zu vermeiden, um den Körper vor einer Hyperinsulin-induzierten Hypoglykämie zu schützen [153].

Die dargestellten Zusammenhänge sind in Abb. 2 zusammengefasst und deuten auf ein komplexes Zusammenspiel der drei Zelltypen in der Regulation der Blutglucose. In diesem Feedbackmechanismus nimmt die pankreatische Somatostatinsekretion eine wichtige Rolle

ein. Unter basalen Glucosekonzentrationen kontrolliert die δ -Zelle die Glukagonsekretion und unter postabsorptiven Phasen mit hohen Blutglucosewerten sowohl die Glukagon- als auch die Insulinsekretion. Dadurch wird zum einen eine Steigerung der Glukagonsekretion und zum anderen eine postabsorptive Insulinhypersekretion sowie eine Hypoglykämie vermieden [159].

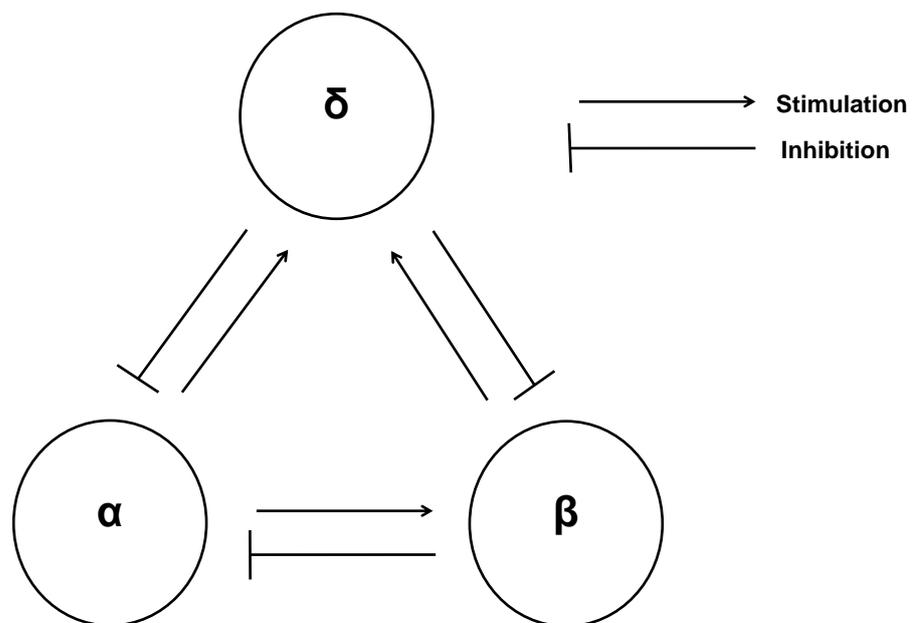


Abb. 2: Interaktion von α -, β - und δ -Zellen in der Langerhansschen Insel.
(Abbildung modifiziert nach [177])

Eine Störung dieses δ -Zell-Feedbackmechanismus ist beim Krankheitsbild des T2DM zu beobachten [153]. Hier kommt es zu einer veränderten Hormonsekretion in der pankreatischen Insel. So ist ein T2DM begleitet von einer unzureichenden Ausschüttung von Insulin sowie einer Insulinresistenz [178]. Zudem kommt es unter Hyperglykämie zu einer erhöhten Glukagonsekretion, während die Ausschüttung unter Hypoglykämie zu gering ist [161, 179]. Auch die pankreatische Somatostatinausschüttung ist in diesem Krankheitsbild verändert. Neuere Untersuchungen vermuten eine erhöhte Somatostatinsekretion als Ursache für die verringerte kompensatorische Glukagonsekretion unter einer Insulin-induzierten Hypoglykämie [146]. Zudem scheint auch der Feedbackmechanismus zwischen der β - und der δ -Zelle gestört, wodurch die Amplifizierung der Glucose-stimulierten Somatostatinsekretion verändert ist. So kann unter einem T2DM ein progressiver Verlust von UCN3 in der β -Zelle beobachtet werden. Dies ermöglicht einen kompensatorischen Mechanismus, um den erhöhten Insulinbedarf aufgrund der peripheren Insulinresistenz zu steigern; allerdings wird die Inhibierung der gesteigerten Glukagonsekretion unter einer Hyperglykämie durch die fehlende δ -Zell-Aktivierung unterbrochen [153, 168]. Zudem

konnten in der Insel Typ2-diabetischer Patienten veränderte Zell-Zell-Kontakte zwischen den einzelnen Inselzelltypen beobachtet werden. Die abnehmende β -Zellmasse ging mit einer Abnahme der β/δ -Zellkontakte einher [180], wodurch die elektrische Kopplung über *Gap junctions* zwischen beiden Zelltypen gestört wird. Auch dieser Zusammenhang führt möglicherweise zu der exzessiven Glukagonausschüttung unter hohen Glucosekonzentrationen bei Typ2-diabetischen Patienten [171].

1.7 Zielstellung der Arbeit

Zahlreiche Untersuchungen widmeten sich der Aufklärung zur Bedeutung von Melatonin für die pankreatische β - sowie α -Zelle und zeigten einen Rezeptor-vermittelten, inhibitorischen Einfluss von Melatonin auf die Insulinsekretion sowie einen stimulatorischen Einfluss auf die Glukagonsekretion. Durch die Modulation der Sekretion beider Hormone nimmt Melatonin Einfluss auf die Glucosehomöostase. Das Hormon Somatostatin, welches als parakriner Regulator sowohl die Insulin- als auch die Glukagonsekretion moduliert, wurde bei diesen Untersuchungen bisher nicht berücksichtigt. Daher war es Ziel dieser Arbeit den Einfluss von Melatonin auf die Somatostatinsekretion der pankreatischen δ -Zelle zu untersuchen. Als Modell diente hierbei im Wesentlichen die humane δ -Zelllinie QGP-1.

Im ersten Teil der Arbeit wurden folgende Aspekte untersucht:

- Mittels *real-time* RT-PCR-Untersuchungen erfolgte zunächst eine Charakterisierung der humanen Somatostatinoma-Zelllinie QGP-1 hinsichtlich ihrer Eignung als ein funktionelles Modell für die native pankreatische δ -Zelle.
- Nachweise der beiden Melatoninrezeptor-Isoformen auf Transkript- und Proteinebene in QGP-1-Zellen bildeten die Grundlage für funktionelle Untersuchungen zum Einfluss von Melatonin auf die Somatostatinsekretion.
- In Inkubationsversuchen wurde untersucht, ob Melatonin die pankreatische Somatostatinsekretion moduliert und ob diese Rezeptor-spezifisch erfolgt.
- Dabei sollte die Frage geklärt werden, über welche Signalkaskaden ein möglicher Einfluss vermittelt wird.
- Mittels transienter Überexpression, entweder des MT1- oder des MT2-Rezeptors im QGP-1-Modell, wurde untersucht, ob die Modulation der Somatostatinsekretion Rezeptorisoform-abhängig erfolgt.

Die Erkenntnisse aus den Zellkulturuntersuchungen sollten im Anschluss auf die humane Insel übertragen werden. Hierbei wurden folgende aus der Literatur bekannte Aspekte berücksichtigt. Zum einen lassen sich die beiden Melatoninrezeptoren MT1 und MT2 in den verschiedenen pankreatischen Zelllinien bzw. Zelltypen der Langerhansschen Insel

nachweisen. Ihre Verteilung wird allerdings Spezies-vergleichend kontrovers diskutiert. Zum anderen sind Störungen der inneren Uhr immer wieder bei einem Diabetes mellitus beobachtet worden. Ein funktioneller Zusammenhang zwischen Melatonin und Insulin kann hier beobachtet werden. So weisen diabetische Patienten eine gestörte Melatoninrhythmik auf. Zudem koinzidieren bei Typ2-diabetischen Patienten und Typ2-diabetischen GK-Ratten erhöhte Plasmainsulinkonzentrationen mit erniedrigten Melatoninkonzentrationen sowie einer gesteigerten Melatoninrezeptorexpression im Pankreas. Gleichzeitig ist die Hormonsekretion sowohl von Insulin als auch Glukagon und Somatostatin unter einem Diabetes verändert.

Zur Klärung dieser Zusammenhänge basiert der zweite Teil dieser Arbeit auf Untersuchungen an primärem humanen Pankreasgewebe und Langerhansschen Inseln:

- Zunächst wurde immunhistochemisch der Zelltyp-spezifische Nachweis der beiden Melatoninrezeptor-Isoformen im humanen Pankreas geführt.
- Mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie wurde konsekutiv die Rezeptordichte von MT1 und MT2 in β -, α - und δ -Zellen bestimmt und ihre Veränderungen in humanen pankreatischem Gewebe Typ2-diabetischer Patienten untersucht.
- Unter besonderer Berücksichtigung der pankreatischen δ -Zelle wurde anschließend der Einfluss von Melatonin auf die Somatostatinsekretion in der humanen Langerhansschen Insel eines nicht-diabetischen und eines Typ2-diabetischen Patienten untersucht.

Die Ergebnisse dieser Arbeit sollen zum besseren Verständnis der Wirkungsweise von Melatonin auf die Hormonsekretion der pankreatischen Insel, unter besonderer Berücksichtigung der pankreatischen δ -Zelle, beitragen und damit Erklärungsansätze bieten, warum Störungen der inneren Uhr mit einem höheren Risiko für T2DM einhergehen können. So müssen bei den bisher untersuchten Einflüssen von Melatonin auf die pankreatische Insulin- und Glukagonsekretion auch mögliche modulierende Aspekte durch Melatonin auf die Somatostatinsekretion berücksichtigt werden, da für die Aufrechterhaltung der Blutglucosekonzentration alle drei Zelltypen verantwortlich sind.

2 Material

2.1 Feinchemikalien und Reagenzien

Agarose	Promega GmbH, Mannheim, Deutschland
Ampicillin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Aprotinin	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Bacto™-Agarose	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland
Bacto™-Trypton	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland
Bacto™-Yeast Extract	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland
BenchTop 100 bp DNA Ladder	Promega GmbH, Mannheim, Deutschland
bovines Serumalbumin (BSA)	Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
8-Br-cAMP (<i>8-Bromoadenosine 3',5'-cyclic monophosphate</i>)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
8-Br-cGMP (<i>8-Bromoguanosine 3',5'-cyclic monophosphate</i>)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Chloroform	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
D(+)-Glucose	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
D(+)-Glucoselösung (10%, steril)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Dinatriumphosphat-Dihydrat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
<i>Dulbecco's phosphate buffered saline</i> (DPBS)	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
Entellan®	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Esel-Normalserum	Dianova GmbH, Hamburg, Deutschland
Ethanol	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
EvaGreen®	Biotium, Hayward, CA, USA
fetales Kälberserum (FKS)	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Formaldehyd	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Formamid	Promega GmbH, Mannheim, Deutschland
FuGENE® HD	Promega GmbH, Mannheim, Deutschland
GelRed®	Biotium, Hayward, CA, USA
Gibco® CMRL (<i>Connaught Medical Research Laboratories</i>)-Medium	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
Glutaraldehyd	Agar Scientific Ltd. Plano GmbH, Wetzlar, Deutschland
Glycerin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
HEPES(2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure)-Puffer	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Histo-Clear II	National Diagnostics, Atlanta, GA, USA
Hoechst 33342	Invitrogen AG, Carlsbad, CA, USA
IBMX	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Isopropanol	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Kaliumhexacyanidoferrat(III) ($\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland

Kaliumhexacyanidoferrat(II)- Trihydrat ($K_4[Fe(CN)_6] \times 3H_2O$)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
L-Glutamin	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Luzindol	Biotrend Chemicals AG, Wangen, Schweiz
Magnesiumchlorid ($MgCl_2$)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Melatonin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
MOPS (3-(N-Morpholino)- propansulfonsäure)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Mowiol® 4-88	Calbiochem, Darmstadt, Deutschland
Natriumacetat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Natriumchlorid (NaCl)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Natriumcitrat	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Natriumhydrogencarbonat	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Natriumhydroxid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Natriumpyruvat	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Nuklease-freies Wasser	Promega GmbH, Mannheim, Deutschland
Paraformaldehyd (PFA)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
PBS (<i>Phosphate buffered saline</i>)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
PCR-Mastermix	Promega GmbH, Mannheim, Deutschland
Penicillin	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
PeqGOLD TriFast™	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
Poly-L-Lysin	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
4-P-PDOT	Biotrend Chemicals AG, Wangen, Schweiz
RNAlater™	Ambion by Life Technologies, Austin, TX, USA
RPMI (<i>Roswell Park Memorial Institute</i>) 1640-Medium	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
RPMI 1640-Medium ohne Glc	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen, Deutschland
Salzsäure	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Streptomycin	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
TRIS	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen, Deutschland
Triton X-100	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen, Deutschland
Trypsin	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
X-Gal (5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- β-D-galaktopyranosid)	Promega GmbH, Mannheim, Deutschland
Xylol	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Ziege-Normalserum	Dianova GmbH, Hamburg, Deutschland
Zitronensäure	Serva Feinbiochemica GmbH & Co. KG, Heidelberg, Deutschland

Melatonin (50 mM) wurde mit Minimalmengen von absolutem Ethanol angelöst. 8-Br-cAMP (100 mM) und 8-Br-cGMP (100 mM) wurden in destilliertem Wasser gelöst. Die Stammlösungen von IBMX (50 mM), 4-P-PDOT (5 mM) und Luzindol (5 mM) wurden mit absolutem Ethanol hergestellt. Um die gewünschten Endkonzentrationen zu erreichen, wurden die Stammlösungen mit destilliertem Wasser verdünnt und bis zum Zeitpunkt des Versuchs bei -20°C gelagert. Die Lösung von Aprotinin (100 µg/ml) erfolgte in destilliertem Wasser. Für die Herstellung von RPMI 1640 ohne Glucose wurde das pulverförmige Medium in 1 l Aqua dest gelöst und mit 2 g Natriumhydrogencarbonat versetzt. Entsprechend der

jeweiligen Glucosekonzentration wurde das Medium mit Glucose versetzt und vor Gebrauch steril filtriert.

2.2 Verwendete Kits

β-Galaktosidase-Assay	Promega GmbH, Mannheim, Deutschland
BigDye® Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit	Applied Biosystems by Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
cAMP Biotrak™ EIA System	GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg, Deutschland
cGMP Biotrak™ EIA System	GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg, Deutschland
DNA-free™ Kit	Ambion by Life Technologies, Austin, TX, USA
DNA Quantification Kit	Kamiya Biomedical Company, Seattle, WA, USA
EASY PURE DNA Purification Kit	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, Deutschland
EndoFree® Plasmid Purification Maxi Kit	QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland
Reverse Transcription System	Promega GmbH, Mannheim, Deutschland
Somatostatin RIA	IBL International GmbH, Hamburg, Deutschland

2.3 Zubehör und Geräte

Autoklav Systec Dx-45	Systec GmbH, Linden, Deutschland
CO ₂ -Inkubator HERAccl® 150	Heraeus Holding GmbH, Hanau, Deutschland
Deckgläser	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Deckgläschen	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
Elektrophoresekammer	Biometra GmbH, Göttingen, Deutschland
Agagel Maxi	
Fluoreszenzmikroskop	Keyence Deutschland GmbH, Neu-Isenburg, Deutschland
BZ-8100 Biozero	
γ-Counter Gamma C12	DPC Biermann, Bad Nauheim, Deutschland
Geldokumentationssystem	LTF Labortechnik, Wasserburg, Deutschland
CN 2000W	
Gewebehomogenisator	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
Precellys® 24	
Laser-Scanning-Mikroskop	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland
Leica TCS SP5	
Lichtmikroskop Olympus CK 2	Olympus Optical Co., Ltd., Tokio, Japan
Magnetrührer MR 3001	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach, Deutschland
	Heraeus Holding GmbH, Hanau, Deutschland
Mikrobiologische Sicherheitswerkbank HERAsafe® HS12	
Mikroplatten-Reader	BioTek Instruments Inc., Winooski, VT, USA
Synergy™ Mx	
Mikrotom HM 400 R	MICROM Laborgeräte GmbH, Walldorf, Deutschland
Neubauer Hämozytometer	Brand GmbH & CO KG, Wertheim, Deutschland
Nunc™ Zellkulturplatten	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
PCR-Tubes	LTF Labortechnik GmbH & Co. KG, Wasserburg, Deutschland
Polystyrol-Reagenzröhrchen	Dr. Ilona Schubert Laborfachhandel, Leipzig, Deutschland

<i>Real-time</i> PCR-Cycler Rotor-Gene™ 6000	Corbett Research, Mortlake, NSW, Australien
Reinstwasseranlage EASYpure RF	Barnstaed/Thermolyne, Dubuque, IA, USA
Rotations-Vakuum-Konzentrator SpeedVac RVC 2-18 CDplus	Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH, Osterode, Deutschland
Schüttelinkubator KS 15A/ TH15	Edmund Bühler, Hechingen, Deutschland
Spannungsgerät Standard Power Pack P25	Biometra GmbH, Göttingen, Deutschland
Spektrophotometer NanoVue™ Plus	GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg, Deutschland
Sterilisator	Memmert GmbH & Co. KG, Schwabach, Deutschland
Objektträger Menzel-Gläser SuperFrost® Plus	Gerhard Menzel B.V. & Co. KG, Braunschweig, Deutschland
Objektträger StarFrost®	Engelbrecht Medizin- und Labortechnik GmbH, Edermünde, Deutschland
pH-Meter 765	Knick Elektronische Messgeräte GmbH & Co. KG, Berlin, Deutschland
Thermomixer ThermoStat plus	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Ultraschallgerät Sonopuls mini20	BANDELIN electronic GmbH & Co. KG, Berlin, Deutschland
Vortexer Vortex Genie 2	Scientific Industries Inc., New York, NY, USA
Wärmeschrank	Binder GmbH, Tuttlingen, Deutschland
Wasserbad W12	Labortechnik Medingen, Arnsdorf, Deutschland
Zellkulturflaschen	TPP Techno Plastic Products AG, Trasadingen, Schweiz
Zellkulturtestplatten	TPP Techno Plastic Products AG, Trasadingen, Schweiz
Zentrifugen	
Biofuge® primo	Heraeus Holding GmbH, Hanau, Deutschland
Biofuge® primo R	Heraeus Holding GmbH, Hanau, Deutschland
5415 D	Eppendorf AG, Hamburg Deutschland
Multifuge® 4KR	Heraeus Holding GmbH, Hanau, Deutschland

2.4 Analysensoftware

Bio1D	Vilber Lourmat Deutschland GmbH, Eberhardzell, Deutschland
BZ-Analyzer	Keyence Deutschland GmbH, Neu-Isenburg, Deutschland
Fiji (Fiji is just ImageJ)	<i>open source image processing program</i>
GraphPad Prism5	GraphPad Software, San Diego, CA, USA
<i>Nucleotide Basic Local Alignment Search Tool (BLASTN)</i>	National Center for Biotechnology Information (NCBI), Rockville Pike, Bethesda, MD, USA
Primer3Plus	<i>free software, web-interface (A. Untergasser, H. Nijveen)</i>
Rotor-Gene™ 6000 Series Software 1.7	Corbett Research, Mortlake, NSW, Australien

3 Methoden

3.1 Zellen und Gewebe

3.1.1 Die humane δ -Zelllinie QGP-1

Zur Durchführung der Versuche wurde die Somatostatin-produzierende humane Somatostatinoma-Zelllinie QGP-1 genutzt, welche freundlicherweise von Frau PD Dr. Kerstin Hill (Rudolf-Boehm-Institut für Pharmakologie und Toxikologie, Medizinische Fakultät, Universität Leipzig) zur Verfügung gestellt wurde. Diese Zelllinie wurde 1980 von Kaku et al. [181] aus einem pankreatischen Somatostatinom eines 61 Jahre alten Mannes isoliert.

Die Kultivierung der QGP-1-Zellen erfolgte im Inkubator bei 37°C, 95% Luftfeuchtigkeit und 5% CO₂ im Kulturmedium RPMI 1640. Dem Medium wurden 10% FKS, 10 mM HEPES-Puffer, 2 mM L-Glutamin, 1 mM Natriumpyruvat, 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin zugesetzt. Zweimal wöchentlich erfolgte eine 1:3-Passage, indem die Zellen mit Trypsin von der Zellkulturflasche abgelöst und 7 min bei 150 x g und Raumtemperatur zentrifugiert wurden. Das entstandene Zellpellet wurde in frischem Medium resuspendiert und auf 25 cm² große Zellkulturflaschen aufgeteilt. Für die Versuche wurden die Zellen in einem Neubauer Hämocytometer unter dem Lichtmikroskop ausgezählt und in Zellkulturplatten ausplattiert. Im Rahmen dieser Arbeit fanden QGP-1-Zellen der 6. bis 34. Passage Verwendung.

Für Stimulationsversuche wurden 2 x 10⁵ Zellen pro *well* in 24-*well*-Zellkulturplatten ausgesät und für 24 h unter Standardbedingungen inkubiert, sodass eine Konfluenz der Zellen zwischen 60% und 80% erreicht wurde. Anschließend wurden die Zellen unter Zugabe verschiedener Testsubstanzen (Melatonin, IBMX, 8-Br-cAMP, 8-Br-cGMP) für 1 h, 4 h oder 6 h in frischem RPMI 1640-Medium (11,1 mM Glc), versetzt mit 10 mM HEPES-Puffer, 2 mM L-Glutamin und 1 mM Natriumpyruvat unter Standardbedingungen inkubiert. Der Einfluss der Melatoninrezeptorantagonisten wurde zudem durch eine 30-minütige Vorinkubation mit Luzindol (100 nM) bzw. 4-P-PDOT (100 nM) untersucht. Anschließend erfolgte in diesem Versuchsansatz eine Koinkubation mit 1 nM Melatonin. Für die Glucoseversuche wurde RPMI 1640-Medium ohne Glucose entsprechend mit verschiedenen Glucosekonzentrationen versetzt und anschließend steril filtriert. Die Zellen wurden für 30 min in RPMI 1640 mit 1 mM Glucose vorinkubiert und anschließend mit 1 nM Melatonin und Glucosekonzentrationen zwischen 1 mM und 20 mM koinkubiert. Am Ende der Stimulationszeit wurde der Überstand abgenommen, mit Aprotinin (2 µg/ml) versetzt und bis zur Bestimmung des Somatostatingehaltes bei -80°C gelagert. Für die Analyse der Zellpellets wurden die Zellen mit DPBS gewaschen und mit Trypsin abgelöst. Nach Zentrifugation bei 16 000 x g und erneutem Waschen mit DPBS wurden die Zellen bei -80°C gelagert.

3.1.2 Humane Langerhanssche Inseln

Über die Firma Prodo Laboratories, Inc. (Irvine, CA, USA; vertrieben durch tebu-bio GmbH, Offenbach, Deutschland) können zentral primäre humane Langerhanssche Inseln für Forschungszwecke erworben werden. Diese sogenannten Human Islets for Research (HIR™) werden frisch aus Pankreata von Organspendern isoliert, welche für Forschungszwecke jedoch nicht für eine klinische Transplantation des Pankreas bzw. der isolierten Inseln freigegeben sind. Nach der Isolation werden die Inseln für 2 bis 3 Tage in Kultur gehalten, um eine hohe Qualität der Inseln sicherzustellen. Zudem wird jede Inselseparation vor dem Versand verschiedenen Qualitätskontrollen unterzogen.

Nach Ankunft der Inseln wurden diese für 7 min bei 300 x g zentrifugiert und das Pellet in CMRL-Kulturmedium resuspendiert. Dem Medium wurden 10% FKS, 10 mM HEPES-Puffer, 2 mM L-Glutamin, 1 mM Natriumpyruvat, 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin zugesetzt. Anschließend wurden die Inseln auf zwei 24-*well*-Zellkulturplatten mit ca. 20 Inseln pro *well* verteilt und über Nacht im Inkubator bei 37°C, 95% Luftfeuchtigkeit und 5% CO₂ kultiviert. Für den Versuch wurden die Inseln in CMRL-Medium, versetzt mit 10 mM HEPES-Puffer, 2 mM L-Glutamin und 1 mM Natriumpyruvat, mit zwei verschiedenen Glucose- (5,5 und 11,1 mM) und steigenden Melatoninkonzentrationen zwischen 100 pM und 100 nM für jeweils 4 h inkubiert. Die Glucosekonzentration von 5,5 mM ergab sich entsprechend dem vorgegebenen Gehalt im CMRL-Medium und liegt damit im normoglykämischen Blutglucosebereich. Unter Zusatz einer sterilen Glucoselösung wurde die Konzentration auf 11,1 mM erhöht. Diese Konzentration wurde entsprechend der Glucosekonzentration des Zellkultur-Standardmediums RPMI 1640 gewählt und entspricht einer hyperglykämischen Stoffwechsellage. Anschließend wurde das Medium abgenommen, mit Aprotinin (2 µg/ml) versetzt und bei -80°C gelagert. Die Inseln wurden mit DPBS gewaschen und mit Trypsin für 10 min unter Schütteln von der Platte gelöst. Nach Abstoppen der Reaktion mit Medium wurden die Inseln für 7 min bei 10 000 x g zentrifugiert, das Pellet mit DPBS gewaschen und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

Um den Einfluss von Melatonin auf die Somatostatinsekretion in Typ2-diabetischen und nicht-diabetischen pankreatischen Inseln zu vergleichen, wurden im Rahmen dieser Doktorarbeit isolierte primäre Inseln zweier Organspender männlichen Geschlechts untersucht, wobei ein Organspender seit 9 Jahren als Typ2-Diabetiker bekannt war, der ausschließlich über eine diätetische Therapie behandelt wurde. Wichtige klinische Parameter der beiden Organspender sind in Tabelle 13 (Anhang, S. XIII) zusammengefasst.

3.1.3 Humanes Pankreasgewebe

Für die Untersuchungen im Rahmen dieser Doktorarbeit stand humanes Pankreasgewebe zur Verfügung. Dieses Gewebe stammte von Patienten, die in der Universitätsklinik für

Allgemein-, Viszeral- und Gefäßchirurgie Halle (Saale) aufgrund von gut- und bösartigen pankreatischen Tumoren oder Tumoren der Papilla Vateri, einem Magen- oder Gallengangskarzinom bzw. einer akuten oder chronischen Pankreatitis eine partielle oder totale Pankreatektomie erhielten. Es handelte sich um Operationsmaterial der histologischen Befunderhebung durch das Institut für Pathologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg. Hierbei wurde tumorfrees Operationsmaterial direkt nach der Resektion konserviert und asserviert. Ein Teil des Gewebes wurde in RNA^{later}[™] bei -20°C aufbewahrt und für molekularbiologische Untersuchungen zur RNA-Extraktion genutzt. Ein anderer Teil wurde für 24 h in 4%igem PFA in 0,1 M PBS fixiert, anschließend in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert und nach Standardmethoden in Paraffin eingebettet [108]. Die Studie unterlag der Genehmigung durch die Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg. Angaben zu Geschlecht, Alter, Diagnose, Glucosestoffwechselsituation und Morphologie des Gewebes waren anhand von Patientenakten ersichtlich.

Im Rahmen dieser Arbeit erfolgte eine Analyse zur Genexpression der pankreatischen Hormone sowie eine immunhistochemische Analyse zum Vorkommen der Melatoninrezeptoren in den spezifischen Zelltypen der Langerhansschen Inseln Typ2-diabetischer und nicht-diabetischer Patienten. Für die molekularbiologischen Untersuchungen wurden 14 männliche und 15 weibliche Patienten zwischen 28 und 78 Jahren ausgewertet. 7 der untersuchten Patienten hatten einen Typ2-Diabetes (5 Männer, 2 Frauen). Das mittlere Alter der nicht-diabetischen Patienten betrug 58 Jahre, das der Typ2-diabetischen Patienten 63 Jahre. Für die immunhistochemische Untersuchung wurde ein Teil der Patienten nach Alter und Diagnose ausgewählt (Tabelle 14 im Anhang, S. XIII).

3.1.4 Isolierte humane RNA

Zur Standardisierung der Patientenproben, aber auch als Positivkontrolle bei den molekularbiologischen Untersuchungen, diente isolierte, DNase-behandelte RNA extrahiert aus unauffälligem, humanem Pankreasgewebe, verfügbar über die Firma Ambion® (Austin, TX, USA). Als weitere Kontrollen standen isolierte und DNase-behandelte Gesamt-RNA aus pankreatischen Inselzellen eines gesunden Pankreas der Firma System Bioscience (Mountain View, CA, USA) sowie RNA isoliert aus einer humanen Skelettmuskelprobe, einem Pinealom und der humanen Neuroblastomzelllinie SH-SY5Y, subkloniert aus der Zelllinie SK-N-SH [182], zur Verfügung.

3.2 Transiente Transfektion

3.2.1 Plasmide

Das Plasmidkonstrukt pT-REx-DEST30 (Abb. 21 und Tabelle 10, Anhang S. X) enthielt die cDNA des humanen MT1 (NM_005958.3, *Homo sapiens melatonin receptor 1A (MTNR1A)*)

und wurde als Expressionsklon OCABo5050D0459D-pT-REx-DEST30 (hMT1; Source BioScience, Cambridge, UK) in *Escherichia coli* (E. coli) DH10B kommerziell erworben. Weiterhin wurden im Rahmen dieser Arbeit das bereits existierende Plasmidkonstrukt pT-REx-DEST30 mit der cDNA des humanen MT2 (NM_005959, *Homo sapiens melatonin receptor 1B (MTNR1B)*), welches als Expressionsklon IMGXo8341A0947-pT-REx-DEST30 (hMT2; imaGenes GmbH, Berlin, Deutschland) in E. coli DH10B erworben wurde, genutzt. Als Kontrollplasmid lag eine Deletionsvariante des hMT2-Plasmids vor, in dem durch ein Restriktionsverdau die cDNA des MT2 fast vollständig entfernt wurde [134]. Der Expressionsvektor pCMV-LacZ (Abb. 22 und Tabelle 11, Anhang S. XI) diente als Referenzplasmid für die Optimierung des Transfektionsprotokolls sowie der Kontrolle zur Überprüfung der Transfektion in den Experimenten.

3.2.2 Plasmidextraktion aus E. coli

Für die Vermehrung der kompetenten E. coli und die anschließende Plasmidextraktion wurde die Bakterienkultur mit einer sterilen Impföse auf *Lysogeny broth*(LB)-Agarplatten (LB-Medium + 15 g/l Bacto™-Agarose + 100 µg/ml Ampicillin) ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Für die Vorkultur wurden 2 ml LB-Medium (mit 100 µg/ml Ampicillin) mit einer Kolonie der selektiven Ampicillin-Platte angeimpft und für 8 h im Schüttelinkubator bei 37°C und 300 rpm inkubiert. Anschließend wurden 100 µl der Vorkultur in 100 ml LB-Medium (mit 100 µg/ml Ampicillin) übertragen und für 14 h bei 37°C geschüttelt. Nach der Inkubation wurden die Zellen durch Zentrifugation (6000 x g, 4°C, 15 min) für die Plasmidextraktion mit dem EndoFree® Plasmid Purification Maxi Kit geerntet. Das Zellpellet wurde in 10 ml Resuspendierungspuffer (mit 100 µg/ml RNase) gelöst. Nach der Zugabe von 10 ml Lysispuffer und sorgfältigem Mischen per Hand erfolgte eine Inkubation für 5 min bei Raumtemperatur. Anschließend wurden 10 ml des eiskalten Neutralisationspuffers zugegeben, erneut gemischt und das Lysat in eine QIAfilter-Patrone des Kits überführt. Nach 10 min wurde das Zelllysate in ein neues Reaktionsgefäß gefiltert. Um das Binden von Endotoxinen an die beschichtete Säule (QIAGEN-tip 500) zur Aufreinigung der Plasmid-DNA zu verhindern, erfolgte der Zusatz von 2,5 ml ER-Puffer und eine 30-minütige Inkubation auf Eis. Währenddessen wurde die Säule mit 10 ml QBT-Puffer äquilibriert. Das gefilterte Lysat wurde auf die vorbereitete Säule übertragen. Nach zweimaligem Waschen der Säule mit je 30 ml Waschpuffer (QC) wurde die DNA mit 15 ml QN-Puffer von der Säule eluiert, anschließend mit 10,5 ml Isopropanol gefällt und 30 min bei 15 000 x g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und das DNA-Pellet mit 5 ml 70% Ethanol gewaschen. Nach der erneuten Zentrifugation bei 15 000 x g für 10 min wurde das getrocknete Pellet in 500 µl TE-Puffer (10 mM TRIS, 1 mM EDTA; pH 8,0) gelöst. Die Konzentration wurde am Spektrophotometer gemessen.

<u>LB-Medium (pH 7,5):</u>	10 g Bacto™-Trypton
	5 g Bacto™-Yeast Extract
	10 g NaCl
	1 l Aqua dest
	pH 7,5
	Autoklavieren für 20 min bei 121°C

3.2.3 Transfektion von QGP-1-Zellen

FuGENE® HD ist ein nicht-liposomales Transfektionsreagenz, um DNA mit einer hohen Effizienz und geringen Toxizität in verschiedene Zelllinien einzubringen.

Für die transiente Transfektion wurden 1×10^5 Zellen pro *well* in eine 24-*well*-Platte ausgesät. Nach 24-stündiger Inkubation unter Standardbedingungen hatten die Zellen eine 70%ige Konfluenz erreicht und wurden mit 1 µg Plasmid-DNA (je 0,5 µg pCMV-LacZ und pT-REx-DEST30-Plasmidkonstrukte) transfiziert. Dazu wurden 50 µl RPMI 1640-Medium, unter Zugabe von HEPES-Puffer (10 mM), L-Glutamin (2 mM) und Natriumpyruvat (1 mM), mit 1 µg DNA versetzt und FuGENE im Verhältnis 1:5 zugegeben. Dieses Verhältnis ergab sich aus Optimierungsversuchen mit dem Plasmid pCMV-LacZ. In diesen Vorversuchen konnte die höchste β -Galaktosidase-Aktivität (siehe Abschnitt 3.2.4.2) unter einem DNA zu FuGENE-Verhältnis von 1:5 beobachtet werden. Daher wurde dieses Verhältnis für die transienten Transfektionsversuche zur Rezeptorüberexpression eingesetzt. Nach 15-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde der Komplex tropfenweise auf die Zellen gegeben. Um eine transiente Expression der transfizierten Rezeptor-DNA zu ermöglichen, wurden die Zellen für weitere 48 h unter Standardbedingungen inkubiert. Die derart transfizierten QGP-1-Zellen wurden dann für Stimulationsversuche mit verschiedenen Melatoninkonzentrationen (1 nM, 100 nM, 10 µM) für 4 h verwendet. Am Ende der Stimulationszeit wurde der Überstand abgenommen, mit Aprotinin (2 µg/ml) versetzt und bis zur Bestimmung des Somatostatingehaltes bei -80°C gelagert. Die Zellen wurden mit DPBS gewaschen und entweder mit Trypsin abgelöst und für molekularbiologische Untersuchungen nach Zentrifugation bei 16 000 x g und erneutem Waschen mit DPBS bei -80°C gelagert oder für den β -Galaktosidase-Nachweis genutzt. Da das Transfektionsreagenz FuGENE®HD Ethanol enthält, wurden QGP-1-Zellen, versetzt mit Ethanol, als Kontrollen mitgeführt, um eine Zytotoxizität des Transfektionsreagenz auszuschließen.

3.2.4 β -Galaktosidase-Assay

Um die Transfektionseffizienz in den QGP-1-Zellen zu testen, wurde das Plasmid pCMV-LacZ in die Zellen kotransfiziert. Das Plasmid trägt als Reportergen das bakterielle *lacZ*-Gen, das für das Enzym β -Galaktosidase codiert. Durch die Aufnahme des Plasmids kommt es in den QGP-1-Zellen zur Expression des bakteriellen Enzyms, welches sich qualitativ und quantitativ nachweisen lässt.

3.2.4.1 Qualitativer β -Galaktosidase-Nachweis

Mittels der *in situ*-Färbung lässt sich die β -Galaktosidase-Aktivität in den transfizierten Zellen mikroskopisch darstellen. Nach der Spaltung des chromogenen Substrats X-Gal (5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- β -D-galaktopyranosid) in Galaktose und 5-Brom-4-chlor-3-hydroxyindol entsteht durch Oxidation 5,5'-Dibrom-4,4'-dichlor-indigo, das sich als blaues Präzipitat in den Zellen nachweisen lässt [183].

Hierfür wurden 1×10^5 Zellen pro *well* in eine 24-*well*-Platte mit Poly-L-Lysin beschichteten Deckgläsern ausgesät. Nach 24-stündiger Inkubation unter Standardbedingungen hatten die Zellen eine 70%ige Konfluenz erreicht und wurden wie oben beschrieben transfiziert. Als Kontrolle dienten hierbei Zellen, die mit der entsprechenden Menge Ethanol behandelt wurden, da das Transfektionsreagenz in 80%igen Ethanol gelöst ist. Um eine transiente Expression der β -Galaktosidase zu ermöglichen, wurden die Zellen für weitere 48 h unter Standardbedingungen inkubiert. Anschließend wurde das Medium entfernt und die Zellen mit DPBS gewaschen. Die Fixierung der Zellen erfolgte durch Zugabe von 500 μ l einer 0,25%igen Glutaraldehydlösung (in DPBS) für 15 min. Danach wurden die Zellen dreimal mit DPBS gewaschen und für 1 h bei 37°C im Inkubator mit 300 μ l der X-Gal-Lösung inkubiert. Anschließend wurden die Plättchen mit Entellan® eingedeckt und mit dem Mikroskop ausgewertet (Abb. 3).

X-Gal-Lösung in DPBS: 0,2% X-Gal (50 mg/ml in Dimethylformamid)
2 mM $MgCl_2$
5 mM $K_4[Fe(CN)_6] \times 3H_2O$
5 mM $K_3[Fe(CN)_6]$



Abb. 3: Qualitativer β -Galaktosidase-Nachweis nach *in situ*-Färbung der mit pCMV-LacZ transfizierten QGP-1-Zellen mit X-Gal.

Die mit Ethanol behandelten Kontrollzellen wiesen keine β -Galaktosidase-Aktivität auf (A), während die mit pCMV-LacZ transfizierten Zellen eine blaue Färbung 48 h nach der Transfektion zeigten (B, C). (C) zeigt eine Vergrößerung von (B).

3.2.4.2 Quantitativer β -Galaktosidase-Nachweis

Die Enzymaktivität wurde mit Hilfe des β -Galaktosidase-Assays quantitativ bestimmt. Das Enzym spaltet das Laktoseanalogon *o*-Nitrophenyl- β -D-galactopyranosid in Galaktose und das gelbgefärbte *o*-Nitrophenol. Der Farbumschlag kann photometrisch bestimmt werden.

Dabei spiegelt die Intensität des Farbumschlags die enzymatische Aktivität und somit auch die relative Transfektionseffizienz wider.

Hierfür wurden die Zellen mit DPBS gewaschen und durch Zugabe von 100 µl Reporter Lysis Puffer lysiert. Nach 15 min konnte das Zelllysate abgelöst werden. Anschließend wurde das Lysat für 2 min bei 15 000 x g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde direkt in dem Enzym-Assay eingesetzt. Eine Standardreihe wurde durch Verdünnung einer definierten β-Galaktosidasekonzentration mit dem Reporter Lysis Puffer hergestellt. 50 µl der Verdünnungsstufen bzw. 50 µl Zellextrakt wurden mit 50 µl Assay Puffer versetzt und 1 h bei 37°C inkubiert. Die Farbentwicklung wurde durch die Zugabe von 150 µl 1 M Natriumcarbonat abgestoppt und die Extinktion bei 420 nm im Mikroplatten-Reader gemessen.

3.3 Molekularbiologische Methoden

3.3.1 RNA-Isolierung

Die Isolierung der Gesamt-RNA aus den QGP-1-Zellen erfolgte mittels einer Phenol-Chloroform-Extraktion. Um eine Degradation der RNA durch ubiquitär vorkommende RNasen zu verhindern, wurde mit Nuklease-freiem Wasser und autoklavierten Materialien gearbeitet. Zellpellets wurden unter Zugabe von 500 µl PeqGOLD TriFast™ mit Hilfe kleiner Keramikkügelchen im Gewebehomogenisator für 15 s bei 5000 rpm mechanisch homogenisiert. Um die Dissoziation der Nukleotidkomplexe zu gewährleisten, wurden die Proben für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde 100 µl eiskaltes Chloroform zugegeben und die Proben durch mehrmaliges Schwenken gemischt. Nach einer Inkubationszeit von 2 min folgte eine Zentrifugation bei 10 000 x g und 4°C für 15 min, um eine Phasentrennung von RNA, DNA und Protein zu erzielen. Die obere wässrige Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und für die Präzipitation mit 250 µl Isopropanol versetzt. Nach einer 10-minütigen Inkubation bei Raumtemperatur erfolgte ein weiterer 15-minütiger Zentrifugationsschritt bei 10 000 x g und 4°C. Der Überstand wurde dekantiert und die RNA mit 500 µl 70%igen Ethanol gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation für 10 min wurde der Überstand abgenommen und das RNA-Pellet unter dem Abzug getrocknet. Die Resuspension erfolgte in Nuklease-freiem Wasser über Nacht bei 4°C. Um die RNA-Konzentration zu bestimmen, wurde die Absorption (A) spektrophotometrisch bei einer Wellenlänge (λ) von 260 nm gemessen. Eine optische Dichte von 1,0 entspricht hierbei einer RNA-Konzentration von 40 µg/ml, woraus sich folgende Formel für die Konzentrationsberechnung (c) ergibt:

$$c [\mu\text{g/ml}] = A_{260} \times 40$$

Zur Einschätzung der Reinheit der RNA-Präparation wurde zudem das Verhältnis der optischen Dichte der Nukleinsäuren (λ = 260 nm) zur optischen Dichte von Proteinen (λ = 280 nm) bestimmt. Das Verhältnis sollte hierbei in einem Bereich zwischen 1,8 und 2,0 liegen. Die Lagerung der gelösten RNA erfolgte bei -80°C.

Die Integrität der extrahierten RNA wurde stichprobenartig mittels der Agarosegelelektrophorese überprüft. Um die Ausbildung von Sekundärstrukturen durch intramolekulare Basenpaarung der einzelsträngigen RNA zu verhindern, wurde unter denaturierenden Bedingungen gearbeitet. Bei intakter eukaryotischer RNA sind nach Auftrennung zwei Banden der ribosomalen RNA (rRNA) im Gel sichtbar, die als 28S und 18S rRNA bezeichnet werden.

