

**„Untersuchungen zur Bedeutung von Melatoninrezeptoren für
die pankreatische β -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
Diplom-Ernährungswissenschaftlerin Elke Albrecht
geboren am 18.07.1980 in Altenburg

Gutachter:

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

Verteidigung am: 20.08.2013

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	III
1 Einleitung	1
1.1 <i>Biologische Rythmen</i>	1
1.2 <i>Melatonin</i>	2
1.3 <i>Melatoninrezeptoren</i>	3
1.4 <i>Einfluss von Melatonin auf den Glukosestoffwechsel</i>	5
1.5 <i>Melatoninrezeptoren im Pankreas</i>	6
1.6 <i>Zielsetzung</i>	8
2 Material und Methoden	9
2.1 <i>Feinchemikalien und Reagenzien</i>	9
2.2 <i>Zelllinie INS-1 und Zellkultur</i>	11
2.3 <i>Generierung von stabil transfizierten Zelllinien</i>	12
2.3.1 <i>Plasmide</i>	12
2.3.2 <i>Herstellung des Kontrollplasmids</i>	16
2.3.3 <i>Transformation von E. coli-Zellen</i>	19
2.3.4 <i>Transfektion von INS-1-Zellen</i>	20
2.4 <i>Charakterisierung der stabil transfizierten Zelllinien</i>	23
2.4.1 <i>DNA-Extraktion</i>	23
2.4.2 <i>RNA-Extraktion und RNA-Gelelektrophorese</i>	24
2.4.3 <i>Northern Blot-Verfahren</i>	24
2.4.4 <i>cDNA-Synthese für RT-PCR</i>	27
2.4.5 <i>Real-time RT-PCR</i>	28
2.4.6 <i>Immunzytochemie</i>	32
2.5 <i>Inkubationsversuche</i>	33
2.5.1 <i>Batch-Versuche an INS-1-Zellen</i>	33
2.5.2 <i>Festphasen-Radioimmunoassay</i>	33
2.5.3 <i>Proteinextraktion und Protein-Konzentrationsbestimmung</i>	34
2.5.4 <i>Bestimmungen von cAMP- und cGMP-Konzentrationen</i>	34
2.5.5 <i>Calcium Imaging</i>	36
2.6 <i>Batch-Versuche an Inseln von Melatoninrezeptor-knockout-Mäusen</i>	36
2.6.1 <i>Tiere</i>	36
2.6.2 <i>Gewinnung der Langerhansschen Inseln aus Pankreata der Melatoninrezeptor-knockout-Mäuse</i>	36
2.6.3 <i>Batch-Versuche an Inseln</i>	37

<i>2.7 Statistische Auswertungen</i>	37
3 Ergebnisse	38
<i>3.1 Funktion des humanen MT₂-Rezeptors in der β-Zelle</i>	38
3.1.1 Expression des humanen MT ₂ -Rezeptors in INS-1-Zellen	38
3.1.2 Einfluss des hMT ₂ -Rezeptors auf die Expression der Insulingene und die basale Insulinsekretion	41
3.1.3 Bedeutung des hMT ₂ -Rezeptors für die Insulinsekretion	42
3.1.4 hMT ₂ -Rezeptor assoziierte Signalwege in der β-Zelle	50
<i>3.2 Funktion des MT₁-Rezeptors in der INS-1-Zelle</i>	54
3.2.1 <i>knockdown</i> des MT ₁ -Rezeptors in INS-1-Zellen	54
3.2.2 Einfluss des MT ₁ -Rezeptors auf die Expression der Insulingene und die basale Insulinsekretion	56
3.2.3 Bedeutung des MT ₁ -Rezeptors für die Insulinsekretion	57
3.2.4 MT ₁ -Rezeptor gekoppelte Signalwege in der β-Zelle	59
<i>3.3 Einfluss der Melatoninrezeptoren auf die Insulinsekretion der pankreatischen Insel</i>	62
4 Diskussion	65
<i>4.1 Funktion des humanen MT₂-Rezeptors in der β-Zelle</i>	65
<i>4.2 Funktion des MT₁-Rezeptors in der INS-1-Zelle</i>	72
<i>4.3 Einfluss der Melatoninrezeptoren auf die Insulinsekretion der pankreatischen Insel</i>	77
5 Zusammenfassung	80
6 Summary	82
7 Literaturverzeichnis	84
7.1 <i>Eigene wissenschaftliche Beiträge</i>	94
Lebenslauf	VII
Eidesstattliche Erklärung	IX
Danksagung	X

Abkürzungsverzeichnis

AANAT	Arylkylamin-N-acetyltransferase
α TC1 Klon 9	murine pankreatische α -Zelllinie
attR1 und attR2	<i>attachment site</i> ; Rekombinationsstellen für λ -Phagen
BlaRes	Blasticidin-Resistenzgen
bp	Basenpaare
BSA	bovines Serumalbumin
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
ccdB	Toxin, das die wesentliche Gyrase von <i>E. coli</i> hemmt
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
cGMP	cyclisches Guanosinmonophosphat
CHO-Zellen	Ovarialzelllinie vom chinesischen Hamster <i>Cricetulus griseus</i>
Cm ^R	Chloramphenicolgen
CMV	Humanes Cytomegalievirus
COS-7-Zellen	Nierenfibroblastenzelllinie aus <i>Cercopithecus aethiops</i>
CREB	<i>cAMP response element-binding protein</i>
CREs	<i>cAMP response elements</i>
Ct	<i>cycle threshold</i>
Δ hMT ₂ -INS-1	mit dem Kontrollplasmid ohne humanen MT ₂ -Rezeptor transfizierte INS-1-Zellen
DEPC	Diethyldicarbonat
DIG	Digoxigenin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DPBS	<i>Dulbecco's phosphate buffered saline</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EM-7 Promotor	Synthetischer prokaryotischer Promotor
Epac2	<i>cAMP-regulated guanine nucleotide exchange factor II</i>
f1	filamentöser Bakteriophage
FKS	fetales Kälberserum
G418	Geneticin
G _i -Protein	inhibitorische α -Untereinheit des Guaninnucleotid-bindenden Proteins
GLP-1	<i>Glucagon-like Peptide 1</i>
Gnai1	inhibitorisches Guaninnucleotid-bindendes Protein, alpha-1-Untereinheit
Gnai2	inhibitorisches Guaninnucleotid-bindendes Protein, alpha-2-Untereinheit
Gnai3	inhibitorisches Guaninnucleotid-bindendes Protein, alpha-3-Untereinheit
G _q -Protein	α q-Untereinheit des Guaninnucleotid-bindenden Proteins
HEK-293 Zellen	humane embryonale Nierenzelllinie

HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
hMT ₂	humaner Melatoninrezeptor-Isoform 2
hMT ₂ -INS-1	mit dem humanen MT ₂ -Rezeptor transfizierte INS-1-Zellen
HygRes	Hygromycin-Resistenzgen
IBMX	3-Isobutyl-1-methylxanthin
INS-1	Ratten-Insulinomazelllinie
IP ₃	Inositoltrisphosphat
IVS	<i>intervening sequence</i>
Kontroll-shRNA-INS-1	mit dem Kontroll-shRNA-Plasmid transfizierte INS-1-Zellen
L	Molekulargewichtsstandard
<i>lacZ</i> -Gen	codiert für das Enzym β -Galactosidase
LB-Medium	<i>Lysogeny broth</i> -Medium
M13	filamentöser Bakteriophage
Mel	Melatonin
Mel _{1c}	Melatoninrezeptor-Isoform 1c
MIN6-Zellen	murine Insulinomazelllinie
MOPS	3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure
mRNA	<i>messenger</i> Ribonukleinsäure
MT ₁	Melatoninrezeptor-Isoform 1
MT ₂	Melatoninrezeptor-Isoform 2
MT ₁ KO	MT ₁ -Rezeptor- <i>knockout</i> -Maus
MT ₂ KO	MT ₂ -Rezeptor- <i>knockout</i> -Maus
MT ₁ MT ₂ KO	MT ₁ MT ₂ -Rezeptor-Doppel- <i>knockout</i> -Maus
<i>MTNR1A</i>	Melatoninrezeptor-Isoform 1A von <i>Homo sapiens</i>
<i>Mtnr1a</i>	Melatoninrezeptor-Isoform 1A von <i>Rattus norvegicus</i>
<i>MTNR1B</i>	Melatoninrezeptor-Isoform 1B von <i>Homo sapiens</i>
MTS	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium Salz
NA	Noradrenalin
NADH	Nicotinamidadenindinukleotid, reduzierte Form
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat, reduzierte Form
NeoRes	Neomycin-Resistenzgen
Neuro2A-Zellen	murine Neuroblastomzelllinie
NIH 3T3 Zellen	Maus-Fibroblasten-Zelllinie
ori	<i>origin of replication</i>
P	Promotor
pA	Polyadenylierungssignal
PAZ6 Adipozyten	humane Präadipozytenzelllinie
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCREB	phosphoryliertes <i>cAMP response element-binding protein</i>
PD	Primerdimere