Tabelle 1: Reagenzien für die RNA-Agarosegelelektrophorese

Reagenz	Ansatz
Agarosegel (1,5%)	0,84 g Agarose, 46,2 ml Aqua dest, 6,44 ml 10 x MOPS-Puffer, 1,82 ml 37%iges Formaldehyd, 5,5 µl GelRed®
RNA-Probe	3 µl RNA, 3 µl Nuklease-freies Wasser, 2,5 µl 10 x MOPS-Puffer, 12 µl Formamid, 4 µl Formaldehyd, 4 µl Probenpuffer

Für die Herstellung des Agarosegels wurde Agarose mit Aqua dest unter Hitze gelöst, anschließend mit 10 x MOPS-Puffer, Formaldehyd sowie GelRed® versetzt und in den mit Kamm vorbereiteten Gelschlitten gegossen. Nach dem Aushärten wurde das Gel mit 1 x MOPS-Puffer bedeckt. Vor dem Probenauftrag wurde die RNA für 15 min bei 55°C denaturiert und nach kurzem Abkühlen mit Probenpuffer versetzt (Tabelle 1). Die Auftrennung der Proben erfolgte bei einer Spannung von 80 V. Durch Interkalation des Nukleinsäurefarbstoffes GelRed® zwischen die Basen der RNA wird die Detektion der Banden mittels eines UV-Dokumentationssystems und dazugehöriger Software ermöglicht.

<u>10 x MOPS-Puffer:</u>	200 mM MOPS 50 mM Natriumacetat 10 mM EDTA pH 7,0 ad 1 l DEPC-Wasser	<u>DEPC-Wasser:</u>	0,1% DEPC 24 h bei 37°C Autoklavieren
--------------------------	---	---------------------	---

Probenpuffer: 1,5 ml 0,25 M EDTA (pH 8,0)
2 ml Glycerin
0,4 ml 0,5% Bromphenolblau

3.3.2 DNase-Verdau

Zur Entfernung einer möglichen DNA-Kontamination der RNA-Präparation erfolgte vor der cDNA-Synthese eine DNase-Behandlung der Proben unter Verwendung des DNA-free™ Kits. Mittels der rekombinanten DNase I wird die vorhandene DNA verdaut und anschließend werden bivalente Kationen, wie Magnesium und Calcium entfernt, um eine RNA-Degradation bei Erhitzung zu verhindern.

Zu 20 µl RNA wurden 2 µl 10 x DNase I-Puffer und 0,2 µl Enzym gegeben und für 25 min bei 37°C inkubiert. Durch die Zugabe von 2 µl des DNase Inaktivierungsreagenz und einer Inkubation von 2 min bei Raumtemperatur wurde die Reaktion gestoppt und die DNase inaktiviert. Nach einer Zentrifugation von 2 min bei 16 000 x g wurde der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

3.3.3 Reverse Transkription

Für das selektive Umschreiben der isolierten einzelsträngigen mRNA in die komplementäre DNA (cDNA) wird das Verfahren der Reversen Transkription mit Hilfe des Enzyms AMV Reverse Transcriptase (Reverse Transcription System) genutzt. Pro Syntheseansatz wurden 1 µg RNA in einem Gesamtvolumen von 10 µl eingesetzt. Die mit Nuklease-freiem Wasser verdünnten Proben wurden für 10 min bei 70°C im Thermomixer inkubiert, um Sekundärstrukturen zu denaturieren. Anschließend wurden 10 µl des in Tabelle 2 beschriebenen Mastermix zugesetzt. Die Synthese der cDNA erfolgte im Wasserbad für 1 h bei 37°C. Um das Enzym zu inaktivieren, wurden die Proben im Anschluss für 5 min bei 99°C inkubiert und mit Nuklease-freiem Wasser auf 100 µl aufgefüllt. Bis zur weiteren Verwendung wurde die cDNA bei -20°C gelagert.

Tabelle 2: Reaktionsansatz für die Reverse Transkription

Reagenz	Volumen [µl]
MgCl ₂ (25 mM)	4
Reverse Transkriptase-Puffer (10 x)	2
dNTP-Mix (10 mM)	2
Rekombinanter Ribonuklease-Inhibitor (RNasin)	0,5
Random Primer (0,5 µg/µl)	1
AMV Reverse Transcriptase (30 U/µl)	0,5

3.3.4 Real-time RT-PCR

Mit Hilfe genspezifischer Oligonukleotide (Primer) erfolgt in der Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) die selektive Amplifizierung spezifischer DNA-Abschnitte durch die DNA-Polymerase. Das Prinzip der PCR beruht auf der zyklischen Wiederholung aufeinanderfolgender Reaktionsphasen. Zu Beginn erfolgt eine initiale Denaturierung. In den folgenden Zyklen wird die cDNA zunächst thermisch in ihre Einzelstränge aufgetrennt. Unter Temperaturabsenkung erfolgt eine Anlagerung (*Annealing*) spezifischer Primerpaare an den zu amplifizierenden DNA-Abschnitt. Zur Optimierung der PCR wurde mit einem *Touchdown*-Protokoll gearbeitet. Hierbei liegt die initiale *Annealing*-Temperatur über der zu erwartenden Schmelztemperatur der Primer. Durch eine Verringerung der Temperatur um je 1°C pro Zyklus auf die zu erwartende Schmelztemperatur erhöht sich die Spezifität der

Primerbindung [184]. In der sich anschließenden Elongationsphase wird mit Hilfe der thermostabilen DNA-Polymerase und Desoxyribonukleotiden der definierte DNA-Abschnitt amplifiziert. Durch Wiederholung dieser Reaktionsphasen kommt es zu einer exponentiellen Vermehrung des spezifischen DNA-Abschnittes. Unter Verwendung des Fluoreszenzfarbstoffes EvaGreen® kann die Amplifizierung des PCR-Produktes in Echtzeit verfolgt werden. Der Farbstoff lagert sich unspezifisch in die doppelsträngige DNA und fluoresziert ausschließlich in der Doppelstrangphase. So erfolgt die Quantifizierung des Fluoreszenzsignals am Ende jeder Elongationsphase. Dabei verhält sich die Fluoreszenzintensität proportional zur Menge des gebildeten PCR-Produktes. Der Zeitpunkt an dem das Fluoreszenzsignal einen definierten Schwellenwert übersteigt, stellt den Beginn der exponentiellen Phase der Amplifikation dar und dient der Bestimmung des *Cycle threshold*(C_T)-Wertes. Zur Bestimmung der Produktspezifität wird am Ende des PCR-Laufs durch Temperaturerhöhung eine Schmelzkurve erstellt. Bei Erreichen der spezifischen Schmelztemperatur des Produktes kommt es zur Auftrennung des Doppelstranges und damit zur Abnahme der Fluoreszenzintensität durch Freisetzung des Farbstoffes. Spezifische Produkte weisen hierbei einen höheren Schmelzpunkt auf als unspezifische Produkte bzw. Primerdimere.

Der Ablauf der *real-time* Reverse Transkriptase(RT)-PCR ist in Tabelle 3 beschrieben.

Tabelle 3: Reaktionsbedingungen der *real-time* RT-PCR

Phase	Temperatur	Dauer
Initiale Denaturierung	95°C	120 s
40 Zyklen		
Denaturierung	94°C	30 s
<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
Fluoreszenzmessung	75 - 80°C	15 s
Schmelzkurve	50 - 99°C	5 s/°C

Tabelle 4 zeigt den Reaktionsansatz für die *real-time* RT-PCR. Als Negativkontrolle wurde das Template durch 4 µl Nuklease-freies Wasser ersetzt (*non template control*, NTC). Die verwendeten Primer sind in Tabelle 12 (Anhang, S.XII) aufgeführt. Die Auswertung der PCR erfolgte mit der entsprechenden Gerätesoftware des *real-time Cyclers*. Mit Hilfe der ermittelten C_T -Werte wurde die relative mRNA-Expression der untersuchten Gene nach der $\Delta\Delta C_T$ -Methode [185] berechnet. Für die Normalisierung der Expression wurde β -Actin als konstitutiv exprimiertes Gen verwendet.

Tabelle 4: Reaktionsansatz für die *real-time* RT-PCR

Reagenz	Volumen [μ l]
PCR-Mastermix	10
Nuklease-freies Wasser	4,75
Vorwärtsprimer (25 μ M)	0,5
Rückwärtsprimer (25 μ M)	0,5
EvaGreen®	0,25
<i>Template</i>	4

3.3.5 DNA-Agarosegelelektrophorese

Im Anschluss an die PCR wurde mittels Agarosegelelektrophorese stichprobenartig die Qualität und Spezifität des gebildeten Amplikons überprüft. Hierfür wurden 2,25 g Agarose in 15 ml 10 x MOPS-Puffer und 135 ml Aqua dest unter vorsichtigem Aufkochen gelöst und nach kurzem Abkühlen mit 15 μ l GelRed® versetzt und in den Gelschlitten gegossen. 10 μ l Probe wurden mit 5 μ l Glycerin versetzt und in die Geltaschen pipettiert. Für die Bestimmung der Molekülgröße des PCR-Produktes wurde ein 100 bp DNA-Längenstandard mitgeführt. 5 μ l des Standards wurden mit 5 μ l Nuklease-freiem Wasser und 5 μ l Probenpuffer versetzt. Die Elektrophorese erfolgte bei einer Spannung von 80 V in 1 x MOPS-Puffer. Die Erfassung der Größe des PCR-Produktes erfolgte mittels einer UV-Dokumentationseinrichtung und dazugehöriger Software.

3.3.6 Sequenzierung der PCR-Produkte

3.3.6.1 DNA-Extraktion aus dem Agarosegel

Um die Spezifität der PCR-Produkte zu untersuchen, wurden diese sequenziert. Hierfür erfolgte eine DNA-Extraktion aus dem Agarosegel mittels dem EASY PURE DNA Purification Kit. Die PCR-Bande wurde unter UV-Licht aus dem Gel ausgeschnitten. Das Gelstück wurde anschließend unter Zugabe von 800 μ l Salt Reagenz durch Erhitzen auf 55°C gelöst. Um die DNA zu binden, wurden 10 μ l Bind Reagenz hinzugegeben und für 5 min inkubiert. Das so entstandene Pellet wurde zentrifugiert, der Überstand verworfen und mit 1 ml Wash Reagenz gewaschen. Nach einer erneuten Zentrifugation wurde das DNA-Pellet in 20 μ l Nuklease-freiem Wasser gelöst. Nach einer Inkubation für 5 min erfolgte eine letzte Zentrifugation bei 16 000 x g für 1 min. Der die DNA enthaltende Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß übertragen.

3.3.6.2 Sequenzierungs-PCR

Die Sequenzierung der PCR-Produkte erfolgte im ABI PRISM® 3100 *Genetic Analyzer* durch das Zentrum für Medizinische Grundlagenforschung (Martin-Luther-Universität

Halle-Wittenberg). Hierfür wurde das extrahierte Produkt in einer PCR-Reaktion mit dem BigDye® Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit und dem spezifischen Primer vorbereitet. Der PCR-Ansatz sowie der Ablauf der PCR sind in Tabelle 5 und Tabelle 6 dargestellt. Im Anschluss wurde das PCR-Produkt aufgereinigt. Dafür wurde der Reaktionsansatz mit 1 µl Natriumacetat (3 M, pH 5,2) und 40 µl 96%igen Ethanol versetzt und für 30 min bei 13 000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet zweimal mit 150 µl bzw. 100 µl 70%igen Ethanol gewaschen und erneut für 20 min bzw. 10 min bei 13 000 x g zentrifugiert. Das entstandene Pellet wurde anschließend für 10 min im Rotations-Vakuum-Konzentrator getrocknet und zur Sequenzierung versandt. Die Auswertung der Sequenzen erfolgte mittels *Nucleotide Basic Local Alignment Search Tool* (BLASTN).

Tabelle 5: Reaktionsansatz für die Sequenzierungs-PCR

Reagenz	Volumen [µl]
BigDye® Terminator Sequencing Buffer	1,5
BigDye® Terminator Ready Reaction Mix	2
Vorwärtsprimer (25 µM)	0,5
Nuklease-freies Wasser	4
<i>Template</i>	2

Tabelle 6: Reaktionsbedingungen der Sequenzierungs-PCR

Phase	Temperatur	Dauer
Initiale Denaturierung	96°C	60 s
25 Zyklen		
Denaturierung	96°C	10 s
<i>Annealing</i>	60°C	15 s
Elongation	60°C	240 s

3.4 Somatostatin-Radioimmunoassay

Mittels Radioimmunoassay (Somatostatin RIA-Kit) wurde die Somatostatinkonzentration aus den Inkubationsversuchen mit den QGP-1-Zellen sowie den humanen pankreatischen Inseln im Zellkulturüberstand bestimmt. Die Methode beruht auf einer kompetitiven Bindung von ¹²⁵I-markiertem Somatostatin und Somatostatin der Probe an spezifische Antikörper für Somatostatin-14. Die zu untersuchende Probe wird mit einer definierten Konzentration von ¹²⁵I-markiertem Hormon und einer konstanten Antikörperkonzentration inkubiert. Das unmarkierte Somatostatin der Probe konkurriert hierbei um die Bindungsstellen am spezifischen Antikörper. In einem zweiten Schritt werden über die Bindung eines sekundären Antikörpers die ungebundenen Antigene von den gebundenen durch Präzipitation getrennt.

Anschließend wird die Radioaktivität der Präzipitate im γ -Counter gemessen. Die Radioaktivität verhält sich hierbei umgekehrt proportional zur Antigenkonzentration in der Probe. Je höher die Somatostatinkonzentration in der Probe, desto geringer ist der Anteil an gebundenem ^{125}I -markiertem Hormon und somit auch der gemessenen Radioaktivität in den Pellets. Durch die Mitführung von definierten Standards steigender Konzentration lässt sich anhand einer Standardkurve die Somatostatinkonzentration in den zu untersuchenden Proben bestimmen.

100 μl Probe bzw. Standard wurden in Polystyrol-Reagenzröhrchen pipettiert. Nach Zugabe von 200 μl Kaninchen-Antiserum gegen synthetisches zyklisches Somatostatin und Mischen der Proben erfolgte eine Inkubation für 24 h bei 4°C . Anschließend wurden 200 μl ^{125}I -markiertes Somatostatin hinzugegeben, gemischt und erneut für 24 h bei 4°C inkubiert. Für die Präzipitation erfolgte eine Zugabe von 100 μl Anti-Kaninchen-IgG gekoppelt an Zellulosepartikel. Nach einer Inkubation von 60 min bei 4°C wurden die Proben für 15 min bei $1700 \times g$ und 4°C zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand dekantiert und die Radioaktivität in den verbleibenden Pellets im γ -Counter gemessen. Durch die mitgeführten Standards wurde eine Standardkurve in einem Messbereich zwischen 3,9 pM und 250 pM Somatostatin generiert und die Somatostatinkonzentration der Proben durch Interpolation bestimmt. Um in den Messbereich der Eichreihe zu gelangen wurden die Zellkulturüberstände entsprechend mit dem Puffer des Kits verdünnt.

3.5 Immunzytochemie

Die indirekte Immunfluoreszenz diente dem qualitativen Nachweis von Somatostatin sowie der beiden Melatoninrezeptoren in den QGP-1-Zellen. Die Methode beruht auf der Bindung eines spezifischen Primärantikörpers an das entsprechende Antigen. Über die Bindung von Fluoreszenz-markierten Sekundärantikörpern können die Antigen-Antikörper-Komplexe sichtbar gemacht werden.

Deckgläser wurden in 24-*well*-Zellkulturplatten gelegt und mit Poly-L-Lysin (0,1 mg/ml) beschichtet, für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend zweimal mit DPBS gewaschen. Anschließend wurden QGP-1-Zellen (1×10^5 Zellen pro *well*) ausgesät und mit Zellkulturmedium bedeckt. Die Inkubation der Zellen erfolgte unter Standardbedingungen (5% CO_2 und 37°C) in RPMI 1640 für 24 h. Danach wurde das Medium entfernt und die Zellen mit PBS (pH 7,4) gewaschen und für 15 min mit 500 μl 4%igen PFA in PBS fixiert. Im Anschluss folgten zwei Waschschriffe mit PBS für je 10 min und ein Waschschriff mit Aqua dest. Bis zur Immunmarkierung wurden die Zellen in 70%igem Ethanol bei 4°C gelagert. Für die Immunzytochemie wurden die Zellen in Aqua dest gespült und anschließend für 30 min in PBS gewaschen. Um unspezifische Bindungsstellen zu blocken, erfolgte eine Inkubation mit 0,3% Triton X-100 und 5% Ziege-Normalserum in PBS für 1 h

bei Raumtemperatur. Die Inkubation mit dem verdünnten Primärantikörper (in PBS mit 0,3% Triton X-100 und 5% Ziege-Normalserum) erfolgte über Nacht bei 4°C. Zum Entfernen von ungebundenem Antikörper wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen und anschließend mit einem Cy3-konjugiertem Sekundärantikörper im Dunkeln für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach erneutem dreimaligen Spülen mit PBS erfolgte eine Gegenfärbung mit Hoechst 33342 (0,5 µg/ml) in PBS für 5 min. Die mit Zellen beschichteten Deckgläschen wurden anschließend wieder mit PBS und Aqua dest gewaschen und nach dem Lufttrocknen mit Entellan® auf Objektträger eingebettet. Die Spezifität sowie die entsprechenden Verdünnungen der primären und sekundären Antikörper sind in Tabelle 7 angegeben. Als Kontrolle für den sekundären Antikörper wurden die Deckgläschen entsprechend behandelt, allerdings wurde die Inkubation mit dem primären Antikörper durch eine Inkubation mit 5% Ziege-Normalserum/0,3% Triton X-100 in PBS ersetzt. Um die Spezifität der primären Melatoninrezeptor-Antikörper zu untersuchen, wurden die Antikörper vor der Immunmarkierung über Nacht bei 4°C mit ihrem entsprechenden Blocking-Peptid in einem Konzentrationsverhältnis 1:1 (1 µg Peptid pro 1 µg Antikörper) behandelt, wodurch die Epitope der Antikörperbindungsstellen blockiert wurden. Die Auswertung erfolgte mit einem Fluoreszenzmikroskop und entsprechender Software. Einzelne Aufnahmen in der z-Ebene von Kontrollen und immunmarkierten Zellen erfolgten unter gleichen Mikroskop- und Kameraeinstellungen und wurden in einem Maximum-Gesamtbild zusammengefasst.

Tabelle 7: Spezifität der verwendeten Antikörper

Primärantikörper	Spezies	Verdünnung	Sekundärantikörper ⁴	Verdünnung
Anti-Somatostatin (A0566) ¹	Kaninchen	1:100	Ziege-anti-Kaninchen-Cy3	20 µg/ml in 2% BSA/PBS
Anti-MT1 (AMR-031) ²	Kaninchen	1:300	Ziege-anti-Kaninchen-Cy3	20 µg/ml in 2% BSA/PBS
Anti-MT2 (GTX70723) ³	Kaninchen	1:100	Ziege-anti-Kaninchen-Cy3	20 µg/ml in 2% BSA/PBS

¹DAKO, Glostrup, Dänemark; ²Alomone Labs, Ltd., Jerusalem, Israel; ³GeneTex, Inc., Irvine, CA, USA; ⁴Dianova GmbH, Hamburg, Deutschland

3.6 Immunhistochemie

Der Nachweis der beiden Melatoninrezeptoren in den β -, α - und δ -Zellen der Langerhansschen Insel erfolgte an humanem pankreatischen Gewebe mittels einer Doppelmarkierung mit spezifischen Antikörpern für den MT1- bzw. MT2-Rezeptor und den Hormonen Insulin, Glukagon bzw. Somatostatin. Für die immunhistochemische Färbung wurden von dem in Paraffin eingebetteten Gewebe 5 µm dicke Schnitte am Mikrotom angefertigt und auf Objektträger übertragen. Die Entparaffinierung der Gewebeschnitte

erfolgte bei 60°C im Wärmeschrank für 2 h. Im Anschluss folgte eine Rehydratisierung der Schnitte in Histo-Clear für zweimal 5 min, in Isopropanol für 3 min und in einer absteigenden Alkoholreihe (96%, 80%, 70%, 60%) für je 3 min. Anschließend wurden die Gewebeschnitte für je 5 min zweimal in Aqua dest und zweimal in PBS gespült. Um eine Maskierung der Antigene in Formalin-fixierten und Paraffin-eingebetteten Gewebeschnitten zu verhindern, wurden die Schnitte in 10 mM Citratpuffer für 15 min in der Mikrowelle wärmebehandelt. Bis zum Abkühlen wurden die Schnitte im Citratpuffer belassen und anschließend dreimal für 5 min in PBS gewaschen. Für das Blocken unspezifischer Epitope erfolgte eine Inkubation der Schnitte mit 10% Esel-Normalserum in PBS für 1 h in einer befeuchteten Inkubationskammer, um ein Austrocknen zu verhindern. Im Anschluss folgte eine Doppelmarkierung, jeweils mit einem primären Antikörper der pankreatischen Hormone (Insulin, Glukagon bzw. Somatostatin) und einem MT1- bzw. MT2-spezifischen Antikörper über Nacht bei 4°C. Die Verdünnung erfolgte in PBS mit 10% Esel-Normalserum. Zum Entfernen von ungebundenem Antikörper wurden die Zellen anschließend dreimal in PBS gewaschen und mit entsprechenden Fluoreszenz-markierten Sekundärantikörpern im Dunkeln für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Die Spezifität sowie die Verdünnung der verwendeten Antikörper ist in Tabelle 8 aufgelistet. Nach erneutem dreimaligen Spülen in PBS erfolgte eine Gegenfärbung mit Hoechst 33342 (0,5 µg/ml) in 2% BSA/PBS für 5 min. Die Objektträger wurden anschließend noch einmal mit PBS und Aqua dest gewaschen und mit Mowiol eingedeckt. Als Kontrolle für den sekundären Antikörper wurden die Objektträger entsprechend behandelt, allerdings wurde die Inkubation mit den primären Antikörpern durch eine Inkubation mit 10% Esel-Normalserum ersetzt. Gelagert wurden die immunmarkierten Schnitte im Dunkeln bei 4°C.

<u>PBS:</u>	20 mM KH ₂ PO ₄ 80 mM Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O	<u>Citratpuffer (pH 6,0):</u>	4,5 ml 0,1 M Zitronensäure 20,5 ml 0,1 M Natriumcitrat 225 ml Aqua dest
-------------	---	-------------------------------	---

<u>Mowiol:</u>	12 g Glycerin 4,8 g Mowiol® 4-88 12 ml Aqua dest 2 h bei Raumtemperatur mischen 24 ml 0,2 M TRIS-Puffer (pH 8,5) 10 min bei 50°C erhitzen 15 min bei 5000 x g zentrifugieren Überstand bei -20°C
----------------	---

Tabelle 8: Spezifität der verwendeten Antikörper

Primärantikörper	Spezies	Verdünnung	Sekundärantikörper ⁵	Verdünnung
Anti-Proinsulin C-Peptid (CBL94) ¹	Maus	1:100	Esel-anti- Maus-Cy2	20 µg/ml in 2% BSA/PBS
Anti-Glucagon (G-2654) ²	Maus	1:100	Esel-anti- Maus-Cy2	20 µg/ml in 2% BSA/PBS
Anti-Somatostatin (A0566) ³	Kaninchen	1:50	Esel-anti- Kaninchen-FITC	20 µg/ml in 2% BSA/PBS
Anti-MT1 (Sc-13186) ⁴	Ziege	1:10	Esel-anti- Ziege-Cy3	20 µg/ml in 2% BSA/PBS
Anti-MT2 (Sc-13177) ⁴	Ziege	1:5	Esel-anti- Ziege-Cy3	20 µg/ml in 2% BSA/PBS

¹Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland; ²Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland; ³DAKO, Glostrup, Dänemark; ⁴Santa Cruz Biotechnology, Inc., Dallas, TX, USA; ⁵Dianova GmbH, Hamburg, Deutschland

Die Auswertung erfolgte mit einem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop. Für die semiquantitative Analyse wurde ein 63x Ölimmersionsobjektiv und ein konstanter Zoomfaktor von 1,0 verwendet. Hierbei wurde das gesamte Gewebestück beurteilt und 3 - 13 Inseln pro Patient in der mittleren z-Ebene mit einer Auflösung von 2048 x 2048 Pixel aufgenommen. Die Laserspannung der drei Kanäle wurde nach optimalen Bedingungen gewählt. Die Aufnahme der Melatoninrezeptor- sowie der jeweiligen Hormonmarkierung erfolgte unter konstanten Scanbedingungen im Photonencounting-Programm bei einer Anregungswellenlänge von 552 nm bzw. 489 nm. Die Aufnahme der Kernmarkierung erfolgte im Standardprogramm bei einer Anregungswellenlänge von 405 nm, wobei die Laserleistung entsprechend angepasst wurde. Für die quantitative Auswertung der aufgenommenen Bildserien wurde die Software Fiji [186] genutzt. Um die mittlere Intensität der Melatoninrezeptormarkierung zu ermitteln, wurde als Begrenzung die jeweilige Hormonmarkierung in den Inselzelltypen sowie die Zellkernmarkierung definiert. Dafür wurde über die Hormonmarkierung zunächst ein *Auto Threshold* und anschließend ein Medianfilter von 5 Pixeln gelegt. Für die Lokalisation der Zellkerne wurde ein Medianfilter von 5 Pixeln verwendet. Im Anschluss wurden die Aufnahmen in ein binäres Bild umgewandelt, sodass eine von der Software automatisierte Erkennung der jeweiligen Markierung genutzt werden konnte. Die hormonmarkierte Fläche (ohne Zellkernbereich) wurde als *Region of interest* (ROI) definiert und diente der Auswertung der mittleren Fluoreszenzintensität der Melatoninrezeptormarkierung im unveränderten Bild, berechnet aus Gesamtintensität (Summe der Grauwerte aller Pixel) und Fläche (Anzahl der Pixel). Die so ermittelte mittlere Intensität galt als indirekter Indikator für die Melatoninrezeptordichte in den einzelnen Zelltypen. Für die statistische Auswertung wurde die gemessene mittlere Intensität in den einzelnen Zelltypen der aufgenommenen Inseln pro Patient gemittelt. Für einen semiquantitativen Vergleich der

Intensität sowohl der MT1- als auch der MT2-Rezeptormarkierung in nicht-diabetischen und Typ2-diabetischen Patienten in den drei Inselzelltypen wurden Patienten entsprechend des Alters sowie der Diagnose ausgewählt und untersucht. Die klinischen Parameter sind in Tabelle 14 (Anhang S. XIII) zusammengefasst. Das mittlere Alter der nicht-diabetischen Patienten lag bei 60 Jahren, das der Typ2-diabetischen Patienten bei 62 Jahren.

3.7 DNA-Bestimmung

Um die Gleichmäßigkeit der Verteilung der humanen Inseln pro *well* zu überprüfen und zu verrechnen, wurde in den Inkubationsversuchen mit den primären Langerhansschen Inseln der DNA-Gehalt im Zelllysat mittels eines DNA Quantification Kits bestimmt. Auch in den Untersuchungen zur Zeitabhängigkeit des Melatonineinflusses in QGP-1-Zellen wurde der DNA-Gehalt pro *Batch* bestimmt. Prinzip hierbei ist die Bindung eines Fluoreszenzfarbstoffes (bisBenzimide H 33258) an doppelsträngige DNA.

Die Zellpellets wurden in Puffer gelöst und per Ultraschall aufgeschlossen. Anschließend wurden 50 µl Homogenat mit 1 ml Puffer und 50 µl *Color Developer* (H 33258) versetzt und gemischt. Die Fluoreszenzintensität wurde bei einer Anregung von 356 nm und bei einer Emission von 458 nm gemessen. Durch das Mitführen einer Standardreihe definierter DNA-Konzentration (zwischen 0 und 100 µg/ml) ließ sich die DNA-Konzentration in den Proben ermitteln.

3.8 Bestimmung der cAMP- und cGMP-Konzentration

QGP-1-Zellen wurden in 96-*well*-Zellkulturplatten mit einer Dichte von 5×10^4 Zellen pro *well* ausgesät und für 24 h unter Standardbedingungen inkubiert. Danach wurden die Zellen mit frischem Medium gewaschen und anschließend mit verschiedenen Melatoninkonzentrationen (zwischen 100 pM und 10 µM) für 4 h bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Am Ende der Stimulation wurde mittels eines kompetitiven Enzymimmunoassay (cAMP/cGMP Biotrak™ EIA System) die gesamtzelluläre Konzentration der *second messenger* bestimmt, das heißt es wurde sowohl die intrazelluläre Konzentration als auch die in den Zellkulturüberstand abgegebene Konzentration erfasst. Mit Hilfe eines Lysisreagenz werden Zellmembranen hydrolysiert, wodurch intrazelluläres cAMP/cGMP freigesetzt wird. Das cAMP oder das cGMP der Probe konkurriert mit einer konstanten Menge von Peroxidase-markierten cAMP/cGMP um die Bindungsstellen spezifischer Antikörper (*Rabbit anti-cAMP* oder *-cGMP*). Durch die Verwendung einer mit einem sekundären Antikörper (*Donkey anti-rabbit IgG*) beschichteten Mikrotiterplatte wird der Antigen-Antikörper-Komplex immobilisiert. Nach Zugabe des Enzymsubstrates aus 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin/Wasserstoffperoxid kommt es durch die Oxidation von Tetramethylbenzidin mittels der Konjugat-gebundenen Peroxidase zu einem blauen Farbumschlag. Um die Reaktion abzustoppen, erfolgte die Zugabe von Schwefelsäure, wodurch ein gelber Farbumschlag entsteht. Durch Messung der

Extinktion bei 450 nm im Mikroplatten-Reader konnte mit Hilfe einer Standardkurve die *second messenger*-Konzentration in den zu untersuchenden Proben bestimmt werden.

3.8.1 cAMP-ELISA

Für die Messung der cAMP-Konzentration im Mikrotiterplattenformat erfolgte am Ende der Stimulation die Zugabe von 12 µl Lysisreagenz in das Stimulationsmedium sowie eine Inkubation für 10 min im Schüttler bei Raumtemperatur. Die Zellyse wurde per Mikroskop überprüft. 100 µl Probe bzw. Standard wurden in die beschichtete Assay-Mikrotiterplatte übertragen und mit 100 µl Antiserum versetzt. Nach einer Inkubation für 2 h bei 4°C erfolgte die Zugabe von 50 µl cAMP-Peroxidase-Konjugat und eine weitere Inkubation für 1 h bei 4°C. Um ungebundene Antigen-Antikörper-Komplexe zu entfernen, wurden die *wells* viermal mit Waschpuffer gewaschen. Danach wurden 150 µl Enzymsubstrat hinzugegeben. Nach einer 1-stündigen Inkubation im Schüttler wurde die Reaktion durch Zugabe von 100 µl 1 M Schwefelsäure abgestoppt. Der Messbereich des ELISA lag zwischen 25 fmol/well und 6400 fmol/well.

3.8.2 cGMP-ELISA

Analog erfolgte die Bestimmung der cGMP-Konzentration unter Zugabe von 10 µl Lysisreagenz für 10 min. Im Anschluss wurde dem Zellysat 10 µl Acetylierungsreagenz (1 Teil Essigsäureanhydrid, 2 Teile Triethylamin) zugefügt, um cGMP zu stabilisieren. Nach einer Inkubation für 5 min wurden 50 µl in die Assay-Mikrotiterplatte überführt. Zu den Proben bzw. Standards wurden 100 µl Antiserum gegeben und für 2 h bei 4°C inkubiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von 100 µl cGMP-Konjugat und eine weitere Inkubation für 1 h bei 4°C. Um ungebundene Antigen-Antikörper-Komplexe zu entfernen, wurden die *wells* viermal mit Waschpuffer gewaschen. Danach wurden 200 µl Enzymsubstrat hinzugegeben. Nach einer 30-minütigen Inkubation im Schüttler wurde die Reaktion durch Zugabe von 100 µl 1 M Schwefelsäure abgestoppt. Der Messbereich des ELISA lag zwischen 2 fmol/well und 512 fmol/well.

3.9 Statistische Auswertung

Die experimentell erhobenen Daten sind als Mittelwerte \pm Standardfehler (*standard error of the mean*, SEM) dargestellt. Die Auswertung erfolgte mittels der Software GraphPad Prism5. Mittelwertvergleiche zwischen zwei Gruppen erfolgten unter Verwendung des nicht-parametrischen Mann-Whitney-U-Tests. Abhängige Vergleiche zwischen mehreren Gruppen bzw. unterschiedlichen Einflussfaktoren wurden mit einem *repeated-measures one-* bzw. *two-way* ANOVA und anschließendem Bonferroni-Test durchgeführt. Eine Irrtumswahrscheinlichkeit (P) kleiner 5% wurde als statistisch signifikant angesehen. Statistisch signifikante Unterschiede sind gekennzeichnet durch: * P < 0,05, ** P < 0,01, *** P < 0,001.

4 Ergebnisse

4.1 Untersuchungen an der humanen δ -Zelllinie QGP-1

4.1.1 Charakterisierung der Zelllinie QGP-1

Die Untersuchungen zum Einfluss von Melatonin auf die pankreatische Somatostatinsekretion erfolgten an der humanen δ -Zelllinie QGP-1. Diese Zelllinie wurde 1980 von Kaku et al. [181] aus einem pankreatischen Somatostatinom eines 61 Jahre alten Mannes isoliert. In der Literatur fehlen bisher vergleichende Untersuchungen zum Einfluss von Melatonin auf die Somatostatinsekretion. Zudem wird diese Zelllinie nur selten als ein Modell in Untersuchungen zur pankreatischen Somatostatinsekretion genutzt. Daher erfolgte zunächst eine Charakterisierung der QGP-1-Zellen. Mittels *real-time* RT-PCR und anschließender DNA-Gelelektrophorese wurde die mRNA-Expression verschiedener Gene, die zum einen im Zusammenhang mit der Somatostatinsekretion stehen und zum anderen eine Grundlage für die Untersuchungen zum Einfluss von Melatonin bildeten, untersucht. Als Kontrollen dienten humanes Pankreasgewebe sowie isolierte humane Langerhanssche Inseln. Die Ergebnisse dieser molekularbiologischen Untersuchungen sind in Tabelle 9 zusammengefasst. Es zeigte sich, dass in der Literatur beschriebene Gene, die eine Rolle in der Glucose-vermittelten Sekretion von Somatostatin spielen, in dieser Zelllinie exprimiert werden. So ließen sich die beiden Untereinheiten des ATP-abhängigen Kaliumkanals (KIR6.2 und SUR1) nachweisen. Auch verschiedene, das Ca^{2+} -Signal vermittelnde spannungsabhängige Calciumkanäle und Ryanodinrezeptoren werden in den Zellen exprimiert. Zudem konnten Isoformen der Glukosetransporter auf Transkriptebene nachgewiesen werden. In Bezug auf die parakrine Modulation der Somatostatinsekretion innerhalb der pankreatischen Insel exprimiert die QGP-1-Zelllinie beide Insulinrezeptor-Isoformen (INSR-A/B), während die Expression des Glukagonrezeptors nicht nachweisbar war. Übereinstimmend ließen sich die untersuchten Gene auch in den Kontrollgeweben Pankreas und Insel darstellen. Bei gering exprimierten Genen konnte der Transkriptnachweis in der humanen Insel allerdings nicht erbracht werden.

Tabelle 9: Expression ausgewählter Gene in humanem Pankreasgewebe, humanen Langerhansschen Inseln und QGP-1-Zellen zur Charakterisierung des δ -Zellmodells

Name	Gen	Pankreas	Insel	QGP-1
Hormon				
Somatostatin	<i>SST</i>	x	x	x
ATP-abhängiger Kaliumkanal				
KIR6.2	<i>KCNJ11</i>	x	x	x
SUR1	<i>ABCC8</i>	x	x	x
Spannungsabhängige Calciumkanäle				
Cav1.3 (L-type)	<i>CACNA1D</i>	x	x	x
Cav2.1 (P/Q-type)	<i>CACNA1A</i>	x	-	x
Cav2.3 (R-type)	<i>CACNA1E</i>	-	-	-
Cav3.2 (T-type)	<i>CACNA1H</i>	x	-	x
Ryanodinrezeptoren				
RYR-1	<i>RYR1</i>	x	x	-
RYR-2	<i>RYR2</i>	x	x	x
RYR-3	<i>RYR3</i>	x	-	x
Glukosetransporter				
GLUT1	<i>SLC2A1</i>	x	x	x
GLUT2	<i>SLC2A2</i>	x	x	-
GLUT3	<i>SLC2A3</i>	x	x	x
GLUT4	<i>SLC2A4</i>	x	x	x
Rezeptoren				
Glukagonrezeptor	<i>GCGR</i>	x	x	-
Insulinrezeptor-Isoform A	<i>INSR</i>	x	x	x
Insulinrezeptor-Isoform B	<i>INSR</i>	x	x	x
MT1	<i>MTNR1A</i>	x	x	x
MT2	<i>MTNR1B</i>	x	x	x
Phosphodiesterasen				
Phosphodiesterase 8A	<i>PDE8A</i>	x	x	x
Phosphodiesterase 8B	<i>PDE8B</i>	x	x	x
Phosphodiesterase 9A	<i>PDE9A</i>	x	x	x

4.1.2 Nachweis der Melatoninrezeptoren in QGP-1-Zellen

Um den Einfluss von Melatonin auf die Somatostatinsekretion untersuchen zu können, wurde zunächst analysiert, ob beide bislang beschriebenen Melatoninrezeptor-Isoformen in der QGP-1-Zelllinie exprimiert werden. Mittels RT-PCR und anschließender Gelelektrophorese der PCR-Produkte erfolgte der spezifische Nachweis sowohl der Somatostatin-mRNA (SST) als auch der beiden Melatoninrezeptor-Isoformen MT1 und MT2 (Abb. 4 A - C). Auch in humanem Kontrollgewebe konnte ein spezifisches PCR-Produkt nachgewiesen werden. Die quantitative Analyse der MT1- und MT2-Expression aus *real-time* RT-PCR-Untersuchungen zeigte ein annähernd gleiches Verhältnis der beiden Rezeptortranskripte in den QGP-1-Zellen (100% vs. 83%, $P = 0,0563$; Abb. 5).

Mittels Immunzytochemie konnte zudem ein Nachweis von Somatostatin, MT1 und MT2 in QGP-1-Zellen, also auf Proteinebene, erbracht werden (Abb. 4 D - F). Die Blockierung der primären Melatoninrezeptor-Antikörper (Bildausschnitt in Abb. 4 E, F) mit dem spezifischen Peptid zeigte keine Antikörperbindung und ist damit Beleg für eine spezifische Immunmarkierung durch die Antikörper.

Durch den Nachweis der Melatoninrezeptoren erwies sich die QGP-1-Zelllinie somit als ein geeignetes Zellmodell für die native humane pankreatische δ -Zelle, um Melatonin-abhängige Effekte auf die Somatostatinsekretion zu untersuchen.

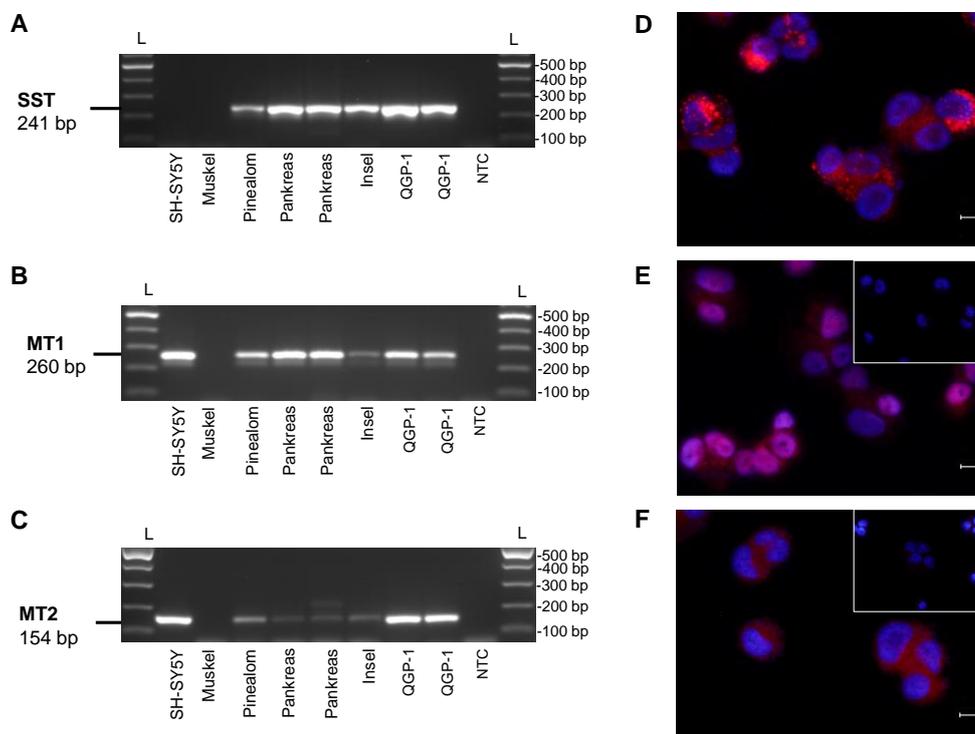


Abb. 4: Nachweis von Somatostatin und Melatoninrezeptoren in QGP-1-Zellen und humanem Gewebe. Darstellung des RT-PCR-Produktes von Somatostatin (SST) (A) sowie der Melatoninrezeptor-Isoformen MT1 (B) und MT2 (C) im 1,5% Agarosegel nach gelelektrophoretischer Auftrennung. Immunzytochemischer Nachweis von Somatostatin (D) sowie der Melatoninrezeptor-Isoformen MT1 (E) bzw. MT2 (F) in QGP-1-Zellen. Der Bildausschnitt in (E) und (F) zeigt die Blockierung des primären Antikörpers mit dem spezifischen Peptid. Die Zellkerne sind mit Hoechst 33342 (blau) dargestellt. bp, Basenpaare; L, 100 bp-Molekulargewichtsstandard; NTC, *non template control*; SH-SY5Y, humane Neuroblastomzelllinie. Scala 10 μ m

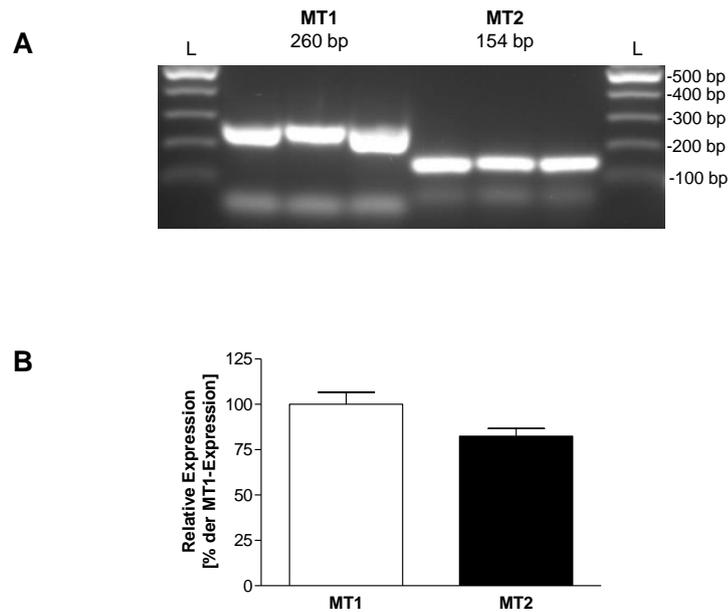


Abb. 5: Expressionsvergleich der Melatoninrezeptoren in QGP-1-Zellen.

(A) Darstellung der MT1- und MT2-Expression mittels Gelelektrophorese von RT-PCR-Produkten. (B) Quantifizierung der relativen mRNA-Expression der Melatoninrezeptor-Isoformen MT1 und MT2 mittels *real-time* RT-PCR, dargestellt als Mittelwert \pm SEM mit $n = 11 - 12$ *Batches* (angegeben in Prozent relativ zu der auf 100%-gesetzten MT1-Expression). Mann-Whitney-*U*-Test. bp, Basenpaare; L, 100 bp-Molekulargewichtsstandard.

4.1.3 Einfluss von Melatonin auf die Somatostatinsekretion in QGP-1-Zellen

Die funktionelle Bedeutung der Melatoninrezeptoren für die Somatostatinsekretion wurde in *Batch*-Kultur getestet. Dafür wurden die Zellen in 24-*well*-Zellkulturplatten ausgesät und mit Melatonin (1 nM) über verschiedene Zeiträume (1 h, 4 h, 6 h) inkubiert. Anschließend wurde die Somatostatinkonzentration im Überstand bestimmt und auf die DNA-Menge pro *well* normiert. Insgesamt zeigte sich ein inhibitorischer Effekt von Melatonin auf die Somatostatinsekretion nach einer Inkubationszeit von 1 h und 4 h, verglichen mit den jeweiligen, unbehandelten Kontrollen. So konnte nach 1 h eine nicht-signifikante Senkung der Somatostatinsekretion unter Melatonininkubation beobachtet werden (100% vs. 69%, $P = 0,0605$), mit einem statistisch signifikanten Effekt nach 4 h (119% vs. 98%). Nach 6 h war kein spezifischer Effekt von Melatonin auf die Somatostatinausschüttung mehr zu beobachten (Abb. 6).

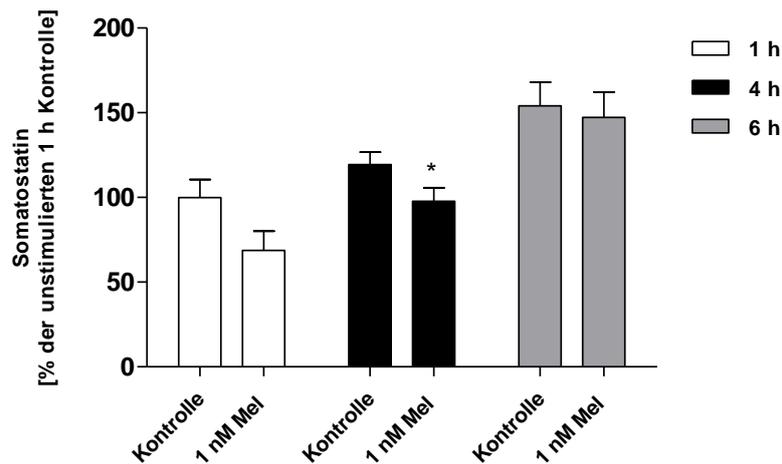


Abb. 6: Einfluss von Melatonin auf die Somatostatinsekretion der QGP-1-Zellen in Abhängigkeit von der Inkubationszeit.

Somatostatinsekretion der QGP-1-Zellen nach Inkubation für 1 h, 4 h oder 6 h mit 1 nM Melatonin (Mel). Die Somatostatinkonzentration im Zellkulturüberstand wurde bezogen auf den DNA-Gehalt pro *Batch*. Die Daten repräsentieren Mittelwerte \pm SEM aus mindestens 3 unabhängigen Versuchen mit je $n = 4 - 6$ *Batches* (angegeben in Prozent relativ zu den 100%-gesetzten, für 1 h inkubierten Kontrollen). * $P < 0,05$; Mann-Whitney-*U*-Test.

Auf Grundlage dieser Ergebnisse erfolgten die weiteren Versuche zu Effekten von Melatonin auf QGP-1-Zellen mit einer Inkubationszeit von 4 h.

In diesem Zusammenhang wurde zunächst eine Dosis-Wirkungsbeziehung von Melatonin auf die Somatostatinausschüttung untersucht. Dafür wurden die QGP-1-Zellen mit steigenden Melatoninkonzentrationen in einem Bereich zwischen 100 pM und 10 μ M Melatonin inkubiert (Abb. 7 A). In der Auswertung zeigte sich eine dichotome Dosis-Wirkungsbeziehung mit einer signifikanten Hemmung der Somatostatinsekretion im physiologischen Melatoninkonzentrationsbereich zwischen 1 nM und 10 nM (100% vs. 86% bei 1 nM bzw. 84% bei 10 nM). Dieser inhibitorische Effekt hob sich mit weiterer Erhöhung der Melatoninkonzentration auf und wurde ersetzt durch eine leichte, nicht-signifikante Sekretionssteigerung unter einer pharmakologischen Konzentration von 10 μ M Melatonin (100% vs. 124%, $P = 0,801$). Um weiterführend zugrundeliegende Signaltransduktionsmechanismen zu untersuchen, wurde in folgenden Inkubationsversuchen die Konzentration der *second messenger* cAMP und cGMP sowohl intrazellulär als auch die in den Zellkulturüberstand abgegebene Konzentration mittels eines spezifischen ELISA bestimmt (Abb. 7 B, C). Sowohl für cAMP als auch für cGMP konnte über den gesamten Melatoninkonzentrationsbereich eine Abnahme der *second messenger*-Konzentration gegenüber den Kontrollen beobachtet werden. Für die cAMP-Analyse zeigte sich unter der Inkubation mit 1 nM Melatonin eine nicht-signifikante Senkung (100% vs. 86%, $P = 0,0865$), mit einem signifikanten Effekt bei einer Konzentration von 100 nM bzw. 10 μ M Melatonin im Zellkulturmedium (Abb. 7 B). Für cGMP zeigte sich unter allen Konzentrationen eine signifikante Abnahme des cGMP-Gehaltes (Abb. 7 C).

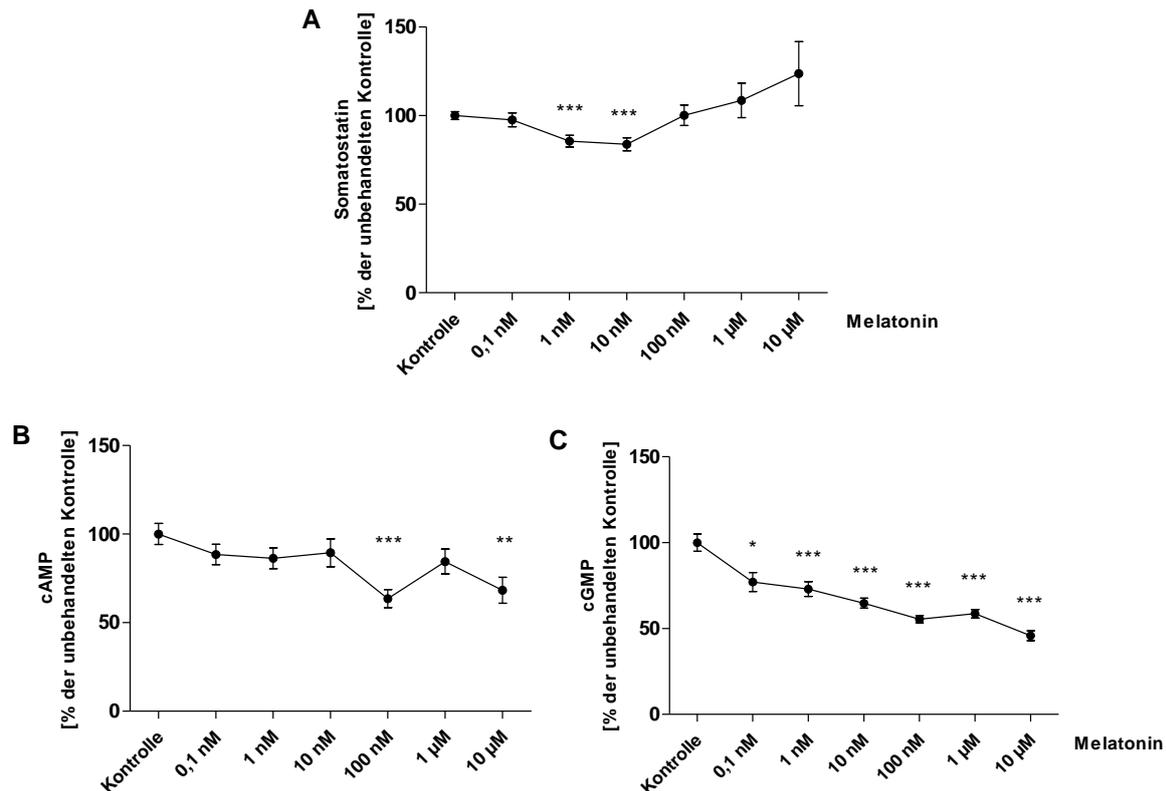


Abb. 7: Einfluss steigender Melatoninkonzentrationen auf die Sekretion von Somatostatin sowie auf die gesamtzelluläre cAMP- und cGMP-Konzentration von QGP-1-Zellen.

(A) Somatostatinsekretion der QGP-1-Zellen nach 4-stündiger Inkubation mit verschiedenen Melatoninkonzentrationen. Die Daten repräsentieren Mittelwerte \pm SEM aus mindestens 3 unabhängigen Versuchen mit $n \geq 4$ Batches. (B, C) cAMP- und cGMP-Konzentrationsveränderungen in QGP-1-Zellen nach 4-stündiger Inkubation mit verschiedenen Melatoninkonzentrationen. Die Daten repräsentieren Mittelwerte \pm SEM mit $n = 9 - 13$ Batches (angegeben in Prozent relativ zu den 100%-gesetzten Kontrollen). * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$; Mann-Whitney-U-Test.

4.1.4 Einfluss von cAMP und cGMP auf die Somatostatinsekretion

Um zu untersuchen, ob es einen direkten Einfluss der *second messenger* cAMP und cGMP auf die Somatostatinsekretion von QGP-1-Zellen gibt, wurden die Zellen mit verschiedenen Konzentrationen der membrangängigen Analoga 8-Br-cAMP bzw. 8-Br-cGMP mit und ohne dem unspezifischen Phosphodiesterasehemmer IBMX (1 mM) für 1 h inkubiert (Abb. 8). Die Inkubation mit verschiedenen Konzentrationen von 8-Br-cAMP führte mit Ausnahme der höchsten Konzentration von 1 mM zu keiner Steigerung der Somatostatinausschüttung (Abb. 8 A). Wenn die Aktivität der Phosphodiesterasen (PDE) durch IBMX gehemmt wurden, konnte eine signifikant erhöhte Somatostatinsekretion unter 100 μ M und 1 mM 8-Br-cAMP im Vergleich zur IBMX-stimulierten Kontrolle beobachtet werden (Abb. 8 C). Im Gegensatz hierzu führte die Zugabe steigender Konzentrationen von 8-Br-cGMP zu keinem messbaren Unterschied in der Somatostatinausschüttung (Abb. 8 B). Auch unter der Zugabe von IBMX konnte keine weitere Erhöhung der Somatostatinsekretion beobachtet werden. Zudem führte die zusätzliche Inkubation mit 1 μ M 8-Br-cGMP zu einer Senkung der Hormonausschüttung in QGP-1-Zellen (Abb. 8 D). Die alleinige Inkubation mit 1 mM IBMX führte in beiden

Experimenten zu einer signifikanten Steigerung der Hormonsekretion um 77% (Abb. 8 C) bzw. 95% (Abb. 8 D).

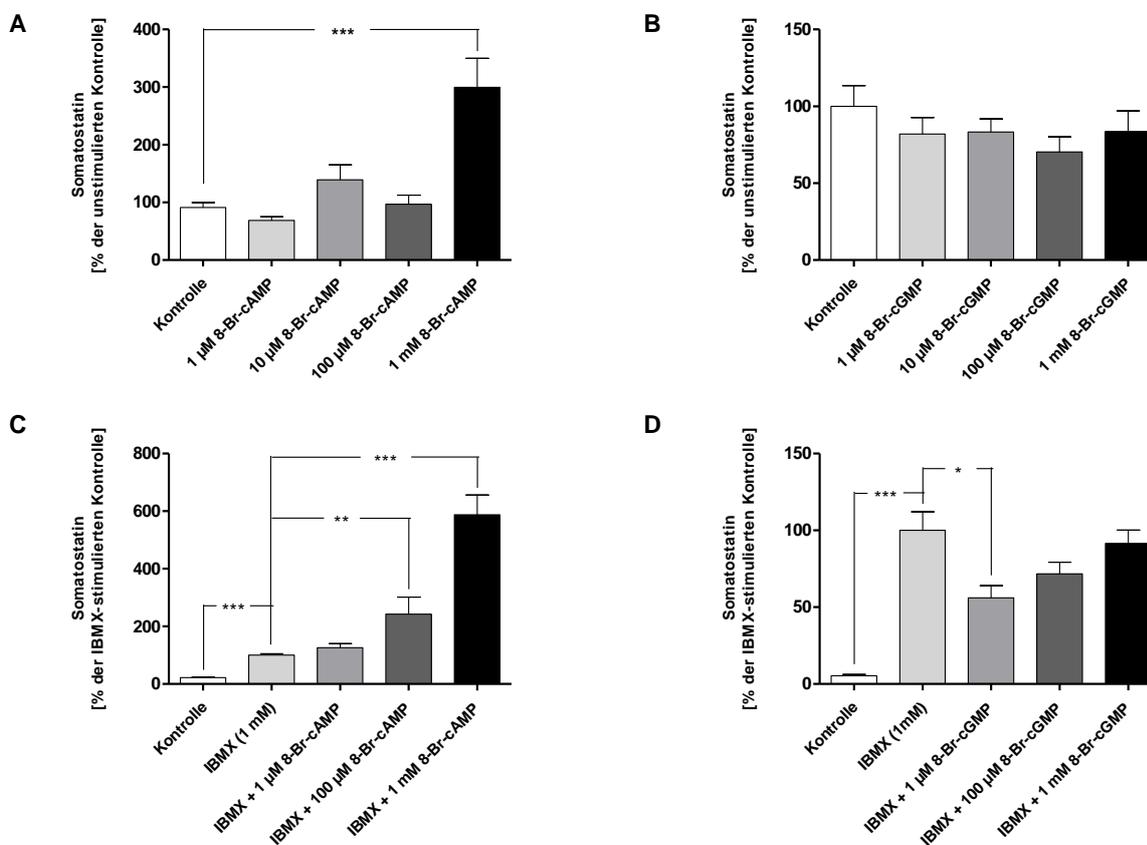


Abb. 8: Einfluss von 8-Br-cAMP und 8-Br-cGMP auf die Somatostatinsekretion der QGP-1-Zellen.

(A, C) Somatostatinsekretion der QGP-1-Zellen nach 1-stündiger Inkubation mit verschiedenen Konzentrationen des cAMP-Analogons 8-Br-cAMP bzw. IBMX (1 mM) und 8-Br-cAMP. Die Daten repräsentieren Mittelwerte \pm SEM aus mindestens 3 unabhängigen Versuchen mit je $n = 3 - 4$ Batches (angegeben in Prozent relativ zu den 100%-gesetzten unstimulierten (A) bzw. IBMX-stimulierten (C) Kontrollen). (B, D) Somatostatinsekretion der QGP-1-Zellen nach 1-stündiger Inkubation mit verschiedenen Konzentrationen des cGMP-Analogons 8-Br-cGMP bzw. IBMX (1 mM) und 8-Br-cGMP. Die Daten repräsentieren Mittelwerte \pm SEM aus 3 unabhängigen Versuchen mit je $n = 3 - 4$ Batches (angegeben in Prozent relativ zu den 100%-gesetzten unstimulierten (B) bzw. IBMX-stimulierten (D) Kontrollen). * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$; Mann-Whitney- U -Test.

4.1.5 Untersuchung des rezeptorspezifischen Einflusses von Melatonin auf die Somatostatinsekretion

4.1.5.1 Melatoninrezeptorantagonisten

Um zu überprüfen, ob der inhibierende Einfluss von Melatonin auf die Somatostatinsekretion rezeptorspezifisch vermittelt wird, wurden die QGP-1-Zellen für 4 h mit 1 nM Melatonin und den beiden Melatoninrezeptorantagonisten Luzindol bzw. 4-P-PDOT koinkubiert (Abb. 9). Unter der Inkubation mit 1 nM Melatonin kam es im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle zu einer signifikanten Abnahme der Somatostatinausschüttung um 25%. Der nicht-selektive Rezeptorantagonist Luzindol reduzierte diesen Effekt, ohne die Signifikanzgrenze zu erreichen (75% vs. 99%, $P = 0,2366$). Die gleichzeitige Inkubation mit dem selektiven

MT2-Rezeptorantagonisten 4-P-PDOT konnte die Senkung der Somatostatinsekretion jedoch nicht vollständig aufheben (75% vs. 83%, $P = 0,2549$). Die alleinige Inkubation mit den beiden Rezeptorantagonisten beeinflusste die Somatostatinsekretion in den Zellen nicht signifikant. Verglichen mit der unbehandelten Kontrolle (100%) deutete sich dennoch eine geringe Abnahme der Somatostatinausschüttung unter diesen Bedingungen an (4-P-PDOT: 100% vs. 83%, $P = 0,2366$; Luzindol: 100% vs. 78%, $P = 0,0690$).

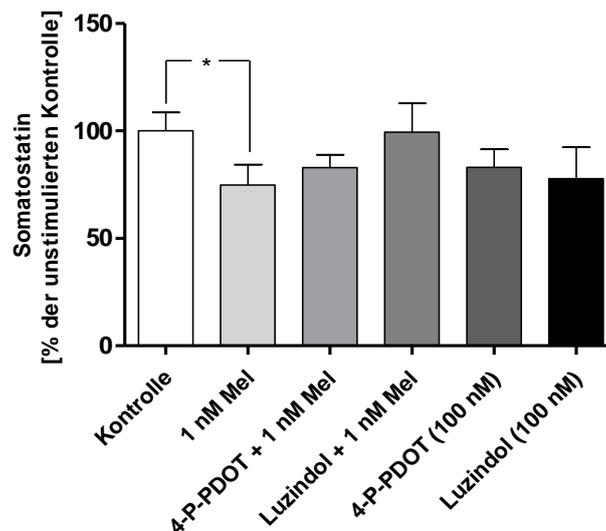


Abb. 9: Einfluss von Melatonin und Melatoninrezeptorantagonisten auf die Somatostatinsekretion der QGP-1-Zellen.

Somatostatinsekretion der QGP-1-Zellen nach 4-stündiger Inkubation mit 1 nM Melatonin (Mel) oder Koinkubation mit 1 nM Mel und dem nicht-selektiven Melatoninrezeptorantagonisten Luzindol (100 nM) bzw. dem selektiven MT2-Rezeptorantagonisten 4-P-PDOT (100 nM). Vor der Melatoninstimulation erfolgte eine 30-minütige Vorinkubation mit den jeweiligen Antagonisten. Als Kontrolle erfolgte zudem die alleinige Inkubation beider Rezeptorantagonisten. Die Daten repräsentieren Mittelwerte \pm SEM aus 3 unabhängigen Versuchen mit je $n = 3-4$ Batches (angegeben in Prozent relativ zu den 100%-gesetzten Kontrollen). * $P < 0,05$; Mann-Whitney-U-Test.

4.1.5.2 Transiente Überexpression der humanen Melatoninrezeptoren MT1 und MT2

In Transfektionsexperimenten sollte der Fragestellung nachgegangen werden, welche Rezeptorisoform die beobachteten Effekte von Melatonin auf die Somatostatinsekretion in den QGP-1-Zellen vermittelt. Daher wurden die Zellen mit einem Plasmid, welches die cDNA des humanen MT1 (hMT1-QGP-1), MT2 (hMT2-QGP-1) oder eine nicht-funktionelle Deletionsvariante des Rezeptors (Δ hMT-QGP-1) trägt, transfiziert, um eine Überexpression der jeweiligen Rezeptorisoform zu ermöglichen. Nach 48 h wurde die Überexpression der Melatoninrezeptoren molekularbiologisch mittels *real-time* RT-PCR untersucht. Die transiente Transfektion erhöhte die hMT1-Expression 327-fach in den hMT1-QGP-1-Zellen und die hMT2-Expression 730-fach in den hMT2-QGP-1-Zellen, verglichen mit der basalen Expression der Rezeptoren in den Δ hMT-QGP-1-Zellen, die in diesem Experiment als Kontrollen dienten (Abb. 10 A). Die Abb. 10 B und Abb. 10 C zeigen die jeweiligen

RT-PCR-Produkte nach der Gelelektrophorese sowie die entsprechenden Fluoreszenzdaten der *real-time* RT-PCR zur Verdeutlichung der Überexpression.

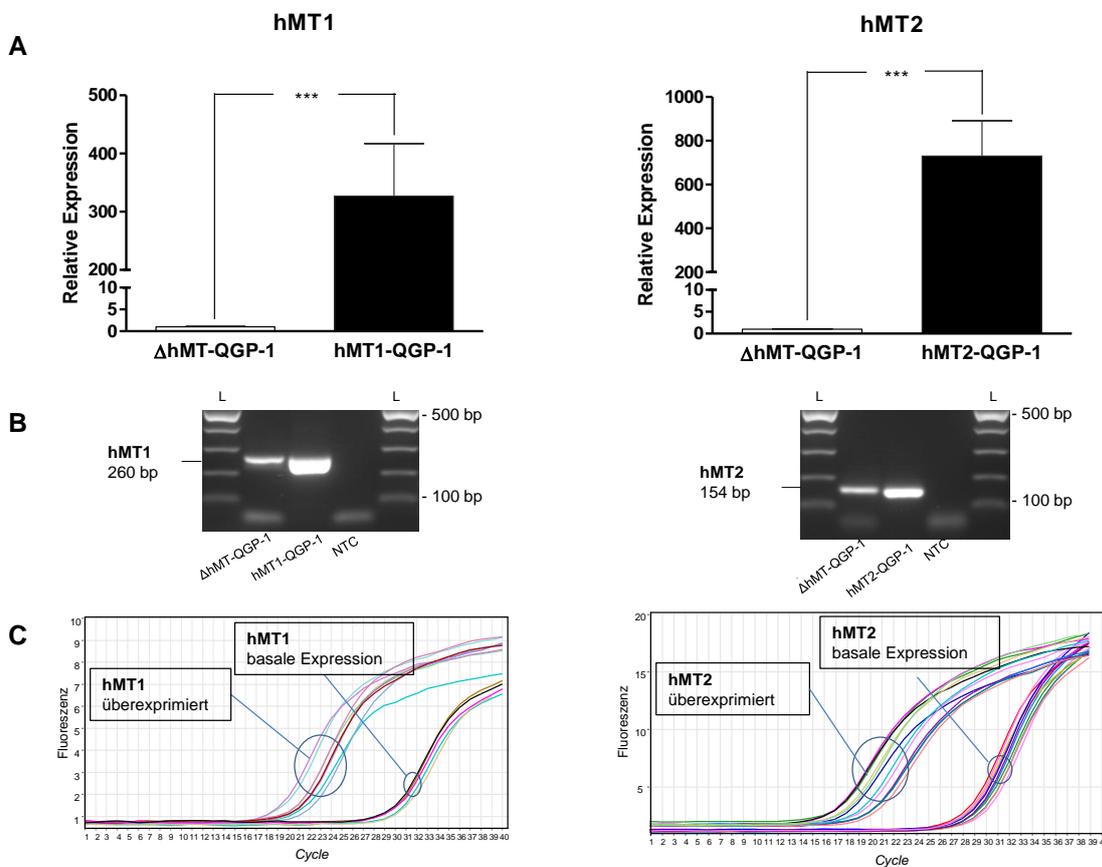


Abb. 10: Nachweis der transienten Überexpression der humanen Melatoninrezeptoren MT1 und MT2 in QGP-1-Zellen.

(A) Relative mRNA-Expression des humanen MT1- (hMT1, links) und MT2-Rezeptors (hMT2, rechts) in den mit dem Kontrollplasmid (Δ hMT-QGP-1) bzw. mit dem hMT1- (hMT1-QGP-1) oder hMT2-Rezeptor (hMT2-QGP-1) transfizierten QGP-1-Zellen nach 48 h. Die Daten repräsentieren Mittelwerte \pm SEM mit $n = 13 - 19$ Batches (relativ zu den auf 1,0-gesetzten Δ hMT-QGP-1-Kontrollen). *** $P < 0,001$; Mann-Whitney-U-Test. (B) Darstellung der hMT1- (links) und hMT2-Expression (rechts) mittels Gelelektrophorese. (C) Fluoreszenzdaten der *real-time* RT-PCR zur Expression der hMT1- (links) bzw. hMT2-mRNA (rechts) in Δ hMT-QGP-1 bzw. hMT2-QGP-1. bp, Basenpaare; L, 100 bp-Molekulargewichtsstandard; NTC, *non template control*.

Um zu untersuchen, ob die Melatoninrezeptorüberexpression verbunden ist mit einer veränderten Somatostatinsekretion, wurden die mit den Expressionsvektoren hMT1, hMT2 und Δ hMT transient transfizierten QGP-1-Zellen nach 48 h für 4 h mit verschiedenen Melatoninkonzentrationen (1 nM, 100 nM, 10 μ M) inkubiert und die Somatostatinkonzentration im Überstand gemessen (Abb. 11). Die Auswertung der drei Gruppen zeigte einen stärkeren Einfluss von Melatonin in den hMT1-QGP-1-Zellen und deutet damit auf eine primäre Rolle der MT1-Rezeptoraktivität in der Vermittlung des inhibitorischen Einflusses von Melatonin auf die Somatostatinsekretion hin. So konnte, verglichen mit den unstimulierten (links) Kontrollzellen (100%), in den hMT1-überexprimierenden Zellen eine Abnahme der Somatostatinausschüttung um 34% unter 1 nM Melatonin beobachtet werden. Unter 100 nM Melatonin wurde der inhibitorische Effekt in den

hMT1-QGP-1-Zellen weiter verstärkt (45% vs. 100%). Hingegen betrug die Senkung der Sekretion durch die endogen exprimierten Rezeptoren in den Δ hMT-QGP-1-Kontrollen bei 1 nM Melatonin, im Vergleich zu den unstimulierten Zellen, nur 24%. Die Melatoninkonzentration von 100 nM verursachte in den Δ hMT-QGP-1-Kontrollen eine nicht-signifikante Verringerung der Somatostatinsekretion um 20% ($P = 0,0569$). Im direkten Vergleich zeigten die hMT1- und Δ hMT-QGP-1-Zellen einen signifikanten Unterschied in Form einer stärkeren Verringerung der Sekretion als Reaktion auf eine Melatonininkubation von 100 nM. Ein Unterschied in der Somatostatinausschüttung konnte auch unter der pharmakologischen (unphysiologischen) Melatoninkonzentration von 10 μ M beobachtet werden. Während es in den hMT1-überexprimierenden Zellen auch hier zu einer signifikanten Senkung der Somatostatinsekretion kam, konnte hingegen in den Δ hMT-QGP-1-Kontrollen, verglichen mit den unstimulierten Zellen, eine leichte, nicht-signifikante Steigerung der Somatostatinausschüttung nachgewiesen werden (117% vs. 100%, $P = 0,7340$). Das Sekretionsprofil der Δ hMT-QGP-1-Kontrollen, die mit einer Deletionsvariante des Melatoninrezeptors transfiziert wurden und daher nur eine basale Expression beider endogen exprimierter Melatoninrezeptoren aufweisen, ähnelt der initialen Dosis-Wirkungsbeziehung in nicht-transfizierten QGP-1-Zellen (Abb. 7 A).

Im Gegensatz zu den hMT1-QGP-1-Zellen führte eine Überexpression des hMT2-Rezeptors in den hMT2-QGP-1-Zellen, im Vergleich zu den Δ hMT-QGP-1-Kontrollzellen, zu keinem veränderten Einfluss von Melatonin auf die Somatostatinsekretion. Unter einer Inkubation mit 1 nM Melatonin kam es in den hMT2-QGP-1-Zellen zu einer deutlichen Senkung um 30%. Auch die Melatoninkonzentration von 100 nM resultierte in einer deutlichen, jedoch nicht-signifikanten Reduktion der Ausschüttung um 32% ($P = 0,0571$) im Vergleich zu den unbehandelten hMT2-überexprimierenden Kontrollen. Eine Inkubation mit 10 μ M Melatonin zeigte in diesen Zellen keinen spezifischen Effekt.

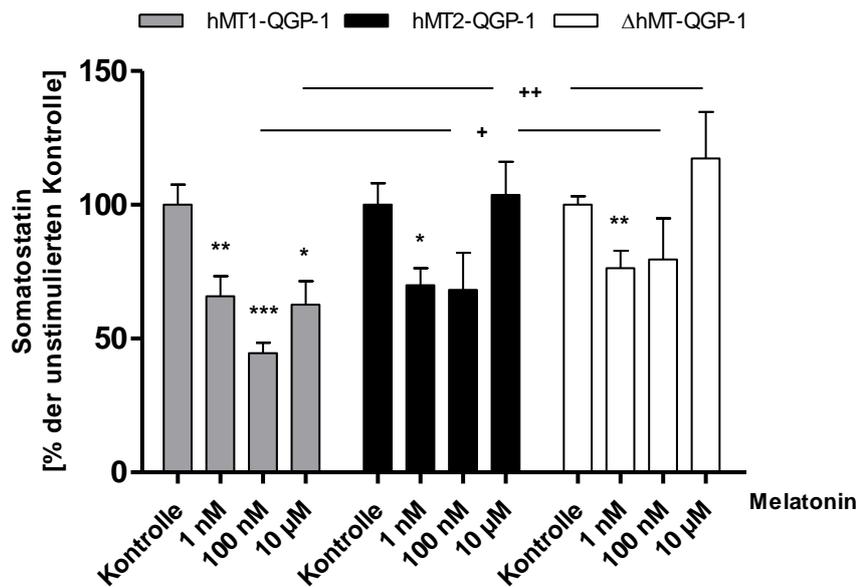


Abb. 11: Einfluss von Melatonin auf die Somatostatinsekretion der QGP-1-Zellen nach transients Transfektion mit den humanen Melatoninrezeptoren MT1 und MT2.

Somatostatinsekretion nach 4-stündiger Inkubation der mit dem hMT1- (hMT1-QGP-1) oder hMT2-Rezeptor (hMT2-QGP-1) bzw. mit dem Kontrollplasmid (Δ hMT-QGP-1) transfizierten QGP-1-Zellen mit verschiedenen Melatoninkonzentrationen. Die Daten repräsentieren Mittelwerte \pm SEM aus mindestens 3 unabhängigen Versuchen mit je $n = 2 - 4$ Batches (angegeben in Prozent relativ zu den 100%-gesetzten Kontrollen). * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$ für Vergleiche innerhalb der 3 Gruppen; + $P < 0,05$, ++ $P < 0,01$ für Vergleiche der jeweiligen Melatoninbehandlung zwischen hMT1- bzw. hMT2-QGP-1 und Δ hMT-QGP-1; Mann-Whitney-U-Test.

4.1.6 Einfluss von Melatonin auf die Somatostatinsekretion unter verschiedenen Glucosekonzentrationen

Da Glucose als Stimulator der Somatostatinsekretion gilt, wurde der Einfluss von Melatonin auf die Somatostatinausschüttung unter verschiedenen Glucosekonzentrationen untersucht. Dafür wurden QGP-1-Zellen für 4 h mit steigenden Glucosekonzentrationen (1 mM, 5 mM, 10 mM oder 20 mM Glc) versetzt und mit 1 nM Melatonin inkubiert (Abb. 12). QGP-1-Zellen zeigten unter diesen Bedingungen keine Glucoseresponsivität. So konnte keine Steigerung der Somatostatinsekretion unter zunehmenden Glucosekonzentrationen beobachtet werden. Allerdings war unter den verschiedenen Glucosekonzentrationen eine unterschiedliche Reaktion der QGP-1-Zellen auf die zusätzliche Inkubation mit 1 nM Melatonin zu beobachten. So konnte, verglichen mit den entsprechenden melatoninfreien Kontrollen, eine signifikante Senkung der Somatostatinausschüttung um 34% und 24% unter den geringen Glucosekonzentrationen von 1 mM und 5 mM beobachtet werden. Dieser Effekt war nicht so eindeutig unter den höheren Konzentrationen von 10 mM (22%ige Senkung, $P = 0,2775$) und 20 mM Glucose (21%ige Senkung, $P = 0,7928$).

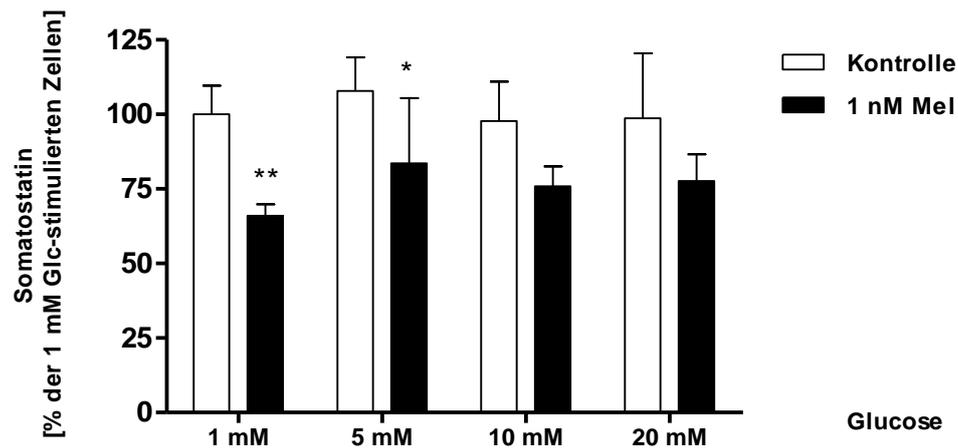


Abb. 12: Einfluss von Melatonin auf die Somatostatinsekretion der QGP-1-Zellen unter verschiedenen Glucosekonzentrationen.

Die QGP-1-Zellen wurden für 30 Minuten in Medium mit 1 mM Glucose (Glc) vorinkubiert. Anschließend erfolgte eine 4-stündige Inkubation der QGP-1-Zellen mit 1 nM Melatonin (Mel) unter verschiedenen Glucosekonzentrationen. Die Daten repräsentieren Mittelwerte \pm SEM aus 3 unabhängigen Versuchen mit je $n = 3 - 4$ Batches (angegeben in Prozent relativ zu den 100%-gesetzten, mit 1 mM Glc stimulierten Kontrollen). * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$; Mann-Whitney-U-Test.

4.2 Untersuchungen an humanem pankreatischen Gewebe

Die bisher beschriebenen Untersuchungen deuten auf einen Zusammenhang zwischen einer Melatonin-abhängigen Signalkaskade und der Somatostatinsekretion in der pankreatischen Insel hin. Zudem zeigen zahlreiche Untersuchungen auch einen Einfluss auf die pankreatische Insulin- und Glukagonsekretion der β - und α -Zelle. Um die eigenen Ergebnisse aus den Experimenten mit der humanen δ -Zelllinie QGP-1 zu verifizieren, erfolgten Untersuchungen an humanem pankreatischen Gewebe bzw. isolierten humanen Langerhansschen Inseln. Zunächst wurde immunhistochemisch das Vorkommen sowie die Verteilung der Melatoninrezeptor-Isoformen MT1 und MT2 sowohl in den δ - als auch in den β - und α -Zellen der Insel untersucht. Da in der Literatur ein antagonistischer Zusammenhang zwischen Melatonin und einem T2DM beschrieben ist, erfolgte zudem ein Vergleich der relativen Melatoninrezeptordichte in den einzelnen Zelltypen zwischen nicht-diabetischen und Typ2-diabetischen Inseln. In Inkubationsversuchen wurde die Veränderung der Somatostatinsekretion unter Melatonineinfluss an isolierten humanen Inseln eines nicht-diabetischen und eines Typ2-diabetischen Patienten betrachtet.

4.2.1 Immunhistochemische Untersuchungen im humanen Pankreas nicht-diabetischer und Typ2-diabetischer Patienten

4.2.1.1 Nachweis von Melatoninrezeptoren in den β -, α - und δ -Zellen der pankreatischen Insel

Mit Hilfe der indirekten Immunfluoreszenz erfolgte der Nachweis der Melatoninrezeptoren auf Proteinebene im humanen pankreatischen Gewebe unter Verwendung spezifischer

Antikörper für den MT1- und MT2-Rezeptor. Mit Hilfe der Doppelmarkierung mit spezifischen Antikörpern für die pankreatischen Hormone Insulin, Glukagon und Somatostatin wurde zudem die entsprechende Lokalisation der Rezeptoren in den unterschiedlichen Zelltypen ermöglicht. So konnte sowohl der MT1- (Abb. 13) als auch der MT2-Rezeptor (Abb. 14) in den β -, α - und δ -Zellen der Langerhansschen Insel nachgewiesen werden. Zudem zeigte sich, dass die Melatoninrezeptoren primär in der pankreatischen Insel lokalisiert sind. Eine spezifische Markierung der pankreatischen Hormone zeigte sich ausschließlich im endokrinen Teil des humanen Pankreasgewebes. Die Hormonmarkierung in den drei Zelltypen sowie die Zellkernfärbung diente der Definierung der *Region of interest* (ROI) für die quantitative Analyse der jeweiligen Rezeptormarkierung (gezeigt in Abb. 13 C, G, K und Abb. 14 C, G, K).

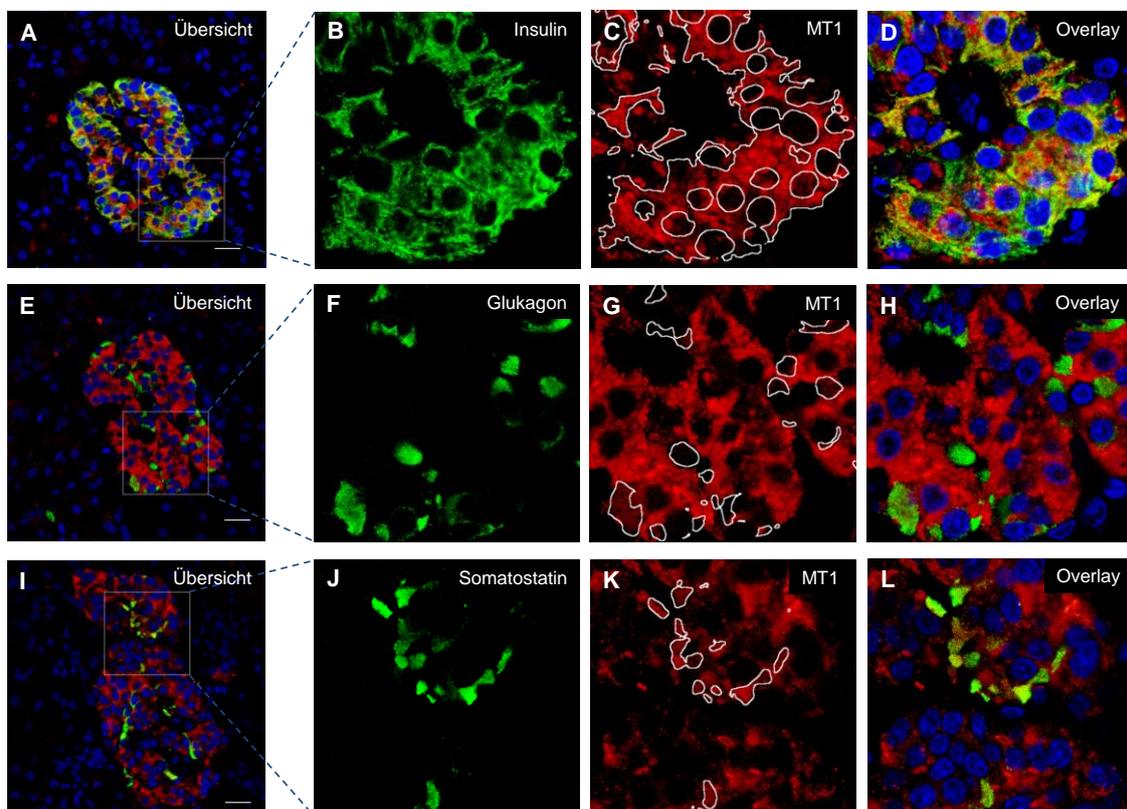


Abb. 13: Immunhistochemische Darstellung von Insulin, Glukagon bzw. Somatostatin und des MT1-Rezeptors als Doppelmarkierung im humanen Pankreasgewebe.

(A, E, I) Immunmarkierung der pankreatischen Hormone (grün) sowie des MT1-Rezeptors (rot) in Kombination mit der Zellkernfärbung mittels Hoechst 33342 (blau) in der pankreatischen Insel. Die Markierung zeigt die Vergrößerung der jeweiligen Insel in (B - D), (F - H) und (J - L). Die jeweilige Hormonmarkierung (B, F, J) wurde definiert als *Region of interest* für die quantitative Analyse der Rezeptormarkierung in β -, α - und δ -Zellen (gezeigt in C, G, K). (D, H, L) zeigen in den übereinander gelegten Bildern (*Overlay*) die Immunmarkierung von Insulin (B), Glukagon (F) bzw. Somatostatin (J) und MT1 (C, G, K) in der jeweiligen Insel. Scala 20 μ m.