PKA	Proteinkinase A
PLC	Phospholipase C
polyA	Polyadenylierungsregion
4P-PDOT	4-Phenyl-2-propionamidotetralin
PTX	Pertussistoxin
pUC	Plasmid konstruiert von der <i>University of California</i>
<i>rIns1</i>	Insulin 1 der Ratte
<i>rIns2</i>	Insulin 2 der Ratte
rMT ₁	Melatoninrezeptor-Isoform 1 der Ratte
rMT ₂	Melatoninrezeptor-Isoform 2 der Ratte
rMT ₁ - <i>knockdown</i> INS-1	mit dem rMT ₁ -shRNA-Plasmid transfizierte INS-1-Zellen
RPMI 1640	Roswell Park Memorial Institute 1640 Medium
RT-PCR	Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
SCN	<i>Nucleus suprachiasmaticus</i>
SDS	Natriumlaurylsulfat
shRNA	<i>small hairpin</i> Ribonukleinsäure
SNP	<i>single nukleotide polymorphism</i>
SP6	Enterobakteriophage
SSC	Saline-sodium citrate
STE-Puffer	Sodium Chloride-TRIS-EDTA
SV40	Simian-Virus 40
T7	Bakteriophage
TAE-Puffer	TRIS-Acetat-EDTA-Puffer
τ	tau, Periodenlänge
TE-Puffer	TRIS-EDTA-Puffer
Tet	Tetracyclin
Tet-hMT ₂ -INS-1	INS-1-Zellen mit Tetracyclin-regulierbarer hMT ₂ -Rezeptor-Expression
TetO ₂	Tetracyclin-Operator
TetR	Tetracyclin-Repressor
TRIS	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U1	short unique region 1
WT	Wildtyp Maus

1 Einleitung

1.1 Biologische Rhythmen

Zahlreiche Körperfunktionen, wie z.B. Körpertemperatur, Puls und Blutdruck unterliegen einer rhythmischen Regulation. Die Periodenlänge τ dieser biologischen Rhythmen variiert zwischen ultradian ($\tau < 20$ h), circadian (lat. *circa*, ungefähr, lat. *dies*, der Tag; $\tau = 20$ bis 28 h) sowie infradian ($\tau > 28$ h) und ist genetisch determiniert (Korf und Stehle, 2005). Beim Menschen dauert eine Periode etwas weniger als 25 h (Aschoff und Wever, 1976). Dieser endogene Rhythmus wird bei allen Vertebraten im *Nucleus suprachiasmaticus* (SCN), einem hypothalamischen Kerngebiet, durch transkriptional/translationale Rückkopplungsschleifen zwischen Uhrengenen und ihren Produkten generiert (Korf und Stehle, 2005). Durch externe Reize aus der Umwelt (Zeitgeber) wird der endogene, circadiane Rhythmus auf eine 24-Stunden-Periodik synchronisiert, wobei der wichtigste natürliche Zeitgeber das Licht ist (Reuss, 1996). Der Organismus kann aus der Länge der täglichen Lichteinwirkung die Tages- und Jahreszeit ableiten (Reiter, 1993). Diese Lichtinformation wird mittels spezieller Ganglienzellen der Retina (3. Neuron der Sehbahn) aufgenommen und über den *Tractus retinohypothalamicus* zum SCN geleitet (Foster, 2004). Dazu verwenden die Melanopsin-haltigen retinalen Ganglienzellen den Neurotransmitter Glutamat und das Neuropeptid *pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide* als Botenstoffe (Simonneaux und Ribelayga, 2003). Die neuronalen Signale des SCN gelangen dann nach synaptischer Verschaltung im *Nucleus paraventricularis*, *Nucleus intermediolateralis* und *Ganglion cervicale superius* über noradrenerge postganglionäre Nervenfasern aus dem *Ganglion cervicale superius* in Begleitung von Blutgefäßen als *Nervi conarii* zur *Epiphysis cerebri* (Korf und Stehle, 2005). Die Epiphyse übersetzt die nervale, circadiane Information aus dem SCN in ein hormonelles Signal: das Melatonin und ist damit ein „Photoneuroendokriner Vermittler“.

Der SCN wird, wegen der Generierung des endogenen Rhythmus, als zentrale Innere Uhr bezeichnet (Korf und Stehle, 2005). Daneben werden in zahlreichen Geweben, wie z.B. in der Nebennierenrinde, in der *Pars tuberalis* und im endokrinen Pankreas periphere Uhren beschrieben, die vom zentralen Schrittmacher über neuroendokrine und neuronale Mechanismen stimuliert und synchronisiert werden (Peschke und Peschke, 1998; Mühlbauer et al., 2004; Korf und Stehle, 2005). Zusätzlich sollen humorale Faktoren z.B. Glukokortikoide und Retinsäure an der Synchronisierung der peripheren Uhren beteiligt sein (Balsalobre et al., 2000; McNamara et al., 2001).

Abweichungen vom circadianen Rhythmus können zu Stoffwechselstörungen, z.B. erhöhten Glukose- und Insulinspiegeln im Plasma führen (Scheer et al., 2009). Es konnte gezeigt werden, dass langjährige Schichtarbeit die Inzidenz des „Metabolischen Syndroms“ unabhängig von sozioökonomischen oder *Lifestyle* Faktoren erhöht und somit zu einem erhöhten Risiko für koronare Herzkrankheit, Typ2-Diabetes und Schlaganfall führt (Karlsson et al., 2005; De Bacquer et al., 2009). Des Weiteren sind Schlafstörungen mit einem erhöhten Risiko für Übergewicht und Typ2-Diabetes assoziiert (Knutson et al., 2006).

1.2 Melatonin

Bereits 1958 gelang Lerner und Mitarbeitern die Isolierung von Melatonin (Lerner et al., 1958) und ein Jahr später dessen Strukturaufklärung (Lerner et al., 1959). Melatonin wird hauptsächlich in der Epiphyse synthetisiert. In geringen Mengen wird es außerdem von neuroendokrinen Zellen wie z.B. der Retina, der Harderschen Drüse und vom Gastrointestinaltrakt sowie von anderen Zelltypen beispielsweise Immunzellen produziert (Kvetnoy, 1999). Das Indolamin Melatonin entsteht aus der essentiellen Aminosäure Tryptophan. Tryptophan wird von den Pinealozyten durch aktiven Transport aus dem Blut aufgenommen und durch Hydroxylierung und Decarboxylierung zu Serotonin (5-Hydroxytryptamin) umgewandelt. Anschließend wird Serotonin durch N-Acetylierung mittels des Enzyms Arylalkylamin-N-acetyltransferase (AANAT) sowie O-Methylierung durch das Enzym Hydroxyindol-O-methyltransferase zu Melatonin umgebaut (Simonneaux und Ribelayga, 2003). Dabei stellt die AANAT das geschwindigkeitsbestimmende Schlüsselenzym der Melatoninbiosynthese dar (Stehle et al., 2001).

Zu Beginn der Nacht werden große Mengen des Neurotransmitters Noradrenalin (NA) aus sympathischen Nervenendigungen im Pinealorgan freigesetzt (Drijfhout et al., 1996). NA aktiviert β_1 -adrenerge Rezeptoren und die daraus resultierende Erhöhung der intrazellulären cAMP-Konzentration ist bei allen Säugetieren für die Stimulation der Melatoninbiosynthese während der Dunkelheit erforderlich (Stehle et al., 2001). Zusätzlich aktiviert NA auch α_1 -adrenerge Rezeptoren, welche die Phospholipase C (PLC) stimulieren und die intrazelluläre Kalziumkonzentration erhöhen, wodurch die β_1 -adrenerge Signalkaskade verstärkt werden soll (Schomerus et al., 1995; Simonneaux und Ribelayga, 2003).

Bei Rodentia wird die Melatoninbiosynthese vor allem transkriptionell durch Induktion der *Aanat*-Genexpression reguliert. Dabei führt die Aktivierung des NA/cAMP/Proteinkinase A (PKA)-Signalweges zur Phosphorylierung des Transkriptionsfaktor *cAMP response element-binding protein* (CREB) am Serin 133. Phosphoryliertes CREB (PCREB) bildet Homodimere, bindet mit Hilfe des CREB-bindenden Proteins an *cAMP response elements* (CREs) im Promotor des *Aanat*-Gens und aktiviert so dessen Transkription (Roseboom und Klein, 1995; Tamotsu et al., 1995). Dem Anstieg der *Aanat*-mRNA folgt ein Anstieg des AANAT-Proteins und der AANAT-Enzymaktivität (Maronde et al., 1999). Die Hemmung der *Aanat*-Expression erfolgt über Dephosphorylierung von PCREB durch die Protein-Serin/Threonin-Phosphatase, den Entzug des Noradrenalinstimulus und durch den hemmenden Transkriptionsfaktor *inducible cAMP early repressor* (Drijfhout et al., 1996; Maronde et al., 1999; Koch et al., 2003). Zusätzlich werden posttranslationale Steuerungsmechanismen beschrieben. Kurze Lichtreize führen zur Herunterregulation der Melatoninbiosynthese, indem das Absinken von NA und der cAMP-Konzentration zur Ubiquitinierung und damit zu proteasomaler Proteolyse des AANAT-Proteins führt (Gastel et al., 1998).

Bei Ungulata und Primaten zeigen die *Aanat*-mRNA-Level keinen diurnalen Rhythmus (Schomerus et al., 2000; Ackermann et al., 2006). Die AANAT-Aktivität wird vor allem posttranslational reguliert, indem die AANAT über den NA/cAMP/PKA-Signalweg direkt phosphoryliert, durch Komplexierung mit dem 14-3-3 Protein vor proteolytischer Degradation durch das Proteasom geschützt und dadurch aktiviert wird (Schomerus et al., 2000; Ganguly et al., 2005).

Melatonin kann im Pinealozyten nicht gespeichert werden und wird direkt im Anschluss an die Synthese durch passive Diffusion ins Blutgefäßsystem oder den *Liquor cerebrospinalis* abgegeben (Korf und Stehle, 2005). Das Hormon unterliegt einer ausgeprägten circadianen Sekretionsrhythmik mit hohen Sekretionsraten in der Nacht und niedrigen am Tag. Bemerkenswert ist, dass dieser Rhythmus unabhängig vom Aktivitätszustand, sowohl bei tag- als auch bei nachtaktiven Tieren auftritt. Daneben unterliegt die Melatonin synthese einem annualen Rhythmus, wobei im Winter aufgrund der längeren Dunkelperioden die nächtlichen Melatoninsekretionsphasen länger sind, als während langer Photoperioden in den Sommermonaten (Vanecek, 1998).