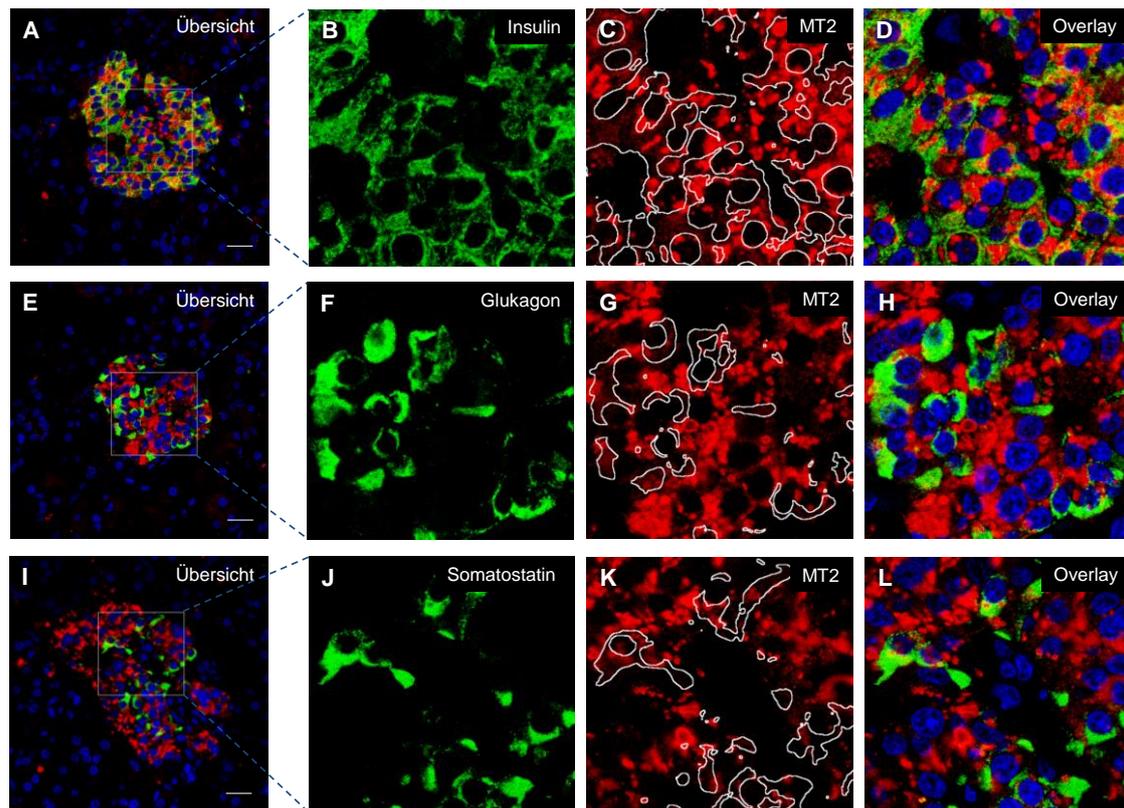


Abb. 14: Immunhistochemische Darstellung von Insulin, Glukagon bzw. Somatostatin und des MT2-Rezeptors als Doppelmarkierung im humanen Pankreasgewebe.

(A, E, I) Immunmarkierung der pankreatischen Hormone (grün) sowie des MT2-Rezeptors (rot) in Kombination mit der Zellkernfärbung mittels Hoechst 33342 (blau) in der pankreatischen Insel. Die Markierung zeigt die Vergrößerung der jeweiligen Insel in (B - D), (F - H) und (J - L). Die jeweilige Hormonmarkierung (B, F, J) wurde definiert als *Region of interest* für die quantitative Analyse der Rezeptormarkierung in β -, α - und δ -Zellen (gezeigt in C, G, K). (D, H, L) zeigen in den übereinander gelegten Bildern (*Overlay*) die Immunmarkierung von Insulin (B), Glukagon (F) bzw. Somatostatin (J) und MT2 (C, G, K) in der jeweiligen Insel. Scala 20 μm .

4.2.1.2 Vergleich der Melatoninrezeptorverteilung in Pankreata nicht-diabetischer und Typ2-diabetischer Patienten

Die semiquantitative Auswertung der mittleren Fluoreszenzintensität in den hormonmarkierten Zellen ermöglichte einen Vergleich der Signalintensität der Melatoninrezeptormarkierung in β -, α - und δ -Zellen. Dies galt als Indikator für die Rezeptordichte in den einzelnen Zelltypen von Inseln nicht-diabetischer und Typ2-diabetischer pankreatischer Gewebeproben. Die Signalintensität/Rezeptordichte in den einzelnen Zelltypen wurde zum einen innerhalb der nicht-diabetischen oder diabetischen Inseln und zum anderen zwischen den drei Zelltypen von nicht-diabetischen und Typ2-diabetischen Patienten verglichen. Für die Analyse der Daten wurde die mittlere Fluoreszenzintensität der ROI, die mit Hilfe der Hormon- und Zellkernmarkierung definiert wurde, in der jeweiligen Insel bestimmt. Pro Patient wurden zwischen 3 und 13 Inseln ausgewertet, aus denen ein Mittelwert gebildet wurde, der wiederum in die Statistik einfließt. Die Auswertung der relativen mittleren

Fluoreszenzintensität in pankreatischen Inseln nicht-diabetischer Patienten zeigte, dass bei Einsatz des MT1-spezifischen Antikörpers die α -Zellen (69%) im Vergleich zu den β - (100%) und δ -Zellen (88%) eine signifikant schwächere Immunmarkierung aufwiesen, was auf eine geringere Rezeptordichte hindeutet (Abb. 15 A). Dieser Zusammenhang zeigte sich auch in den Inseln Typ2-diabetischer Patienten. Auch hier war die Fluoreszenzintensität in den α -Zellen im Vergleich zu den β - (100%) und δ -Zellen (105%) signifikant geringer (68%, Abb. 15 B).

Unter Verwendung eines MT2-spezifischen Antikörpers zeigte sich ein unterschiedliches Verteilungsmuster des MT2-Rezeptors in den drei Zelltypen zwischen nicht-diabetischen und Typ2-diabetischen Inseln. Nicht-diabetische Patienten wiesen einen signifikanten Unterschied in der Rezeptordichte lediglich zwischen den β - (100%) und α -Zellen (75%) auf, während sich die MT2-Rezeptordichte zwischen den α - und δ -Zellen (88%) nicht unterschied (Abb. 15 C). Im Gegensatz dazu zeigte der Vergleich der Signalintensität zwischen den einzelnen Zelltypen der Inseln Typ2-diabetischer Patienten eine signifikant geringere Rezeptordichte in den α -Zellen (83%) sowohl in Bezug auf β - (100%) als auch δ -Zellen (104%) (Abb. 15 D).

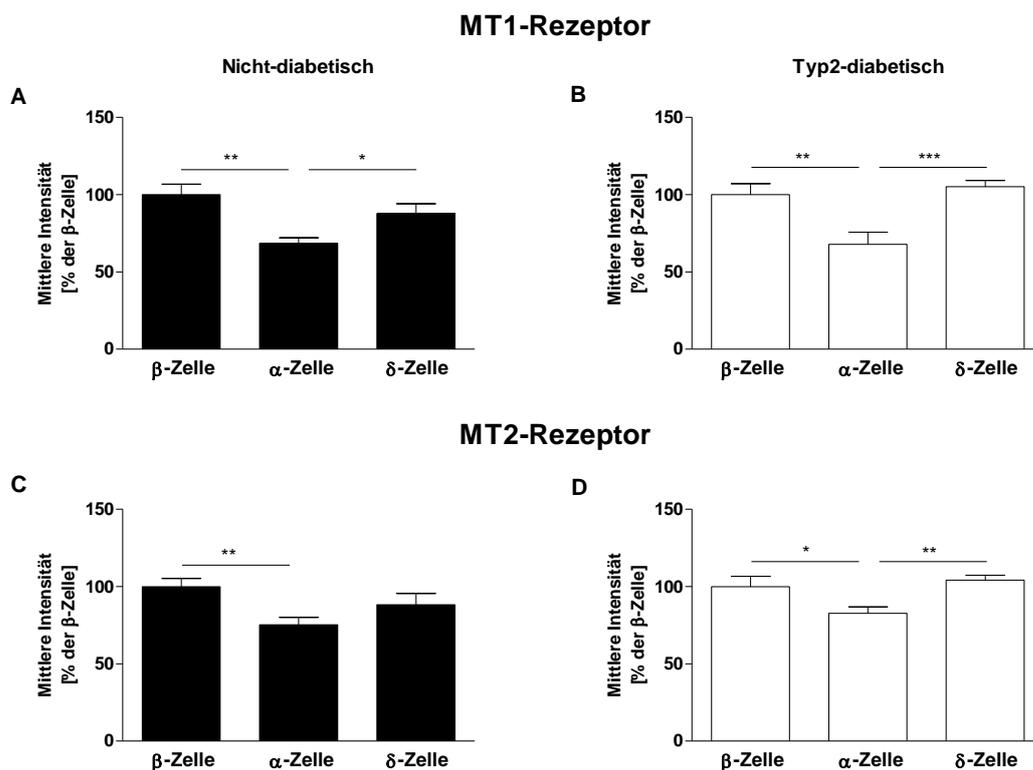


Abb. 15: MT1- und MT2-Rezeptorverteilung in den β -, α - und δ -Zellen der Langerhansschen Insel nicht-diabetischer und Typ2-diabetischer Patienten.

Semiquantitative Auswertung der mittleren Fluoreszenzintensität der MT1- (A, B) und MT2- (C, D) Rezeptor-markierung in den verschiedenen Zelltypen der pankreatischen Insel nicht-diabetischer Patienten (A, C; n = 8) und Typ2-diabetischer Patienten (B, D; n = 6). Die Daten repräsentieren Mittelwerte \pm SEM der relativen mittleren Fluoreszenzintensität (bezogen auf die 100%-gesetzte mittlere Intensität der β -Zelle). * P < 0,05, ** P < 0,01, *** P < 0,001; *Repeated-measures one-way ANOVA*.

Der semiquantitative Vergleich der mittleren Fluoreszenzintensität in den drei Zelltypen nicht-diabetischer und Typ2-diabetischer Inseln zeigte eine signifikante Erhöhung der MT1-Rezeptordichte in den δ -Zellen Typ2-diabetischer Patienten um 23%, verglichen mit der mittleren Intensität der δ -Zelle nicht-diabetischer Inseln (Abb. 16 A). Auch für den MT2-Rezeptor konnte ein Anstieg von 11% beobachtet werden, der jedoch nicht die Signifikanzgrenze erreichte (Abb. 16 B). Die β - und α -Zellen nicht-diabetischer und Typ2-diabetischer Inseln wiesen keine Unterschiede in der Rezeptordichte des MT1- oder MT2-Rezeptors auf.

Zusammenfassend lässt sich sowohl für den MT1- als auch den MT2-Rezeptor bei allen Patienten eine spezifische Verteilung der Rezeptoren in den einzelnen Zelltypen der pankreatischen Insel beobachten, wobei die Rezeptordichte in den α -Zellen in beiden Gruppen am geringsten ist. Zudem kann unter einem Diabetes eine Zunahme der Rezeptordichte der Melatoninrezeptoren in den δ -Zellen Typ2-diabetischer Inseln beobachtet werden.

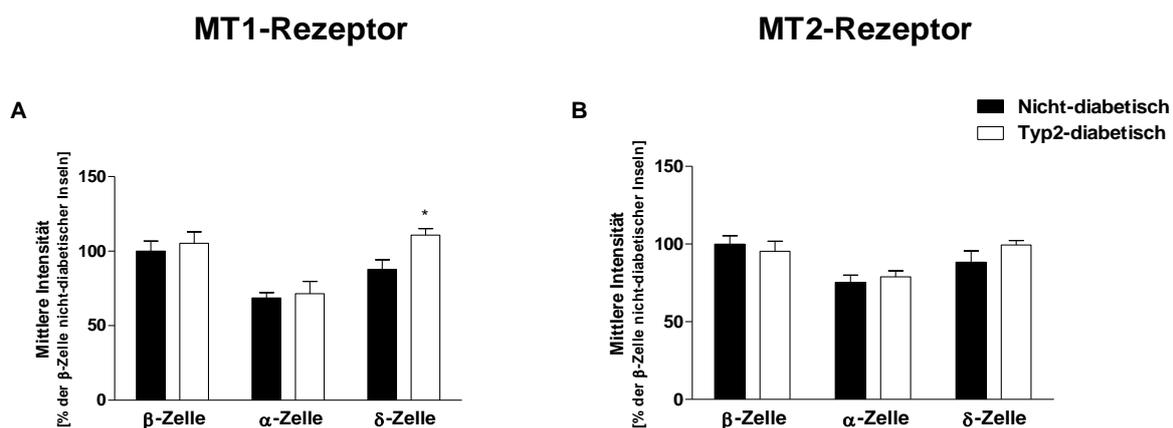


Abb. 16: Vergleich der MT1- und MT2-Rezeptormarkierung in den β -, α - und δ -Zellen der Langerhansschen Insel nicht-diabetischer und Typ2-diabetischer Patienten.

Semiquantitative Auswertung der mittleren Fluoreszenzintensität der MT1- (A) und MT2- (B) Rezeptormarkierung in den verschiedenen Zelltypen der pankreatischen Insel nicht-diabetischer Patienten (n = 8) und Typ2-diabetischer Patienten (n = 6). Die Daten repräsentieren Mittelwerte \pm SEM der relativen mittleren Fluoreszenzintensität (bezogen auf die 100%-gesetzte mittlere Intensität der β -Zelle nicht-diabetischer Inseln). * P < 0,05; *Repeated-measures two-way ANOVA*.

4.2.2 Molekularbiologische Charakterisierung der humanen Pankreata nicht-diabetischer und Typ2-diabetischer Patienten

Zur weiterführenden Charakterisierung der humanen Pankreata nicht-diabetischer und Typ2-diabetischer Patienten erfolgte eine Analyse von humanen Gewebeproben mittels *real-time* RT-PCR zur Erfassung der Expression der drei in der Immunhistochemie untersuchten pankreatischen Hormone. In der Auswertung zeigte sich im Vergleich zu den nicht-diabetischen Patienten bei den Typ2-diabetischen Patienten eine erhöhte mRNA-Expression aller drei Hormone (Abb. 17). So konnte für Insulin ein nicht-signifikanter

Anstieg um das 4,5-fache beobachtet werden ($P = 0,06$). Für Glukagon wurde eine 4,6-fach höhere Glukagonexpression in den Pankreata Typ2-diabetischer Patienten gemessen. Die relative Expression der Somatostatin-mRNA war um das 2,3-fache gesteigert. Insgesamt zeigte sich, dass die Genexpression der drei untersuchten Hormone unter einer diabetischen Stoffwechsellage auffällig erhöht ist.

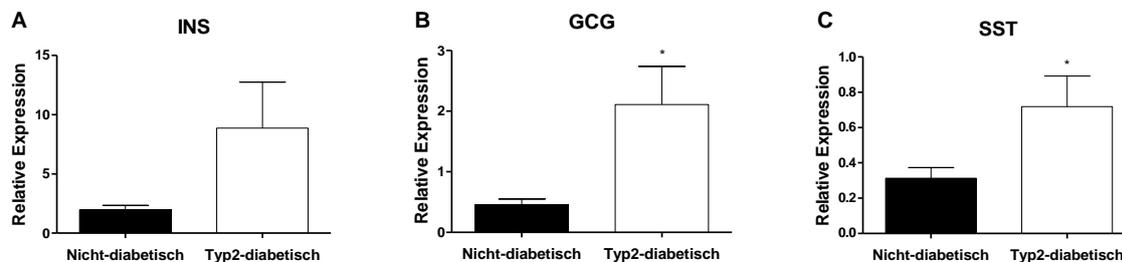


Abb. 17: Relative mRNA-Expression der pankreatischen Hormone im Pankreas nicht-diabetischer und Typ2-diabetischer Patienten.

Vergleich der relativen mRNA-Expression der pankreatischen Hormone Insulin (INS, A), Glukagon (GCG, B) und Somatostatin (SST, C) im Pankreas von nicht-diabetischen und Typ2-diabetischen Patienten. Die Daten repräsentieren Mittelwerte \pm SEM mit $n = 19 - 20$ nicht-diabetischen und $n = 7$ diabetischen Patienten. * $P < 0,05$; Mann-Whitney-*U*-Test.

4.2.3 Einfluss von Melatonin auf die Somatostatinsekretion der pankreatischen Insel nicht-diabetischer und Typ2-diabetischer Patienten

Um die physiologische Bedeutung der beobachteten Veränderungen der Melatoninrezeptordichte in den δ -Zellen Typ2-diabetischer Inseln sowie die Übertragbarkeit der Ergebnisse zum Melatonineinfluss am Modell der humanen δ -Zelllinie QGP-1 (siehe unter Kapitel 4.1) auch auf native humane pankreatische Inseln zu untersuchen, erfolgte eine Stimulation isolierter humaner Inseln. Dazu wurden Inseln eines nicht-diabetischen und Typ2-diabetischen Patienten mit steigenden Melatoninkonzentrationen (0,1 nM, 1 nM und 100 nM) in *Batch*-Kultur inkubiert. Zusätzlich wurde bei diesen Experimenten der Einfluss von Melatonin auf die Somatostatinsekretion sowohl unter einer normoglykämischen (5,5 mM) als auch einer hyperglykämischen Glucosekonzentration (11,1 mM) untersucht. Nach einer 4-stündigen Inkubation wurde die Konzentration von Somatostatin im Zellkulturüberstand bestimmt und auf die DNA-Menge pro *well* normiert. Nachfolgend werden die Ergebnisse dieser Untersuchungen nur beschreibend dargestellt, da die Analysen auf Inseln von jeweils einem Patienten basieren.

Die Inkubation nicht-diabetischer Inseln (Abb. 18 A) mit einer physiologischen Konzentration von 0,1 nM Melatonin und 5,5 mM Glucose führte zu einer Steigerung der Somatostatinsekretion um 53% im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (100%). Eine Steigerung (100% unbehandelt vs. 223% behandelt) war auch unter 1 nM Melatonin zu beobachten. Bei 100 nM Melatonin war kein Effekt mehr zu verzeichnen. Ein anderes Bild zeichnete sich

unter einer hyperglykämischen Konzentration von 11,1 mM Glucose ab. Während 0,1 nM Melatonin eine Senkung der Somatostatinsekretion verursachte (161% unbehandelt vs. 101% behandelt), kam es bei 1 nM zu einer erhöhten Ausschüttung von Somatostatin um 252%. Unter 100 nM Melatonin war kein spezifischer Melatonineinfluss zu beobachten (161% unbehandelt vs. 124%). Im Vergleich beider Kontrollen deutete sich eine Glucose-responsivität der Inseln an. So reagierten die Inseln bei 11,1 mM Glucose mit einer 61%igen Steigerung der Somatostatinausschüttung.

Im Gegensatz dazu reagierten Typ2-diabetische Inseln (Abb. 18 B) unter allen Melatoninkonzentrationen und unter beiden Glucosebedingungen mit einer Senkung der Somatostatin-ausschüttung. Die größten Effekte zeigten sich unter beiden Glucosekonzentrationen bei einer Melatoninkonzentration von 1 nM. So konnte unter 5,5 mM Glucose eine Senkung der Sekretion um 62% und unter 11,1 mM um 50%, verglichen mit der entsprechenden melatoninfreien Kontrolle, beobachtet werden. Eine Glucoseresponsivität der δ -Zelle war in den Inseln nicht mehr nachweisbar. So veränderte sich die Somatostatinsekretion unter einer Erhöhung der Glucosekonzentration in den Typ2-diabetischen Inseln nicht. Insgesamt zeigte sich ein unterschiedlicher Einfluss von Melatonin auf die Somatostatinsekretion in nicht-diabetischen und Typ2-diabetischen Inseln.

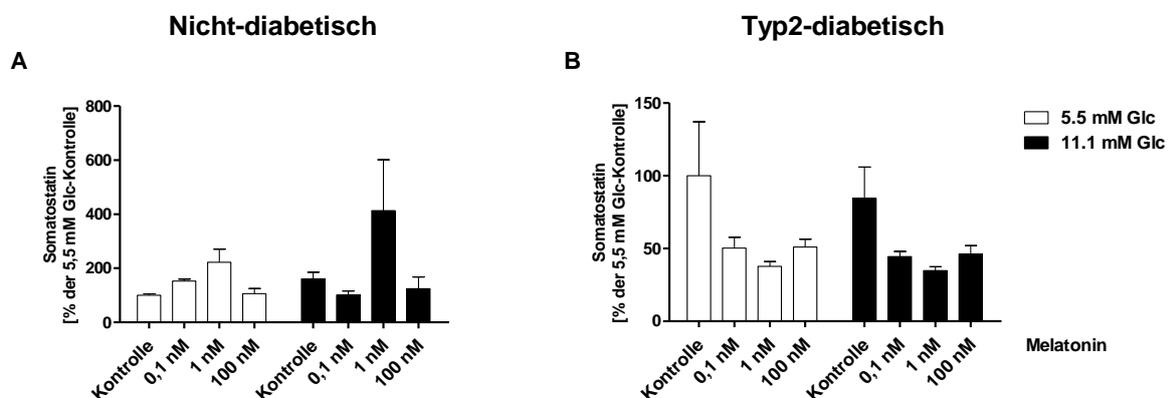


Abb. 18: Einfluss von Melatonin auf die Somatostatinsekretion pankreatischer Inseln eines nicht-diabetischen und Typ2-diabetischen Patienten.

Somatostatinsekretion nicht-diabetischer (A) und Typ2-diabetischer Inseln (B) nach 4-stündiger Inkubation mit steigenden Melatoninkonzentrationen (0,1 nM, 1 nM, 100 nM) unter 5,5 mM und 11,1 mM Glucose (Glc). Die Konzentration von Somatostatin im Zellkulturüberstand wurde mit dem DNA-Gehalt pro *well* korreliert. Die Daten sind angegeben als Mittelwerte \pm SEM, um die Schwankungsbreite der Mittelwerte der jeweiligen Behandlung (je $n = 5 - 6$ Batches) zu verdeutlichen (dargestellt in Prozent relativ zur 100%-gesetzten Kontrolle unter 5,5 mM Glc).

5 Diskussion

5.1 Charakterisierung der humanen pankreatischen δ -Zelllinie QGP-1

Das circadiane System steht im Zusammenhang mit der Regulation der Glucosehomöostase [187]. Dieses System ist hierarchisch organisiert, mit einem zentralen Rhythmusgenerator im SCN, der durch externe Zeitgeber an die Länge der täglichen Photoperiode angepasst wird, und peripheren Uhren in Gehirn und Organen, die wiederum durch den SCN synchronisiert werden [188]. Zellautonome, selbsterhaltende circadiane Oszillationen in der pankreatischen Insel spielen eine wichtige Rolle in der zeitlichen Koordinierung der Insulin- und Glukagonsekretion [121, 122, 187, 189–192]. Sowohl in der β - als auch α -Zelle sind Unterschiede in der rhythmischen Expression von Uhrengenen sowie Genen, die im Zusammenhang mit der Insulin- und Glukagonsekretion stehen, beteiligt an der oszillierenden Hormonsekretion [76, 187, 193–195], die einer circadianen/diurnalen Rhythmik unterliegt [74–77, 121, 122, 192, 196–199]. Die pankreatische Uhr wird sowohl durch den zentralen Rhythmusgenerator im SCN über neuronale Verbindungen des autonomen Nervensystems und über humorale Wege als auch durch die rhythmische Nahrungsaufnahme und parakrine Signale synchronisiert [187]. Zu den neuronalen Wegen zählen sympathische und parasympathische Verbindungen zwischen dem SCN und dem Pankreas [11, 200–204]. Für die humorale Synchronisation spielt u. a. das Hormon Melatonin eine bedeutende Rolle, dessen Sekretion ebenfalls circadian durch den SCN gesteuert wird [10, 84, 205]. So konnte in zahlreichen Untersuchungen ein Einfluss des Indolamins sowohl auf die pankreatische Insulin- [77, 96, 97, 99, 135] als auch Glukagonsekretion [101, 104] beobachtet werden. Ein Einfluss auf das von der pankreatischen δ -Zelle sezernierte Hormon Somatostatin wurde bisher nicht publiziert. Die δ -Zelle besitzt innerhalb der pankreatischen Insel eine wichtige Funktion, indem sie als parakriner Regulator sowohl die Insulin- als auch die Glukagonsekretion kontrolliert [153]. In der Regulation der Blutglucose stellt die pankreatische Insel ein komplexes Netzwerk dar, indem die verschiedenen Zelltypen miteinander interagieren. Dadurch wird eine präzise Hormonsekretion ermöglicht, die die Blutglucosekonzentration in engen Grenzen konstant aufrechterhält [148, 153]. Zudem scheint Somatostatin auch einen direkten Einfluss auf den Uhrenmechanismus der pankreatischen β - und α -Zelle zu haben, indem die Phasenlage von Uhrengenen in beiden Zelltypen durch das Hormon verändert werden kann [195]. So müssen bei Untersuchungen zur Hormonsekretion in der pankreatischen Insel auch mögliche circadiane Modulationen der Somatostatinsekretion berücksichtigt werden. Daher erfolgten im Rahmen dieser Arbeit Untersuchungen zum Einfluss des tageszeitlich gesteuerten Hormons Melatonin auf die Somatostatinsekretion der pankreatischen δ -Zelle. Als zelluläres Modell diente hierbei die humane Somatostatinoma-Zelllinie QGP-1.

Diese Zelllinie wurde 1980 von Kaku et al. [181] aus einem pankreatischen Somatostatinom eines 61 Jahre alten Mannes isoliert. Eine genauere Charakterisierung dieser Zelllinie ließ eine Abstammung von der pankreatischen δ -Zelle vermuten. So konnten Iguchi et al. [206] immunhistochemisch den Nachweis von Somatostatin in den QGP-1-Zellen und dem Ursprungstumorgewebe erbringen. Zudem zeigte diese Studie, dass die QGP-1-Zellen δ -Zell-spezifisch die Isoform Somatostatin-14 sezernieren, während die Hormone Insulin und Glukagon nicht in den Zellen nachgewiesen werden konnten. In Übereinstimmung ließ sich in den eigenen Untersuchungen Somatostatin sowohl auf mRNA- als auch immunhistochemisch auf Proteinebene in den Zellen nachweisen.

In der Literatur sind nur wenig Studien zu finden, die QGP-1- bzw. QGP-1N-Zellen, welche nach Xenotransplantation von QGP-1-Zellen aus dem Tumor der Maus isoliert und kultiviert wurden [207], als ein Modell für Untersuchungen der Somatostatinsekretion in der pankreatischen δ -Zelle nutzen [208–211]. Zudem sind genaue Regulationsmechanismen der pankreatischen Somatostatinsekretion nur ansatzweise bekannt [146]. Daher erfolgte im Rahmen dieser Arbeit zunächst eine Charakterisierung der Zelllinie hinsichtlich der Expression wichtiger Gene, die eine Rolle in der Somatostatinsekretion spielen, um die Eignung dieser Zelllinie als ein Modell für die native humane pankreatische δ -Zelle zu untersuchen. Dabei wurde zunächst basierend auf *Patch-Clamp*-Untersuchungen an murinen und humanen Inseln [212–214] die Expression verschiedener Ionenkanäle, die an der Stimulus-gekoppelten Somatostatinsekretion beteiligt sind, mittels RT-PCR untersucht. Ein wichtiger Stimulus für die pankreatische δ -Zelle ist Glucose [146]. Dabei wird die Glucose-induzierte Somatostatinsekretion (Abb. 19) über ATP-abhängige Kaliumkanäle (K_{ATP} -Kanäle) Membranpotential-abhängig vermittelt [146, 212–215]. Ähnlich wie in der β -Zelle [178] kommt es durch die Metabolisierung von Glucose zu einem Anstieg des ATP/ADP-Verhältnisses, verbunden mit einem Schließen der K_{ATP} -Kanäle. Dies führt zu einer Depolarisation der Zelle sowie einer Aktivierung von spannungsabhängigen Calciumkanälen, die ein Aktionspotential initiieren. Der Einstrom von Ca^{2+} über diese Kanäle ist verbunden mit der Exozytose von Somatostatin. Nachgeschaltet kommt es in der pankreatischen δ -Zelle über eine Aktivierung von Ryanodinrezeptoren im glatten ER zu einer Calcium-induzierten Calciumfreisetzung (CICR, *calcium-induced calcium release*) aus intrazellulären Speichern, wodurch die Exozytose von Somatostatin zusätzlich verstärkt wird [146, 214, 216]. Zudem scheint Glucose auch Membranpotential-unabhängig über eine Erhöhung der intrazellulären cAMP-Konzentration die CICR und die Exozytose zu stimulieren [214]. Diese CICR ist bisher in der murinen δ -Zelle untersucht, wird allerdings auch für die humane δ -Zelle vermutet [213].

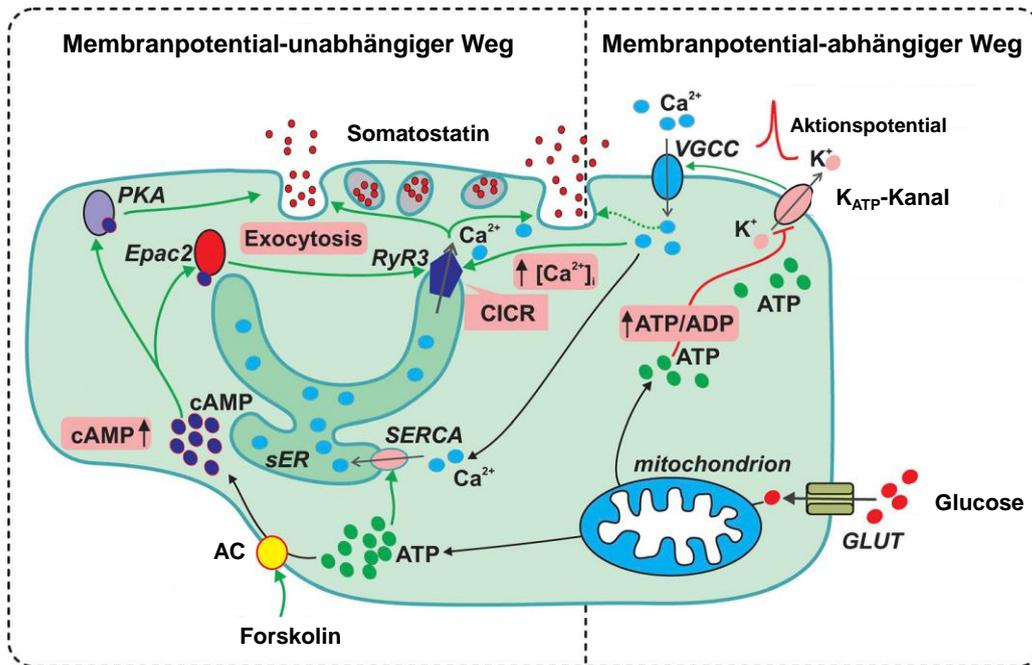


Abb. 19: Modellvorstellung zur Somatostatinsekretion der pankreatischen δ -Zelle.

Durch die Metabolisierung von Glucose kommt es zu einem Anstieg des ATP/ADP-Verhältnisses und einem Schließen von K_{ATP} -Kanälen, verbunden mit einer Depolarisation und einem Einstrom von Ca^{2+} über spannungsabhängige Calciumkanäle (VGCC, *voltage-gated Ca^{2+} channels*). Dieser Membranpotential-abhängige Weg wird durch die Calcium-induzierte Calciumfreisetzung (CICR, *calcium-induced calcium release*) verstärkt. ATP führt zu einem Anstieg der Ca^{2+} -Konzentration im glatten ER (sER, *smooth ER*) über die SERCA und zum anderen zur Erhöhung der cAMP-Konzentration, wodurch die Proteinkinase A (PKA) und Epac2 (*exchange protein directly activated by cAMP 2*) aktiviert werden. PKA stimuliert direkt die Exozytose von Somatostatin und Epac2 die CICR über eine Sensitivierung von Ryanodinrezeptoren (RyR3). GLUT, Glucosetransporter. (Abbildung modifiziert nach [214])

Ein ähnlicher Mechanismus der Stimulus-Sekretions-Kopplung scheint auch in der humanen δ -Zelllinie QGP-1 eine Rolle zu spielen. In den Expressionsanalysen konnten wesentliche Elemente der nativen δ -Zelle auch in den QGP-1-Zellen nachgewiesen werden. So zeigten QGP-1-Zellen die Expression beider Untereinheiten des K_{ATP} -Kanals (KIR6.2 und SUR1) auf Ebene der mRNA. Auch die verschiedenen spannungsabhängigen Calciumkanäle vom L-, P/Q- und T-Typ werden in dieser Zelllinie exprimiert. Der für die Vermittlung der CICR in der murinen δ -Zelle bedeutende R-Typ-Calciumkanal Cav2.3 [216] konnte in der humanen δ -Zelllinie QGP-1 allerdings nicht nachgewiesen werden. Auch Untersuchungen von Braun et al. [217] fanden keine Expression des Cav2.3 in der humanen Insel. So zeigen sich in Bezug auf den R-Typ-Calciumkanal Spezies-spezifische Unterschiede in der Ausstattung der humanen δ -Zelllinie QGP-1. Allerdings konnte die Expression von Ryanodinrezeptoren auf mRNA-Ebene auch in humanen QGP-1-Zellen gefunden werden, mit Ausnahme des Subtyps RYR-1. Untersuchungen in der humanen und murinen pankreatischen Insel zeigten eine Expression aller drei Subtypen der Ryanodinrezeptoren in der Insel des Menschen (RYR-1/2/3) [213] und der Maus (Ryr-1/2/3) [216]. Auf Proteinebene wurden immunhistochemisch die Subtypen Ryr-1/2/3 in der murinen Insel nachgewiesen, wobei in der δ -Zelle nur der Rezeptorsubtyp Ryr-3 vorkommt [216]. Untersuchungen an humanen

QGP-1N-Zellen deuten auf eine Beteiligung sowohl des Einstroms von Ca^{2+} über spannungsabhängige Calciumkanäle als auch über eine Ca^{2+} -Mobilisierung aus intrazellulären Speichern an der Agonist-induzierten Vermittlung des Ca^{2+} -Signals hin [211], wodurch eine CICR auch in der humanen δ -Zelllinie QGP-1 vermutet werden kann.

Im Hinblick auf die Mechanismen der Glucoseaufnahme wurde die Expression der verschiedenen Glucosetransporter (GLUT1 - 4) in der QGP-1-Zelle untersucht. Rorsman und Huising [146] deuten in ihrem Modell zur Regulation der pankreatischen Somatostatinsekretion der Maus auf die Rolle von Glut1 und Glut3 in der Aufnahme von Glucose in die Zelle hin. In Übereinstimmung konnte bei den eigenen Untersuchungen die Expression von GLUT1 und GLUT3 in der humanen δ -Zelllinie QGP-1 gefunden werden, während die für die pankreatische β -Zelle bedeutende Isoform GLUT2 [178] nicht exprimiert wird. Auch in Transkriptomanalysen konnten DiGruccio et al. [218] keine Glut2-Expression in der nativen pankreatischen δ -Zelle der Maus nachweisen. Zudem zeigten die eigenen Untersuchungen eine Expression des GLUT4 in den QGP-1-Zellen. Welche Bedeutung diese Rezeptorisoform für die pankreatische δ -Zelle hat, ist bisher in der Literatur nicht beschrieben. Allerdings konnte dieser Rezeptor bereits in vorausgegangenen Untersuchungen der Arbeitsgruppe Peschke sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene in der pankreatischen Insel von Maus, Ratte sowie Mensch nachgewiesen werden. Zudem war der Glut4 mittels RT-PCR und Westernblot in der pankreatischen β -Zelllinie der Ratte INS-1 sowie in der murinen α -Zelllinie $\alpha\text{TC1.9}$ nachweisbar [219].

Zusätzlich zum Einfluss von Glucose unterliegt die Somatostatinsekretion innerhalb der pankreatischen Insel parakrinen Einflüssen der β - und α -Zellen [146]. Daher wurde die Expression der Rezeptoren für die Hormone Insulin und Glukagon in den QGP-1-Zellen untersucht. Während die Expression beider Rezeptoren in den humanen Kontrollgeweben nachgewiesen werden konnte, exprimiert die humane δ -Zelllinie QGP-1 nur den Insulinrezeptor (INSR). Dabei konnten beide Isoformen des Rezeptors (INSR-A/B), die durch alternatives Splicing entstehen [220], auf mRNA-Ebene gefunden werden. Beide Transkriptvarianten wurden auch in einer Studie von Muller et al. [221] auf Einzelzellebene in der humanen nativen δ -Zelle beschrieben. Die physiologische Bedeutung von Insulin für die Somatostatinsekretion wird allerdings kontrovers diskutiert [146]. Obwohl die Insr-Expression, übereinstimmend mit den eigenen Ergebnissen an den QGP-1-Zellen, in der murinen Insel sowie der Somatostatin-sezernierenden Zelllinie TGP52 gefunden werden konnte [166], zeigten Untersuchungen an Maus und Ratte gegensätzliche Ergebnisse. Sie fanden entweder keine Beeinflussung der Somatostatinsekretion durch Insulin [166, 222] oder einen stimulatorischen Effekt [175]. Untersuchungen an humanen Pankreata deuten auf einen stimulatorischen Einfluss von Insulin auf die Somatostatinausschüttung und

dokumentierten eine Abnahme der Glucose-stimulierten Somatostatinsekretion nach Immunoneutralisation mit einem Insulin-Antikörper [167]. Auch Vergari et al. [175] zeigten eine Steigerung der Somatostatinsekretion durch Insulin in der humanen Insel, ein Effekt der durch einen Insulinrezeptor-Antikörper aufgehoben wurde. Diese Literaturbefunde unterstützen die Hypothese, dass auch QGP-1-Zellen im Hinblick auf die INSR-Expression Eigenschaften einer nativen humanen δ -Zelle aufweisen und die Somatostatinsekretion dieser Zellen durch Insulin moduliert werden kann.

In Bezug auf das von der pankreatischen α -Zelle ausgeschüttete Hormon Glukagon zeigten zahlreiche Untersuchungen an Tiermodellen und am Menschen eine stimulatorische Rolle auf die pankreatische Somatostatinsekretion [163, 164, 167, 222]. In Transkriptomanalysen konnte der Glukagonrezeptor (Gcgr) in der murinen δ -Zelle nachgewiesen werden [218]. Auch in der pankreatischen Insel der Ratte wurde der Glukagonrezeptor in der δ -Zelle nachgewiesen, obwohl nur 11% der δ -Zellen (vs. 97% der β -Zellen) eine immunhistochemisch positive Reaktion zeigten [165]. Im Gegensatz dazu konnte in der eigenen Arbeit die Expression des GCGR in der humanen QGP-1-Zelllinie nicht nachgewiesen werden. Auch Hauge-Evans et al. [166] fanden in der murinen δ -Zelllinie TGP52 keine Expression des Gcgr, verbunden mit einer fehlenden Beeinflussung der Somatostatinsekretion in diesen Zellen. Andererseits wurde in dieser Studie die Glucose-stimulierte Somatostatinsekretion der primären murinen Insel durch Inkubation mit Glukagon gesteigert. Die Autoren diskutieren mögliche Limitationen dieser Zelllinie in der Repräsentation von primärem nativem Gewebe. Auch QGP-1-Zellen könnten aufgrund ihrer transformierten Natur veränderte Eigenschaften aufweisen, was die fehlende Expression des GCGR erklären würde. Andererseits wird gerade für die humane Insel ein weiterer α/δ -Zell-Feedbackmechanismus über das Hormon UCN3 diskutiert [168], der möglicherweise auch für die humane δ -Zelllinie QGP-1 eine Rolle spielen könnte. Insgesamt besteht eine komplexe Interaktion zwischen den einzelnen hier betrachteten Zelltypen der pankreatischen Insel (Abb. 2).

Zusammenfassend zeigte sich, dass die im Rahmen dieser Doktorarbeit verwendete humane δ -Zelllinie QGP-1 wesentliche Gene exprimiert, die in der Signaltransduktion der Stimulus-gekoppelten Somatostatinsekretion eine wichtige Rolle spielen. Zudem konnte auch die Expression des Insulinrezeptors nachgewiesen werden. Innerhalb der pankreatischen Insel kann die Somatostatinsekretion dadurch parakrin moduliert werden. Hinsichtlich des fehlenden Nachweises des Glukagonrezeptors in QGP-1-Zellen müssen eventuelle Limitationen der Zelllinie oder andere, in der humanen Insel diskutierte α -Zell-Regulationsmechanismen (z. B. über UCN3 [168]) für diese Zelllinie in Betracht gezogen werden. Dennoch unterstützen diese Ergebnisse die Annahme von

Iguchi et al. [206], dass sich die QGP-1-Zelllinie als ein geeignetes Modell für die native pankreatische δ -Zelle erweist. Daher wurde diese Zelllinie verwendet, um weiterführend Einflüsse des Pinealhormons Melatonin auf die Somatostatinsekretion zu untersuchen.

5.2 Untersuchungen zum Einfluss von Melatonin auf die Somatostatinsekretion am Modell der humanen pankreatischen δ -Zelllinie QGP-1

5.2.1 Nachweis der Melatoninrezeptoren

Grundlage dieser Untersuchungen ist der Nachweis der beiden Melatoninrezeptor-Isoformen MT1 und MT2 in der humanen pankreatischen δ -Zelllinie QGP-1. So konnte mittels RT-PCR und anschließender Gelelektrophorese die Genexpression von MT1 und MT2 sowohl in den QGP-1-Zellen als auch in den humanen Kontrollgeweben wie Pankreas und Insel gezeigt werden. Die Expression beider Melatoninrezeptoren im humanen Pankreas sowie in der humanen Insel ist bereits in früheren Arbeiten nachgewiesen worden [108] allerdings ohne zelluläre Zuordnung. Die Auswertung der relativen Expression von MT1 und MT2 zeigte ein Verhältnis von 100% zu 83% in der QGP-1-Zelllinie. Dies unterstützt *in vivo*-Daten am humanen Pankreas [108] sowie an humanen Inseln [126], dass die MT1- und MT2-Rezeptorexpression beim Menschen geringere Unterschiede als in der Insel der Ratte zeigen [133]. Auch in der β - [134] und δ -Zelllinie [223] der Ratte wurde eine wesentlich geringere Expression des MT2- im Vergleich zum MT1-Rezeptor beobachtet.

Um die RT-PCR-Ergebnisse zu verifizieren, wurden die beiden Rezeptorisoformen MT1 und MT2 immunhistochemisch, also auf Proteinebene, in der QGP-1-Zelllinie untersucht. Auch hier zeigte sich, dass beide Isoformen in der δ -Zelle nachgewiesen werden können. Dieser Nachweis, zusammen mit den bisherigen Beobachtungen zum Einfluss von Melatonin sowohl auf die Insulin- als auch die Glukagonsekretion [84] lassen auch einen Einfluss von Melatonin auf die pankreatische Somatostatinsekretion vermuten. Dies bildete die Grundlage für die nachfolgenden funktionellen Untersuchungen.

5.2.2 *In vitro*-Untersuchung zur funktionellen Bedeutung von Melatonin auf die Somatostatinsekretion in Abhängigkeit von der Zeit

Die Untersuchungen zur funktionellen Bedeutung von Melatoninrezeptoren auf die Somatostatinsekretion erfolgten in *Batch*-Kultur mittels verschiedener Inkubationsversuche unter einer Glucosekonzentration von 11,1 mM. Zunächst wurde ein Einfluss der Inkubationsdauer mit einer physiologischen Konzentration von 1 nM Melatonin auf die Somatostatinausschüttung der QGP-1-Zelllinie untersucht. Hier ließ sich ein zeitabhängiger Effekt auf die Sekretion beobachten. So zeigte sich eine Abnahme der Somatostatinausschüttung nach Inkubation mit Melatonin für 1 h und 4 h. Dieser

inhibitorische Effekt war unter einer Inkubationsdauer von 6 h Stunden nicht mehr zu beobachten.

Vergleichende Untersuchungen zum Einfluss von Melatonin auf die Somatostatinsekretion fehlen in der Literatur. Allerdings ist ein inhibitorischer Einfluss von Melatonin auf die pankreatische β -Zelle sehr gut untersucht. Über die Kopplung der Melatoninrezeptoren an inhibitorische G-Proteine kommt es hier zu einer Hemmung der AC-cAMP- und GC-cGMP-Signalkaskade, verbunden mit einer Senkung der Insulinsekretion [98, 100, 101, 132, 134, 135, 141, 142]. Eine Vermittlung des inhibitorischen Effektes von Melatonin über G_i -Proteine könnte folglich auch für die pankreatische δ -Zelle vermutet werden, da sich die Regulationsmechanismen der Insulin- und Somatostatinsekretion (Abb. 19) ähneln [146, 178, 214]. Der fehlende Effekt bei einer Stimulation mit Melatonin für 6 h könnte auf eine Rezeptordesensitivierung zurückzuführen sein. So scheinen Melatoninrezeptoren durch Melatonin selbst reguliert zu werden. Dabei könnten Prozesse, wie die Entkopplung des G-Proteins, die Phosphorylierung, die Internalisierung und die Herunterregulation der Expression eine Rolle spielen [224]. Ein häufig genutztes Modell zur Untersuchung des Phänomens der Melatoninrezeptor-Desensitivierung stellt die *Chinese hamster ovary*(CHO)-Zelllinie dar. So zeigten Untersuchungen an CHO-Zellen mit heterologer Expression des humanen MT1- oder MT2-Rezeptors eine Desensitivierung beider Rezeptoren nach einer chronischen Melatonininkubation (1 μ M) von 5 h, verbunden mit einer Aufhebung des inhibitorischen Effektes von Melatonin auf die Forskolin-induzierte cAMP-Konzentration [71]. In einer anderen Studie an hMT1-exprimierenden CHO-Zellen kam es trotz erhöhter Melatoninrezeptorbindungsstellen nach chronischer Melatoninexposition (8 h) zu einer verminderten Affinität für Melatonin sowie einer Abnahme der funktionellen Sensitivität des Rezeptors. Vermittelt wurden diese Effekte eventuell durch eine Entkopplung von Rezeptor und G-Protein. Die beobachtete Desensitivierung erfolgte nur unter einer Melatoninkonzentration von 100 nM, während eine physiologische Konzentration von 400 pM Melatonin keine der genannten Effekte zeigte [225]. Obwohl im eigenen Versuch eine hundertfach geringere Konzentration von Melatonin (1 nM) als in der zuvor genannten Studie eingesetzt wurde, könnte es hier nach 6-stündiger Inkubation ebenfalls zu einer Desensitivierung des MT1- und/oder des MT2-Rezeptors gekommen sein, die den inhibitorischen Einfluss von Melatonin auf die Somatostatinsekretion aufhebt. Ob der in der letztgenannten Studie beobachtete fehlende Desensitivierungseffekt unter physiologischen Melatoninkonzentrationen im pM-Konzentrationsbereich [225] auch in der QGP-1-Zelle eine Rolle spielt, muss in weiteren Untersuchungen geklärt werden. Zudem müssen auch MT2-Rezeptor-vermittelte Desensitivierungsaspekte berücksichtigt werden, da dieser Rezeptor möglicherweise stärker dem Phänomen der Desensitivierung unterliegt als der MT1-Rezeptor und in humanen Inseln stärker exprimiert ist als in Inseln der Ratte [126, 133].

So zeigte sich in rekombinanten hMT2-CHO-Zellen bereits nach einer Kurzzeitstimulation mit Melatonin (10 nM für 10 min) eine Abnahme der Melatoninbindung, verbunden mit einer verminderten Senkung der Forskolin-stimulierten cAMP-Konzentration und einer Rezeptorinternalisierung. Eine funktionelle Desensitivierung und Internalisierung war in dieser Studie bei dem humanen MT1-Rezeptor jedoch nicht zu beobachten [226]. Untersucht in dieser Doktorarbeit wurden Effekte zwischen 1 h und 6 h. Obwohl der inhibitorische Aspekt von Melatonin auf die Somatostatinsekretion nach 1 h stärker war, konnte nur nach 4 h Inkubation ein statistisch signifikanter Effekt beobachtet werden, der sich nach 6 h wieder verlor. Zudem stellt eine Inkubation von 4 h gegenüber 1 h eine physiologischere Situation zu den natürlicherweise nächtlich erhöhten Melatoninwerten von ca. 8 h Stunden dar [37, 42, 224]. Daher wurden folgende Experimente zur Klärung zugrundeliegender Signalkaskaden des Melatonineinflusses auf die Somatostatinsekretion unter einer Inkubationszeit von 4 h durchgeführt.

5.2.3 Untersuchung der Dosis-Wirkungsbeziehung von Melatonin auf die Somatostatinsekretion sowie zugrundeliegender Signaltransduktionsmechanismen

Des Weiteren erfolgte eine Untersuchung des Dosis-Wirkungszusammenhangs zwischen der Melatoninkonzentration und der Somatostatinsekretion. Hierfür wurden die QGP-1-Zellen mit steigenden Melatoninkonzentrationen (0,1; 1; 10; 100 nM sowie 1 und 10 µM) für 4 h inkubiert und die Somatostatinsekretion im Überstand gemessen. In der Auswertung zeigte sich eine Dosis-Wirkungsbeziehung. So konnte im physiologischen Melatoninkonzentrationsbereich von 1 nM und 10 nM erneut ein inhibitorischer Einfluss auf die Somatostatinsekretion in QGP-1-Zellen beobachtet werden, während sich im pharmakologischen Konzentrationsbereich eine Umkehr des Effektes andeutete. Eine Konzentration von 100 pM, die die nächtliche Konzentration von Melatonin im Blut unterschreitet [46], zeigte keinen Effekt auf die Somatostatinsekretion.

Um zugrundeliegende Signaltransduktionsmechanismen zu klären, wurde über den gesamten Konzentrationsbereich der Einfluss von Melatonin auf die *second messenger* cAMP und cGMP untersucht. Hier zeigte sich eine im Wesentlichen konzentrationsabhängige Abnahme der intrazellulären Konzentration beider *second messenger* nach einer Melatonininkubation von 4 h. Dieser Zusammenhang war für cGMP über den gesamten Melatoninkonzentrationsbereich zu sehen. Die Abnahme der cAMP-Konzentration war nicht-signifikant bei 1 nM Melatonin, erreichte allerdings unter einer Konzentration von 100 nM und 10 µM Melatonin die Signifikanzgrenze.

Hinsichtlich der gekoppelten intrazellulären Signalkaskaden nach Bindung von Melatonin an seine spezifischen Rezeptoren existiert eine generelle Übereinstimmung. So sind die beiden

Melatoninrezeptoren an heterotrimere G-Proteine vom Typ G_i oder $G_{q/11}$ gekoppelt. Die Bindung des Liganden Melatonin an G_i -gekoppelte Rezeptoren resultiert in einer Herunterregulation der AC-Aktivität, verbunden mit einer Abnahme der cAMP-Konzentration. Im Anschluss wird die Aktivität der PKA vermindert. Zudem kann eine Aktivierung des MT2-Rezeptors über die Inhibierung der GC zu einer verminderten cGMP-Bildung führen [24].

Die Melatonin-vermittelte Abnahme der cAMP- [98, 132, 134, 135] und cGMP-Konzentrationen [141, 142] führt in der pankreatischen β -Zelle zu einer Hemmung der Insulinsekretion. Veränderungen der cAMP-Konzentration modulieren die elektrische Aktivität sowie das Ca^{2+} -Signal in der β -Zelle. Zudem sensitiviert cAMP den Sekretionsmechanismus gegenüber Ca^{2+} , wodurch die Insulinsekretion verstärkt werden kann [227]. Hierbei spielen sowohl PKA-abhängige als auch -unabhängige Mechanismen eine Rolle [227–230]. PKA-abhängige Mechanismen werden im Wesentlichen durch die Phosphorylierung von Proteinen vermittelt, die im Zusammenhang mit der Exozytose stehen [230]. So können K_{ATP} -Kanäle [231], spannungsabhängige L-Typ-Calciumkanäle [232] sowie Ryanodin- [233] und IP_3 -Rezeptoren [234, 235] durch die PKA moduliert und sensitiviert werden. PKA-unabhängige Mechanismen werden durch cAMP-bindende Proteine der cAMP-GEF/Epac-Familie (*cAMP-regulated guanine nucleotide exchange factor/exchange protein directly activated by cAMP*) vermittelt, die den Prozess der Exozytose von sekretorischen Granula beeinflussen. Über eine Interaktion der Isoform cAMP-GEFII/Epac2 mit Exozytose-assoziierten Proteinen sowie mit der regulatorischen Untereinheit SUR1 des K_{ATP} -Kanals kann die Insulinsekretion in der β -Zelle stimuliert werden [227, 229, 230, 236]. Zudem scheint cAMP-GEFII/Epac2 über eine funktionelle Interaktion mit Ryanodinrezeptoren auch eine Rolle in der Mobilisierung von Ca^{2+} aus intrazellulären Speichern zu spielen und damit die CICR zu modulieren [237, 238]. Einen weiteren Effektor für PKA-unabhängige Mechanismen bilden die nicht-selektiven Kationenkanäle (CNG-Kanäle, *cyclic nucleotide-gated channels*). Über die Bindung von cAMP modulieren sie den Einstrom von Na^+ und Ca^{2+} in die Zelle [230].

Auch eine Veränderung der cGMP-Konzentration führt zu einer Modulation der Aktivität dieser Kanäle [239]. Eine Rolle dieser Kanäle für die Insulinsekretion ist bisher nicht untersucht, allerdings konnten Stumpf et al. [141] die Expression verschiedener Untereinheiten der CNG-Kanäle in der β -Zelllinie INS-1 nachweisen. Daneben werden cGMP-Effekte über eine Aktivierung der Proteinkinase G (PKG) vermittelt [240]. Zudem scheint es eine enge Verknüpfung zwischen dem cAMP- und cGMP-Signalweg zu geben. So wird zum einen durch die cGMP-spezifische Hemmung der PDE3 über einen verminderten Abbau die intrazelluläre cAMP-Konzentration erhöht [241] und zum anderen kann cGMP auch die PKA direkt aktivieren [242].

Analoge Prozesse könnten auch eine Rolle in der Vermittlung des Melatonineinflusses auf die Somatostatinsekretion der pankreatischen δ -Zelllinie QGP-1 spielen. Die beobachtete Abnahme von cAMP und cGMP in QGP-1-Zellen nach Melatoninstimulation könnte daher den inhibitorischen Effekt von Melatonin auf die Somatostatinsekretion im physiologischen Konzentrationsbereich erklären. cAMP besitzt auch in der pankreatischen δ -Zelle eine stimulatorische Funktion [243]. So zeigten Untersuchungen in der murinen Insel, dass cAMP im Zusammenhang mit der Ca^{2+} -Freisetzung über die CICR eine wichtige Rolle für die Somatostatinsekretion spielt [216]. Untersuchungen von Hauge-Evans et al. [166] zeigten in der murinen Insel und δ -Zelllinie TGP52 eine Stimulation der Somatostatinsekretion durch Forskolin, das über eine Aktivierung der AC die intrazelluläre cAMP-Konzentration steigert. Zudem wird die Sekretion von Somatostatin über K_{ATP} -Kanäle vermittelt [212, 214, 215, 244]. Wie unter 5.1 diskutiert, lassen sich auf Transkriptebene in den QGP-1-Zellen wichtige Elemente des Sekretionsmechanismus, wie z. B. der K_{ATP} -Kanal mit seinen Untereinheiten KIR6.2 und SUR1, der L-Typ-Calciumkanal und die Ryanodinrezeptoren (RYR-2/3) nachweisen. Ob diese Elemente in der humanen δ -Zelle, ähnlich wie in der β -Zelle, einer Modulation durch PKA-abhängige und -unabhängige Mechanismen, mediiert durch cAMP-GEF/Epac, unterliegen, muss in weiterführenden Untersuchungen mittels spezifischer Antagonisten bzw. Agonisten für die PKA und cAMP-GEF/Epac untersucht werden. Die Bedeutung von PKA und cAMP-GEFII/Epac2 in der Vermittlung der Somatostatinsekretion wurde erst kürzlich in der δ -Zelle der murinen Insel gezeigt. Hier untersuchten Denwood et al. [214] die Rolle von cAMP als amplifizierenden Faktor der Glucose-induzierten Somatostatinsekretion und zeigten, dass es über eine cAMP-abhängige Aktivierung der PKA zu einer Stimulation der Exozytose und über eine Interaktion von Epac2 und Ryanodinrezeptoren zu einer Aktivierung der CICR kommt. Vergleichende Untersuchungen mit QGP-1N-Zellen belegen ebenfalls eine cAMP-abhängige Stimulation der Somatostatinsekretion. Hier konnte durch Forskolin oder durch das zellpermeable cAMP-Analogon Dibutyryl-cAMP (dbcAMP) die Sekretion gesteigert werden [209].

In eigenen, weiterführenden Untersuchungen sollte daher geklärt werden, ob die *second messenger* cAMP und cGMP einen direkten Einfluss auf die Somatostatinsekretion in QGP-1-Zellen haben. Hierfür wurden die Zellen mit verschiedenen Konzentrationen der membranpermeablen Analoga 8-Br-cAMP bzw. 8-Br-cGMP mit und ohne unspezifischem PDE-Hemmer IBMX (1 mM) für 1 h inkubiert. Durch Einsatz von IBMX sollte in diesem Versuchsansatz ein Abbau von cAMP und cGMP über die Hemmung der zellulären PDEs verhindert werden. Hinsichtlich der Beteiligung von cAMP im Sekretionsprozess konnte in den QGP-1-Zellen ein direkter Einfluss von cAMP auf die Somatostatinsekretion bestätigt werden. So zeigte sich in den Inkubationsversuchen mit 8-Br-cAMP und gleichzeitiger Inkubation mit dem PDE-Hemmer IBMX eine konzentrationsabhängige Steigerung der

Somatostatinausschüttung in den QGP-1-Zellen. In Vorversuchen ohne IBMX führte hingegen nur eine sehr hohe Konzentration von 8-Br-cAMP (1 mM) zu einer erhöhten Ausschüttung von Somatostatin. Grund hierfür könnte möglicherweise eine Ausstattung der Zelle mit einem effizienten PDE-System sein, das mit den unphysiologisch hohen Konzentrationen von cAMP konkurriert, mit Ausnahme der höchsten Konzentration von 1 mM 8-Br-cAMP. Diese Annahme würde ebenfalls den ausbleibenden Effekt des membranpermeablen cGMP-Analogons 8-Br-cGMP erklären. Auch hier hatte 8-Br-cGMP keinen stimulatorischen Effekt auf die Somatostatinsekretion, wenn die zellulären PDEs nicht gehemmt wurden. Zudem kam es bei diesem Analogon in Kombination mit IBMX zu einer Abnahme der Somatostatinausschüttung unter einer Konzentration von 1 μ M 8-Br-cGMP. Obwohl in der Kombination mit IBMX unter steigenden 8-Br-cGMP-Konzentrationen ein leichter Anstieg der Sekretion zu beobachten war, blieb die Somatostatinkonzentration im Überstand immer unterhalb der IBMX-Kontrolle. Beide Substanzen können durch bestimmte PDEs hydrolysiert werden [245]. In der Zelle gibt es 11 verschiedene Isoenzyme (PDE1 - PDE11), die sich wiederum in verschiedene Isoformen aufteilen. Zudem lassen sich IBMX-sensitive und -insensitive Isoenzyme unterscheiden. Zu den IBMX-insensitiven PDEs gehören die Isoformen PDE8A/B und PDE9A. Vor allem die PDE9A gilt als spezifischer cGMP-PDE-Hemmer [241]. Der Nachweis dieser Isoformen mittels *real-time* RT-PCR in QGP-1-Zellen bestätigte eine Expression von PDE8A/B und zeigte zudem eine sehr hohe Expression der Isoform PDE9A. Eventuell führte eine hohe Aktivität dieser Enzyme innerhalb der Zelle zu der fehlenden Reaktion von 8-Br-cGMP. Auf der anderen Seite muss bei der Verwendung der Br-substituierten Analoga eine geringe Membranpermeabilität intakter Zellmembranen berücksichtigt werden, wobei die Permeabilität von 8-Br-cGMP noch geringer ist als die von 8-Br-cAMP. Dies führt in Experimenten mit intakten Zellen zu einer Verwendung der Substanzen im mM-Konzentrationsbereich [245]. So könnten fehlende Effekte im eigenen Versuchsaufbau auch auf zu gering eingesetzte Konzentrationen der Analoga zurückzuführen sein. Untersuchungen von Tateishi et al. [209] zeigten in diesem Zusammenhang, dass die Effekte auf die Somatostatinsekretion nach 1-stündiger Inkubation mit 2 mM dbcAMP in QGP-1N-Zellen geringer ausfielen als bei einer Stimulation mit Forskolin. Dennoch zeigte eine alleinige IBMX-Inkubation eine Steigerung der Sekretion, was auf eine Beteiligung der *second messenger* cAMP und möglicherweise cGMP am Sekretionsprozess von Somatostatin in den QGP-1-Zellen deutet. Die Frage, ob cGMP eine Rolle für die Somatostatinsekretion spielt oder ob eine hohe PDE-Aktivität in den QGP-1-Zellen diesen Signalweg maskiert, muss in weiteren Untersuchungen geklärt werden. Andere Untersuchungen an der QGP-1-Zelllinie zeigten in diesem Zusammenhang eine Abnahme der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration durch 8-Br-cGMP [246], wodurch sich die beobachtete Abnahme der Somatostatinsekretion in den eigenen Versuchen erklären ließe.

Auch 8-Br-cGMP-Stimulationsuntersuchungen an der Insulin-produzierenden Rattenzelllinie RIN-m5F zeigten, dass es über den cGMP-PKG-Signalweg zu einer Hemmung des L-Typ Calciumkanals (Cav1.3) kommen kann, die in einer Abnahme der Insulinsekretion resultierte [247]. In der Ratten- β -Zelllinie INS-1 zeigte sich allerdings in ähnlichen Experimenten wie den eigenen, dass es unter alleiniger 8-Br-cGMP-Inkubation zu einem konzentrationsabhängigen Anstieg der Insulinsekretion über den gesamten Konzentrationsbereich (0,01 mM - 2 mM 8-Br-cGMP) kommt [141].

Zusammenfassend deuten die Untersuchungen auf einen inhibitorischen Einfluss von Melatonin auf die Somatostatinsekretion im physiologischen Konzentrationsbereich, der durch die Abnahme der intrazellulären *second messenger*-Konzentration von cAMP und cGMP erklärbar ist. Diese Abnahme kann die unter pharmakologischen Melatoninkonzentrationen beobachtete Zunahme der Somatostatinsekretion allerdings nicht erklären. Hier spielen möglicherweise Desensitivierungseffekte nachgeschaltet der *second messenger* cAMP und cGMP eine Rolle. Eine andere Erklärung wäre die Kopplung des MT1-Rezeptors an stimulatorische G-Proteine vom Typ $G_{q/11}$ [58, 100, 143]. Solch eine Kopplung ist verbunden mit einer Aktivierung der PLC, die PIP_2 in DAG und IP_3 spaltet. Die IP_3 -Bildung führt zu einer Ca^{2+} -Freisetzung aus intrazellulären Speichern. Zudem kommt es durch DAG zu einer Aktivierung der PKC [58]. Daneben kann auch über die $\beta\gamma$ -Untereinheit der G_i -gekoppelten Melatoninrezeptoren eine Aktivierung der PLC beobachtet werden, wodurch eine Inositol-spezifische transiente Ca^{2+} -Mobilisierung vermittelt wird [54, 61, 72]. Diese dualen Signaltransduktionswege konnten sowohl für den humanen MT1- als auch den MT2-Rezeptor nachgewiesen werden [58, 71]. So zeigten Untersuchungen an transfizierten HEK 293-Zellen mit einer stabilen Expression des MT1-Rezeptors eine dosisabhängige Modulation der intrazellulären Ca^{2+} - und cAMP-Konzentration [58]. Auch in CHO-Zellen, transfiziert mit dem humanen MT1- bzw. MT2-Rezeptor, kommt es mit steigenden Melatoninkonzentrationen zu einer verstärkten Phosphatidylinositol-Hydrolyse [71].

Ebenso konnten diese parallelen Signalwege in der Ratten- β -Zelllinie INS-1 beobachtet werden. Hier führte die Stimulation mit Melatonin, neben der G_i -vermittelten Abnahme von cAMP und cGMP, zu einer G_q -vermittelten erhöhten IP_3 -Bildung verbunden mit einer Ca^{2+} -Freisetzung [143]. Diese Effekte führten nach Blockierung der G_i -Proteine mittels PTX zu einer Steigerung der Insulinsekretion [100]. So könnte die, in den eigenen Versuchen bei den QGP-1-Zellen beobachtete, Steigerung der Somatostatinsekretion unter hohen Melatoninkonzentrationen auf eine IP_3 -vermittelte Erhöhung der Ca^{2+} -Freisetzung zurückzuführen sein, die die Effekte des Indolamins auf die *second messenger*-Konzentration überlagert. Die Rolle einer G_q -abhängigen Änderung der IP_3 -Konzentration in der Vermittlung der Ca^{2+} -medierten Somatostatinsekretion über muskarinerge Rezeptoren konnte in Untersuchungen anderer Autoren mit der QGP-1N-Zelllinie beobachtet werden.

Zudem scheint in dieser Zelllinie auch die PKC eine Rolle in der Sekretion zu spielen [210]. Übereinstimmend konnte auch in der murinen Insel sowie der δ -Zelllinie TGP52 ein stimulatorischer Effekt des PKC-Aktivators Phorbol-12-myristat-13-acetat auf die Somatostatinsekretion gezeigt werden [166]. Daher sollten in nachfolgenden Untersuchungen zur Melatonin-vermittelten Signalkaskade, insbesondere unter pharmakologischen Melatoninkonzentrationen, eventuelle Einflüsse auf eine veränderte Ca^{2+} -Mobilisierung aus internen Speichern in den QGP-1-Zellen berücksichtigt werden. Zudem sollte in Inkubationsversuchen mit dem $G_{\alpha i}$ -Hemmer PTX der inhibitorische Einfluss von Melatonin auf die Somatostatinsekretion verifiziert werden.

5.2.4 Untersuchung des rezeptorspezifischen Einflusses von Melatonin

Inkubationsexperimente mit Melatoninrezeptorantagonisten sollten der Fragestellung nachgehen, ob der Effekt von Melatonin in den QGP-1-Zellen rezeptorspezifisch erfolgt. Dafür wurden die Zellen zunächst für 30 min mit dem nicht-spezifischen MT1/MT2-Rezeptorantagonisten Luzindol bzw. dem MT2-spezifischen Rezeptorantagonisten 4-P-PDOT (jeweils 100 nM) vorinkubiert und anschließend mit 1 nM Melatonin über einen Zeitraum von 4 h kokubiert. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen belegen, dass der Einfluss von Melatonin auf die Somatostatinsekretion Rezeptor-mediert erfolgt und im Wesentlichen über den MT1-Rezeptor vermittelt wird. So zeigte sich durch die Inkubation von QGP-1-Zellen mit dem nicht-selektiven Antagonisten Luzindol, der sowohl den MT1- als auch den MT2-Rezeptor blockiert, eine Aufhebung des inhibitorischen Effektes von Melatonin. Der primär MT2-selektive Antagonist 4-P-PDOT konnte die Melatonin-abhängige Inhibition der Sekretion nicht vollständig aufheben, was auf eine geringere Beteiligung des MT2-Rezeptors an dem inhibitorischen Einfluss von Melatonin auf die Somatostatin-ausschüttung hindeutet. Die alleinige Inkubation der Zellen mit den beiden Rezeptor-antagonisten beeinflusste die Somatostatinsekretion nicht signifikant. Dennoch deutete sich eine geringe Abnahme der Somatostatinausschüttung an. Solche Effekte sind möglicherweise auf eine Agonist-Wirkung von Luzindol und 4-P-PDOT zurückzuführen. Dass diese Antagonisten in einigen Fällen auch als Agonisten wirken können, wurde bereits an NIH3T3- und CHO-Zellen mit heterologer Expression von humanen Melatoninrezeptoren gezeigt, wobei Luzindol in CHO-Zellen als inverser Agonist des MT1 wirkte und 4-P-PDOT in beiden Zelllinien als partieller Agonist des MT2 [248, 249]. Frühere Untersuchungen der Arbeitsgruppe Peschke zur Bedeutung des Melatoninrezeptor-vermittelten Einflusses auf die Insulinsekretion zeigten, dass eine alleinige Inkubation mit Luzindol und 4-P-PDOT die Insulinsekretion der β -Zelllinie INS-1 nicht beeinflussten, während sie die Effekte von Melatonin aufhoben [141]. Zudem wurde auch gezeigt, dass der cAMP- und cGMP-senkende Effekt von Melatonin in den INS-1-Zellen durch beide Rezeptorantagonisten

aufgehoben werden konnte [98, 141]. Die Aufhebung des inhibitorischen Effektes von Melatonin auf die Somatostatinsekretion durch Luzindol, aber nicht durch 4-P-PDOT, deutet in der QGP-1-Zelllinie auf einen MT1-Rezeptor-spezifischen Melatonineinfluss hin und lässt vermuten, dass auch hier der inhibitorische Effekt auf den *second messenger* cAMP durch eine Blockierung des Rezeptors aufgehoben wird. Dennoch zeigte sich in den QGP-1-Zellen auch eine Senkung der cGMP-Konzentration unter einer Inkubation mit Melatonin. Ein cGMP-modulierender Effekt von Melatonin scheint allerdings spezifisch durch den MT2-Rezeptor vermittelt zu werden [57, 70, 141]. Luzindol ist der am häufigsten eingesetzte kompetitive, nicht-selektive Melatoninrezeptorantagonist um Rezeptor-medierte Effekte von Melatonin zu charakterisieren [250], obwohl es eine 11- bis 25-fach höhere Affinität für den MT2- gegenüber dem MT1-Rezeptor besitzt. 4-P-PDOT hingegen zeigt eine 61- bis 22 000-fach höhere Affinität für den MT2 und ermöglicht daher eine Unterscheidung zwischen MT1- und MT2-Rezeptor-medierten Effekten [248, 249, 251, 252]. Da bisher noch kein selektiver MT1-Rezeptorantagonist zur Verfügung steht [250], sollte in folgenden Transfektionsexperimenten der Fragestellung, über welche Rezeptorisoform die Modulation der Somatostatinsekretion erfolgt, weiter nachgegangen werden.

Über einen molekulargenetischen Ansatz mittels Transfektion wurden QGP-1-Zellen mit einem Plasmid, welches die cDNA des humanen MT1 (hMT1-QGP-1), MT2 (hMT2-QGP-1) oder eine nicht-funktionelle Deletionsvariante des Rezeptors (Δ hMT-QGP-1) trägt, transient transfiziert und nach 48 h mit verschiedenen Melatoninkonzentrationen (1 nM, 100 nM, 10 μ M) für 4 h inkubiert. Anschließend wurde die Somatostatinkonzentration im Zellkulturüberstand bestimmt. Die Behandlung der mit dem hMT1-Konstrukt transfizierten Zellen (hMT1-QGP-1) führte sowohl unter physiologischen als auch unter pharmakologischen Konzentrationen von Melatonin zu einer verminderten Somatostatinausschüttung. Obwohl die MT2-Rezeptorexpression in den hMT2-QGP-1-Zellen nach transients Transfektion auf mRNA-Ebene im Vergleich zu den Δ hMT-QGP-1-Kontrollen höher war als die des MT1 in den hMT1-QGP-1, führte die Überexpression des MT2 nach Melatonininkubation zu einem ähnlichen Sekretionsprofil wie in den Δ hMT-QGP-1-Zellen. So zeigte sich unter beiden Vektorkonstrukten (hMT2, Δ hMT) eine Senkung der Somatostatinsekretion unter 1 nM und 100 nM Melatonin, begleitet von einem leichten Anstieg der Sekretion unter einer pharmakologischen Melatoninkonzentration von 10 μ M in den Δ hMT-QGP-1-Zellen. Während in den hMT1-QGP-1-Zellen die Somatostatinsekretion im Vergleich zu den Δ hMT-QGP-1-Kontrollen unter einer Melatoninkonzentration von 100 nM signifikant stärker gesenkt wurde und zudem auch unter 10 μ M eine Senkung zu beobachten war, zeigten sich in der Reaktion der hMT2-überexprimierenden Zellen gegenüber den Δ hMT-QGP-1-Kontrollen keine Unterschiede in der Somatostatinantwort. Dies könnte auf eine selektive MT2-Downregulation zurückzuführen sein. So zeigte eine Studie von

Gerardin et al. [226] eine MT2- jedoch keine MT1-Downregulation in CHO-Zellen, die beide Rezeptorisoformenten überexprimierten. Über einen Arrestin-medierten Prozess kam es in diesen Zellen zu einer Internalisierung des Rezeptors, sodass der MT2-Rezeptor möglicherweise eher einer Desensitivierung in den QGP-1-Zellen unterliegt. Allerdings ist eine Desensitivierung nach chronischer Melatonininkubation mit höheren Konzentrationen auch für den MT1-Rezeptor beschrieben [71, 225]. Dennoch konnte in den hMT1-überexprimierenden Zellen eine Senkung der Somatostatinsekretion sowohl unter physiologischen als auch pharmakologischen Melatoninkonzentrationen beobachtet werden. Vermutlich überwog hier die Ansprechbarkeit der Signalkaskaden unter Rezeptor-überexpression des MT1 gegenüber Prozessen, wie der Signaldesensitivierung und der Rezeptorinternalisation. Aufgrund der Ähnlichkeit zwischen dem Sekretionsprofil der hMT2-, Δ hMT-QGP-1-Zellen und der initialen Dosis-Wirkungsbeziehung in den Versuchen mit nicht-transfizierten QGP-1-Zellen (Abb. 7 A) ist der inhibitorische Effekt von Melatonin in diesen beiden Gruppen vermutlich auf die endogene native MT1-Aktivität zurückzuführen. Ob sich die veränderte Reaktion der hMT1-überexprimierenden QGP-1-Zellen, insbesondere unter pharmakologischen Melatoninkonzentrationen, auch in einer veränderten *second messenger*-Antwort widerspiegelt, muss in weiteren Untersuchungen geklärt werden. Experimente der Arbeitsgruppe Peschke mit INS-1-Zellen, die den humanen MT2-Rezeptor überexprimieren, zeigten in diesem Zusammenhang, dass sich der cAMP- und cGMP-senkende Effekt von Melatonin verstärkt, verbunden mit einer Steigerung des Insulinsenkenden Einflusses gegenüber unveränderten INS-1-Zellen [134]. Zusammenfassend deuten die Ergebnisse aus den Untersuchungen mit den Melatoninrezeptorantagonisten und die Transfektionsexperimente in der QGP-1-Zelllinie auf eine überwiegende Rolle des MT1-Rezeptors in der Vermittlung des inhibitorischen Einflusses von Melatonin auf die Somatostatinsekretion hin.

5.2.5 Einfluss von Melatonin unter verschiedenen Glucosekonzentrationen

In diesem Versuchsansatz sollte überprüft werden, ob sich der Einfluss von Melatonin auf die Somatostatinsekretion unter verschiedenen Glucosekonzentrationen verändert. Dafür wurden QGP-1-Zellen für 4 h mit einer physiologischen Konzentration von 1 nM Melatonin und steigenden Glucosekonzentrationen (1, 5, 10 und 20 mM) inkubiert. In der Auswertung zeigte sich unter allen Glucosekonzentrationen eine verringerte Somatostatinsekretion nach Melatonininkubation, mit einer signifikanten Abnahme bei 1 mM und 5 mM Glucose im Medium. Während in *in vitro*-Untersuchungen mit isolierten murinen [166, 214] und humanen Inseln [154, 213] die Somatostatinsekretion in Abhängigkeit von der Glucosekonzentration steigt, konnte in den eigenen Experimenten in den QGP-1-Zellen keine Glucose-responsivität beobachtet werden. Eine fehlende Glucoseresponsivität der QGP-1-Zelllinie

wurde bereits in anderen Arbeiten mit QGP-1- [206] und QGP-1N-Zellen [210] nachgewiesen. Auch die murine δ -Zelllinie TGP52 zeigte keinen signifikanten Effekt von Glucose auf die Stimulation der Somatostatinsekretion [166]. In *Patch-Clamp*-Untersuchungen von Braun et al. [213] an vereinzelt humanen pankreatischen δ -Zellen konnten ebenfalls keine einheitlichen Effekte von Glucose auf das Membranpotential und die elektrische Aktivität der δ -Zelle festgestellt werden. Dagegen sind die Effekte in Untersuchungen an oberflächlich gelegenen δ -Zellen im intakten Verbund der Insel von Mäusen einheitlicher [214]. Braun et al. [213] diskutieren in ihrer Studie mögliche fehlende parakrine Einflüsse benachbarter Zellen, die in der komplexen Interaktion innerhalb der Insel eine Rolle in der Regulation der Somatostatinsekretion spielen. So sind bspw. von der β -Zelle ausgeschüttete Faktoren wie GABA [176, 213] oder UCN3 [168] für die δ -Zelle in der Verstärkung der Glucose-stimulierten Somatostatinsekretion von Bedeutung. Diese Beobachtungen im Hinblick parakriner Regulationsmechanismen innerhalb der pankreatischen Insel erklären möglicherweise die fehlende Responsivität der QGP-1-Zelllinie gegenüber steigenden Glucosekonzentrationen. Dennoch zeigte sich in den eigenen Versuchen der inhibitorische Einfluss von Melatonin sowohl unter hypo- als auch hyperglykämischen Bedingungen, wodurch Melatonin über eine Modulation der Somatostatinsekretion Einfluss sowohl auf die Glukagon- als auch die Insulinsekretion innerhalb der nativen pankreatischen Insel nehmen könnte.

5.3 Untersuchungen an humanem pankreatischen Gewebe

5.3.1 Verteilung der Melatoninrezeptoren in der humanen Langerhansschen Insel

Circadiane/diurnale Rhythmen von Melatonin [74, 75] und der pankreatischen Hormone Insulin [74–77, 121, 122, 192, 197, 198] und Glukagon [76, 122, 196, 197, 199] deuten auf eine Wechselwirkung zwischen Melatonin und der Hormonsekretion in der pankreatischen Insel. Beim Menschen koinzidieren geringe Insulinsekretionsraten zur Nacht und hohe am Tag mit erhöhten nächtlichen Melatoninkonzentrationen und reduzierten Melatoninspiegel am Tag [74, 75]. Auch bei nachtaktiven Mäusen, bei denen die Melatoninsekretion ebenfalls auf die Dunkelphase beschränkt ist [23], zeigt die 24 h-Periodik der Insulin- und Glukagonkonzentration im Serum unter nüchternen Bedingungen einen Peak für Insulin am Ende der Hellphase und ein Sekretionsmaximum für Glukagon in der Dunkelphase [76]. *Ex vivo*-Untersuchungen an der nativen pankreatischen Insel bestätigten einen Einfluss von Melatonin auf die Hormonsekretion von Insulin und Glukagon [77, 96, 97, 101, 104]. Ein diurnales Profil für die pankreatische Somatostatinsekretion wurde bisher nicht untersucht. Nur eine Studie zeigte auf Transkriptebene eine circadiane Expressionsrhythmik in Serumschock-synchronisierten β TC-3-Zellen [253].

Zahlreiche Untersuchungen an β -Zelllinien von Ratte und Maus und der murinen α -Zelllinie widmeten sich der Aufklärung des Melatonineinflusses auf die Insulin- und Glukagonsekretion und erbrachten den Nachweis beider Melatoninrezeptoren in den beiden Zelltypen. Sie zeigten einen Transkriptnachweis für den MT1 und MT2 sowohl in der β -Zelllinie der Ratte (INS-1, [133]) sowie der Maus (MIN6, [101]) als auch in der murinen α -Zelllinie α TC1.9 [103]. In eigenen Vorarbeiten konnten zudem in der Ratten- δ -Zelllinie RIN14B beide Rezeptoren auf mRNA-Ebene nachgewiesen werden [223]. Die im Rahmen dieser Arbeit geführten Untersuchungen erbrachten den Nachweis auch in der humanen δ -Zelllinie QGP-1.

Übereinstimmend konnte in der pankreatischen Insel des Menschen [101, 108, 126], der Ratte [101, 133] und der Maus [103, 136, 137] die Expression beider Rezeptorisoformen gezeigt werden. Allerdings wird die Expression der jeweiligen Melatoninrezeptor-Isoform in den einzelnen Zelltypen der nativen pankreatischen Insel kontrovers diskutiert [101, 124, 126, 137, 138, 254]. Daher wurde immunhistochemisch das Vorkommen sowie die Verteilung der beiden Melatoninrezeptor-Isoformen in den drei Inselzelltypen in humanen pankreatischen Gewebeschnitten untersucht. Mittels einer Doppelmarkierung mit spezifischen Antikörpern für Insulin, Glukagon und Somatostatin sowie für die beiden Melatoninrezeptoren gelang der Nachweis sowohl des MT1 als auch des MT2 in den β -, α - sowie δ -Zellen der humanen pankreatischen Insel. Zudem zeigte sich eine unterschiedliche Rezeptordichte in den einzelnen Zelltypen. Sowohl die Rezeptordichte von MT1 als auch MT2 war in den α -Zellen im Vergleich zu den β - und δ -Zellen verringert. Vergleichende Untersuchungen zur quantitativen Verteilung in den einzelnen Zelltypen fehlen bisher. Allerdings bestätigten Untersuchungen auf Einzelzellebene der humanen Insel, dass der MT1- [138] und der MT2-Rezeptor [124, 138] in der humanen β -Zelle exprimiert wird. Untersuchungen von Ramracheya et al. [101] zeigten zudem die mRNA-Expression des MT1-Rezeptors in der humanen α -Zelle, konnten diese Rezeptorisoform in der β -Zelle allerdings nicht nachweisen. Aufgrund der geringen Expression des MT2-Rezeptors war ein Transkriptnachweis auf Einzelzellebene in dieser Studie nicht möglich. Transkriptomanalysen wiederum konnten diese Rezeptorisoform in der humanen α -Zelle nachweisen. Allerdings konnte eine MT1-Expression in diesen Zellen nicht gezeigt werden [138]. Wiederum andere Transkriptomanalysen erbrachten den Expressionsnachweis von MT1 und MT2 sowohl in der humanen β - und α -Zelle als auch in der δ -Zelle [254], wodurch die Spezifität des eigenen Nachweises von MT1 und MT2 in allen drei endokrinen Zelltypen der humanen Insel unterstützt wird. Zudem bestätigte der hier geführte immunhistochemische Nachweis beider Melatoninrezeptoren in der humanen δ -Zelle der pankreatischen Insel die eigenen Ergebnisse im Hinblick auf die QGP-1-Zelllinie. Auch in der β -Zelllinie INS-1 der Ratte konnten immunhistochemisch beide Rezeptorisoformen

nachgewiesen werden [134, 135]. Immunhistochemische Untersuchungen in der nativen Insel von Maus [137], Ratte und Mensch [108, 126] zeigten eine Insel-spezifische Lokalisation der MT1- und MT2-Rezeptoren und bestätigen damit die eigenen Ergebnisse der spezifischen Immunmarkierung durch die in dieser Arbeit verwendeten Melatoninrezeptor-Antikörper in der humanen pankreatischen Insel. Allerdings finden sich bei den Arbeiten von Nagorny et al. [137] und Lyssenko et al. [126] Unterschiede in der zellulären Verteilung der beiden Rezeptoren in den β - und α -Zellen. Während in der eigenen Arbeit eine evidente Immunreaktion für den MT1- und MT2-Rezeptor sowohl in der humanen β - als auch der α -Zelle gefunden wurde, zeigten Nagorny et al. [137] unter Verwendung der gleichen Antikörper in ihrer immunhistochemischen Untersuchung an murinen Inseln, dass der MT1 in einer Subpopulation der α -Zellen vorkommt, während der MT2 in den β -Zellen lokalisiert ist. Die Spezifität der Melatoninrezeptor-Antikörper wurde in der Studie von Nagorny et al. [137] durch Melatoninrezeptor-*Knockout*(KO)-Mäuse mit fehlender Expression des MT1, MT2 oder beider Rezeptoren belegt. Auch Lyssenko et al. [126] verwendeten die gleichen Antikörper wie in der eigenen Untersuchung und zeigten an Pankreasschnitten von Mensch, Ratte und Maus die Immunmarkierung des MT2 in den β -Zellen. Zudem konnte in dieser Studie der MT1 auch in einer Subpopulation peripher lokalisierter β -Zellen nachgewiesen werden. Eine Untersuchung in den α -Zellen fand hier nicht statt. Der Nachweis sowohl des MT2- als auch des MT1-Rezeptors in der humanen β -Zelle bestätigt die eigenen Ergebnisse, in denen das Vorkommen des MT1 allerdings nicht auf eine periphere Subpopulation der pankreatischen β -Zelle beschränkt war. Im Hinblick auf die Unterschiede in der immunhistochemischen Markierung der Melatoninrezeptoren sollten methodische Aspekte berücksichtigt werden. Auch wenn die gleichen Antikörper für den Melatoninrezeptornachweis genutzt wurden, erfolgten die Untersuchungen der beiden letztgenannten Arbeiten an Kryoschnitten [126, 137], während die Immunmarkierung im Rahmen dieser Arbeit an Paraffinschnitten des Pankreas untersucht wurde. So könnten Unterschiede in der Antigenerkennung der Antikörper die verschiedenen Ergebnisse erklären. Obwohl generell Formalin-fixierte, Paraffin-eingebettete Proben eine hohe Qualität in Bezug auf die Bewahrung morphologischer Strukturen gewährleisten, sind Änderungen der Struktur des Antigens bzw. eine Antigenmaskierung möglich. Daher erfolgte in den eigenen Untersuchungen, unter Austestung verschiedener Behandlungen, eine Hitzebehandlung der Gewebeschnitte, um die Reaktivität des Antigens zu verbessern.