Die nächtliche Melatoninsekretionsrate verändert sich im Verlauf des Lebens. Während die nächtliche Melatoninkonzentration im Serum des Säuglings sehr niedrig ist (ca. 0,12 nmol/l), erreicht sie der frühen Kindheit zwischen dem 1. und 3. Lebensjahr einen Peak (ca. 1,43 nmol/l), um dann rapide bis zum 20. Lebensjahr abzusinken (ca. 0,27 nmol/l). Ab dem ca. 55. Lebensjahr ist eine weitere moderate Abnahme der nächtlichen Melatoninkonzentration im Serum nachweisbar (ca. 0,13 nmol/l) (Waldhauser et al., 1988). Ebenso wurden bei Patienten mit neurodegenerativen Erkrankungen, wie z.B. Morbus Alzheimer, verminderte Melatoninkonzentrationen beobachtet (Hardeland, 2012). Erstaunlicherweise ist aber auch bei vielen anderen Krankheiten wie z.B. Fibromyalgie, Migräne und Typ2-Diabetes eine reduzierte Melatonin synthese nachweisbar (Peschke et al., 2006; Hardeland, 2012).

Der Abbau von Melatonin erfolgt durch Metabolisierung des Hormons in der Leber zu 6-Hydroxymelatonin, das dann sulfatiert oder glukuronidiert und mit dem Harn ausgeschieden wird (Kopin et al., 1961). Aufgrund des starken hepatischen *first pass effect* beträgt die Halbwertszeit von Melatonin im Plasma nur ca. 10 bis 20 Minuten (Vanecek, 1998).

Das Indolamin Melatonin ist lipophil und kann deshalb durch Zellmembranen und die Blut-Hirn-Schranke diffundieren (Vanecek, 1998). In seiner Funktion als „Zeitgeber“ reguliert Melatonin den circadianen Rhythmus und beeinflusst somit als „Neurotransmitter“ oder Hormon im Blut zahlreiche Organsysteme wie z.B. das endokrine und kardiovaskuläre sowie das Immunsystem (Guerrero und Reiter, 2002; Masana et al., 2002; Peschke et al., 2002; von Gall et al., 2002; Yasuo et al., 2009; Slominski et al., 2012). Viele der Melatoninwirkungen werden über G-Protein-gekoppelte Membranrezeptoren vermittelt. Einige Effekte könnten aber auch Rezeptor-unabhängig vermittelt werden, so dient Melatonin beispielweise aufgrund seiner chemischen Struktur als Scavenger für reaktive Sauerstoffspezies und reaktive Stickstoffspezies (Slominski et al., 2012). Des Weiteren soll Melatonin direkt oder indirekt mit nukleären Retinoid-Orphan-Rezeptoren interagieren (Becker-Andre et al., 1994).

1.3 Melatoninrezeptoren

Im Jahr 1994 konnte erstmals die cDNA eines Melatoninrezeptors aus Melanophoren des Afrikanischen Krallenfroschs isoliert und durch Expression in der Nierenfibroblastenzelllinie COS-7-Zellen untersucht werden (Ebisawa et al., 1994). Es stellte sich jedoch heraus, dass dieser Rezeptor (Mel_{1c}) nur bei Nichtsäugern beispielsweise Vögeln und Amphibien exprimiert wird (Reppert et al., 1995). Bei Säugern konnten die Melatoninrezeptor-Isoformen MT_1 (Mel_{1A}) und MT_2 (Mel_{1B}) nachgewiesen werden. Beide Rezeptoren gehören zur Familie G-Protein-gekoppelter

Membranrezeptoren mit sieben transmembranären Domänen, die über weite Bereiche Homologien ihrer Aminosäuresequenzen aufweisen (Reppert et al., 1994, 1995b). Daneben stellt die Chinonreduktase 2 eine dritte Melatoninbindungsstelle dar (Nosjean et al., 2000). Weiterhin konnte bei Säugetieren ein dem Melatoninrezeptor-verwandter Rezeptor (*G protein-coupled receptor 50*) identifiziert werden, welcher jedoch unfähig ist, Melatonin zu binden und ortholog zum Mel_{1c}-Rezeptor ist (Reppert et al., 1996; Drew et al., 2001; Dufourny et al., 2008).

Durch RT-PCR und *in situ*-Hybridisierung konnte MT₁-Rezeptor-mRNA in der Retina und im Cortex des Gehirns, ferner in Hippocampus, Thalamus, Hypothalamus und *Cerebellum* sowie in der *Pars tuberalis* nachgewiesen werden (Reppert et al., 1994, 1995b; Mazzucchelli et al., 1996; Naji et al., 2004; Sallinen et al., 2005). Der Nachweis von MT₂-Rezeptor-mRNA gelang in der Retina und in geringen Mengen im gesamten Gehirn, jedoch speziell im Hippocampus (Reppert et al., 1995b). Weitere Untersuchungen belegen die Expression beider Rezeptoren auch in nichtneuronalen Geweben, wie z.B. Herz, Lunge, Leber, Dünndarm und Nieren (Drew et al., 1998; Naji et al., 2004; Sallinen et al., 2005).

Durch immunhistochemische Studien und Western Blot gelang die Darstellung des humanen MT₁-Rezeptor-Proteins in SCN, Hippocampus, Epiphyse und Cortex, und des humanen MT₂-Rezeptor-Proteins in Hippocampus, Epiphyse und Cortex (Savaskan et al., 2002, 2005; Brunner et al., 2006; Wu et al., 2007).

Die Expression des MT₁-Rezeptors unterliegt einem circadianen Rhythmus, der durch den Hell-Dunkel-Wechsel und durch Melatonin reguliert wird (Guerrero et al., 2000; Schuster et al., 2001). Außerdem verändert sich die Expression der Melatoninrezeptoren während des Alterns und bei bestimmten Erkrankungen wie z.B. Morbus Alzheimer (Savaskan et al., 2002, 2005; Wu et al., 2007).

Der MT₁-Rezeptor kann sowohl Pertussistoxin (PTX)-sensitive inhibitorische Guaninnucleotid-bindende Proteine (G_i) aktivieren als auch an PTX-insensitive G-Proteine (G_{q/11}) binden (Brydon et al., 1999). Durch die Stimulation PTX-sensitiver G_{iα2}- und G_{iα3}-Proteine hemmt der MT₁-Rezeptor die Aktivität von Adenylatzyklasen und PKA und reduziert die Phosphorylierung von CREB (McNulty et al., 1994; Reppert et al., 1994; Witt-Enderby et al., 1998; Brydon et al., 1999). Die Aktivierung des PTX-insensitiven G_{q/11}-Proteins führt hingegen zur Stimulation der PLC_β und Erhöhung der zytosolischen Kalziumionen-Konzentration (Brydon et al., 1999; Roka et al., 1999). Ebenso kann der MT₁-Rezeptor möglicherweise durch Aktivierung PTX-sensitiver G_{iβγ}-Proteine die Stimulation der PLC und folglich der Arachidonsäure Freisetzung verstärken (Godson und Reppert, 1997). Darüber hinaus werden über den MT₁-Rezeptor c-Jun N-Terminalkinasen, die Mitogen-aktivierten Proteinkinasen 1 und 2 sowie die *extracellular signal-regulated* Kinasen 1 und 2 aktiviert (Witt-Enderby et al., 2000; Chan et al., 2002).

Über den MT₁-Rezeptor können ebenso verschiedene Ionenkanäle beeinflusst werden. Durch Aktivierung PTX-sensitiver G_i-Proteine wird der Kalziumstrom über spannungsabhängige Kalziumkanäle reduziert (Slanar et al., 2000). Die Stimulation PTX-sensitiver G_i-Proteine durch den MT₁-Rezeptor führt des Weiteren zur Senkung der cAMP-abhängigen Phosphorylierung kalziumaktivierter Kaliumkanäle und damit zur Hemmung dieser Kanäle (Geary et al., 1998).

Andererseits kann Melatonin durch die Stimulation PTX-insensitiver $G_{q/11}$ -Proteine die Aktivität dieser kalziumaktivierten Kaliumkanäle vorübergehend erhöhen (Steffens et al., 2003). Über den MT_1 -Rezeptor können außerdem, vermutlich durch die Aktivierung PTX-sensitiver $G_{i\beta\gamma}$ -Proteine, einwärtsgerichtete Kaliumkanäle stimuliert werden (Nelson et al., 1996).

Der MT_2 -Rezeptor kann ebenfalls PTX-sensitive G_i -Proteine aktivieren und dadurch die Forskolin-stimulierte cAMP Bildung hemmen (Reppert et al., 1995b; Browning et al., 2000; MacKenzie et al., 2002). Ferner stimuliert Melatonin über den MT_2 -Rezeptor die Phosphoinositol-Hydrolyse und erhöht die Aktivität der Proteinkinase C (Hunt et al., 2001; MacKenzie et al., 2002). Ebenso werden über den MT_2 -Rezeptor c-Jun N-Terminalkinasen und die *extracellular signal-regulated* Kinasen 1 und 2 phosphoryliert (Chan et al., 2002; Daulat et al., 2007). Des Weiteren inhibiert der MT_2 -Rezeptor die cGMP-Bildung durch Hemmung der löslichen Guanylatzyklase (Vanecek und Vollrath, 1989; Petit et al., 1999). Andererseits belegen Studien eine Erhöhung der intrazellulären cGMP-Konzentration durch Stimulation von Guanylatzyklasen und Inhibierung cGMP-abhängiger Phosphodiesterasen (Faillace et al., 1996; Bubis und Zisapel, 1999).

Die Aktivierung G_i -Protein-gekoppelter Rezeptoren hemmt die Aktivität der Adenylatzyklasen und vermindert dadurch die cAMP-Akkumulation. Paradoxerweise kommt es nach Ende der Langzeitaktivierung eines G_i -Protein-gekoppelten Rezeptors zur Aktivierung der Adenylatzyklasen und zum Anstieg der cAMP-Spiegel (Watts und Neve, 2005). Dieses Phänomen wird als heterologe Sensitivierung (= Supersensitivierung) bezeichnet. Watts und Neve beschreiben die Supersensitivierung G_i -Protein-gekoppelter Rezeptoren als einen Mechanismus, mit dem die Zellen versuchen, die chronische Inhibierung, die über die G_i -Proteine vermittelt wird, zu kompensieren. Die Autoren vermuten, dass die Sensitivierung durch Aktivierung G_s -Protein-gekoppelter Rezeptoren vermittelt wird. Die Stimulation dieser Signalwege soll dann, durch erhöhte Expression der sensitivierten Adenylatzyklasen und isoformspezifischer Phosphorylierung von Adenylatzyklasen, zum Anstieg von cAMP führen (Watts und Neve, 2005). Von Gall und Mitarbeiter (2002) konnten zeigen, dass die nächtliche Aktivierung des MT_1 -Rezeptors im *Pars tuberalis* zur Sensitivierung des Adenosin- A_{2B} -Rezeptors, eines G_s -Protein-gekoppelten Rezeptors, führt.

1.4 Einfluss von Melatonin auf den Glukosestoffwechsel

Boden und Mitarbeitern (1996) gelang durch Messung der Plasmainsulinspiegel im Tagesgang der Nachweis einer diurnalen Rhythmik der Insulinsekretion beim Menschen; dabei wurden erhöhte Insulinsekretionsraten am Tag und erniedrigte in der Nacht festgestellt. Ebenso konnte die circadiane Rhythmik der Insulinsekretion an perfundierten Ratten-Inseln nachgewiesen werden (Peschke und Peschke, 1998; Picinato et al., 2002).

Erste Untersuchungen zum Einfluss von Melatonin auf den Glukosestoffwechsel wurden von Parhon (1939) durchgeführt. Er beschrieb eine Insulin-ähnliche, hypoglykämisierende und anabole Wirkung des pinealen Hormons. Die hypoglykämisierende Wirkung von Melatonin konnte durch eine Studie von Shima und Mitarbeitern (1997) bestätigt werden. Übereinstimmend konnte außerdem gezeigt werden, dass Pinealektomie zu erniedrigten Insulinspiegeln und erhöhten Glukosespiegeln im Plasma der Versuchstiere führte (de Lima et al., 2001).

Andere Untersuchungen kamen jedoch zum Ergebnis, dass Melatoninbehandlung die Glukosespiegel im Plasma erhöht oder auch keinen Einfluss auf die Glukosekonzentration im Plasma hat (John et al., 1990; Nijima et al., 1998). Eine weitere Studie zeigte, dass weder die Behandlung mit den Melatoninagonisten S-20304, noch Pinealektomie, die basalen Glukose- und Insulinspiegel im Plasma beeinflusst (Bizot-Espiard et al., 1998). Ebenso wenig konnte durch physiologische Konzentrationen von Melatonin die basale oder Glukose-stimulierte Insulinsekretion von isolierten Mäuse-Inseln *in vitro* beeinflusst werden (Frankel und Strandberg, 1991).

Dennoch belegt die Mehrzahl der Studien einen Einfluss von Melatonin auf die pankreatische Insel. Bailey und Mitarbeiter (1974) konnten den Nachweis erbringen, dass Melatonin die stimulierte Insulinsekretion bei Ratten und Mäusen reduziert. Ebenso wurde durch Superfusionsexperimente sowohl an pankreatischen Inseln der Ratte als auch an Ratten-Insulinomazellen INS-1 nachgewiesen, dass Melatonin die Glukose-, KCl- und Forskolin-stimulierte Insulinsekretion senkt (Peschke et al., 1997, 2000, 2002, 2006b; Picinato et al., 2002b). Des Weiteren senkte die orale Melatoningabe die Plasmainsulinspiegel und erhöhte die Plasmaglucagonspiegel von normoglykämischen Wistarratten (Peschke et al., 2010; Bähr et al., 2011). Die Untersuchung der murinen pankreatischen α -Zelllinie α TC1 Klon 9 zeigte zudem, dass Melatonininkubation die Expression und Sekretion von Glucagon erhöht (Bähr et al., 2011). Ebenso stimulierte Melatonin-Applikation die Glucagonsekretion von perifundierten humanen Inseln (Ramracheya et al., 2008). In der letztgenannten Studie wurde ebenfalls nachgewiesen, dass Melatonin die Glukose-stimulierte Insulinsekretion der murinen Insulinomazellen MIN6 senkt. Die Autoren diskutierten eine Spezies-spezifische Wirkung von Melatonin -sekretionshemmend in β -Zellen von Nagern und stimulierend in humanen Inseln.

1.5 Melatoninrezeptoren im Pankreas

Mehrere Genom-weite Assoziationsstudien zeigten, dass sowohl ein spezifischer *single nucleotide polymorphism* (SNP, rs10830963) im Intron des humanen MT_2 -Rezeptorgens (*MTNR1B*), als auch weitere SNPs (rs1387153, rs2166706, rs10830962, rs4753426) im 5' Promotorbereich des *MTNR1B* Gens mit erhöhten Nüchternglukosespiegeln im Plasma, pathologisch veränderter *first phase* Insulinsekretion im oralen und intravenösen Glukosetoleranztest, sowie erhöhtem Typ2-Diabetesrisiko assoziiert sind (Staiger et al., 2008; Bouatia-Naji et al., 2009; Chambers et al., 2009; Lyssenko et al., 2009; Prokopenko et al., 2009; Ronn et al., 2009; Bonnefond et al., 2012). Im Gegensatz dazu belegt nur eine Studie den Zusammenhang eines SNPs (rs2119882) im Promotorbereich des humanen MT_1 -Rezeptors (*MTNR1a*) mit erhöhten Nüchternglukosespiegeln im Plasma, erhöhten Blutzuckerspiegeln bei oralen Glukosetoleranztests und Insulinresistenz (Li et al., 2011). Eine Insulin-Melatonin-Interaktion konnte auch durch die Untersuchung von Typ2-diabetischen Goto-Kakizaki (GK)-Ratten und Typ2-diabetischen Patienten belegt werden. Diese zeigten bei erhöhtem Plasmainsulin erniedrigte Plasmamelatoninkonzentrationen sowie eine erhöhte Expression beider Melatoninrezeptoren im Pankreas (Peschke et al., 2006, 2007; Mäntele et al., 2012). Hingegen konnten bei Typ1-diabetischen Tiermodellen mit erniedrigtem bzw. fehlendem Plasmainsulin, erhöhte Plasmamelatoninwerte festgestellt werden (Peschke et al., 2008, 2011).

Erste Studien zeigten, dass der MT_1 -Rezeptor in der Ratten-Insulinomazelllinie INS-1 exprimiert und funktionell aktiv ist (Kemp et al., 2002; Peschke et al., 2002). Später konnte die Expression beider

Melatoninrezeptoren in INS-1-Zellen und MIN6-Zellen, einer murinen Insulinomazelllinie, nachgewiesen werden (Mühlbauer und Peschke, 2007; Ramracheya et al., 2008). Weitere Untersuchungen belegen die Expression beider Melatoninrezeptor-Isoformen in pankreatischen Inseln des Menschen und von Nagern (Mühlbauer und Peschke, 2007; Peschke et al., 2007; Lyssenko et al., 2009). In pankreatischen Inseln der Ratte war die MT₂-Rezeptor-mRNA-Konzentration viel niedriger (86-fach) als die MT₁-Rezeptor Transkriptkonzentration (Mühlbauer und Peschke, 2007). Auch in humanen Inseln zeigten Expressionsanalysen und die subjektive Auswertung von Immunreaktionen, dass die MT₁-Rezeptor-Expression im Vergleich zur MT₂-Rezeptor-Expression erhöht ist (Peschke et al., 2007; Ramracheya et al., 2008). In einer anderen Studien hingegen wiesen beide Melatoninrezeptoren in humanen Inseln annähernd gleiche Expressionslevel auf (Lyssenko et al., 2009). Weitere RT-PCR Analysen belegen, dass vor allem der MT₂-Rezeptor in humanen pankreatischen Inseln and β -Zellen exprimiert ist (Bouatia-Naji et al., 2009). Ebenso ergab eine immunhistochemische Untersuchung, dass der MT₂-Rezeptor sowohl in humanen als auch in Inseln von Nagern vor allem in β -Zellen lokalisiert ist, der MT₁-Rezeptor hingegen nur in geringer Menge in peripher lokalisierten β -Zellen nachweisbar ist (Lyssenko et al., 2009). Eine PCR-Analyse auf Einzelzellebene ergab: der MT₁-Rezeptor ist in humanen α -Zellen, aber nicht in β -Zellen exprimiert (Ramracheya et al., 2008). Übereinstimmend dazu zeigte eine andere immunhistochemische Studie, dass der MT₁-Rezeptor in α -Zellen, der MT₂-Rezeptor hingegen in β -Zellen nachweisbar ist (Nagorny et al., 2011). Andererseits konnten in der α -Zelllinie α TC1, Klon 9, beide Melatoninrezeptor-Isoformen nachgewiesen werden (Bähr et al., 2011).