In Bezug auf die an der murinen Insel gewonnenen Ergebnisse von Nagorny et al. [137] müssen zudem Speziesunterschiede berücksichtigt werden, denn sowohl das Verteilungsmuster der endokrinen Zellen als auch ihr relativer Anteil variiert zwischen den Spezies [151]. Die Zytoarchitektur der humanen pankreatischen Insel unterscheidet sich von der der Rodentia [150, 151, 255]. So zeigen Inseln von Ratte und Maus eine

charakteristische Verteilung mit einem Kern aus β -Zellen, der umgeben ist von einem Mantel aus nicht- β -Zellen [150, 256]. In der humanen Insel hingegen sind die α - und δ -Zellen verteilt über das gesamte endokrine Organ [150]. Die humane β -Zelle bildet keine Cluster und zeigt mehr Assoziationen mit den anderen Zelltypen [151]. Zudem hat die humane Insel proportional einen geringeren Anteil an β -Zellen und einen höheren Anteil an α - und δ -Zellen im Vergleich zur murinen Insel [150, 151]. Das für die humane Insel charakteristische Verteilungsmuster der β -, α - und δ -Zellen konnte auch in der eigenen Untersuchung durch die Hormonmarkierung von Insulin, Glukagon und Somatostatin beobachtet werden. Welche Bedeutung diese strukturellen Speziesunterschiede für den Einfluss von Melatonin auf die Hormonsekretion in der pankreatischen Insel hat, ist bisher nicht abschließend geklärt. In diesem Zusammenhang deuten Ramracheya et al. [101] in ihren Untersuchungen an isolierten humanen pankreatischen Inseln auf Spezies-spezifische Unterschiede zum Einfluss von Melatonin auf die Insulinsekretion zwischen tag- und nachtaktiven Lebewesen und diskutierten in der humanen Insel einen Glukagon-vermittelten, stimulatorischen Einfluss von Melatonin auf die Insulinsekretion. Im Gegensatz dazu konnte in zahlreichen Studien mit isolierten Inseln von Maus [135] und Ratte [77, 96, 97, 99] ein inhibitorischer Einfluss auf die Insulinsekretion beobachtet werden. Ein stimulatorischer Einfluss von Melatonin auf die Glukagonsekretion konnte allerdings sowohl in der Insel des Menschen [101] als auch von Ratte und Maus [104] beobachtet werden. Der Glukagon-steigernde Effekt in Rodentia wurde allerdings erst nach längerer Melatoninbehandlung beobachtet [103, 104], während er in der humanen Insel direkt nach einer Melatoninstimulation sichtbar war [101], worauf sich möglicherweise die Unterschiede in der Modulation der Insulinsekretion von Nagetieren und Mensch begründen. Generell müssen bei Untersuchungen mit pankreatischen Inseln parakrine Effekte der verschiedenen Zelltypen berücksichtigt werden. So diskutierten Ramracheya et al. [101] in ihrer Studie an der humanen Insel, dass der beobachtete Insulinsteigernde Effekt parakrin durch eine gesteigerte Melatonin-medierte Glukagonsekretion vermittelt wurde, da ein Transkriptnachweis des MT1 in der β -Zelle fehlte und ein Nachweis des MT2-Rezeptors auf Einzelzellebene nicht möglich war. Mögliche Spezies-spezifische Unterschiede zwischen tag- und nachtaktiven Lebewesen in der Vermittlung des Melatonineinflusses auf die Hormonsekretion der pankreatischen Insel werden auch in der relativen Expression der beiden Melatoninrezeptor-Isoformen in Rodentia und Mensch deutlich. Während in der Insel der Ratte eine 86-fach geringere Expression des MT2 im Vergleich zum MT1 beobachtet wurde [133], zeigte sich in der humanen Insel ein nahezu gleiches Expressionsverhältnis beider Rezeptoren [126]. Dennoch belegten Untersuchungen an der Ratten- β -Zelllinie INS-1 sowie an isolierten Inseln von MT1- und/oder MT2-Rezeptor-KO-Mäusen, dass sowohl der MT1- als auch der MT2-Rezeptor eine funktionelle Bedeutung in der Modulation der Insulinsekretion besitzt [135, 136, 141], was

durch den eigenen Nachweis beider Rezeptorisoformen in der β -Zelle des humanen Pankreas bestätigt werden kann. Der immunhistochemische Nachweis der Melatoninrezeptoren in der pankreatischen α - und δ -Zelle des humanen Pankreas wird durch funktionelle Untersuchungen an der murinen α -Zelle α TC1.9 und isolierten Inseln von Melatoninrezeptor-KO-Mäusen [103, 104] sowie durch die eigenen Untersuchungen an der humanen δ -Zelllinie QGP-1 gestützt. Dabei scheint der Einfluss auf die Glukagonsekretion über den MT2 vermittelt zu werden [104], während in der δ -Zelle eine Modulation der Somatostatinsekretion über den MT1-Rezeptor im Vordergrund steht.

Das Vorkommen beider Melatoninrezeptor-Isoformen in allen drei Zelltypen der humanen pankreatischen Insel deutet auf eine direkte Rolle von Melatonin in der Rezeptor-vermittelten Modulation der Hormonsekretion sowohl von Insulin und Glukagon als auch von Somatostatin. Ein Funktionszusammenhang zwischen der Rezeptordichte und der Regulation der einzelnen Sekretionssysteme muss in weiteren Untersuchungen betrachtet werden. Die geringere Rezeptordichte in den α -Zellen im Vergleich zu den β - und δ -Zellen deutet darauf hin, dass die pankreatische Glukagonsekretion in der humanen Insel möglicherweise einem geringeren Einfluss von Melatonin unterliegt und beim Menschen weniger durch circadiane Prozesse moduliert wird als die Insulin- und Somatostatinsekretion. Bei einem gleichzeitigen Vorkommen beider Melatoninrezeptoren in einer Zelle oder einem Gewebe sollten zudem eventuelle Heterodimerbildungen zwischen MT1- und MT2-Rezeptoren berücksichtigt werden [257]. Eine Bildung von MT1/MT2-Heterodimeren wurde in transfizierten HEK 293-Zellen nachgewiesen [51], wobei insbesondere der MT2-Rezeptor zur Heterodimerbildung neigt [52]. In nativem Gewebe müssen solche Heterodimerbildungen noch belegt werden [257]. Erste Untersuchungen konnten allerdings eine Heterodimerbildung in retinalen Photorezeptorzellen nachweisen [258]. Daher sollten weiterführende Untersuchungen an isolierten primären β -, α - und δ -Zellen der Insel von Nagetieren und Menschen Rezeptorisoform-spezifische Einflüsse von Melatonin auf die Hormonsekretion klären sowie mögliche Unterschiede in der Rezeptordichte zwischen den verschiedenen Zelltypen innerhalb einer Spezies betrachten.

Im zweiten Teil der Untersuchungen wurde in analoger Weise die Melatoninrezeptordichte in den einzelnen Inselzelltypen in Pankreasschnitten diabetischer Patienten untersucht. Grund für diese weiterführenden Experimente war die Beobachtung, dass erniedrigte Plasmakonzentrationen von Melatonin sowohl bei Typ2-diabetischen Patienten als auch GK-Ratten mit einer erhöhten MT1- und MT2-Rezeptorexpression im Pankreas koinzidieren [75, 102, 108]. Zudem wird beim Menschen ein gestörter Melatoninrhythmus bei diabetischer Stoffwechsellage beschrieben [105]. Immunhistochemische Nachweise beider

Melatoninrezeptoren am Pankreas von nicht-diabetischen und Typ2-diabetischen Patienten belegen eine höhere Rezeptordichte von MT1 und MT2 in der Typ2-diabetischen Insel [108]. In den eigenen Untersuchungen zeigte sich, ähnlich wie in den nicht-diabetischen Inseln, dass die α -Zellen der Typ2-diabetischen Insel im Vergleich zu den β - und δ -Zellen die geringste Rezeptordichte aufweisen. Zudem konnte eine verstärkte Immunmarkierung in der pankreatischen δ -Zelle Typ2-diabetischer Patienten beobachtet werden, was die oben genannten Untersuchungen bestätigt. Ein Erreichen der Signifikanzschwelle war allerdings nur für den MT1-Rezeptor sichtbar, was möglicherweise für die Dominanz des MT1 als Hauptvermittler des inhibitorischen Melatonineinflusses auf die Somatostatinsekretion in der QGP-1-Zelllinie spricht. Diese beobachteten Veränderungen in der pankreatischen δ -Zelle deuten auf einen veränderten funktionellen Zusammenhang zwischen Melatonin und Somatostatin im Krankheitsbild des T2DM hin und wurden im Folgenden in Inkubationsexperimenten mit isolierten humanen Inseln näher analysiert.

5.3.2 Einfluss von Melatonin auf die Somatostatinsekretion der humanen Insel

Basierend auf den Ergebnissen der immunhistochemischen Untersuchungen an den humanen Pankreata wurde in Inkubationsexperimenten mit isolierten humanen Inseln untersucht, ob die beobachtete Veränderung der Melatoninrezeptordichte in der pankreatischen δ -Zelle diabetischer Inseln verbunden ist mit einer veränderten Hormonausschüttung durch Melatonin. Daher wurde im Folgenden der Einfluss von Melatonin auf die pankreatische Somatostatinsekretion von isolierten humanen Inseln zweier Spender, einem nicht-diabetischen und einem Typ2-diabetischen Patienten bestimmt. Zudem sollte untersucht werden, ob sich die Ergebnisse zum Einfluss von Melatonin in der humanen δ -Zelllinie QGP-1 auch auf die native humane Insel übertragen lassen.

Die Inkubation der humanen Inseln erfolgte sowohl mit physiologischen (0,1 nM, 1 nM) als auch pharmakologischen Melatoninkonzentrationen (100 nM) für 4 h unter einer normoglykämischen (5,5 mM) und einer hyperglykämischen (11,1 mM) Glucosekonzentration. Unter einer normoglykämischen Glucosekonzentration zeigte sich bei den nicht-diabetischen Inseln eine Steigerung der Somatostatinsekretion unter 0,1 nM und 1 nM Melatonin. Unter einer pharmakologischen Melatoninkonzentration von 100 nM konnte kein spezifischer Effekt auf die Somatostatinsekretion der humanen pankreatischen Insel beobachtet werden. Dies ist möglicherweise, ähnlich wie in den QGP-1-Zellen, auf eine Rezeptordesensitivierung unter hohen Melatoninkonzentrationen zurückzuführen [71]. Allerdings spiegelte sich der in der humanen δ -Zelllinie QGP-1 gezeigte inhibitorische Einfluss von Melatonin auf die Somatostatinsekretion unter dieser basalen Glucosekonzentration nicht wider.

Vergleichende Untersuchungen zum Einfluss von Melatonin auf die Somatostatinsekretion der pankreatischen Insel fehlen bisher. Ramracheya et al. [101] untersuchten den Einfluss von Melatonin auf die Insulin- und Glukagonsekretion der humanen Insel. In diesen *ex vivo*-Untersuchungen kam es durch Melatoninbehandlung in isolierten humanen Inseln zu einer Erhöhung der Glukagonsekretion. Gleichzeitig wurde hier eine Steigerung der Insulinsekretion beobachtet. Wie bereits erwähnt, wurde hier im Gegensatz zu vielen anderen Studien, die bei Rodentia eine inhibierende Funktion von Melatonin auf die Insulinausschüttung zeigten [84], der insulinotrope Einfluss als mögliche Folge einer parakrinen Glukagonwirkung diskutiert [101]. Diese parakrine Interaktion könnte auch die Erhöhung der Somatostatinsekretion in den eigenen *Batch*-Versuchen erklären. So könnte die beobachtete erhöhte Somatostatinsekretion nach Inkubation der humanen Inseln mit Melatonin auf eine Steigerung der Glukagonsekretion zurückzuführen sein, wodurch wiederum auch die Somatostatinsekretion der pankreatischen δ -Zelle beeinflusst werden kann. So zeigten verschiedene Studien, dass Glukagon oder von der α -Zelle ausgeschüttete Faktoren die pankreatische Somatostatinsekretion steigern [163, 164, 167, 168, 222]. Da auch die β -Zelle einen stimulatorischen Einfluss auf die δ -Zelle besitzt [167, 168, 171, 175, 176] könnten parakrine Effekte auf die Somatostatinsekretion auch durch eine möglicherweise veränderte Insulinsekretion eine Rolle spielen, die die Interaktionen zwischen der β - und der δ -Zelle widerspiegeln würden. Auf parakrine Interaktionen durch die α - und/oder β -Zellen deuten zudem die eigenen immunhistochemischen Befunde hin, in denen die Melatoninrezeptoren in beiden Zelltypen nachgewiesen werden konnten. Dies lässt einen Rezeptor-vermittelten Einfluss auch auf die Glukagon- und Insulinsekretion in der humanen pankreatischen Insel vermuten.

Bei der Übertragung von Beobachtungen aus Untersuchungen an Zelllinien oder isolierten Zellen muss bei der Arbeit mit intakten Inseln als Zellverbund die komplexe Interaktion der drei Zelltypen berücksichtigt werden (Abb. 2). In Bezug auf die parakrine Regulation der pankreatischen Hormonsekretion lässt sich möglicherweise auch die etwas veränderte Reaktion der nicht-diabetischen Inseln unter einer hyperglykämischen Glucosekonzentration erklären. Generell konnte unter diesen Glucosebedingungen die beschriebene physiologische Glucoseresponsivität der δ -Zelle beobachtet werden [154, 213]. So zeigte sich bei den nicht-diabetischen Kontrollinseln zwischen der normo- und hyperglykämischen Glucosekonzentration ein Anstieg der Somatostatinsekretion. Im Hinblick auf die Behandlung nicht-diabetischer Inseln mit 0,1 nM Melatonin deutete sich eine Abnahme der Somatostatinsekretion an. Dies wird durch den an QGP-1-Zellen gezeigten Rezeptor-vermittelten inhibitorischen Einfluss von physiologischen Melatoninkonzentrationen auf die Somatostatinsekretion bestätigt. Dagegen konnte unter einer Melatoninkonzentration von 1 nM wiederum ein Anstieg der Somatostatinkonzentration im Überstand unter dieser

stimulatorischen Glucosekonzentration beobachtet werden. So scheinen unter hyperglykämischen Glucosekonzentrationen im Vergleich zu der normoglykämischen Glucosekonzentration veränderte parakrine Regulationsmechanismen in der Insel eine Rolle zu spielen. Während die Somatostatinsekretion unter steigenden Glucosekonzentrationen stimuliert wird, wird die Glukagonsekretion inhibiert [154]. Untersuchungen mit der murinen α -Zelllinie α TC1.9 zeigten, dass die Glukagonausschüttung unter steigenden Glucosekonzentrationen im Vergleich zur basalen Sekretion unter normoglykämischen Bedingungen abnimmt [103]. Gleichzeitig zeigten diese Untersuchungen, dass die Glukagonsekretion in der α -Zelllinie α TC1.9 sowohl unter normo- als auch hyperglykämischen Bedingungen durch Melatonin stimuliert wird. Allerdings wurden in diesen Untersuchungen höhere Melatoninkonzentrationen (zwischen 10 nM und 1 μ M) eingesetzt [103]. So könnte in den eigenen Untersuchungen aufgrund einer gegensätzlichen Wirkung von Glucose und Melatonin unter hyperglykämischen Bedingungen in der humanen Insel ein stimulatorischer Effekt unter der geringen Melatoninkonzentration von 0,1 nM auf die α -Zelle fehlen. Eine höhere Konzentration von 1 nM Melatonin könnte hingegen erneut zu einer Stimulation der Glukagonsekretion geführt haben, wodurch sich die beobachtete Erhöhung der Somatostatinsekretion erklären ließe. Vergleichende Untersuchungen von Ramracheya et al. [101] zeigten an der isolierten humanen Insel stimulatorische Effekte von Melatonin auf die Glukagonsekretion unter einer hyperglykämischen Glucosekonzentration von 20 mM und einer Melatoninkonzentration von 10 nM. Gleichzeitig ließ sich in dieser Studie eine Zunahme der Insulinsekretion sowohl unter einer hypo- als auch hyperglykämischen Glucosekonzentration erkennen, was auf einen Einfluss von Melatonin auf die Glukagonsekretion sowohl unter hypo- als auch hyperglykämischen Bedingungen hindeutet. Auf Grundlage der aktuellen Literatur und den publizierten Ergebnissen aus dieser Arbeit fasst ein Modell von Karamitri und Jockers [10] den gegenwärtigen Wissensstand zum Einfluss von Melatonin auf die Hormonsekretion der β -, α - und δ -Zellen der pankreatischen Insel zusammen und erklärt die Wechselwirkung zwischen den verschiedenen Zelltypen (Abb. 20).

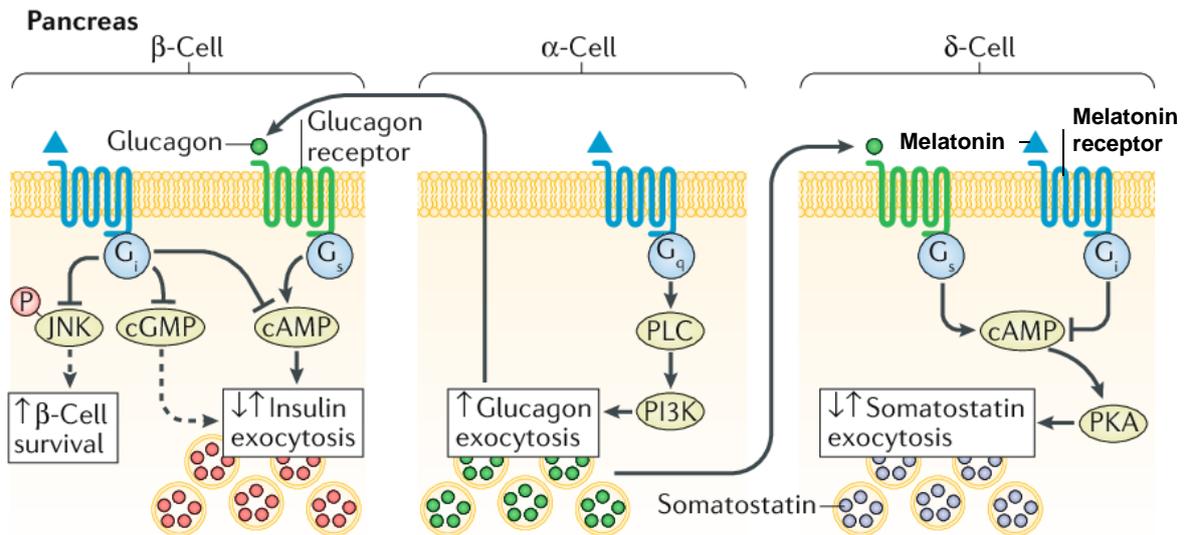


Abb. 20: Einfluss von Melatonin auf die pankreatische Hormonsekretion von β -, α - und δ -Zellen.

Melatonin reduziert die Insulinsekretion (Insulin exocytosis, rot) über eine G_i-vermittelte Senkung der cAMP- und cGMP-Konzentration (gezeigt in Rodentia). In der humanen Insel führt Melatonin zu einer Stimulation der Insulinsekretion und verbessert die Überlebensfähigkeit der β -Zelle über eine Abnahme der c-JUN N-terminalen Kinase (JNK)-Aktivität. In der pankreatischen α -Zelle von Rodentia sowie in der humanen Insel kommt es zu einer Melatonin-vermittelten Stimulation der Glukagonsekretion (Glucagon exocytosis, grün) über den G_q-Phospholipase C (PLC)-Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K)-Weg. In der humanen pankreatischen δ -Zelle kommt es im Wesentlichen über eine Modulation der cAMP-Konzentration zu einer G_i-medierten Senkung der Somatostatinsekretion (Somatostatin exocytosis, grau) durch Melatonin. Die Melatonin-vermittelte Steigerung der Glukagonausschüttung führt zu einer Stimulation sowohl der Insulin- als auch der Somatostatinsekretion über G_s-gekoppelte Glukagonrezeptoren (Glucagon receptor), wodurch die Effekte von Melatonin auf die β - und δ -Zelle moduliert werden. (Abb. modifiziert nach [10].)

Wie die Befunde an Typ2-diabetischen Inseln zeigten, scheinen die δ -Zellen unter einer diabetischen Stoffwechsellage ihre Glucoseresponsivität zu verlieren. Diese Dysregulation ließ sich in einer fehlenden Zunahme der Somatostatinsekretion unter 11,1 mM Glucose im Vergleich zu einer Glucosekonzentration von 5,5 mM erkennen. Obwohl vergleichbare Untersuchungen an isolierten humanen diabetischen Inseln fehlen, konnte dieses Phänomen auch bei Patienten mit einem T2DM gezeigt werden, bei denen eine verminderte Glucose-stimulierte Somatostatinsekretion im Plasma nach oraler Glucoseapplikation gemessen wurde [259, 260]. Auch im Tierversuch konnten diese Aspekte beobachtet werden. So zeigte eine Studie an jungen STZ-behandelten Ratten, die nur eine milde Hyperglykämie aufgrund eines Nicht-Insulinabhängigen Diabetes Mellitus entwickelt hatten, eine ausgeprägte Abnahme der δ -Zellsensitivität gegenüber Glucose [261]. Zudem ließ sich in perfundierten Pankreata von GK-Ratten eine gestörte Responsivität auf Glucose nachweisen [262]. In isolierten murinen Inseln von diabetischen ob/ob-Mäusen konnte eine gestörte Glucose-stimulierte Somatostatinsekretion beobachtet werden [168].

Weitere Unterschiede gegenüber nicht-diabetischen Inseln zeigten sich bei den eigenen Versuchen in der Reaktion diabetischer Inseln auf die Melatonininkubation. Hier konnte im Gegensatz zu den Kontrollinseln unter beiden Glucosekonzentrationen über den gesamten

Melatoninkonzentrationsbereich eine Abnahme der Somatostatinsekretion beobachtet werden. Die Senkung der Somatostatinsekretion durch Melatonin sowohl unter einer normal- als auch hyperglykämischen Konzentration in diabetischen Inseln spiegelt die Ergebnisse aus den eigenen Untersuchungen hinsichtlich eines inhibitorischen Einflusses von Melatonin in der humanen δ -Zelllinie QGP-1 wider, der sich unter allen Glucosekonzentrationen abzeichnete. Zudem deutet die immunhistochemisch gezeigte höhere Rezeptordichte in der pankreatischen δ -Zelle diabetischer Inseln auf eine mögliche verstärkte inhibitorische Wirkung von Melatonin auf die Somatostatinsekretion Typ2-diabetischer Inseln über G_i -gekoppelte Melatoninrezeptoren hin. Vergleichende Untersuchungen zum Einfluss von Melatonin auf die pankreatische Hormonsekretion unter einem T2DM analysierten bisher nur die Hormone Glukagon und Insulin. In diesem Zusammenhang zeigten Untersuchungen an isolierten neonaten Inseln von Wistar- und Typ2-diabetischen GK-Ratten einen stimulatorischen Einfluss von Melatonin auf die Glukagonsekretion [104]. Allerdings belegen *in vivo*-Untersuchungen an älteren GK-Ratten, in denen Diabetes-bedingte Veränderungen mit steigendem Alter zunehmen [263], im Vergleich zu Wistarratten eine veränderte Glukagonsekretion unter einer Melatoninsubstitution [103]. Obwohl in diesen Untersuchungen GK-Ratten eine höhere Plasmaglukagonkonzentration als normoglykämische Wistarratten aufwiesen, führte eine nächtliche Melatoninsubstitution über 9 Wochen in den GK-Ratten zu einer Abnahme der Plasmaglukagonkonzentration, während die Konzentration von Glukagon im Plasma der Wistar-Kontrollratten anstieg. Diese Zusammenhänge sprechen für eine unterschiedliche Reaktion der pankreatischen Glukagonsekretion auf eine Melatoninsubstitution unter einem T2DM. Dadurch könnte in den eigenen *Batch*-Versuchen ein veränderter Melatonin-vermittelter Einfluss auf die Glukagonsekretion der humanen Typ2-diabetischen Insel vermutet werden, der wiederum zu veränderten parakrinen Einflüssen auf die Somatostatinsekretion der pankreatischen δ -Zelle führen würde. So scheint die in den nicht-diabetischen Inseln vermutete parakrine stimulatorische Modulation der Somatostatinsekretion durch eine Melatonin-vermittelte Steigerung der Glukagonsekretion in der diabetischen Insel keine Rolle zu spielen. Weiterführende Untersuchungen sollten daher den Einfluss von Melatonin auf die pankreatische Glukagonsekretion in der humanen Insel unter einem T2DM betrachten. Untersuchungen zum Einfluss von Melatonin auf die Insulinsekretion unter einem T2DM erfolgten bisher nur *in vivo*. Hier zeigte sich beim Menschen, dass erhöhte Plasmainsulinkonzentrationen verbunden sind mit einem verringerten Melatoninspiegel. Dieser Zusammenhang konnte auch in Typ2-diabetischen GK-Ratten beobachtet werden [75]. Eine Behandlung von GK-Ratten mit Melatonin führte, ähnlich wie bei den Wistar-Kontrolltieren, zu einer Senkung der Plasmainsulinspiegel [102]. In einem anderen Typ2-diabetischen Tiermodell wurde in *in vivo*-Untersuchungen mit SAMP8-Mäusen (*senescence-accelerated mouse prone 8*) ein

Einfluss von Melatonin auf die pankreatische Genexpression von Insulin, Glukagon und Somatostatin betrachtet [264]. Diese Mäuse unterliegen einem beschleunigten Alternsprozess und zeigen im Vergleich zu gleichaltrigen SAMR1-Mäusen (*senescence-accelerated mouse resistant 1*) typische Veränderungen, die mit einem T2DM einhergehen. So zeigten SAMP8-Mäuse einen stärkeren Anstieg der Plasmainsulinkonzentration sowie eine Zunahme der peripheren Insulinresistenz. Gleichzeitig wurde im Pankreas dieser Mäuse eine Abnahme von Insulin beobachtet. Zudem fand sich ein Anstieg der pankreatischen mRNA-Expression von Insulin, Glukagon und Somatostatin, welcher auch in den Pankreata der Typ2-diabetischen Patienten in der eigenen Untersuchung beobachtet werden konnte. Eine Behandlung der SAMP8-Mäuse mit Melatonin (als einem im Alter abnehmenden Hormon) für 4 Wochen führte zu einer Senkung der Genexpression aller drei Hormone [264]. Dieser Befund unterstreicht die in den eigenen Versuchen beobachtete Abnahme der Sekretion von Somatostatin in der Typ2-diabetischen humanen Insel. Die in diesen Mäusen veränderte Expression von Insulin und Glukagon untermauert zudem den bei Rodentia gut untersuchten inhibitorischen Einfluss von Melatonin auf die Insulinsekretion der pankreatischen β -Zelle und deutet auf einen möglichen inhibitorischen Einfluss auf die pankreatische α -Zelle unter einem T2DM hin. In der bereits oben genannten Untersuchung von Peschke et al. [102] an GK-Ratten konnte eine Melatoninsubstitution die pankreatische Insulin-, Glukagon- und Somatostatinexpression allerdings nicht beeinflussen. Es sollten daher weitere Studien folgen, die den Einfluss von Melatonin auf die Hormonsekretion aller drei Zelltypen in der Insel von Mensch und Rodentia untersuchen und dadurch mögliche Spezies-spezifische Einflüsse von Melatonin auf parakrine Interaktionen zwischen β -, α - und δ -Zellen innerhalb der pankreatischen Insel klären. Bei diesen Untersuchungen sollte ebenfalls die circadiane Uhr der pankreatischen Insel berücksichtigt werden, da diese unter einem T2DM verändert ist [122, 265]. Jüngste Untersuchungen in diesem Zusammenhang konnten in der humanen Typ2-diabetischen Insel zeigen, dass eine Veränderung der peripheren Uhr sowohl in β - als auch α -Zellen mit einer gestörten Sekretion von Insulin und Glukagon einhergeht [122]. Diese Studie zeigte zudem, dass die Synchronisation der Uhrengen-Rhythmik durch physiologische Stimuli in den diabetischen Inseln verändert ist. So führte die Verwendung eines Somatostatin-Analogons nur in den nicht-diabetischen Inseln zu einer Synchronisation der circadianen Oszillationen des Uhrengens *Bmal1*. Auch Glucose hatte in den diabetischen Inseln keinen Einfluss auf die Rhythmik der Uhrengene *Bmal1* und *Per2*. In der nicht-diabetischen Insel hingegen fanden die Autoren eine veränderte Rhythmik durch eine Erhöhung der Glucosekonzentration im Medium. Hinsichtlich der Sekretionsrhythmik zeigte sich in der nicht-diabetischen Insel eine Tagesrhythmik für Insulin und Glukagon. In der diabetischen Insel hingegen blieb zwar die Insulinrhythmik erhalten, allerdings war die Größe der Amplitude sowie die Menge an sezerniertem Insulin vermindert.

Eine circadiane Rhythmizität der Glukagonsekretion war unter einem T2DM nicht mehr erkennbar [122]. Eine Rhythmik der Uhrengene in der pankreatischen δ -Zelle bzw. der Somatostatinsekretion wurde in diesen Untersuchungen nicht betrachtet. Allerdings könnte eine Veränderung im Uhrenmechanismus unter einem T2DM auch in diesem Zelltyp eine Rolle spielen, die zu veränderten parakrinen Einflüssen führen und dadurch die eigenen Ergebnisse hinsichtlich der beobachteten Unterschiede zum Einfluss von Melatonin auf die Somatostatinsekretion der nicht-diabetischen und Typ2-diabetischen Inseln stützen könnten. Welchen Einfluss Melatonin auf den Uhrenmechanismus in der pankreatischen Insel unter einem T2DM hat, ist bisher nicht bekannt. Auf einen möglichen Einfluss von Melatonin auf die Rhythmik der Uhrengene der pankreatischen Insel deuten Untersuchungen am Pankreas von Melatoninrezeptor-KO-Mäusen [136] sowie Untersuchungen an isolierten Inseln der Ratte hin, in denen Melatonin zu einem Phasenshift der Insulinsekretion führte [77].

Petrenko et al. [122] diskutierten eine Bedeutung der zellulären Struktur der pankreatischen Insel sowie der parakrinen Interaktionen für die circadiane und funktionelle Kopplung zwischen den Inselzellen. Generell ist ein Diabetes neben einem β -Zell-Untergang gekennzeichnet durch eine veränderte Inselstruktur, verbunden mit einer Unterbrechung der parakrinen Kommunikation zwischen den endokrinen Zelltypen und einer veränderten Hormonsekretion der pankreatischen Insel. Von einer Dysfunktion ist nicht nur die pankreatische β -Zelle betroffen, sondern auch die α - und δ -Zelle [148, 180]. Ein T2DM wird als bi-hormonale Krankheit bezeichnet [266] und ist sowohl durch eine unzureichende Ausschüttung von Insulin und/oder Insulinresistenz [178] als auch durch eine unzureichende Ausschüttung von Glukagon unter geringen Glucosekonzentrationen und einer gesteigerten Sekretion unter hohen Konzentrationen von Glucose charakterisiert [179]. Während der Anteil der β -Zellen in der pankreatischen Insel unter einem T2DM abnimmt, steigt der Anteil der α -Zellen. Eine Zunahme kann auch für die humane δ -Zelle beobachtet werden [267] und wird durch Tiermodelle bestätigt. So zeigten GK-Ratten mit zunehmendem Alter eine gestörte Zytoarchitektur, verbunden mit polymorphen β -, α - und δ -Zellen sowie einer Abnahme von β -Zellen und einer δ -Zellhyperplasie [263]. In anderen Studien mit GK-Ratten [262] und spontan diabetischen ob/ob- sowie db/db-Mäusen [268] konnte gezeigt werden, dass die Konzentration von Somatostatin im Pankreas erhöht ist. Zudem wurde in db/db-Mäusen eine Zunahme von α - und δ -Zellen beobachtet, die eine topographische Umverteilung von der Peripherie hin zum Zentrum der Insel zeigten [268]. Diese Umverteilung war verbunden mit einer Zunahme der Kontaktfläche zwischen δ -Zellen und hypersekretorischen β -Zellen, die in der früheren Phase des T2DM bei db/db-Mäusen eine Hypertrophie und Hyperplasie zeigen. Im weiteren Verlauf der Krankheit koinzidierten die Zunahme der δ -Zellen und ein erhöhtes Volumen mit einer massiven β -Zellnekrosis [269]. Alán et al. [263] vermuteten, dass es durch die Hyperplasie der δ -Zellen in pankreatischen

Inseln von GK-Ratten zu einer lokalen Überproduktion von Somatostatin und damit zu einer verminderten Viabilität und Masse der β -Zellen über parakrine Effekte kommt. Zudem führen diese zellulären Veränderungen zu veränderten Zell-Zell-Kontakten in der pankreatischen Insel. Untersuchungen an pankreatischem Gewebe von Patienten mit einem T2DM zeigten insbesondere in großen Inseln eine Abnahme der β -Zellen und eine reziproke Zunahme der α -Zellen. Als Folge kam es zu erhöhten Kontakten zwischen α -Zellen und verminderten Kontakten zwischen β -Zellen sowie zwischen β - und α -Zellen. Zudem zeigten diese Inseln im Vergleich zu nicht-diabetischen Inseln verminderte β/δ -Kontakte sowie mehr δ/δ - und δ/α -Zellkontakte [180]. Solche Veränderungen beeinflussen die interzelluläre Kommunikation innerhalb der Insel. Da Somatostatin als sogenanntes *buffering hormone* sowohl die Insulin- als auch die Glukagonsekretion moduliert [148], ist die erhöhte pankreatische Somatostatin-ausschüttung unter einem T2DM verbunden mit einer Hemmung der Insulinsekretion und einer verringerten kompensatorischen Glukagonsekretion unter einer Hypoglykämie. Gleichzeitig kommt es durch einen gestörten β/δ -Feedbackmechanismus zu einer erhöhten Glukagonsekretion unter Hyperglykämie [146, 161, 171, 179]. Unter vergleichsweiser Betrachtung der basalen Sekretion von Somatostatin bei den normoglykämischen nicht-diabetischen Kontrollinseln konnte auch im eigenen Versuch eine höhere basale Sekretionsrate von Somatostatin in den Typ2-diabetischen Inseln beobachtet werden, was auf eine veränderte Inselstruktur sowie Hormonsekretion hindeutet. In diesem Zusammenhang konnte auch der von Kilimnik et al. [180] beschriebene Verlust an großen Inseln im eigenen Versuch beobachtet werden. Die in dieser Arbeit verwendeten Inseln des Typ2-diabetischen Spenders wiesen visuell betrachtet eine geringere Größe auf als die Inseln des nicht-diabetischen Patienten.

Diese dargestellten Veränderungen unter einem T2DM könnten die unterschiedlichen Reaktionen nicht- und Typ2-diabetischer Inseln auf eine Melatoninbehandlung erklären. Insbesondere die höhere Melatoninrezeptordichte in der δ -Zelle der Typ2-diabetischen Insel, verbunden mit einer Melatonin-vermittelten Senkung der Somatostatinsekretion im Falle eines T2DM könnte ein kompensatorischer Mechanismus sein, um einer weiteren Abnahme der Insulinsekretion vorzubeugen sowie eine Glukagonsekretion unter hypoglykämischen Episoden zu erhöhen. Um diesen Aspekt näher zu betrachten, sollten künftige Untersuchungen auch unter hypoglykämischen Bedingungen erfolgen. Zudem sollten weitere Untersuchungen folgen, die insbesondere isolierte Effekte von Melatonin auf primäre, FACS-gesortete α -, β - und δ -Zellen der humanen pankreatischen Insel unter physiologischen und pathophysiologischen Bedingungen berücksichtigen. Auch Untersuchungen speziell an humanen Zelllinien sollten die an Zelllinien von Rodentia gewonnenen Erkenntnisse zum Einfluss von Melatonin ergänzen und damit mögliche Spezies-spezifische Unterschiede einbeziehen. Hinsichtlich der β -Zelle könnte hier die

humane Zelllinie EndoC- β H1 ein mögliches Modell darstellen [270–272]. Für die α -Zelle ist allerdings noch kein humanes Modell etabliert. Weiterhin sind weiterführende Untersuchungen notwendig, um die eigenen Ergebnisse zu verifizieren, da die durchgeführten Untersuchungen auf Inseln von jeweils einem Spender basierten, in denen Entnahmezeitpunkt der Probe sowie andere Parameter hinsichtlich der Medikation oder des Gesundheitszustandes unbekannt waren. Allerdings konnte hier ein insulinpflichtiger T2DM ausgeschlossen werden, da die Behandlung des Spenders ausschließlich in einer diätetischen Therapie bestand.

Auch bei den immunhistochemischen Untersuchungen humaner Inseln sei abschließend erwähnt, dass die Auswahl der zur Verfügung stehenden pankreatischen Gewebeproben zwischen der Kontroll- und diabetischen Gruppe nach Alter und Krankheitsbild erfolgte. Hinsichtlich des Operationszeitpunktes der Patienten erfolgten alle Gewebeentnahmen zwischen 8 und 12 Uhr am Vormittag. In diesem Zusammenhang sollte erwähnt werden, dass die Homogenität hinsichtlich weiterer Faktoren, wie Ernährungsstatus, BMI, Medikation, Allgemeinzustand sowie Schlafverhalten, nicht gegeben war. So kann nicht ausgeschlossen werden, dass diese Parameter die Expression von Melatoninrezeptoren auf mRNA- und Proteinebene beeinflussen. Nicht nur die Melatoninsekretion zeigt einen diurnalen Rhythmus, sondern auch Zielgewebe können täglichen Variationen in ihrer Responsivität für Melatonin unterliegen. Dabei scheint Melatonin die eigene Wirkung über eine Regulation der Melatoninrezeptoren zu kontrollieren [24]. Dies wird auch in Untersuchungen an Ratten deutlich, bei denen insbesondere in Typ2-diabetischen GK-Ratten eine Erhöhung der MT1-Expression in der Nacht gezeigt werden konnte [75]. Weiterhin stammten die humanen Pankreasproben aus unterschiedlichen pankreatischen Abschnitten, wodurch sich möglicherweise Einflüsse durch Unterschiede in der zellulären Zusammensetzung der untersuchten Inseln ergeben könnten. So wird das humane Pankreas makroskopisch in den Pankreaskopf (*Caput pancreatis*), den -körper (*Corpus pancreatis*) und den -schwanz (*Cauda pancreatis*) unterteilt. In der *Cauda pancreatis* befinden sich anteilig mehr Inseln und der Anteil an großen Inseln ist im Vergleich zum *Caput* und *Corpus pancreatis* erhöht. Zudem variiert der Anteil der verschiedenen Zelltypen in Abhängigkeit von der Inselgröße, z. B. steigt der Anteil von α -Zellen in großen Inseln während der β -Zellanteil abnimmt [273]. Hinsichtlich der zellulären Verteilung zeigen humane Inseln eine stärkere Heterogenität als murine Inseln [150]. Poudel et al. [274] zeigten in humanen nicht-diabetischen und diabetischen Inseln sowohl eine interindividuelle Heterogenität als auch eine intraindividuelle Variabilität in der Inselzellzusammensetzung der verschiedenen Zelltypen in Abhängigkeit von der Region des untersuchten Pankreasabschnittes. Daher sollten in Folgestudien die oben genannten Merkmale und Anregungen berücksichtigt werden.

6 Zusammenfassung

Circadiane/diurnale Rhythmen von Melatonin sowie der pankreatischen Hormone Insulin und Glukagon deuten auf eine Wechselwirkung zwischen Melatonin und der Hormonsekretion in der pankreatischen Insel hin. Untersuchungen an Rodentia zeigen einen Rezeptor-vermittelten inhibitorischen Einfluss von Melatonin auf die Insulinsekretion der β -Zelle. Demgegenüber steht ein stimulatorischer Einfluss von Melatonin auf die Glukagonsekretion der α -Zelle, der sowohl in Inseln von Rodentia als auch in humanen Inseln gezeigt wurde. Durch die Modulation der Sekretion beider Hormone nimmt Melatonin Einfluss auf die Glucosehomöostase. Das von der pankreatischen δ -Zelle ausgeschüttete Hormon Somatostatin, welches als parakriner Regulator sowohl die Insulin- als auch die Glukagonsekretion in der Langerhansschen Insel moduliert, wurde bei diesen Untersuchungen bisher nicht berücksichtigt. Daher war es Ziel dieser Arbeit, den Einfluss von Melatonin auf die Somatostatinsekretion der pankreatischen δ -Zelle zu untersuchen. Als zelluläres Modell diente hierbei die humane Somatostatinoma-Zelllinie QGP-1.

Die Grundlage dieser Untersuchungen bildete die Charakterisierung dieser Zelllinie hinsichtlich ihrer Modellhaftigkeit für die native humane pankreatische δ -Zelle mittels RT-PCR-Untersuchungen sowie der Nachweis beider Melatoninrezeptor-Isoformen sowohl auf Transkript- als auch auf Proteinebene. In Inkubationsversuchen konnte erstmalig gezeigt werden, dass Melatonin die Somatostatinsekretion der QGP-1-Zelllinie moduliert und unter physiologischen Konzentrationen einen inhibitorischen Einfluss auf die δ -Zelle ausübt. Dieser Einfluss zeigte eine Zeit- und Konzentrationsabhängigkeit und war sowohl unter hypo- als auch normo- und hyperglykämischen Bedingungen nachweisbar. Die beobachtete Abnahme der gesamtzellulären *second messenger*-Konzentration von cAMP und cGMP unter einer Melatonininkubation lässt in der QGP-1-Zelle eine Kopplung der Melatoninrezeptoren an inhibitorische G-Proteine vermuten. Dabei fungiert cAMP als Hauptvermittler des inhibitorischen Einflusses von Melatonin auf die Somatostatinsekretion. So kam es in Inkubationsversuchen mit den membrangängigen Analoga 8-Br-cAMP und 8-Br-cGMP nur durch 8-Br-cAMP zu einer dosisabhängigen Steigerung der Sekretion unter einer Hemmung der zellulären Phosphodiesterasen mittels IBMX, während 8-Br-cGMP die IBMX-stimulierte Somatostatinausschüttung nicht steigerte. Weiterhin konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass im Wesentlichen der MT1-Rezeptor für die Vermittlung des Melatonineinflusses auf die Somatostatinsekretion in den QGP-1-Zellen von Bedeutung ist. So konnte der inhibitorische Einfluss durch die Inkubation mit dem unspezifischen MT1/MT2-Rezeptorantagonisten Luzindol, nicht jedoch durch den MT2-spezifischen Rezeptorantagonisten 4-P-PDOT aufgehoben werden. Dies zeigte sich auch in transienten Transfektionsversuchen mit QGP-1-Zellen, die den humanen MT1, MT2 oder eine nicht-funktionelle Deletionsvariante des Rezeptors als Kontrolle überexprimierten. In den hMT1-überexprimierenden QGP-1-Zellen kam es sowohl unter physiologischen als auch pharmakologischen

Melatoninkonzentrationen zu einer Abnahme der Somatostatinsekretion, während sich die hMT2-überexprimierenden Zellen in der Reaktion auf eine Melatonininkubation nicht von den Kontroll-QGP-1-Zellen unterscheiden.