Frühere *in vitro*-Untersuchungen konnten zeigen, dass in die Vermittlung der Melatoninwirkung auf die β -Zelle verschiedene Signalwege involviert sind. Studien der Arbeitsgruppe Peschke belegen, dass Melatonin durch Hemmung der cAMP-Kaskade die Forskolin-stimulierte Insulinsekretion von INS-1-Zellen reduziert (Peschke et al., 2002, 2006b). Außerdem senkte Melatonin die cAMP-Konzentration und die Insulinsekretion von MIN6-Zellen, während es die cAMP-Konzentration von humanen Inseln nicht beeinflusste (Ramracheya et al., 2008). In einer weiteren Studie verminderte Melatoninbehandlung die durch Forskolin oder *Glucagon-like Peptide 1* (GLP-1) stimulierte Insulinsekretion, die Insulinpromotoraktivität und die CRE-medierte Genexpression sowie die cAMP-Konzentration von INS-1-Zellen (Kemp et al., 2002). Durch Einsatz des unspezifischen Melatoninrezeptor-Antagonisten Luzindol konnte die Melatoninwirkung blockiert werden. Daher wurde angenommen, dass Melatonin die Forskolin-stimulierte Insulinsekretion über den G_i-Proteingekoppelten MT₁-Rezeptor und Inhibierung des cAMP-Systems senkt (Peschke et al., 2000, 2002, 2006b).

Weitere Arbeiten der Halleschen Gruppe zeigten durch Einsatz des Melatoninrezeptor-Antagonisten Luzindol und des selektiveren MT₂-Rezeptor-Antagonisten 4-Phenyl-2-propionamidotetralin (4P-PDOT), dass der insulinhemmende Effekt von Melatonin auf die Forskolin-stimulierte Insulinsekretion in INS-1-Zellen vermutlich ebenso über den MT₂-Rezeptor vermittelt wird (Stumpf et al., 2008). Die Ergebnisse der *Batch*-Inkubationsversuche von Stumpf und Mitarbeitern (2008) zeigten zudem, dass Melatonin die durch den unspezifischen Phosphodiesterase-Hemmer 3-Isobutyl-1-methylxanthin (IBMX)-stimulierte cGMP-Konzentration von INS-1-Zellen in Abhängigkeit von Dosis und Inkubationsdauer hemmt. Durch Vorinkubation sowohl mit Luzindol als auch mit 4P-PDOT konnte der

cGMP-senkende Melatonineffekt aufgehoben werden, woraus die Auffassung resultierte, dass dieser Effekt vor allem über den MT₂-Rezeptor vermittelt wird. Außerdem deuteten die Ergebnisse weiterer Untersuchungen darauf hin, dass Melatonin die cGMP-inhibierende Wirkung durch Hemmung der löslichen Guanylatzyklase vermittelt (Stumpf et al., 2009). Ebenso konnte in der letztgenannten Studie durch Expressionsanalysen an INS-1-Zellen gezeigt werden, dass Melatonin die Expression der löslichen Guanylatzyklase reduziert.

Weitere in *Batch*-Kultur durchgeführte Experimente zeigten eine unmittelbare, dosisabhängige Stimulation der IP₃-Bildung in INS-1-Zellen durch Melatonin (Bach et al., 2005). Da dieser IP₃-steigernde Einfluss von Melatonin durch Einsatz des kompetitiven Melatoninrezeptor-Antagonisten Luzindol aufgehoben wurde, folgte man eine Beteiligung des MT₁-Rezeptors. Die Stimulation der IP₃-Signalkaskade führt zur Stimulation zellulärer IP₃-Rezeptoren. In der letztgenannten Studie konnten alle 3 Isoformen des IP₃-Rezeptors in der INS-1-Zelle nachgewiesen werden. Das gebildete IP₃ bindet vermutlich an diese IP₃-Rezeptoren am Endoplasmatischen Retikulum, was zur Freisetzung von Kalzium und somit zu einem vorübergehenden Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration und konsekutiv der Insulinsekretion führt (Bach et al., 2005). Der Einfluss von Melatonin auf das G_q/PLC/IP₃-System der β -Zelle konnte jedoch erst nach Blockierung der inhibitorischen G-Proteine mittels PTX erfasst werden (Peschke et al., 2006b).

1.6 Zielsetzung

Folgende Fragestellungen sollen in der vorliegenden Arbeit „Untersuchungen zur Bedeutung von Melatoninrezeptoren für die pankreatische β -Zelle“ bearbeitet werden:

Welche Bedeutung hat die Funktion des humanen MT₂-Rezeptors für die β -Zelle?

Wie und über welche Signalkaskaden kann der humane MT₂-Rezeptor die Insulinsekretion der β -Zelle beeinflussen?

Beeinflussen beide Melatoninrezeptoren die β -Zelle in gleicher Weise oder erfolgt die Modulierung der Insulinsekretion hauptsächlich über eine Melatoninrezeptor-Isoform?

Wie wirkt sich ein *knockdown* des MT₁-Rezeptors auf die β -Zelle aus?

Gibt es Unterschiede in der Wirkung akuter vs. chronischer Melatonininkubation?

Sind die an den β -Zellmodellen gewonnenen Erkenntnisse zur Rezeptor-medierten Melatoninwirkung auf die pankreatische Insel übertragbar?

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit sollen zum besseren Verständnis der Wirkungsweise der Melatoninrezeptor-Isoformen in der β -Zelle und der pankreatischen Insel beitragen, und damit Erklärungsansätze bieten, warum eine gestörte Rezeptorfunktion zur Diabetesentstehung beitragen könnte.

2 Material und Methoden

2.1 Feinchemikalien und Reagenzien

Agarose	Promega GmbH, Mannheim, Deutschland
Ampicillin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Anti-Digoxigenin-AP	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland
Bacto™-Agarose	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland
Bacto™-Trypton	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland
Bacto™-Yeast Extract	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland
Blasticidin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Blocking-Reagenz	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland
Bovines Serumalbumin (BSA)	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
Bovines Serumalbumin (BSA) ^{CELLPURE®}	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe, Deutschland
Bromphenolblau	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland
Chloroform	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Dextransulfat Natriumsalz	Promega GmbH, Mannheim, Deutschland
Diethyldicarbonat (DEPC)	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe, Deutschland
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Dinatriumhydrogenphosphat	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe, Deutschland
<i>Dulbecco's phosphate buffered saline</i> (DPBS)	Lonza Cologne GmbH, Köln, Deutschland
Essigsäure	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe, Deutschland
Ethanol	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe, Deutschland
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe, Deutschland
fetales Kälberserum (FKS)	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Ficoll (Typ400)	Promega GmbH, Mannheim, Deutschland
Formaldehyd	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe, Deutschland
Formamid	Promega GmbH, Mannheim, Deutschland
Geneticin (G 418)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Gentamycin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Glucagon synthetic	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
<i>Glucagon-Like Peptide 1</i>	
<i>Amide Fragment 7-36 human</i> (GLP-1)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Glukose	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Glyzerin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Hanks' Salzlösung	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (HEPES)	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe, Deutschland
HEPES-Puffer	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Herring SpermDNA	Promega GmbH, Mannheim, Deutschland

Hygromycin	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe, Deutschland
Isoamylalkohol	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe, Deutschland
3-Isobutyl-1-methylxanthin (IBMX)	Calbiochem, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Isopropanol	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe, Deutschland
Kaliumchlorid	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Kaliumdihydrogenphosphat	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe, Deutschland
Kalziumchlorid	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Kollagenase (NB 8)	Serva, Heidelberg, Deutschland
L-Glutamin	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Magnesiumchlorid	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Maleinsäure	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Medium 199	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Melatonin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
β -Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure (MOPS)	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe, Deutschland
Natriumacetat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Natriumchlorid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Natriumcitrat	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Natriumdihydrogenphosphat	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Natriumhydrogencarbonat	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe, Deutschland
Natriumhydroxid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Natriumlaurylsulfat (SDS)	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe, Deutschland
Natriumphosphat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Natriumpyruvat	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Nuklease-freies Wasser	Promega GmbH, Mannheim, Deutschland
Paraformaldehyd	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe, Deutschland
Penicillin	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Pertussistoxin (PTX)	Calbiochem, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
4-Phenyl-2-propionamidotetralin (4P-PDOT)	Tocris Bioscience, Ellisville, MI, USA
Poly-L-Lysin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Polyvinylpyrrolidon	Promega GmbH, Mannheim, Deutschland
Roti [®] -Phenol	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe, Deutschland
Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 Medium	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Salzsäure	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Schwefelsäure	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe, Deutschland
Streptomycin	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Tetracycline	Sigma Aldrich Chemie, Taufkirchen, Deutschland
TRIS	Sigma Aldrich Chemie, Taufkirchen, Deutschland
Trypanblau	Sigma Aldrich Chemie, Taufkirchen, Deutschland

Trypsin

Biochrom AG, Berlin, Deutschland

Tween 20

Sigma Aldrich Chemie, Taufkirchen, Deutschland

Die Stammlösungen von IBMX (50 mM) und Melatonin (50 mM) wurden mit absolutem Ethanol hergestellt. Die Lösung von 4P-PDOT (5 mM) erfolgte in DMSO. Um die gewünschten Endkonzentrationen zu erreichen, wurden die Stammlösungen mit destilliertem Wasser verdünnt. Die verdünnten Stammlösungen (500 μ M bis 50 nM) wurden bis zum Zeitpunkt des Versuchs lichtgeschützt bei -20°C gelagert. Die Herstellung der Stammlösungen von GLP-1 (50 μ M) und Glucagon (5 μ M) erfolgte mit destilliertem Wasser.

Die verwendeten Selektionsantibiotika wurden in DPBS gelöst, anschließend sterilfiltriert, aliquotiert und bis zum Verbrauch ebenfalls bei -20°C gelagert.

2.2 Zelllinie INS-1 und Zellkultur

Die Insulin-produzierende Ratten-Insulinoma-Zelllinie INS-1 wurde dankenswerter Weise von Prof. Dr. Wollheim von der Universität Genf zur Verfügung gestellt. Diese β -Zelllinie wurde aus einem durch Röntgenstrahlen induzierten Ratteninsulinom entwickelt. Die Zellen wachsen adhären als *Monolayer*-Kultur mit einer Verdopplungszeit von 100 h. Zur Erhaltung des Differenzierungsgrades ist der Zusatz von β -Mercaptoethanol nötig. Dadurch bleiben die strukturellen und funktionellen Eigenschaften der INS-1-Zellen etwa bis zur 80. Passage unverändert (Asfari et al., 1992).

Die Kultivierung der INS-1-Zellen erfolgte im Brutschrank (HERAcell 150; Heraeus Holding GmbH, Hanau, Deutschland) bei 37°C, 95% Luftfeuchtigkeit und 5% CO₂ im Kulturmedium RPMI 1640. Dem Medium wurden 10% FKS, 1 mM HEPES-Puffer, 2 mM L-Glutamin, 1 mM Natriumpyruvat, 50 μ M β -Mercaptoethanol und 1% Penicillin/Streptomycin zugesetzt. Alle drei Tage fand ein Mediumwechsel statt. Einmal wöchentlich erfolgte eine 1:4 Passage, indem die Zellen mit Trypsin abgelöst und 10 min bei 1500 \times g und Raumtemperatur zentrifugiert (Biofuge 15; Heraeus Holding GmbH) wurden. Das entstandene Zellpellet wurde in neuem Medium resuspendiert und in vier 25 cm² großen Zellkultur-Flaschen (Dr. Schubert Laborfachhandel, Halle, Deutschland) ausplattiert. Für die Versuche wurden die Zellen in einem Neubauer Hämocytometer (Labor-Brand, Gießen, Deutschland) unter dem Lichtmikroskop (Olympus CK 2; Olypus Optical CO, Tokio, Japan) ausgezählt und in Zellkultur-Testplatten (Dr. Schubert Laborfachhandel) ausplattiert. Im Rahmen dieser Arbeit fanden INS-1-Zellen der 6. bis 70. Passage Verwendung.

2.3 Generierung von stabil transfizierten Zelllinien

2.3.1 Plasmide

Plasmidbezeichnung	Herkunft
pT-REx-DEST30	Invitrogen GmbH, Darmstadt, Deutschland
IMGXo8341Ao947-pT-REx-DEST30	imaGenes GmbH, Berlin, Deutschland
pcDNA6/TR	Invitrogen GmbH, Darmstadt, Deutschland
SureSilencing™ shRNA Vector	SABiosciences Corporation, Frederick, MD, USA
Negative Control shRNA Vector	SABiosciences Corporation, Frederick, MD, USA
pCMV lacZ	Bestand der Institutssammlung
pSV β -Galactosidase Control Vector	Promega GmbH, Mannheim, Deutschland

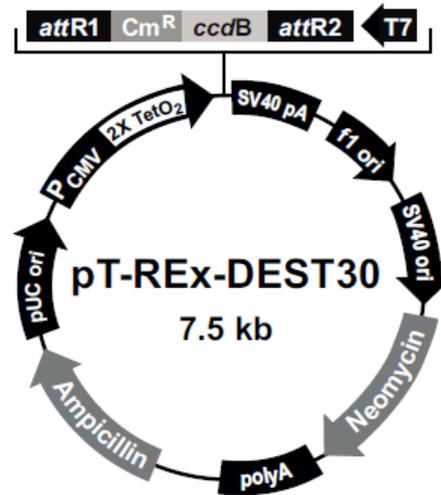


Abb. 1: Schema des Expressionsvektors pT-Rex-DEST30
(Abbildung aus dem Invitrogen Instruction Manual pT-Rex-DEST Gateway™ Vectors übernommen)

Tabelle 1: Beschreibung des Expressionsvektors pT-Rex-DEST30

Bezeichnung	Funktion
Humaner Cytomegalievirus (CMV) <i>immediate-early</i> Promotor / Enhancer	Promotor für starke Genexpression (Boshart et al., 1985; Andersson et al., 1989)
Tetracyclin-Operator (TetO ₂)-Sequenz	2 doppelte Wiederholungen von 19 Nukleotiden, die als Bindungsstelle des Tet-Repressor Homodimers dienen (Hillen und Berens, 1994)
attR1 und attR2 Rekombinationsstelle	Insertionsstelle des „ <i>gene of interest</i> “, hier hMT ₂ -Rezeptor
SV40 Polyadenylierungssignal	Termination der Transkription und Polyadenylierung der mRNA (Goodwin und Rottman, 1992)
SV40 <i>early</i> Promotor und Origin	Verstärkung der Expression des Neomycin-Resistenzgens
Neomycin Resistenzgen	Selektion stabiler Transfektanten in Mammalia-Zellen (Southern und Berg, 1982)
Polyadenylierungsregion	Termination der Transkription und Polyadenylierung der mRNA
Ampicillin Resistenzgen	Selektion der Transformanten in <i>E. coli</i>
pUC Origin of replication	Replikationsursprung aus pMB1, ermöglicht hohe Kopiezahl und Wachstum in <i>E. coli</i>

Tabelle in Anlehnung an Invitrogen Instruction Manual pT-Rex-Dest Gateway™ Vectors

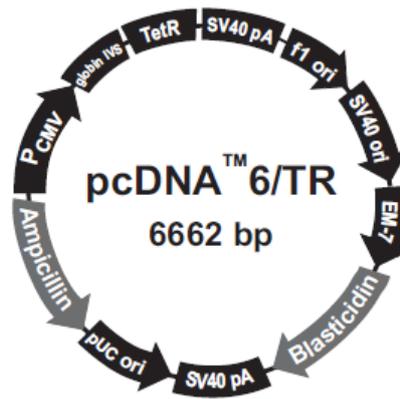


Abb. 2: Schema des Expressionsvektors pcDNA™6/TR
(Abbildung aus dem Invitrogen Instruction Manual pcDNA6/TR übernommen)

Tabelle 2: Beschreibung des Expressionsvektors pcDNA™6/TR

Bezeichnung	Funktion
Humaner Cytomegalievirus (CMV) <i>immediate early</i> Promotor	Promotor für starke Genexpression des TetR Gens (Boshart et al., 1985; Nelson et al., 1987; Andersson et al., 1989)
Rabbit β -Globin Intron II (IVS)	Förderung der Expression des TetR Gens (van Ooyen et al., 1979)
TetR Gen	Codiert für Tet Repressor, der an Tetracyclin-Operator Sequenz bindet um die Expression des „gene of interest“ zu hemmen solange keine Tetracyclin-Induktion erfolgt (Postle et al., 1984; Yao et al., 1998)
SV40 <i>early</i> Promotor und Origin	Verstärkung der Expression des Blasticidin-Resistenzgens in Mammalia-Zellen
EM-7 Promotor	Synthetischer prokaryotischer Promotor für Expression des Blasticidin-Resistenzgens in <i>E. coli</i>
Blasticidin Resistenzgen	Selektion stabiler Transfektanten in Mammalia-Zellen (Kimura et al., 1994) und Transformanten in <i>E. coli</i>
SV40 Polyadenylierungssignal	Termination der Transkription und Polyadenylierung der mRNA
pUC Origin	Replikationsursprung aus pMB1, ermöglicht hohe Kopiezahl und Wachstum in <i>E. coli</i>
Ampicillin Promotor	Expression des Ampicillin-Resistenzgens
Ampicillin Resistenzgen	Selektion der Transformanten in <i>E. coli</i>

Tabelle in Anlehnung an Invitrogen Instruction Manual pcDNA6/TR

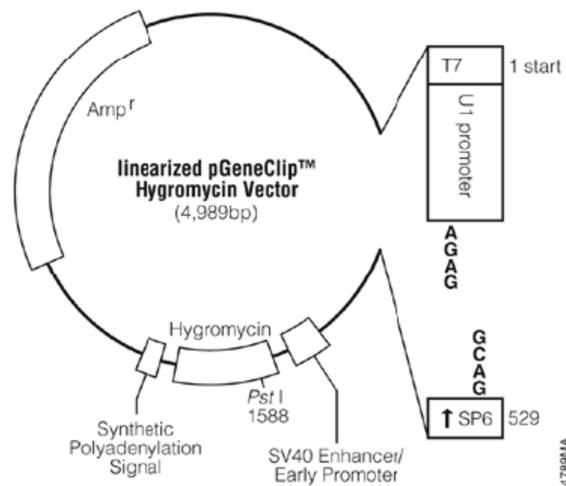


Abb. 3: Schema des shRNA Plasmids pGeneClip™
(Abbildung aus dem Qiagen SureSilencing shRNA Plasmid Handbook übernommen)

Tabelle 3: Beschreibung des Knockdownvektors pGeneClip™

Bezeichnung	Funktion
T7 RNA Polymerase Transkriptionsstartpunkt	Transkriptionsstartpunkt der RNA Polymerase aus T7-Bacteriophage
U1 Promotor	Promotor für Transkription der shRNA
10 bp Abstandshalter	
U1 Terminierungssequenz	Termination der Transkription der shRNA
SP6 RNA Polymerase Promotor	Promotor für starke Genexpression der shRNA
SP6 RNA Polymerase Promotor Bindungsstelle	Bindungsstelle der SP6 RNA Polymerase am Promotor
Bindungsregion für pUC/M13 <i>reverse sequencing primer</i>	
SV40 <i>early</i> Enhancer und Promotor	Verstärkung der Expression von des Hygromycin-Resistenzgens in Mammalia-Zellen
SV40 Minimum Origin of Replikation	Replikationsursprung
Hygromycin Resistenzgen	Selektion stabiler Transfektanten in Mammalia-Zellen
Synthetisches Polyadenylierungssignal	Termination der Transkription und Polyadenylierung der mRNA
Ampicillin Resistenzgen	Selektion der Transformanten in E. coli

Tabelle in Anlehnung an Qiagen SureSilencing shRNA Plasmid Handbook

in der cDNA des hMT₂-Rezeptors hat, aber keine im Vektor selbst, konnte durch den Verdau fast die gesamte cDNA aus dem Plasmid entfernt werden. Die Kontrolle der Restriktion erfolgte durch Agarose-Gelelektrophorese.