Das Vorkommen der beiden Melatoninrezeptor-Isoformen MT1 und MT2 in nativen β - und α -Zellen der Langerhansschen Insel wird Spezies-vergleichend kontrovers diskutiert. Erste Nachweise in der nativen pankreatischen δ -Zelle finden sich bisher nur in humanen Transkriptomanalysen. Außerdem zeigen Untersuchungen zum Insulin-Melatonin-Antagonismus, dass die unter einem Diabetes mellitus Typ2 erhöhten Plasmainsulinkonzentrationen mit erniedrigten Melatoninwerten sowie einer gesteigerten Melatoninrezeptorexpression im Pankreas einhergehen. Daher erfolgte immunhistochemisch ein Nachweis beider Rezeptorisoformen in den verschiedenen endokrinen Zelltypen der humanen Insel von pankreatischem Gewebe nicht-diabetischer und Typ2-diabetischer Patienten. In allen drei Zelltypen konnte sowohl der MT1- als auch MT2-Rezeptor nachgewiesen werden. Die Bestimmung der Rezeptordichte von MT1 und MT2 mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie deutete auf eine spezifische Verteilung zwischen den einzelnen Zelltypen mit einer geringeren Rezeptordichte in den α -Zellen, verglichen mit β - und δ -Zellen hin. Zudem zeigte sich eine Zunahme der Rezeptordichte, vor allem von MT1, in der δ -Zelle der Typ2-diabetischen Inseln. Gleichzeitig wurden Inkubationsversuche mit isolierten humanen Inseln eines nicht-diabetischen und eines Typ2-diabetischen Patienten durchgeführt und festgestellt, dass Melatonin in den nicht-diabetischen Inseln, insbesondere unter einer normoglykämischen Glucosekonzentration, einen stimulatorischen Einfluss auf die Somatostatinsekretion hat. In den Typ2-diabetischen Inseln hingegen zeichnete sich sowohl unter normo- als auch hyperglykämischen Bedingungen ein inhibitorischer Effekt ab, möglicherweise bedingt durch die in den diabetischen Inseln beobachtete erhöhte Melatoninrezeptordichte der δ -Zelle.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass in dieser Arbeit erstmalig der Nachweis von MT1 und MT2 in der humanen pankreatischen δ -Zelle erbracht werden konnte, verbunden mit einer Modulation der Somatostatinsekretion der humanen Langerhansschen Insel durch Melatonin. Hierbei deuten die Untersuchungen an dem humanen δ -Zellmodell QGP-1 auf einen Rezeptor-vermittelten inhibitorischen Einfluss von Melatonin auf die Somatostatin-ausschüttung. Die Ergebnisse dieser Arbeit sollen zum besseren Verständnis der Wirkungsweise von Melatonin auf die Hormonsekretion der Insel, unter besonderer Berücksichtigung der δ -Zelle, beitragen und damit Erklärungsansätze bieten, warum Störungen des circadianen Rhythmus mit einem höheren Risiko für Diabetes mellitus Typ2 einhergehen können. So müssen bei den bisher untersuchten Einflüssen von Melatonin auf die pankreatische Insulin- und Glukagonsekretion auch circadiane Modulationen der Somatostatinsekretion berücksichtigt werden, da für die Aufrechterhaltung der Glucosehomöostase alle drei Zelltypen einander beeinflussen.

7 Summary

Circadian/diurnal rhythms observed in melatonin and the pancreatic islet hormones insulin and glucagon indicate an interaction between melatonin and hormone secretion in pancreatic islets. Investigations in rodents display a receptor-mediated inhibitory influence of melatonin on insulin secretion from β -cells. This contrasts with a stimulatory role of melatonin on glucagon secretion from α -cells, which has been shown in islets of both rodents and humans. By modulating the secretion of insulin, as well as glucagon, melatonin has an impact on glucose homeostasis. As yet, a modulatory role of melatonin on somatostatin secretion from the pancreatic δ -cell, as a paracrine regulator of insulin and glucagon secretion from the islets of Langerhans, has not been proven. The aim of the present work was to study the influence of melatonin on somatostatin secretion from pancreatic δ -cells. The human somatostatinoma cell line QGP-1 served as a cellular model.

The basis for these investigations was provided by proving that QGP-1 expressed both MT1 and MT2 receptors on a transcript level by RT-PCR and on a protein level by immunohistochemistry. For the first time, it could be shown, in incubation experiments, that melatonin modulates somatostatin secretion from the QGP-1 cell line, exerting an inhibitory influence on the δ -cell under physiological melatonin concentrations. This influence varied according to time and concentration and was detectable under hypo- as well as normo- and hyperglycemic conditions. The observed decrease in the total cellular second messenger concentration of cAMP and cGMP under melatonin incubation suggests a coupling of melatonin receptors to inhibitory G-proteins in QGP-1 cells. The second messenger cAMP acted as the main mediator of the inhibitory influence of melatonin on somatostatin secretion. In incubation experiments using the membrane-permeable analogs 8-Br-cAMP and 8-Br-cGMP, only 8-Br-cAMP led to a dose-dependent increase in secretion under inhibition of the cellular phosphodiesterases with IBMX. In contrast 8-Br-cGMP did not enhance the IBMX-stimulated somatostatin release. Furthermore, it was proven that the MT1 receptor is the major transmitter of the inhibitory effect of melatonin on somatostatin secretion in QGP-1 cells. The inhibitory influence could be reversed after incubation with the unspecific MT1/MT2 receptor antagonist luzindole, but not with the MT2-specific receptor antagonist 4-P-PDOT, proving this assumption. Transient transfection experiments with QGP-1 cells overexpressing the human MT1 or MT2 or, as a control, a nonfunctional deletion variant of the receptor also proved that result. In hMT1-overexpressing QGP-1 cells a decrease in somatostatin secretion was measured under both physiological and pharmacological melatonin concentrations, while the cells overexpressing the hMT2 receptor did not differ from the control QGP-1 cells in response to melatonin incubation.

The distribution of both melatonin receptor isoforms MT1 and MT2 in native β - and α -cells of pancreatic islets is critically discussed for different species. First evidence of receptor expression in native pancreatic δ -cells has only been found in transcriptome analyses of humans. In addition, studies of insulin–melatonin antagonism have shown that increased plasma insulin concentrations in diabetes mellitus type 2 are associated with lower melatonin levels and increased melatonin receptor expression in the pancreas. Therefore, in this study, both receptor isoforms were investigated immunohistochemically in the different endocrine cell types of human islets in pancreatic tissue from nondiabetic and type 2 diabetic patients. In all three cell types, the MT1 as well as the MT2 receptor were detected. The determination of MT1 and MT2 receptor density by confocal laser scanning microscopy indicated a specific distribution between individual cell types, with a lower receptor density in α -cells compared to β - and δ -cells. There was also an increase in receptor density, especially of MT1, in the δ -cell of type 2 diabetic islets. Concomitantly, in incubation experiments with isolated human islets of a nondiabetic and a type 2 diabetic patient, it was noted that melatonin has a stimulatory influence on somatostatin secretion in nondiabetic islets, especially under a normoglycemic glucose concentration. On the other hand, in type 2 diabetic islets an inhibitory effect was found under both normo- and hyperglycemic conditions, possibly due to the observed increased melatonin receptor density in δ -cells.

In conclusion, results of the present work demonstrate for the first time that MT1 and MT2 receptors are expressed in the human pancreatic δ -cell and that somatostatin secretion is modulated by melatonin in human islets of Langerhans. Here, the investigations in the human δ -cell model QGP-1 indicate a receptor-mediated inhibitory influence of melatonin on somatostatin release. These results may help in a better understanding of the signaling melatonin exerts on pancreatic hormone secretion, particularly with respect to the δ -cell. The study therefore offers possible explanations for the disturbances in circadian rhythms which may be associated with a higher risk of diabetes mellitus type 2. Thus, considering the influence of melatonin on pancreatic insulin and glucagon secretion, circadian modulations of somatostatin secretion should be taken into account, particularly as all three cell types influence each other in order to maintain glucose homeostasis.

8 Literaturverzeichnis

1. Dibner C, Schibler U (2015) Circadian timing of metabolism in animal models and humans. *J Intern Med* 277(5): 513–527
2. Korf H-W, Stehle JH (2005) Das circadiane System der Säugetiere – integraler Bestandteil des neuroendokrinen Systems. In: Peschke E (Hrsg.): Endokrinologie II, Vorträge im Rahmen des Projekts „Zeitstrukturen endokriner Systeme“. Abh. Sächs. Akad. Wiss., Math.-nat. Kl., Band 63, Heft 2. S. Hirzel, Stuttgart/Leipzig, S. 9–31
3. Maronde E, Stehle JH (2007) The mammalian pineal gland: known facts, unknown facets. *Trends Endocrinol Metab* 18(4): 142–149
4. Aschoff J (1965) Circadian Rhythms in Man. *Science* 148(3676): 1427–1432
5. Reppert SM, Weaver DR (2002) Coordination of circadian timing in mammals. *Nature* 418(6901): 935–941
6. Aschoff J (1954) Zeitgeber der tierischen Tagesperiodik. *Die Naturwissenschaften* 41(3): 49–56
7. Mason IC, Qian J, Adler GK et al. (2020) Impact of circadian disruption on glucose metabolism: implications for type 2 diabetes. *Diabetologia* 63(3): 462–472
8. Balsalobre A, Brown SA, Marcacci L et al. (2000) Resetting of circadian time in peripheral tissues by glucocorticoid signaling. *Science* 289(5488): 2344–2347
9. McNamara P, Seo SB, Rudic RD et al. (2001) Regulation of CLOCK and MOP4 by nuclear hormone receptors in the vasculature: a humoral mechanism to reset a peripheral clock. *Cell* 105(7): 877–889
10. Karamitri A, Jockers R (2019) Melatonin in type 2 diabetes mellitus and obesity. *Nat Rev Endocrinol* 15(2): 105–125
11. Bartness TJ, Song CK, Demas GE (2001) SCN efferents to peripheral tissues: implications for biological rhythms. *J Biol Rhythms* 16(3): 196–204
12. Damiola F, Le Minh N, Preitner N et al. (2000) Restricted feeding uncouples circadian oscillators in peripheral tissues from the central pacemaker in the suprachiasmatic nucleus. *Genes Dev* 14(23): 2950–2961
13. Froy O (2007) The relationship between nutrition and circadian rhythms in mammals. *Front Neuroendocrinol* 28(2-3): 61–71
14. Buhr ED, Yoo S-H, Takahashi JS (2010) Temperature as a universal resetting cue for mammalian circadian oscillators. *Science* 330(6002): 379–385
15. Saini C, Morf J, Stratmann M et al. (2012) Simulated body temperature rhythms reveal the phase-shifting behavior and plasticity of mammalian circadian oscillators. *Genes Dev* 26(6): 567–580
16. Welsh DK, Logothetis DE, Meister M et al. (1995) Individual neurons dissociated from rat suprachiasmatic nucleus express independently phased circadian firing rhythms. *Neuron* 14(4): 697–706
17. Liu C, Reppert SM (2000) GABA synchronizes clock cells within the suprachiasmatic circadian clock. *Neuron* 25(1): 123–128
18. Berson DM, Dunn FA, Takao M (2002) Phototransduction by retinal ganglion cells that set the circadian clock. *Science* 295(5557): 1070–1073
19. Hannibal J, Hindeross P, Knudsen SM et al. (2002) The photopigment melanopsin is exclusively present in pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide-containing retinal ganglion cells of the retinohypothalamic tract. *J Neurosci* 22(1): RC191
20. Hattar S, Lucas RJ, Mrosovsky N et al. (2003) Melanopsin and rod-cone photoreceptive systems account for all major accessory visual functions in mice. *Nature* 424(6944): 76–81
21. Gooley JJ, Rajaratnam SM, Brainard GC et al. (2010) Spectral responses of the human circadian system depend on the irradiance and duration of exposure to light. *Sci Transl Med* 2(31): 31ra33

22. Borjigin J, Zhang LS, Calinescu A-A (2012) Circadian regulation of pineal gland rhythmicity. *Mol Cell Endocrinol* 349(1): 13–19
23. Challet E (2007) Minireview: Entrainment of the suprachiasmatic clockwork in diurnal and nocturnal mammals. *Endocrinology* 148(12): 5648–5655
24. Dubocovich ML, Delagrange P, Krause DN et al. (2010) International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXV. Nomenclature, classification, and pharmacology of G protein-coupled melatonin receptors. *Pharmacol Rev* 62(3): 343–380
25. Lerner AB, Case JD, Takahashi Y et al. (1958) Isolation of melatonin, the pineal gland factor that lightens melanocytes. *J Am Chem Soc* 80(10): 2587
26. Lerner AB, Case JD, Heintzelman RV (1959) Structure of melatonin. *J Am Chem Soc* 81(22): 6084–6085
27. Drijfhout WJ, van der Linde AG, Kooi SE et al. (1996) Norepinephrine release in the rat pineal gland: the input from the biological clock measured by in vivo microdialysis. *J Neurochem* 66(2): 748–755
28. Maronde E, Pfeffer M, Olcese J et al. (1999) Transcription factors in neuroendocrine regulation: rhythmic changes in pCREB and ICER levels frame melatonin synthesis. *J Neurosci* 19(9): 3326–3336
29. Roseboom PH, Klein DC (1995) Norepinephrine stimulation of pineal cyclic AMP response element-binding protein phosphorylation: primary role of a beta-adrenergic receptor/cyclic AMP mechanism. *Mol Pharmacol* 47(3): 439–449
30. Tamotsu S, Schomerus C, Stehle JH et al. (1995) Norepinephrine-induced phosphorylation of the transcription factor CREB in isolated rat pinealocytes: an immunocytochemical study. *Cell Tissue Res* 282(2): 219–226
31. Maronde E, Wicht H, Taskén K et al. (1999) CREB phosphorylation and melatonin biosynthesis in the rat pineal gland: involvement of cyclic AMP dependent protein kinase type II. *J Pineal Res* 27(3): 170–182
32. Baler R, Covington S, Klein DC (1997) The rat arylalkylamine N-acetyltransferase gene promoter. cAMP activation via a cAMP-responsive element-CCAAT complex. *J Biol Chem* 272(11): 6979–6985
33. Borjigin J, Wang MM, Snyder SH (1995) Diurnal variation in mRNA encoding serotonin N-acetyltransferase in pineal gland. *Nature* 378(6559): 783–785
34. Koch M, Mauhin V, Stehle JH et al. (2003) Dephosphorylation of pCREB by protein serine/threonine phosphatases is involved in inactivation of Aanat gene transcription in rat pineal gland. *J Neurochem* 85(1): 170–179
35. Gastel JA, Roseboom PH, Rinaldi PA et al. (1998) Melatonin production: proteasomal proteolysis in serotonin N-acetyltransferase regulation. *Science* 279(5355): 1358–1360
36. Stehle JH, Saade A, Rawashdeh O 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(1): 17–43
37. Ackermann K, Bux R, Rüb U et al. (2006) Characterization of human melatonin synthesis using autoptic pineal tissue. *Endocrinology* 147(7): 3235–3242
38. Schomerus C, Korf H-W, Laedtke E et al. (2000) Selective adrenergic/cyclic AMP-dependent switch-off of proteasomal proteolysis alone switches on neural signal transduction: an example from the pineal gland. *J Neurochem* 75(5): 2123–2132
39. Maronde E, Saade A, Ackermann K et al. (2011) Dynamics in enzymatic protein complexes offer a novel principle for the regulation of melatonin synthesis in the human pineal gland. *J Pineal Res* 51(1): 145–155
40. Ganguly S, Gastel JA, Weller JL et al. (2001) Role of a pineal cAMP-operated arylalkylamine N-acetyltransferase/14-3-3-binding switch in melatonin synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(14): 8083–8088
41. Klein DC, Ganguly S, Coon S et al. (2002) 14-3-3 Proteins and photoneuroendocrine transduction: role in controlling the daily rhythm in melatonin. *Biochem Soc Trans* 30(4): 365–373

42. Grivas TB, Savvidou OD (2007) Melatonin the "light of night" in human biology and adolescent idiopathic scoliosis. *Scoliosis* 2: 6
43. Harpsøe NG, Andersen LPH, Gögenur I et al. (2015) Clinical pharmacokinetics of melatonin: a systematic review. *Eur J Clin Pharmacol* 71(8): 901–909
44. Wehr TA (1991) The durations of human melatonin secretion and sleep respond to changes in daylength (photoperiod). *J Clin Endocrinol Metab* 73(6): 1276–1280
45. Adamsson M, Laike T, Morita T (2016) Annual variation in daily light exposure and circadian change of melatonin and cortisol concentrations at a northern latitude with large seasonal differences in photoperiod length. *J Physiol Anthropol* 36(1): 6
46. Waldhauser F, Weiszenbacher G, Tatzler E et al. (1988) Alterations in nocturnal serum melatonin levels in humans with growth and aging. *J Clin Endocrinol Metab* 66(3): 648–652
47. Karasek M (2004) Melatonin, human aging, and age-related diseases. *Exp Gerontol* 39(11-12): 1723–1729
48. Hardeland R (2012) Melatonin in aging and disease -multiple consequences of reduced secretion, options and limits of treatment. *Aging Dis* 3(2): 194–225
49. Reppert SM, Weaver DR, Ebisawa T (1994) Cloning and characterization of a mammalian melatonin receptor that mediates reproductive and circadian responses. *Neuron* 13(5): 1177–1185
50. Reppert SM, Godson C, Mahle CD 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(19): 8734–8738
51. Ayoub MA, Couturier C, Lucas-Meunier E et al. (2002) Monitoring of ligand-independent dimerization and ligand-induced conformational changes of melatonin receptors in living cells by bioluminescence resonance energy transfer. *J Biol Chem* 277(24): 21522–21528
52. Ayoub MA, Levoye A, Delagrangé P et al. (2004) Preferential formation of MT1/MT2 melatonin receptor heterodimers with distinct ligand interaction properties compared with MT2 homodimers. *Mol Pharmacol* 66(2): 312–321
53. Jockers R, Maurice P, Boutin JA et al. (2008) Melatonin receptors, heterodimerization, signal transduction and binding sites: what's new? *Br J Pharmacol* 154(6): 1182–1195
54. Hunt AE, Al-Ghoul WM, Gillette MU et al. (2001) Activation of MT(2) melatonin receptors in rat suprachiasmatic nucleus phase advances the circadian clock. *Am J Physiol Cell Physiol* 280(1): C110-118
55. Ng KY, Leong MK, Liang H et al. (2017) Melatonin receptors: distribution in mammalian brain and their respective putative functions. *Brain Struct Funct* 222(7): 2921–2939
56. Slominski RM, Reiter RJ, Schlabritz-Loutsevitch N et al. (2012) Melatonin membrane receptors in peripheral tissues: distribution and functions. *Mol Cell Endocrinol* 351(2): 152–166
57. Brydon L, Petit L, de Coppet P et al. (1999) Polymorphism and signalling of melatonin receptors. *Reprod Nutr Dev* 39(3): 315–324
58. Brydon L, Roka F, Petit L et al. (1999) Dual signaling of human Mel1a melatonin receptors via G(i2), G(i3), and G(q/11) proteins. *Mol Endocrinol* 13(12): 2025–2038
59. McNulty S, Ross AW, Barrett P et al. (1994) Melatonin regulates the phosphorylation of CREB in ovine pars tuberalis. *J Neuroendocrinol* 6(5): 523–532
60. Witt-Enderby PA, Masana MI, Dubocovich ML (1998) Physiological exposure to melatonin supersensitizes the cyclic adenosine 3',5'-monophosphate-dependent signal transduction cascade in Chinese hamster ovary cells expressing the human mt1 melatonin receptor. *Endocrinology* 139(7): 3064–3071
61. Godson C, Reppert SM (1997) The Mel1a melatonin receptor is coupled to parallel signal transduction pathways. *Endocrinology* 138(1): 397–404
62. Witt-Enderby PA, MacKenzie RS, McKeon RM et al. (2000) Melatonin induction of filamentous structures in non-neuronal cells that is dependent on expression of the human mt1 melatonin receptor. *Cell Motil Cytoskeleton* 46(1): 28–42

63. Chan ASL, Lai FPL, Lo RKH et al. (2002) Melatonin mt1 and MT2 receptors stimulate c-Jun N-terminal kinase via pertussis toxin-sensitive and -insensitive G proteins. *Cell Signal* 14(3): 249–257
64. Slanar O, Pelisek V, Vanecek J (2000) Melatonin inhibits pituitary adenylyl cyclase-activating polypeptide-induced increase of cyclic AMP accumulation and [Ca²⁺]_i in cultured cells of neonatal rat pituitary. *Neurochem Int* 36(3): 213–219
65. Geary GG, Duckles SP, Krause DN (1998) Effect of melatonin in the rat tail artery: role of K⁺ channels and endothelial factors. *Br J Pharmacol* 123(8): 1533–1540
66. Masana MI, Doolen S, Ersahin C et al. (2002) MT(2) melatonin receptors are present and functional in rat caudal artery. *J Pharmacol Exp Ther* 302(3): 1295–1302
67. Steffens F, Zhou X-B, Sausbier U et al. (2003) Melatonin receptor signaling in pregnant and nonpregnant rat uterine myocytes as probed by large conductance Ca²⁺-activated K⁺ channel activity. *Mol Endocrinol* 17(10): 2103–2115
68. Stehle J, Vanecek J, Vollrath L (1989) Effects of melatonin on spontaneous electrical activity of neurons in rat suprachiasmatic nuclei: an in vitro iontophoretic study. *J Neural Transm* 78(2): 173–177
69. Nelson CS, Marino JL, Allen CN (1996) Melatonin receptors activate heteromeric G-protein coupled Kir3 channels. *Neuroreport* 7(3): 717–720
70. Petit L, Lacroix I, de Coppet P et al. (1999) Differential signaling of human Mel1a and Mel1b melatonin receptors through the cyclic guanosine 3'-5'-monophosphate pathway. *Biochem Pharmacol* 58(4): 633–639
71. MacKenzie RS, Melan MA, Passey DK et al. (2002) Dual coupling of MT(1) and MT(2) melatonin receptors to cyclic AMP and phosphoinositide signal transduction cascades and their regulation following melatonin exposure. *Biochem Pharmacol* 63(4): 587–595
72. McArthur AJ, Hunt AE, Gillette MU (1997) Melatonin action and signal transduction in the rat suprachiasmatic circadian clock: activation of protein kinase C at dusk and dawn. *Endocrinology* 138(2): 627–634
73. Daulat AM, Maurice P, Froment C et al. (2007) Purification and identification of G protein-coupled receptor protein complexes under native conditions. *Mol Cell Proteomics* 6(5): 835–844
74. Boden G, Ruiz J, Urbain JL et al. (1996) Evidence for a circadian rhythm of insulin secretion. *Am J Physiol* 271(2 Pt 1): E246-E252
75. Peschke E, Frese T, Chankiewicz E 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(2): 135–143
76. Petrenko V, Saini C, Giovannoni L et al. (2017) Pancreatic α - and β -cellular clocks have distinct molecular properties and impact on islet hormone secretion and gene expression. *Genes Dev* 31(4): 383–398
77. Peschke E, Peschke D (1998) Evidence for a circadian rhythm of insulin release from perfused rat pancreatic islets. *Diabetologia* 41(9): 1085–1092
78. Bizot-Espiard JG, Doublé A, Guardiola-Lemaitre B et al. (1998) Diurnal rhythms in plasma glucose, insulin, growth hormone and melatonin levels in fasted and hyperglycaemic rats. *Diabetes Metab* 24(3): 235–240
79. Jarrett RJ, Keen H (1970) Further observations on the diurnal variation in oral glucose tolerance. *Br Med J* 4(5731): 334–337
80. Ben-Dyke R (1971) Diurnal variation of oral glucose tolerance in volunteers and laboratory animals. *Diabetologia* 7(3): 156–159
81. Zimmet PZ, Wall JR, Rome R et al. (1974) Diurnal variation in glucose tolerance: associated changes in plasma insulin, growth hormone, and non-esterified fatty acids. *Br Med J* 1(5906): 485–488
82. Gibson T, Jarrett RJ (1972) Diurnal variation in insulin sensitivity. *Lancet* 2(7784): 947–948

83. Gibson T, Stimmler L, Jarrett RJ et al. (1975) Diurnal variation in the effects of insulin on blood glucose, plasma non-esterified fatty acids and growth hormone. *Diabetologia* 11(1): 83–88
84. Peschke E, Bähr I, Mühlbauer E (2015) Experimental and clinical aspects of melatonin and clock genes in diabetes. *J Pineal Res* 59(1): 1–23
85. Diaz B, Blázquez E (1986) Effect of pinealectomy on plasma glucose, insulin and glucagon levels in the rat. *Horm Metab Res* 18(4): 225–229
86. Rodríguez V, Mellado C, Alvarez E et al. (1989) Effect of pinealectomy on liver insulin and glucagon receptor concentrations in the rat. *J Pineal Res* 6(1): 77–88
87. de Lima LM, dos Reis LC, de Lima MA (2001) Influence of the pineal gland on the physiology, morphometry and morphology of pancreatic islets in rats. *Braz J Biol* 61(2): 333–340
88. Quay WB, Gorray KC (1980) Pineal effects on metabolism and glucose homeostasis: evidence for lines of humoral mediation of pineal influences on tumor growth. *J Neural Transm* 47(2): 107–120
89. Csaba G, Baráth P (1971) Are Langerhan's islets influenced by the pineal body? *Experientia* 27(8): 962
90. 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(3-4): 145–148
91. Bizot-Espiard JG, Doublé A, Cousin B et al. (1998) Lack of melatonin effects on insulin action in normal rats. *Horm Metab Res* 30(12): 711–716
92. Rasmussen DD, Boldt BM, Wilkinson CW et al. (1999) Daily melatonin administration at middle age suppresses male rat visceral fat, plasma leptin, and plasma insulin to youthful levels. *Endocrinology* 140(2): 1009–1012
93. Wolden-Hanson T, Mitton DR, McCants RL 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(2): 487–497
94. Dhar M, Dayal SS, Ramesh Babu CS et al. (1983) Effect of melatonin on glucose tolerance and blood glucose circadian rhythm in rabbits. *Indian J Physiol Pharmacol* 27(2): 109–117
95. Bailey CJ, Atkins TW, Matty AJ (1974) Melatonin inhibition of insulin secretion in the rat and mouse. *Horm Res* 5(1): 21–28
96. Peschke E, Peschke D, Hammer T et al. (1997) Influence of melatonin and serotonin on glucose-stimulated insulin release from perfused rat pancreatic islets in vitro. *J Pineal Res* 23(3): 156–163
97. Peschke E, Fauteck JD, Musshoff U et al. (2000) Evidence for a melatonin receptor within pancreatic islets of neonate rats: functional, autoradiographic, and molecular investigations. *J Pineal Res* 28(3): 156–164
98. Peschke E, Mühlbauer E, Musshoff U 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(2): 63–71
99. Picinato MC, Haber EP, Cipolla-Neto J et al. (2002) Melatonin inhibits insulin secretion and decreases PKA levels without interfering with glucose metabolism in rat pancreatic islets. *J Pineal Res* 33(3): 156–160
100. Peschke E, Bach AG, Mühlbauer E (2006) Parallel signaling pathways of melatonin in the pancreatic beta-cell. *J Pineal Res* 40(2): 184–191
101. Ramracheya RD, Muller DS, Squires PE et al. (2008) Function and expression of melatonin receptors on human pancreatic islets. *J Pineal Res* 44(3): 273–279
102. 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(4): 373–381
103. Bähr I, Mühlbauer E, Schucht H et al. (2011) Melatonin stimulates glucagon secretion in vitro and in vivo. *J Pineal Res* 50(3): 336–344

104. Bähr I, Mühlbauer E, Albrecht E et al. (2012) Evidence of the receptor-mediated influence of melatonin on pancreatic glucagon secretion via the G α q protein-coupled and PI3K signaling pathways. *J Pineal Res* 53(4): 390–398
105. O'Brien IA, Lewin IG, O'Hare JP et al. (1986) Abnormal circadian rhythm of melatonin in diabetic autonomic neuropathy. *Clin Endocrinol (Oxf)* 24(4): 359–364
106. Hikichi T, Tateda N, Miura T (2011) Alteration of melatonin secretion in patients with type 2 diabetes and proliferative diabetic retinopathy. *Clin Ophthalmol* 5: 655–660
107. Mäntele S, Otway DT, Middleton B et al. (2012) Daily rhythms of plasma melatonin, but not plasma leptin or leptin mRNA, vary between lean, obese and type 2 diabetic men. *PLoS One* 7(5): e37123
108. Peschke E, Stumpf I, Bazwinsky I et al. (2007) Melatonin and type 2 diabetes - a possible link? *J Pineal Res* 42(4): 350–358
109. Frese T, Bach AG, Mühlbauer E et al. (2009) Pineal melatonin synthesis is decreased in type 2 diabetic Goto-Kakizaki rats. *Life Sci* 85(13-14): 526–533
110. 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(6): 2483–2493
111. Nishida S, Segawa T, Murai I et al. (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(1): 26–33
112. Peschke E, Hofmann K, Pönicke K et al. (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(4): 389–396
113. Peschke E, Wolgast S, Bazwinsky I et al. (2008) Increased melatonin synthesis in pineal glands of rats in streptozotocin induced type 1 diabetes. *J Pineal Res* 45(4): 439–448
114. Peschke E, Hofmann K, Bähr I 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(7): 1831–1840
115. Scheer FAJL, Hilton MF, Mantzoros CS et al. (2009) Adverse metabolic and cardiovascular consequences of circadian misalignment. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106(11): 4453–4458
116. Karlsson B, Alfredsson L, Knutsson A et al. (2005) Total mortality and cause-specific mortality of Swedish shift- and dayworkers in the pulp and paper industry in 1952-2001. *Scand J Work Environ Health* 31(1): 30–35
117. Morikawa Y, Nakagawa H, Miura K et al. (2005) Shift work and the risk of diabetes mellitus among Japanese male factory workers. *Scand J Work Environ Health* 31(3): 179–183
118. Knutson KL, Spiegel K, Penev P et al. (2007) The metabolic consequences of sleep deprivation. *Sleep Med Rev* 11(3): 163–178
119. Antunes LC, Levandovski R, Dantas G et al. (2010) Obesity and shift work: chronobiological aspects. *Nutr Res Rev* 23(1): 155–168
120. Khandelwal D, Dutta D, Chittawar S et al. (2017) Sleep Disorders in Type 2 Diabetes. *Indian J Endocrinol Metab* 21(5): 758–761
121. Saini C, Petrenko V, Pulimeno P et al. (2016) A functional circadian clock is required for proper insulin secretion by human pancreatic islet cells. *Diabetes Obes Metab* 18(4): 355–365
122. Petrenko V, Gandasi NR, Sage D et al. (2020) In pancreatic islets from type 2 diabetes patients, the dampened circadian oscillators lead to reduced insulin and glucagon exocytosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 117(5): 2484–2495
123. Staiger H, Machicao F, Schäfer SA et al. (2008) Polymorphisms within the novel type 2 diabetes risk locus MTNR1B determine beta-cell function. *PLoS One* 3(12): e3962
124. Bouatia-Naji N, Bonnefond A, Cavalcanti-Proença C et al. (2009) A variant near MTNR1B is associated with increased fasting plasma glucose levels and type 2 diabetes risk. *Nat Genet* 41(1): 89–94

125. Chambers JC, Zhang W, Zabaneh D 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(11): 2703–2708
126. Lyssenko V, Nagorny CLF, Erdos MR et al. (2009) Common variant in MTNR1B associated with increased risk of type 2 diabetes and impaired early insulin secretion. *Nat Genet* 41(1): 82–88
127. Prokopenko I, Langenberg C, Florez JC et al. (2009) Variants in MTNR1B influence fasting glucose levels. *Nat Genet* 41(1): 77–81
128. Rönn T, Wen J, Yang Z et al. (2009) A common variant in MTNR1B, encoding melatonin receptor 1B, is associated with type 2 diabetes and fasting plasma glucose in Han Chinese individuals. *Diabetologia* 52(5): 830–833
129. Bonnefond A, Clément N, Fawcett K et al. (2012) Rare MTNR1B variants impairing melatonin receptor 1B function contribute to type 2 diabetes. *Nat Genet* 44(3): 297–301
130. Li C, Shi Y, You L et al. (2011) Melatonin receptor 1A gene polymorphism associated with polycystic ovary syndrome. *Gynecol Obstet Invest* 72(2): 130–134
131. Da Silva Xavier G (2018) The Cells of the Islets of Langerhans. *J Clin Med* 7(3): E54
132. 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(2): 157–166
133. 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(1): 105–106
134. Mühlbauer E, Albrecht E, Hofmann K et al. (2011) Melatonin inhibits insulin secretion in rat insulinoma β -cells (INS-1) heterologously expressing the human melatonin receptor isoform MT2. *J Pineal Res* 51(3): 361–372
135. Mühlbauer E, Albrecht E, Bazwinsky-Wutschke I et al. (2012) Melatonin influences insulin secretion primarily via MT(1) receptors in rat insulinoma cells (INS-1) and mouse pancreatic islets. *J Pineal Res* 52(4): 446–459
136. Mühlbauer E, Gross E, Labucay K et al. (2009) Loss of melatonin signalling and its impact on circadian rhythms in mouse organs regulating blood glucose. *Eur J Pharmacol* 606(1-3): 61–71
137. Nagorny CLF, Sathanoori R, Voss U et al. (2011) Distribution of melatonin receptors in murine pancreatic islets. *J Pineal Res* 50(4): 412–417
138. Blodgett DM, Nowosielska A, Afik S et al. (2015) Novel Observations From Next-Generation RNA Sequencing of Highly Purified Human Adult and Fetal Islet Cell Subsets. *Diabetes* 64(9): 3172–3181
139. Bazwinsky-Wutschke I, Mühlbauer E, Wolgast S et al. (2009) Transcripts of calcium/calmodulin-dependent kinases are changed after forskolin- or IBMX-induced insulin secretion due to melatonin treatment of rat insulinoma beta-cells (INS-1). *Horm Metab Res* 41(11): 805–813
140. Bazwinsky-Wutschke I, Wolgast S, Mühlbauer E et al. (2012) Phosphorylation of cyclic AMP-response element-binding protein (CREB) is influenced by melatonin treatment in pancreatic rat insulinoma β -cells (INS-1). *J Pineal Res* 53(4): 344–357
141. 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(3): 318–327
142. Stumpf I, Bazwinsky I, Peschke E (2009) Modulation of the cGMP signaling pathway by melatonin in pancreatic beta-cells. *J Pineal Res* 46(2): 140–147
143. Bach AG, Wolgast S, Mühlbauer E et al. (2005) Melatonin stimulates inositol-1,4,5-trisphosphate and Ca²⁺ release from INS1 insulinoma cells. *J Pineal Res* 39(3): 316–323
144. Brazeau P, Vale W, Burgus R et al. (1973) Hypothalamic polypeptide that inhibits the secretion of immunoreactive pituitary growth hormone. *Science* 179(4068): 77–79
145. Günther T, Tulipano G, Dournaud P et al. (2018) International Union of Basic and Clinical Pharmacology. CV. Somatostatin Receptors: Structure, Function, Ligands, and New Nomenclature. *Pharmacol Rev* 70(4): 763–835

146. Rorsman P, Huising MO (2018) The somatostatin-secreting pancreatic δ -cell in health and disease. *Nat Rev Endocrinol* 14(7): 404–414
147. Rai U, Thrimawithana TR, Valery C et al. (2015) Therapeutic uses of somatostatin and its analogues: Current view and potential applications. *Pharmacol Ther* 152: 98–110
148. Brereton MF, Vergari E, Zhang Q et al. (2015) Alpha-, Delta- and PP-cells: Are They the Architectural Cornerstones of Islet Structure and Co-ordination? *J Histochem Cytochem* 63(8): 575–591
149. Francis BH, Baskin DG, Saunders DR et al. (1990) Distribution of somatostatin-14 and somatostatin-28 gastrointestinal-pancreatic cells of rats and humans. *Gastroenterology* 99(5): 1283–1291
150. Brissova M, Fowler MJ, Nicholson WE et al. (2005) Assessment of human pancreatic islet architecture and composition by laser scanning confocal microscopy. *J Histochem Cytochem* 53(9): 1087–1097
151. Cabrera O, Berman DM, Kenyon NS et al. (2006) The unique cytoarchitecture of human pancreatic islets has implications for islet cell function. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(7): 2334–2339
152. Dolensšek J, Rupnik MS, Stožer A (2015) Structural similarities and differences between the human and the mouse pancreas. *Islets* 7(1): e1024405
153. Huising MO, van der Meulen T, Huang JL et al. (2018) The Difference δ -Cells Make in Glucose Control. *Physiology (Bethesda)* 33(6): 403–411
154. Walker JN, Ramracheya R, Zhang Q et al. (2011) Regulation of glucagon secretion by glucose: paracrine, intrinsic or both? *Diabetes Obes Metab* 13(Suppl 1): 95–105
155. Strowski MZ, Parmar RM, Blake AD et al. (2000) Somatostatin inhibits insulin and glucagon secretion via two receptors subtypes: an in vitro study of pancreatic islets from somatostatin receptor 2 knockout mice. *Endocrinology* 141(1): 111–117
156. Hauge-Evans AC, King AJ, Carmignac D et al. (2009) Somatostatin secreted by islet delta-cells fulfills multiple roles as a paracrine regulator of islet function. *Diabetes* 58(2): 403–411
157. Kailey B, van de Bunt M, Cheley S et al. (2012) SSTR2 is the functionally dominant somatostatin receptor in human pancreatic β - and α -cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 303(9): E1107-E1116
158. Singh V, Brendel MD, Zacharias S et al. (2007) Characterization of somatostatin receptor subtype-specific regulation of insulin and glucagon secretion: an in vitro study on isolated human pancreatic islets. *J Clin Endocrinol Metab* 92(2): 673–680
159. Strowski MZ, Blake AD (2008) Function and expression of somatostatin receptors of the endocrine pancreas. *Mol Cell Endocrinol* 286(1-2): 169–179
160. Elliott AD, Ustione A, Piston DW (2015) Somatostatin and insulin mediate glucose-inhibited glucagon secretion in the pancreatic α -cell by lowering cAMP. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 308(2): E130-E143
161. Briant L, Salehi A, Vergari E et al. (2016) Glucagon secretion from pancreatic α -cells. *Ups J Med Sci* 121(2): 113–119
162. Patton GS, Dobbs R, Orci L et al. (1976) Stimulation of pancreatic immunoreactive somatostatin (IRS) release by glucagon [proceedings]. *Metabolism* 25(11 Suppl 1): 1499
163. Patton GS, Ipp E, Dobbs RE et al. (1977) Pancreatic immunoreactive somatostatin release. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74(5): 2140–2143
164. Weir GC, Samols E, Day JA, Jr. et al. (1978) Glucose and glucagon stimulate the secretion of somatostatin from the perfused canine pancreas. *Metabolism* 27(9 Suppl 1): 1223–1226
165. Kieffer TJ, Heller RS, Unson CG et al. (1996) Distribution of glucagon receptors on hormone-specific endocrine cells of rat pancreatic islets. *Endocrinology* 137(11): 5119–5125
166. Hauge-Evans AC, Anderson RL, Persaud SJ et al. (2012) Delta cell secretory responses to insulin secretagogues are not mediated indirectly by insulin. *Diabetologia* 55(7): 1995–2004