Tabelle 4: Einfacher Restriktionsansatz

Reagenz	Volumen [μ l]
Plasmidkonstrukt pT-Rex-Dest30 [0,66 μ g/ μ l]	1,5
10x NEBuffer 4 ¹	2
BSG I ¹ [5 U/ μ l]	1
Nuklease-freies Wasser	15,5
Summe	20

¹New England Biolabs, Ipswich, MA, USA

2.3.2.2 Agarose-Gelelektrophorese

Für die Agarose-Gelelektrophorese wurden 0,6 g Agarose in 40 ml 1x TAE-Puffer (5 mM TRIS, 5 mM Natriumacetat, 0,2 mM EDTA; pH 8,0) durch Erhitzen (Magnetrührer Variomag Monotherm; H+P Labortechnik GMBH, Oberschleiheim, Deutschland) gelöst und das 1,5%ige Gel in die mit Kamm vorbereitete Elektrophoresekammer (Agagel; Biometra GmbH, Göttingen, Deutschland) gegossen. Das erstarrte Gel wurde dann mit 1x TAE-Laufpuffer bedeckt. Die verdünnten DNA-Proben und der Molekulargewichts-Standard (O`Gene Ruler 500 bp; Fermentas GmbH, St.-Leon-Rot, Deutschland) wurden vor dem Auftragen mit 1/3 Volumen *Blue-Juice* (siehe unten) versetzt. Es wurde eine Spannung von 80 Volt angelegt (Spannungsgerät Standard Power Pack P25; Biometra GmbH). Nach vollendeter Auftrennung der Proben wurde das Gel 10 min in einer Ethidiumbromidlösung gefärbt und anschließend gewässert. Die Detektion der DNA-Banden erfolgte mittels einer UV-Fotodokumentationseinrichtung (CN 2000W; LTF Labortechnik, Wasserburg, Deutschland). Mit Hilfe der Software Bio1D (Vilber Lourmat, Frankreich) ließ sich die Größe der DNA-Fragmente ermitteln. Das als Restplasmid identifizierte Fragment wurde mit einem Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten.

Blue juice (Stopp-Puffer für Gelelektrophorese): 1,5 ml 0,25 M EDTA; pH 8,0
2,0 ml Glycerin
0,4 ml 0,5% Bromphenolblau

2.3.2.3 DNA-Extraktion aus dem Agarose-Gel

Die DNA-Extraktion aus dem Agarose-Gel wurde mithilfe eines EASY PURE DNA Purification Kits (Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, Deutschland) durchgeführt. Das Gelstück, welches das Restplasmid enthielt, wurde durch Erhitzen auf 55°C (Thermomixer comfort 5355; Eppendorf-Netheler-Hinz, Hamburg, Deutschland) in 1000 μ l Salzlösung (Bestandteil des Kits) in einem Reaktionsgefäß gelöst. Nach Zugabe von 4 μ l Bindelösung (Bestandteil des Kits) wurde gemischt (Vortexer IKA-VIBRO-FIX VF 2; IKA Labortechnik, Staufen, Deutschland) und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Das durch Zentrifugation und abpipettieren erzeugte Pellet wurde zweimal mit 800 μ l verdünnten Waschpuffer (Bestandteil des Kits) gewaschen, in 20 μ l Nuklease-freiem

Wasser resuspendiert und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Lösung für 1 min bei 16438 x g bei Raumtemperatur zentrifugiert. Der entstehende Überstand enthielt die DNA. Er wurde in ein neues Gefäß übertragen und bei -80°C aufbewahrt.

2.3.2.4 Ligation des Restplasmids

Die Ligation erfolgte mit einer T4 DNA Ligase (Fermentas). Der Ligationansatz (Tabelle 5) wurde für 10 min bei Raumtemperatur und dann für 10 min bei 65°C inkubiert. Anschließend wurde die Ligation durch Auftragen eines Aliquots des Ansatzes auf ein Agarose-Gel überprüft.

Tabelle 5: Einfacher Ligationsansatz

Reagenz	Volumen [μ l]
Restplasmid [25 ng/ μ l]	2
10x Ligationspuffer ¹	5
T4 DNA Ligase ¹ [5 U/ μ l]	1
Nuklease-freies Wasser	42
Summe	50

¹Fermentas GmbH, St.-Leon-Rot, Deutschland

Abbildung 4 stellt die Plasmide nach Restriktion und anschließender Ligation des Restplasmids (1,2) im Vergleich zum Ausgangsplasmid (3) dar. Das kleinste Plasmid (1) wurde weiter untersucht. Durch Restriktion mit Enzymen, welche im Vektor und nicht in der cDNA schneiden, konnte gezeigt werden, dass durch den Restriktionsverdau mit BSG I fast die gesamte cDNA-Sequenz des hMT₂-Rezeptors aus dem Plasmid entfernt wurde. Dieses Plasmid wurde als Kontrollplasmid verwendet.

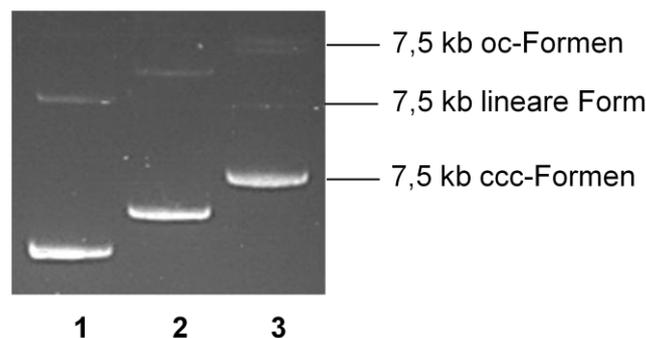


Abb. 4: Kontrollplasmide und Ausgangsplasmid

Plasmide nach Gelelektrophorese und Ethidiumbromidfärbung. Dargestellt sind das Ausgangsplasmid (3) und Plasmide mit Deletionen der hMT₂-Rezeptor-cDNA nach Restriktion mit BSG I und anschließender Ligation des Restplasmids (1, 2). oc: *open circular*, ccc: *closed circular coiled*.

2.3.3 Transformation von E. coli-Zellen

2.3.3.1 Herstellen kompetenter Zellen

Bakterien besitzen, je nach physiologischem Zustand, die Fähigkeit, DNA aufzunehmen. Bei der hier angewandten Methode (Hanahan, 1983) wird die Bakterienzelle durch Zugabe von CaCl_2 in die Lage versetzt, DNA aufzunehmen.

Dazu wurden 50 ml *Lysogeny broth* (LB)-Medium (siehe unten) mit 2 ml einer über Nacht gewachsenen Vorkultur von E. coli DH5 α angeimpft und im Schüttler (KS 15A; Edmund Bühler, Hechingen, Deutschland) bei 37°C unter 200 rpm inkubiert, bis die OD_{600} 0,5 betrug. Anschließend wurde die Zellsuspension für 2 h auf Eis gekühlt und danach für 15 min bei 866 x g und 4°C zentrifugiert. Das entstandene Zellpellet wurde in 25 ml eiskaltem Transformationspuffer (100 mM CaCl_2 , 70 mM MgCl_2 , 40 mM Natriumacetat; pH 5,5) resuspendiert und 45 min auf Eis inkubiert. Nach einer weiteren Zentrifugation für 10 min bei 450 x g und 4°C wurde das Pellet in 5 ml Transformationspuffer mit 15% Glycerin aufgenommen und in Aliquots von 200 μl bei -80°C eingefroren.

LB-Medium: 10 g Bacto™-Trypton
5 g Bacto™-Yeast Extract
10 g NaCl
1 l destilliertes H_2O
pH 7,5
Sterilisation: 20 min bei 121°C

2.3.3.2 Transformation von kompetenten Zellen

Für die Transformation wurden 200 μl der kompetenten Zellen auf Eis aufgetaut und unter Zugabe von 3 μl DMSO mit dem Plasmid (5 bis 500 ng) versetzt. Nach einer 30-minütigen Inkubation auf Eis wurde der Transformationsansatz für 2 min bei 42°C im Wasserbad inkubiert und 1 min auf Eis abgekühlt. Danach wurde der Ansatz mit 2 ml LB-Medium aufgefüllt und 1 h bei 37°C und 200 rpm geschüttelt. 100 μl der Zellsuspension bzw. deren Verdünnungen wurden dann auf LB-Agarplatten (LB-Medium + 15 g/l Bacto™-Agarose + 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Ampicillin) ausplattiert.