167. Brunicardi FC, Kleinman R, Moldovan S et al. (2001) Immunoneutralization of somatostatin, insulin, and glucagon causes alterations in islet cell secretion in the isolated perfused human pancreas. *Pancreas* 23(3): 302–308
168. van der Meulen T, Donaldson CJ, Cáceres E et al. (2015) Urocortin3 mediates somatostatin-dependent negative feedback control of insulin secretion. *Nat Med* 21(7): 769–776
169. Vieira E, Salehi A, Gylfe E (2007) Glucose inhibits glucagon secretion by a direct effect on mouse pancreatic alpha cells. *Diabetologia* 50(2): 370–379
170. Cejvan K, Coy DH, Efendic S (2003) Intra-islet somatostatin regulates glucagon release via type 2 somatostatin receptors in rats. *Diabetes* 52(5): 1176–1181
171. Briant LJB, Reinbothe TM, Spiliotis I et al. (2018) δ -cells and β -cells are electrically coupled and regulate α -cell activity via somatostatin. *J Physiol* 596(2): 197–215
172. Kawamori D, Kurpad AJ, Hu J et al. (2009) Insulin signaling in alpha cells modulates glucagon secretion in vivo. *Cell Metab* 9(4): 350–361
173. Ishihara H, Maechler P, Gjinovci A et al. (2003) Islet beta-cell secretion determines glucagon release from neighbouring alpha-cells. *Nat Cell Biol* 5(4): 330–335
174. Wendt A, Birnir B, Buschard K et al. (2004) Glucose inhibition of glucagon secretion from rat alpha-cells is mediated by GABA released from neighboring beta-cells. *Diabetes* 53(4): 1038–1045
175. Vergari E, Knudsen JG, Ramracheya R et al. (2019) Insulin inhibits glucagon release by SGLT2-induced stimulation of somatostatin secretion. *Nat Commun* 10(1): 139
176. Braun M, Ramracheya R, Bengtsson M et al. (2010) Gamma-aminobutyric acid (GABA) is an autocrine excitatory transmitter in human pancreatic beta-cells. *Diabetes* 59(7): 1694–1701
177. Jain R, Lammert E (2009) Cell-cell interactions in the endocrine pancreas. *Diabetes Obes Metab* 11(Suppl 4): 159–167
178. Rorsman P, Ashcroft FM (2018) Pancreatic β -Cell Electrical Activity and Insulin Secretion: Of Mice and Men. *Physiol Rev* 98(1): 117–214
179. Zhang Q, Ramracheya R, Lahmann C et al. (2013) Role of KATP channels in glucose-regulated glucagon secretion and impaired counterregulation in type 2 diabetes. *Cell Metab* 18(6): 871–882
180. Kilimnik G, Zhao B, Jo J et al. (2011) Altered islet composition and disproportionate loss of large islets in patients with type 2 diabetes. *PLoS One* 6(11): e27445
181. Kaku M, Nishiyama T, Yagawa K et al. (1980) Establishment of a carcinoembryonic antigen-producing cell line from human pancreatic carcinoma. *Gann* 71(5): 596–601
182. Kuramoto T, Werrbach-Perez K, Perez-Polo JR et al. (1981) Membrane properties of a human neuroblastoma II: effects of differentiation. *J Neurosci Res* 6(4): 441–449
183. Trifonov S, Yamashita Y, Kase M et al. (2016) Overview and assessment of the histochemical methods and reagents for the detection of β -galactosidase activity in transgenic animals. *Anat Sci Int* 91(1): 56–67
184. Korbie DJ, Mattick JS (2008) Touchdown PCR for increased specificity and sensitivity in PCR amplification. *Nat Protoc* 3(9): 1452–1456
185. 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(4): 402–408
186. Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E et al. (2012) Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods* 9(7): 676–682
187. Petrenko V, Philippe J, Dibner C (2018) Time zones of pancreatic islet metabolism. *Diabetes Obes Metab* 20(Suppl. 2): 116–126
188. 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
189. Marcheiva B, Ramsey KM, Buhr ED et al. (2010) Disruption of the clock components CLOCK and BMAL1 leads to hypoinsulinaemia and diabetes. *Nature* 466(7306): 627–631

190. Sadacca LA, Lamia KA, deLemos AS et al. (2011) An intrinsic circadian clock of the pancreas is required for normal insulin release and glucose homeostasis in mice. *Diabetologia* 54(1): 120–124
191. Pulimeno P, Mannic T, Sage D et al. (2013) Autonomous and self-sustained circadian oscillators displayed in human islet cells. *Diabetologia* 56(3): 497–507
192. Perelis M, Marcheiva B, Ramsey KM et al. (2015) Pancreatic β cell enhancers regulate rhythmic transcription of genes controlling insulin secretion. *Science* 350(6261): aac4250
193. Petrenko V, Dibner C (2017) Circadian orchestration of insulin and glucagon release. *Cell Cycle* 16(12): 1141–1142
194. Petrenko V, Gosmain Y, Dibner C (2017) High-Resolution Recording of the Circadian Oscillator in Primary Mouse α - and β -Cell Culture. *Front Endocrinol (Lausanne)* 8: 68
195. Petrenko V, Dibner C (2018) Cell-specific resetting of mouse islet cellular clocks by glucagon, glucagon-like peptide 1 and somatostatin. *Acta Physiol (Oxf)* 222(4): e13021
196. Gagliardino JJ, Pessacq MT, Hernandez RE et al. (1978) Circadian variations in serum glucagon and hepatic glycogen and cyclic amp concentrations. *J Endocrinol* 78(2): 297–298
197. Yamamoto H, Nagai K, Nakagawa H (1987) Role of SCN in daily rhythms of plasma glucose, FFA, insulin and glucagon. *Chronobiol Int* 4(4): 483–491
198. Picinato MC, Haber EP, Carpinelli AR et al. (2002) Daily rhythm of glucose-induced insulin secretion by isolated islets from intact and pinealectomized rat. *J Pineal Res* 33(3): 172–177
199. Ruiten M, La Fleur SE, van Heijningen C et al. (2003) The daily rhythm in plasma glucagon concentrations in the rat is modulated by the biological clock and by feeding behavior. *Diabetes* 52(7): 1709–1715
200. Ueyama T, Krout KE, Nguyen XV et al. (1999) Suprachiasmatic nucleus: a central autonomic clock. *Nat Neurosci* 2(12): 1051–1053
201. Buijs RM, Chun SJ, Nijima A et al. (2001) Parasympathetic and sympathetic control of the pancreas: a role for the suprachiasmatic nucleus and other hypothalamic centers that are involved in the regulation of food intake. *J Comp Neurol* 431(4): 405–423
202. Kalsbeek A, Buijs RM (2002) Output pathways of the mammalian suprachiasmatic nucleus: coding circadian time by transmitter selection and specific targeting. *Cell Tissue Res* 309(1): 109–118
203. Kalsbeek A, Foppen E, Schallij I et al. (2008) Circadian control of the daily plasma glucose rhythm: an interplay of GABA and glutamate. *PLoS One* 3(9): e3194
204. Buijs FN, León-Mercado L, Guzmán-Ruiz M et al. (2016) The Circadian System: A Regulatory Feedback Network of Periphery and Brain. *Physiology (Bethesda)* 31(3): 170–181
205. Garaulet M, Qian J, Florez JC et al. (2020) Melatonin Effects on Glucose Metabolism: Time To Unlock the Controversy. *Trends Endocrinol Metab* 31(3): 192–204
206. Iguchi H, Hayashi I, Kono A (1990) A somatostatin-secreting cell line established from a human pancreatic islet cell carcinoma (somatostatinoma): release experiment and immunohistochemical study. *Cancer Res* 50(12): 3691–3693
207. Funakoshi A, Tateishi K, Tsuru M et al. (1990) Pancreastatin producing cell line from human pancreatic islet cell tumor. *Biochem Biophys Res Commun* 168(2): 741–746
208. Funakoshi A, Tateishi K, Tsuru M et al. (1992) Pertussis toxin non-sensitive G protein mediates cholinergic stimulation for secretion of pancreastatin and somatostatin from QGP-1N cells. *Regul Pept* 37(1): 1–7
209. Tateishi K, Funakoshi A, Kitayama N et al. (1992) Interaction between phosphoinositide turnover system and cyclic AMP pathway for the secretion of pancreastatin and somatostatin from QGP-1N cells. *Biochem Biophys Res Commun* 185(3): 1041–1047
210. Funakoshi A, Tateishi K, Kitayama N et al. (1993) Parallel secretion of pancreastatin and somatostatin from human pancreastatin producing cell line (QGP-1N). *Pancreas* 8(3): 375–382
211. Squires PE, Amiranoff B, Dunne MJ (1994) Intracellular Ca^{2+} signals in human-derived pancreatic somatostatin-secreting cells (QGP-1N). *Pflugers Arch* 428(3-4): 275–282

212. Göpel SO, Kanno T, Barg S et al. (2000) Patch-clamp characterisation of somatostatin-secreting δ -cells in intact mouse pancreatic islets. *J Physiol* 528(Pt 3): 497–507
213. Braun M, Ramracheya R, Amisten S et al. (2009) Somatostatin release, electrical activity, membrane currents and exocytosis in human pancreatic delta cells. *Diabetologia* 52(8): 1566–1578
214. Denwood G, Tarasov A, Salehi A et al. (2019) Glucose stimulates somatostatin secretion in pancreatic δ -cells by cAMP-dependent intracellular Ca^{2+} release. *J Gen Physiol* 151(9): 1094–1115
215. Berts A, Liu YJ, Gylfe E et al. (1997) Oscillatory Ca^{2+} signaling in somatostatin-producing cells from the human pancreas. *Metabolism* 46(4): 366–369
216. Zhang Q, Bengtsson M, Partridge C et al. (2007) R-type Ca^{2+} -channel-evoked CICR regulates glucose-induced somatostatin secretion. *Nat Cell Biol* 9(4): 453–460
217. Braun M, Ramracheya R, Bengtsson M et al. (2008) Voltage-gated ion channels in human pancreatic beta-cells: electrophysiological characterization and role in insulin secretion. *Diabetes* 57(6): 1618–1628
218. DiGruccio MR, Mawla AM, Donaldson CJ et al. (2016) Comprehensive alpha, beta and delta cell transcriptomes reveal that ghrelin selectively activates delta cells and promotes somatostatin release from pancreatic islets. *Mol Metab* 5(7): 449–458
219. Bähr I, Bazwinsky-Wutschke I, Wolgast S et al. (2012) GLUT4 in the endocrine pancreas--indicating an impact in pancreatic islet cell physiology? *Horm Metab Res* 44(6): 442–450
220. Malakar P, Chartarifsky L, Hija A et al. (2016) Insulin receptor alternative splicing is regulated by insulin signaling and modulates beta cell survival. *Sci Rep* 6: 31222
221. Muller D, Huang GC, Amiel S et al. (2007) Gene expression heterogeneity in human islet endocrine cells in vitro: the insulin signalling cascade. *Diabetologia* 50(6): 1239–1242
222. Murakami K, Taniguchi H, Tamagawa M et al. (1982) Modulation of somatostatin release by endogenous glucagon and insulin: physiological relationship between A, B and D cells in rat pancreatic islets. *Endocrinol Jpn* 29(5): 503–508
223. Zibolka J, Mühlbauer E, Peschke E (2014) The human somatostatinoma cell line QGP-1 as a model for functional, melatonin-responsive islet δ -cells. In: Peschke E (Hrsg.): *Endokrinologie V, Melatonin und Diabetes mellitus. Symposium der Sächsischen Akademie der Wissenschaften zu Leipzig, veranstaltet im Rahmen des Projekts „Zeitstrukturen endokriner Systeme“ am 13. September 2013 in Leipzig. Abh. Sächs. Akad. Wiss., Math.-nat. Kl., Band 66, Heft 1.* S. Hirzel, Stuttgart/Leipzig, S. 73–78
224. Witt-Enderby PA, Bennett J, Jarzynka MJ et al. (2003) Melatonin receptors and their regulation: biochemical and structural mechanisms. *Life Sci* 72(20): 2183–2198
225. Gerdin MJ, Masana MI, Dubocovich ML (2004) Melatonin-mediated regulation of human MT(1) melatonin receptors expressed in mammalian cells. *Biochem Pharmacol* 67(11): 2023–2030
226. Gerdin MJ, Masana MI, Ren D et al. (2003) Short-term exposure to melatonin differentially affects the functional sensitivity and trafficking of the hMT1 and hMT2 melatonin receptors. *J Pharmacol Exp Ther* 304(3): 931–939
227. Tengholm A, Gylfe E (2009) Oscillatory control of insulin secretion. *Mol Cell Endocrinol* 297(1-2): 58–72
228. Renström E, Eliasson L, Rorsman P (1997) Protein kinase A-dependent and -independent stimulation of exocytosis by cAMP in mouse pancreatic B-cells. *J Physiol* 502(Pt 1): 105–118
229. Eliasson L, Ma X, Renström E et al. (2003) SUR1 regulates PKA-independent cAMP-induced granule priming in mouse pancreatic B-cells. *J Gen Physiol* 121(3): 181–197
230. Seino S, Shibasaki T (2005) PKA-dependent and PKA-independent pathways for cAMP-regulated exocytosis. *Physiol Rev* 85(4): 1303–1342
231. Light PE, Manning Fox JE, Riedel MJ et al. (2002) Glucagon-like peptide-1 inhibits pancreatic ATP-sensitive potassium channels via a protein kinase A- and ADP-dependent mechanism. *Mol Endocrinol* 16(9): 2135–2144

232. Kanno T, Suga S, Wu J et al. (1998) Intracellular cAMP potentiates voltage-dependent activation of L-type Ca²⁺ channels in rat islet beta-cells. *Pflugers Arch* 435(4): 578–580
233. Holz GG, Leech CA, Heller RS et al. (1999) cAMP-dependent mobilization of intracellular Ca²⁺ stores by activation of ryanodine receptors in pancreatic beta-cells. A Ca²⁺ signaling system stimulated by the insulinotropic hormone glucagon-like peptide-1-(7-37). *J Biol Chem* 274(20): 14147–14156
234. Liu YJ, Grapengiesser E, Gylfe E et al. (1996) Crosstalk between the cAMP and inositol trisphosphate-signalling pathways in pancreatic beta-cells. *Arch Biochem Biophys* 334(2): 295–302
235. Dyachok O, Gylfe E (2004) Ca²⁺-induced Ca²⁺ release via inositol 1,4,5-trisphosphate receptors is amplified by protein kinase A and triggers exocytosis in pancreatic beta-cells. *J Biol Chem* 279(44): 45455–45461
236. Shibasaki T, Takahashi H, Miki T et al. (2007) Essential role of Epac2/Rap1 signaling in regulation of insulin granule dynamics by cAMP. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104(49): 19333–19338
237. Kang G, Chepurny OG, Holz GG (2001) cAMP-regulated guanine nucleotide exchange factor II (Epac2) mediates Ca²⁺-induced Ca²⁺ release in INS-1 pancreatic beta-cells. *J Physiol* 536(Pt 2): 375–385
238. Holz GG (2004) Epac: A new cAMP-binding protein in support of glucagon-like peptide-1 receptor-mediated signal transduction in the pancreatic beta-cell. *Diabetes* 53(1): 5–13
239. Kaupp UB, Seifert R (2002) Cyclic nucleotide-gated ion channels. *Physiol Rev* 82(3): 769–824
240. Francis SH, Busch JL, Corbin JD et al. (2010) cGMP-dependent protein kinases and cGMP phosphodiesterases in nitric oxide and cGMP action. *Pharmacol Rev* 62(3): 525–563
241. Bender AT, Beavo JA (2006) Cyclic nucleotide phosphodiesterases: molecular regulation to clinical use. *Pharmacol Rev* 58(3): 488–520
242. Lucas KA, Pitari GM, Kazerounian S et al. (2000) Guanylyl cyclases and signaling by cyclic GMP. *Pharmacol Rev* 52(3): 375–414
243. Tengholm A (2019) Cyclic AMP links glucose stimulation to somatostatin secretion in δ -cells. *J Gen Physiol* 151(9): 1062–1065
244. Braun M, Ramracheya R, Johnson PR et al. (2009) Exocytotic properties of human pancreatic beta-cells. *Ann N Y Acad Sci* 1152: 187–193
245. Schwede F, Maronde E, Genieser H et al. (2000) Cyclic nucleotide analogs as biochemical tools and prospective drugs. *Pharmacol Ther* 87(2-3): 199–226
246. Kalbe B, Schlimm M, Mohrhardt J et al. (2016) Helional induces Ca²⁺ decrease and serotonin secretion of QGP-1 cells via a PKG-mediated pathway. *J Mol Endocrinol* 57(3): 201–210
247. Sandoval A, Duran P, Gandini MA et al. (2017) Regulation of L-type Cav1.3 channel activity and insulin secretion by the cGMP-PKG signaling pathway. *Cell Calcium* 66: 1–9
248. Nonno R, Pannacci M, Lucini V et al. (1999) Ligand efficacy and potency at recombinant human MT2 melatonin receptors: evidence for agonist activity of some mt1-antagonists. *Br J Pharmacol* 127(5): 1288–1294
249. Browning C, Beresford I, Fraser N et al. (2000) Pharmacological characterization of human recombinant melatonin mt(1) and MT(2) receptors. *Br J Pharmacol* 129(5): 877–886
250. Cecon E, Oishi A, Jockers R (2018) Melatonin receptors: molecular pharmacology and signalling in the context of system bias. *Br J Pharmacol* 175(16): 3263–3280
251. Dubocovich ML, Masana MI, Iacob S et al. (1997) Melatonin receptor antagonists that differentiate between the human Mel1a and Mel1b recombinant subtypes are used to assess the pharmacological profile of the rabbit retina ML1 presynaptic heteroreceptor. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 355(3): 365–375
252. Dubocovich ML, Yun K, Al-Ghoul WM et al. (1998) Selective MT2 melatonin receptor antagonists block melatonin-mediated phase advances of circadian rhythms. *FASEB J* 12(12): 1211–1220

253. Allaman-Pillet N, Roduit R, Oberson A et al. (2004) Circadian regulation of islet genes involved in insulin production and secretion. *Mol Cell Endocrinol* 226(1-2): 59–66
254. Segerstolpe Å, Palasantza A, Eliasson P et al. (2016) Single-Cell Transcriptome Profiling of Human Pancreatic Islets in Health and Type 2 Diabetes. *Cell Metab* 24(4): 593–607
255. Arrojo e Drigo R, Ali Y, Diez J et al. (2015) New insights into the architecture of the islet of Langerhans: a focused cross-species assessment. *Diabetologia* 58(10): 2218–2228
256. Cirulli V, Baetens D, Rutishauser U et al. (1994) Expression of neural cell adhesion molecule (N-CAM) in rat islets and its role in islet cell type segregation. *J Cell Sci* 107 (Pt 6): 1429–1436
257. Levoye A, Jockers R, Ayoub MA et al. (2006) Are G protein-coupled receptor heterodimers of physiological relevance?--Focus on melatonin receptors. *Chronobiol Int* 23(1-2): 419–426
258. Baba K, Benleulmi-Chaachoua A, Journé A-S et al. (2013) Heteromeric MT1/MT2 melatonin receptors modulate photoreceptor function. *Sci Signal* 6(296): ra89
259. Grill V, Gutniak M, Roovete A et al. (1984) A stimulating effect of glucose on somatostatin release is impaired in noninsulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab* 59(2): 293–297
260. Gutniak M, Grill V, Roovete A et al. (1989) Impaired somatostatin response to orally administered glucose in type II diabetes entails both somatostatin-28 and -14 and is associated with deranged metabolic control. *Acta Endocrinol (Copenh)* 121(3): 322–326
261. Östenson C-G, Efendic S, Grill V (1990) Abnormal regulation by glucose of somatostatin secretion in the perfused pancreas of NIDDM rats. *Pancreas* 5(3): 347–353
262. Abdel-Halim SM, Guenifi A, Efendić S et al. (1993) Both somatostatin and insulin responses to glucose are impaired in the perfused pancreas of the spontaneously noninsulin-dependent diabetic GK (Goto-Kakizaki) rats. *Acta Physiol Scand* 148(2): 219–226
263. Alán L, Olejár T, Cahová M et al. (2015) Delta Cell Hyperplasia in Adult Goto-Kakizaki (GK/MoITac) Diabetic Rats. *J Diabetes Res* 2015: 385395
264. Cuesta S, Kireev R, García C et al. (2013) Melatonin can improve insulin resistance and aging-induced pancreas alterations in senescence-accelerated prone male mice (SAMP8). *Age (Dordr)* 35(3): 659–671
265. Stamenkovic JA, Olsson AH, Nagorny CL et al. (2012) Regulation of core clock genes in human islets. *Metabolism* 61(7): 978–985
266. Unger RH, Orci L (1975) The essential role of glucagon in the pathogenesis of diabetes mellitus. *Lancet* 1(7897): 14–16
267. Iki K, Pour PM (2007) Distribution of pancreatic endocrine cells including IAPP-expressing cells in non-diabetic and type 2 diabetic cases. *J Histochem Cytochem* 55(2): 111–118
268. Makino H, Matsushima Y, Kanatsuka A et al. (1979) Changes in pancreatic somatostatin content in spontaneously diabetic mice, as determined by radioimmunoassay and immunohistochemical methods. *Endocrinology* 104(1): 243–247
269. Leiter EH, Gapp DA, Eppig JJ et al. (1979) Ultrastructural and morphometric studies of delta cells in pancreatic islets from C57BL/Ks diabetes mice. *Diabetologia* 17(5): 297–309
270. Ravassard P, Hazhouz Y, Pechberty S et al. (2011) A genetically engineered human pancreatic β cell line exhibiting glucose-inducible insulin secretion. *J Clin Invest* 121(9): 3589–3597
271. Gurgul-Convey E, Kaminski MT, Lenzen S (2015) Physiological characterization of the human EndoC- β H1 β -cell line. *Biochem Biophys Res Commun* 464(1): 13–19
272. Tsonkova VG, Sand FW, Wolf XA et al. (2018) The EndoC- β H1 cell line is a valid model of human beta cells and applicable for screenings to identify novel drug target candidates. *Mol Metab* 8: 144–157
273. Wang X, Misawa R, Zielinski MC et al. (2013) Regional differences in islet distribution in the human pancreas--preferential beta-cell loss in the head region in patients with type 2 diabetes. *PLoS One* 8(6): e67454
274. Poudel A, Fowler JL, Zielinski MC et al. (2016) Stereological analyses of the whole human pancreas. *Sci Rep* 6: 34049

-
275. Boshart M, Weber F, Jahn G et al. (1985) A very strong enhancer is located upstream of an immediate early gene of human cytomegalovirus. *Cell* 41(2): 521–530
 276. Nelson JA, Reynolds-Kohler C, Smith BA (1987) Negative and positive regulation by a short segment in the 5'-flanking region of the human cytomegalovirus major immediate-early gene. *Mol Cell Biol* 7(11): 4125–4129
 277. Andersson S, Davis DL, Dahlbäck H et al. (1989) Cloning, structure, and expression of the mitochondrial cytochrome P-450 sterol 26-hydroxylase, a bile acid biosynthetic enzyme. *J Biol Chem* 264(14): 8222–8229
 278. Hillen W, Berens C (1994) Mechanisms underlying expression of Tn10 encoded tetracycline resistance. *Annu Rev Microbiol* 48: 345–369
 279. Goodwin EC, Rottman FM (1992) The 3'-flanking sequence of the bovine growth hormone gene contains novel elements required for efficient and accurate polyadenylation. *J Biol Chem* 267(23): 16330–16334
 280. Southern PJ, Berg P (1982) Transformation of mammalian cells to antibiotic resistance with a bacterial gene under control of the SV40 early region promoter. *J Mol Appl Genet* 1(4): 327–341
 281. MacGregor GR, Caskey CT (1989) Construction of plasmids that express *E. coli* beta-galactosidase in mammalian cells. *Nucleic Acids Res* 17(6): 2365
 282. Okayama H, Berg P (1983) A cDNA cloning vector that permits expression of cDNA inserts in mammalian cells. *Mol Cell Biol* 3(2): 280–289
 283. MacGregor GR, Mogg AE, Burke JF et al. (1987) Histochemical staining of clonal mammalian cell lines expressing *E. coli* beta galactosidase indicates heterogeneous expression of the bacterial gene. *Somat Cell Mol Genet* 13(3): 253–265

9 Anhang

9.1 Plasmide

pT-REx-DEST30

Invitrogen GmbH, Darmstadt, Deutschland

pCMV-LacZ

Clontech Laboratories, Inc., Mountain View, CA, USA

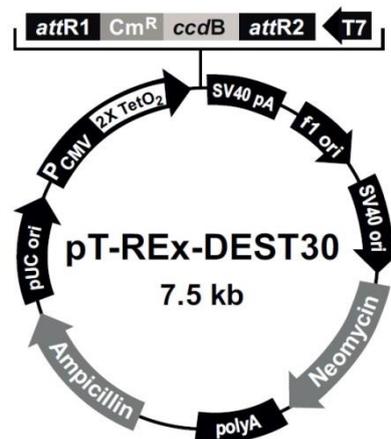


Abb. 21: Schema des Expressionsvektors pT-REx-DEST30.
(Abbildung entnommen aus Invitrogen Instruction Manual pT-REx-DEST Gateway™ Vectors)

Tabelle 10: Beschreibung des Expressionsvektors pT-REx-DEST30

Bezeichnung	Funktion
Humaner Cytomegalievirus (CMV) <i>immediate-early</i> Promotor/Enhancer	Promotor für starke Genexpression in Mammalia-Zellen [275–277]
Tetracyclin-Operator (TetO ₂)-Sequenzen	Bindungsstelle der Tet-Repressor-Homodimere für eine Tetracyclin-regulierte Genexpression [278]
Rekombinationsstellen (attR1 und attR2)	Insertionsstelle des <i>Gene of interest</i> , <i>MTNR1A/MTNR1B</i>
SV40-Polyadenylierungssequenz	Termination der Transkription und Polyadenylierung der mRNA [279]
SV40 <i>early promoter and origin</i>	Promotor für die Verstärkung der Expression des Neomycin-Resistenzgens
Neomycin-Resistenzgen	Selektion stabil transfizierter Zellen [280]
Polyadenylierungssignal	Termination der Transkription und Polyadenylierung der mRNA
Ampicillin-Resistenzgen (β -Lactamase)	Selektion der Transformation in <i>E. coli</i> durch Antibiotika-resistenz
<i>pUC origin</i>	Replikationsursprung, ermöglicht eine hohe Plasmid-kopienzahl in <i>E. coli</i>

SV40: Semian-Virus 40; *E. coli*: *Escherichia coli*; Tabelle in Anlehnung an Invitrogen Instruction Manual pT-REx-DEST Gateway™ Vectors

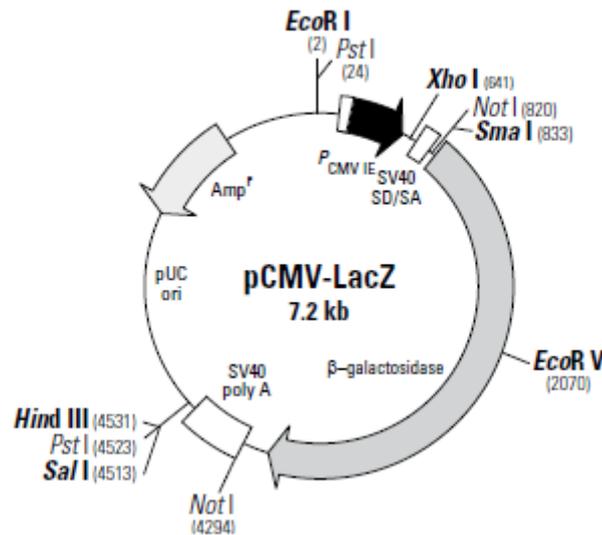


Abb. 22: Schema des Expressionsvektors pCMV-LacZ.
(Abbildung entnommen aus Clontech pCMV-LacZ Vector Information)

Tabelle 11: Beschreibung des Expressionsvektors pCMV-LacZ

Bezeichnung	Funktion
Humaner Cytomegalievirus (CMV) <i>immediate-early</i> Promotor	Promotor für starke Genexpression in Mammalia-Zellen [281]
SV40 <i>splice donor/splice acceptor</i> (SV40 SD/SA)	Intron mit Spleiß-Donor-/Spleiß-Akzeptorstelle für das Spleißen des cDNA-Transkripts [282]
LacZ-Gen	<i>E. coli</i> β -Galactosidase-Gen (Reportergen, z. B. X-Gal-Umsetzung) [283]
SV40-Polyadenylierungssequenz	Termination der Transkription und Polyadenylierung der mRNA [279]
<i>pUC origin</i>	Replikationsursprung, ermöglicht eine hohe Plasmidkopienzahl in <i>E. coli</i>
Ampicillin-Resistenzgen (β -Lactamase)	Selektion der Transformation in <i>E. coli</i> durch Antibiotikaresistenz

SV40: Semian-Virus 40, *E. coli*: *Escherichia coli*; Tabelle in Anlehnung an Clontech pCMV-LacZ Vector Information

9.2 Primer

Die genspezifischen Oligonukleotide (Primer, Tabelle 12) für den Expressionsnachweis und die Quantifizierung von Expressionsunterschieden wurden von der Firma Sigma-Aldrich Chemie GmbH bezogen.

Tabelle 12: Eigenschaften der für die *real-time* RT-PCR verwendeten Primer

Gen		Primersequenz	Größe [bp]	Genbank-Nummer
<i>ABCC8</i>	For. Rev.	5' CTTGCCCTCCTACTGCAAAG 3' 5' TCGATGGCAACCAGATTACA 3'	182	NM_001287174.1
<i>ACTB</i>	For. Rev.	5' ACTCCTACGTGGGCGACGAGG 3' 5' CAGGTCCAGACGCAGGATGGC 3'	389	NM_001101.3
<i>CACNA1A</i>	For. Rev.	5' CTGCTTTGAAGAGGGGACAG 3' 5' GCACTGGAAAACAGTCAGCA 3'	178	NM_000068.3
<i>CACNA1D</i>	For. Rev.	5' ATTGGATCACCCAAGCTGAG 3' 5' CAGCACCCAGAGACTTCCACA 3'	166	NM_000720.3
<i>CACNA1E</i>	For. Rev.	5' ACAAGGACGGGACATCAAG 3' 5' GCGATGACAGCAAAGATGAA 3'	184	NM_001205293.1
<i>CACNA1H</i>	For. Rev.	5' GCCTTCTTTTCATGCTCCTG 3' 5' CTTCATGATCCCCTTCCAGT 3'	188	NM_021098.2
<i>GCG</i>	For. Rev.	5' TGCTGATGGTTCTTTCTCTGATG 3' 5' CCTGTCAGTGATTTTGGTCTGAAT 3'	100	NM_002054.4
<i>GCGR</i>	For. Rev.	5' TGTGCAACAGAACCTTCGAC 3' 5' GCTGTACATCTTGGCCACCT 3'	248	NM_000160.3
<i>INS</i>	For. Rev.	5' AGCCTTTGTGAACCAACACC 3' 5' GCTGGTAGAGGGAGCAGATG 3'	245	NM_000207.2
<i>INSR(-A)</i>	For. Rev.	5' AGCTTTCCCAACACTTCCT 3' 5' ATGTCATCAGCCTTGGCTTC 3'	225	NM_001079817.1
<i>INSR(-B)</i>	For. Rev.	5' CGTCCCCAGAAAACTCTTC 3' 5' ACGGCCACCGTCACATTC 3'	99	NM_000208.2
<i>KCNJ11</i>	For. Rev.	5' ATCATCGTCATCCTGGAAGG 3' 5' GGTGTTGCCAACTTGGAGT 3'	162	NM_000525.3
<i>MTNR1A</i>	For. Rev.	5' GCCACAGTCTCAAGTACGACA 3' 5' CTGGAGAACCAGGATCCATAT 3'	260	NM_005958.3
<i>MTNR1B</i>	For. Rev.	5' TGCCTCATCTGGCTCCTCAC 3' 5' TAGGGAGGAGGAAGTGGATG 3'	154	NM_005959.3
<i>PDE8A</i>	For. Rev.	5' GGCTCACTAGACGTCAAAGC 3' 5' ACTACTTTCCTGGGCAGCAT 3'	150	NM_002605.2
<i>PDE8B</i>	For. Rev.	5' CCAAGAAAACAGCCCAGTC 3' 5' ACAGTCTTCTCAAGCCGTCA 3'	162	NM_003719.3
<i>PDE9A</i>	For. Rev.	5' GACGCGATGTTCCCACTTAC 3' 5' CTGAGGGTGACAGGGTTGAT 3'	178	NM_002606.2
<i>RYR1</i>	For. Rev.	5' CATCAGCACGACATGAGCTT 3' 5' TGTGCTCTCTTTGCCATTG 3'	241	NM_000540.2
<i>RYR2</i>	For. Rev.	5' AAGCCCTCTCGTCTGAAACA 3' 5' CCACCCAGACATTAGCAGGT 3'	193	NM_001035.2
<i>RYR3</i>	For. Rev.	5' ACCCCTTGCTTTGTTGTGAC 3' 5' AGGATCTGCCGAACATCATC 3'	236	NM_001036.3
<i>SLC2A1</i>	For. Rev.	5' CCTGCAGTTTGGCTACAACA 3' 5' TAACGAAAAGGCCACAGAG 3'	194	NM_006516.2
<i>SLC2A2</i>	For. Rev.	5' GGAGTTGGCGCTGTAAACAT 3' 5' AACTCAGCCACCATGAACC 3'	249	NM_000340.1
<i>SLC2A3</i>	For. Rev.	5' TGGGGCTATCTTGGTCTTTG 3' 5' GTAATGAGGAAGCCGGTGAA 3'	222	NM_006931.2
<i>SLC2A4</i>	For. Rev.	5' TGGCGCCTACTCAGGGCTGA 3' 5' GGAGCAGTGGCCACAGGCTG 3'	182	NM_001042.2
<i>SST</i>	For. Rev.	5' AGTTTGACCAGCCACTCTCC 3' 5' ATCATTCTCCGTCTGGTTGG 3'	241	NM_001048.3

9.3 Klinische Parameter der untersuchten Patienten

9.3.1 Humane Langerhanssche Inseln

Tabelle 13 zeigt wichtige klinische Parameter der beiden Organspender für die Untersuchungen mit isolierten primären Inseln.

Tabelle 13: Klinische Parameter der Organspender

Parameter	Nicht-diabetischer Patient	Typ2-diabetischer Patient
Geschlecht	Männlich	Männlich
Alter (Jahre)	47	57
Größe (cm)	177,8	180,34
Gewicht (kg)	104,78	78
BMI (kg/m²)	33,2	23,98
HbA1c (%)	5,2	7,0

9.3.2 Humanes Pankreasgewebe

Tabelle 14 zeigt wichtige klinische Parameter der immunhistochemisch untersuchten Patienten.

Tabelle 14: Klinische Parameter der untersuchten Patienten

Patient	Geschlecht	Alter (Jahre)	Diagnose	T2DM
1	m	74	Chronische Pankreatitis	
2	m	56	Neuroendokriner Pankreastumor	
3	m	58	Pankreaskarzinom	
4	m	56	Gallengangskarzinom	
5	w	41	Neuroendokriner Pankreaskorpustumor	
6	w	66	Gallengangskarzinom	
7	w	77	Adenom der Papilla Vateri	
8	w	48	Pankreaskarzinom	
9	m	67	Gallengangskarzinom	x
10	m	64	Neuroendokriner Pankreastumor	x
11	m	55	Chronische Pankreatitis	x
12	m	53	Pankreatische Pseudozyste	x
13	w	70	Pankreaskarzinom	x
14	w	64	Pankreaskarzinom	x

m: männlich; w: weiblich; T2DM: Diabetes mellitus Typ2

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Juliane Zibolka
 Geburtsdatum/ -ort: geboren am 28.11.1984 in Halberstadt
 Familienstand: ledig, 1 Kind (3 Jahre)

Beruflicher Werdegang

seit 10/2017 wissenschaftliche Mitarbeiterin im Rahmen des DFG-Projektes von Frau PD Dr. I. Bazwinsky-Wutschke und Herrn Prof. Dr. F. Dehghani am Institut für Anatomie und Zellbiologie, Medizinische Fakultät, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
 Thema: „Die Insulinsekretion in der pankreatischen β -Zelle unter dem Einfluss von verschiedenen Cannabinoidrezeptoren und Endocannabinoidmetabolismus“

08/2016 - 09/2017 Mutterschutz und Elternzeit

WS 2014/15 & WS 2015/16 wissenschaftliche Hilfskraft im Kurs „Anatomie und Mikroskopische Anatomie“ für Studierende der Ernährungs- und Naturwissenschaften am Institut für Anatomie und Zellbiologie, Medizinische Fakultät, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

seit 09/2012 Doktorandin am Institut für Anatomie und Zellbiologie, Medizinische Fakultät, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg; Beginn des Promotionsstudiums im Rahmen des Forschungsprojektes „Zeitstrukturen endokriner Systeme“ der Sächsischen Akademie der Wissenschaften zu Leipzig unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. E. Peschke

03/2012 - 08/2012 wissenschaftliche Hilfskraft in der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. E. Peschke am Institut für Anatomie und Zellbiologie, Medizinische Fakultät, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

11/2011 - 04/2012 studentische Hilfskraft in der Nachwuchsgruppe „Prävention“ von Frau PD Dr. S. Weihrauch-Blüher am Integrierten Forschungs- und Behandlungszentrum (IFB) AdipositasErkrankungen, Medizinische Fakultät, Universität Leipzig

Studium

10/2005 - 08/2012 Studium der Ernährungswissenschaften an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
 Abschluss: Diplom-Ernährungswissenschaftlerin
 Diplomarbeit am Institut für Agrar- und Ernährungswissenschaften der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg unter der Betreuung von Frau Prof. Dr. G. I. Stangl
 Thema: „Experimentelle Studien zum Einfluss der maternalen Vitamin D-Versorgung auf den Folatstatus von Muttertier und Nachkommen am Tiermodell Ratte“

Schulbildung

08/1995 - 07/2004 Gymnasium Martineum, Halberstadt
 Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

Halle (Saale), den 14.05.2020

Juliane Zibolka

Publikationsverzeichnis

Zeitschriftenartikel

Zibolka J, Wolf A, Rieger L, Rothgänger C, Jörns A, Lutz B, Zimmer A, Dehghani F, Bazwinsky-Wutschke I (2020) Influence of cannabinoid receptor deficiency on parameters involved in blood glucose regulation in mice. *Int J Mol Sci* 21(9). pii: E3168.
DOI: 10.3390/ijms21093168

Zibolka J*, Bazwinsky-Wutschke I*, Mühlbauer E, Peschke E (2018) Distribution and density of melatonin receptors in human main pancreatic islet cell types. *J Pineal Res* 65(1): e12480.
DOI: 10.1111/jpi.12480 (* geteilte Erstautorschaft)

Zibolka J, Mühlbauer E, Peschke E (2015) Melatonin influences somatostatin secretion from human pancreatic δ -cells via MT1 and MT2 receptors. *J Pineal Res* 58(2): 198–209.
DOI: 10.1111/jpi.12206

Zibolka J, Mühlbauer E, Peschke E (2014) The human somatostatinoma cell line QGP-1 as a model for functional, melatonin-responsive islet δ -cells. In: Peschke E (Hrsg.): *Endokrinologie V, Melatonin und Diabetes mellitus. Symposium der Sächsischen Akademie der Wissenschaften zu Leipzig, veranstaltet im Rahmen des Projekts „Zeitstrukturen endokriner Systeme“ am 13. September 2013 in Leipzig. Abh. Sächs. Akad. Wiss., Math.-nat. Kl., Band 66, Heft 1. S. Hirzel, Stuttgart/Leipzig, S. 73–78.*
ISBN 978-3-7776-2418-1

Brandsch C, **Zibolka J**, Frommhagen M, Lehmann U, Dierkes J, Kühne H, Hirche F, Stangl GI (2014) Vitamin D is not linked to folate status and mRNA expression of intestinal proton-coupled folate transporter. *Eur J Nutr* 53(4): 1115–1122.
DOI: 10.1007/s00394-013-0614-7

Posterbeiträge

Zibolka J, Bazwinsky-Wutschke I, Mühlbauer E, Peschke E (2018) Distribution and density of melatonin receptors in human main pancreatic islet cell types. 113. Jahresversammlung der Anatomischen Gesellschaft, 25. - 28. September 2018 in Rostock.
DOI: 10.337/anatges.2018.0031

Zibolka J, Mühlbauer E, Peschke E (2015) Melatonin influences somatostatin secretion in the human pancreatic δ -cell line QGP-1. *Diabetologie und Stoffwechsel* 2015; 10 – P179. Georg Thieme Verlag KG, Stuttgart. Diabetes Kongress 2015, 50. Jahrestagung der Deutschen Diabetes Gesellschaft, 13. - 16. Mai 2015 in Berlin.
DOI: 10.1055/s-0035-1549685

Zibolka J, Mühlbauer E, Peschke E (2015) Einfluss von Melatonin auf die Somatostatinsekretion am Modell der humanen pankreatischen δ -Zelllinie QGP-1. Satellitensymposium der Fachgruppe „Physiologie und Biochemie der Ernährung“ im Rahmen des 52. Wissenschaftlichen Kongresses der Deutschen Gesellschaft für Ernährung e. V., 11. - 13. März 2015 in Halle (Saale)

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 14.05.2020

Juliane Zibolka

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich all jenen danken, die zum Entstehen und Gelingen dieser Dissertation beigetragen haben.

Dem ehemaligen Institutsleiter, **Herrn Prof. Dr. Dr. Bernd Fischer**, und der neuen Direktorin, **Frau Prof. Dr. Heike Kielstein**, danke ich für die Möglichkeit der Anfertigung meiner Doktorarbeit am Institut für Anatomie und Zellbiologie.

Mein aufrichtiger Dank gilt meinem Doktorvater, **Herrn Prof. Dr. Elmar Peschke**, für die Überlassung des interessanten Themas und die Möglichkeit dieses in seiner Arbeitsgruppe unter hervorragenden Bedingungen eigenverantwortlich bearbeiten zu können. Zudem danke ich ihm für das entgegengebrachte Vertrauen und die sehr gute wissenschaftliche Betreuung, den steten Rückhalt und die persönliche Unterstützung während meiner gesamten Doktorandenzeit sowie für die konstruktiven Anregungen beim Schreiben von Publikationen und dieser Dissertation.

Besonders danken möchte ich auch **Herrn Dr. Eckhard Mühlbauer** für die engagierte Betreuung und die wissenschaftliche Hilfestellung in der Planung, Durchführung und Auswertung der Versuche sowie für die konstruktiven Diskussionen, die mich zu einer selbstständigen sowie kritischen Arbeitsweise angeregt und ebenfalls wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Des Weiteren danke ich ihm für die wertvollen Anmerkungen und Korrekturen beim Verfassen von Veröffentlichungen sowie dieser Dissertationsschrift.

Frau PD Dr. Ivonne Bazwinsky-Wutschke danke ich für ihre fachliche und konstruktive Unterstützung bei den immunhistochemischen Untersuchungen sowie für die wissenschaftliche und kollegiale Zusammenarbeit während meiner Doktorandenzeit und darüber hinaus.

Ein großer Dank gilt der gesamten Arbeitsgruppe Peschke für die herzliche Arbeitsatmosphäre und freundliche Unterstützung. Dabei möchte ich meinen Dank vor allem **Frau Liudmila Litvak** und **Frau Dr. Sabine Wolgast** für die Hilfe in labortechnischen Arbeiten aussprechen. Zudem danke ich **Frau Candy Rothgänger** für die Einarbeitung in viele laborpraktische Arbeitsprozesse.

Ein besonderer Dank geht an die ehemaligen Mitdoktorandinnen, **Frau Dr. Elke Albrecht** und insbesondere **Frau Dr. Kathleen Biemann**, für die freundschaftliche Zusammenarbeit und die Hilfsbereitschaft in allen Fragestellungen.

Von ganzem Herzen bedanke ich mich bei meiner Familie und meinen Freunden, die mich während meiner Promotion mit Verständnis begleitet und unterstützt haben. Insbesondere **meinen Eltern** danke ich für ihren fortwährenden Rückhalt und ihre uneingeschränkte persönliche Unterstützung, die mir die Realisierung dieser Arbeit ermöglicht hat.

Der **Sächsischen Akademie der Wissenschaften zu Leipzig** danke ich für die finanzielle Unterstützung dieser Arbeit.

Halle (Saale), den 14.05.2020

Juliane Zibolka