2.3.3.3. Nachweis von Plasmid-DNA in dem transformierten E. coli-Zellen mit Gelelektrophorese

Mehrere der transformierten E. coli-Kolonien wurden von der selektiven Ampicillin-Platte abgeimpft und in je 25 μl Cracking-Puffer (50 mM NaOH, 0,5% (w/v) SDS, 5 mM EDTA) gelöst. Es folgte eine Inkubation der Proben für 45 min bei 68°C im Wasserbad. Nach dem Abkühlen wurden die Proben mit je 5 μl *Blue juice* (siehe 2.3.2.2 Agarose-Gelelektrophorese) vermischt, auf ein Agarose-Gel aufgetragen und aufgetrennt. So ließ sich kontrollieren, ob die Transformanten die integrierte Plasmid-DNA enthielten.

2.3.3.4 Plasmidextraktion aus E. coli

Für die Vorkultur wurde eine Kolonie von der selektiven Ampicillin-Platte abgeimpft, in 2 ml LB-Medium (mit 50 µg/ml Ampicillin) resuspendiert und für 8 h im Schüttler bei 37°C und 300 rpm inkubiert. Im Anschluss wurden je 100 µl dieser Vorkultur in 100 ml LB-Medium (mit 50 µg/ml Ampicillin) übertragen und für 14 h im Schüttler bei 37°C und 300 rpm inkubiert. Anschließend wurden die Zellen durch Zentrifugation (6000 × g, 4°C, 15 min) „geerntet“ und bis zur Extraktion bei -20°C gelagert. Die Plasmidextraktion erfolgte mit dem QAIGEN Plasmid Maxi Prep Kit (Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland). Das Zellpellet wurde dann in 10 ml Resuspendierungspuffer (Bestandteil des Kits) gelöst. Nach der Zugabe von 10 ml Lysispuffer (Bestandteil des Kits) wurde das Rohlysat „über Kopf“ geschüttelt und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgte die Zugabe von 10 ml eiskaltem Neutralisationspuffer (Bestandteil des Kits). Das Lysat wurde dann in eine Qiafilter-Patrone gegossen und dort 10 min belassen. Im Anschluss wurde die Kappe von der Qiafilter-Patrone abgezogen und das Lysat durchgepresst. Dann folgte der Zusatz von 2,5 ml ER Puffer (Bestandteil des Kits) zum Lysat und eine Inkubation für 30 min auf Eis. Währenddessen wurde die Säule (Qiagen-Tip 500) mit 10 ml Äquilibriumspuffer (Bestandteil des Kits) benetzt. Nach Ablauf der Inkubation wurde das Lysat auf die vorbereitete Säule aufgetragen. Als das Lysat durchgelaufen war, wurde die Säule zweimal mit 30 ml Waschpuffer (Bestandteil des Kits) gewaschen. Nachdem die DNA mit 15 ml Elutionspuffer (Bestandteil des Kits) von der Säule gelöst wurde, erfolgte eine Fällung mit 10,5 ml Isopropanol und eine Zentrifugation für 30 min bei 15000 × g und 4°C. Nach Abgießen des Überstandes wurde das DNA-Pellet mit 5 ml 70% Ethanol gewaschen. Nach dem Trocknen wurde das DNA-Pellet in 500 µl TE-Puffer (10 mM TRIS, 1 mM EDTA; pH 8,0) gelöst und die Konzentration im Spektrophotometer (SPECORD S100, Analytik Jena, Jena, Deutschland) gemessen.

2.3.4 Transfektion von INS-1-Zellen

Das Transfektionsreagenz Fugene[®] (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland) enthält positiv geladene Lipide; diese sind in der Lage, mit der negativ geladenen DNA Komplexe zu bilden. Diese Komplexe können dann mit der Zellmembran interagieren und sie durchdringen.

Für die Transfektion wurden ca. 1×10^6 Zellen pro *well* in eine 6-*well*-Platte ausgesät. Nach 72-stündiger Inkubation unter Standardbedingungen hatten die Zellen eine 70%ige Konfluenz erreicht und konnten transfiziert werden. Dazu wurden 100 µl Minimalmedium, 3 µl Fugene[®] und 2 µg DNA gemischt und 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die so gebildeten Komplexe wurden tropfenweise auf die Zellen gegeben. Die Zellen wurden dann 72 h inkubiert. Danach erfolgte ein Mediumwechsel, das Medium enthielt ein Selektionsantibiotikum, in der zuvor durch eine „Absterbekurve“ ermittelten Konzentration. Die sich nach Absterben der nicht transfizierten Zellen gebildeten Kolonien wurden gepickt und weiterpassagiert, so dass einzelne Klone entstanden. Nach einigen Passagen wurde der Antibiotikagehalt des Mediums halbiert.

2.3.4.1 Test der Transfektionseffizienz

Um die Transfektionseffizienz zu testen, wurden die Plasmide pCMV lacZ und pSV β -Galactosidase, wie oben beschrieben, in die INS-1-Zellen transfiziert. Beide Plasmide enthalten als Reportergen das lac-Z-Gen, welches für das Enzym β -Galactosidase codiert. Die β -Galactosidase spaltet das farblose Laktoseanalog o-Nitrophenyl- β -D-galactopyranosid in Galaktose und das gelbgefärbte o-Nitrophenol. Der Farbumschlag kann dann photometrisch bestimmt werden und spiegelt die Aktivität der β -Galactosidase und damit die Transfektionseffizienz wieder.

Nach Entfernen des Mediums wurden die Zellen zweimal mit DPBS gewaschen und dann mit 500 μ l Reporter Lysis Puffer (Bestandteil des β -Galaktosidase-Assays) für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Das Zelllysate wurde abgelöst, gemischt und für 2 min bei 21885 \times g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde sodann für den β -Galaktosidase-Assay (Promega GmbH, Mannheim, Deutschland) verwendet. Durch entsprechende Verdünnung der mit dem Kit gelieferten reinen β -Galaktosidase mit Reporter Lysis Puffer wurde eine Standardreihe hergestellt. 50 μ l dieser Verdünnung oder 50 μ l Zellextrakt wurden mit 50 μ l Assay Puffer (Bestandteil des Assays) vermischt und ca. 1 h bei 37°C inkubiert. Nach der Farbentwicklung erfolgte die Zugabe von 150 μ l 1 M Na₂CO₃. Die Messung der Extinktion erfolgte im ELISA-Plattenreader (Spectra II; SLT Labinstrument, Crailsheim, Deutschland) bei 420 nm.

Da der Einsatz von 2 μ g des Plasmids pCMV lacZ das stärkere Signal ergab (Abb. 5A), wurde damit anschließend getestet, welches Verhältnis von DNA und des Transfektionsreagenz Fugene am effektivsten ist. Wie in Abb. 5B dargestellt, war die Transfektionseffizienz bei Einsatz von 3 μ l Fugene und 2 μ g DNA am geeignetsten.

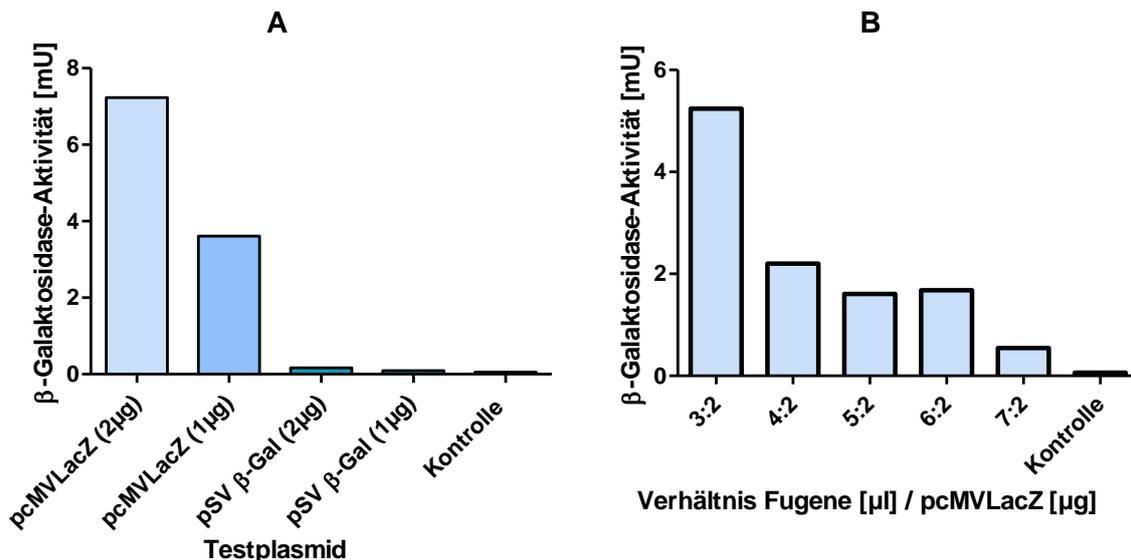


Abb. 5: Test der Transfektionseffizienz mit dem β -Galaktosidase-Assay

(A) Test der Transfektionseffizienz verschiedener Konzentrationen (1 μ g, 2 μ g) der Plasmide pCMV lacZ und pSV β -Galactosidase. (B) Test der Transfektionseffizienz verschiedener Mengen des Transfektionsreagenz Fugene und 2 μ g pCMV lacZ.

2.3.4.2 Antibiotika-Absterbetest

Um die Resistenz der INS-1-Zellen gegen die verwendeten Selektionsantibiotika zu testen, wurden diese auf 24-*well*-Platten ausgesät und mit verschiedenen Antibiotikakonzentrationen für mindestens 72 h inkubiert. Anschließend wurde die Überlebensrate der Zellen mit einem MTS-Test (s.u.) und durch Zellzählung mit Trypanblaufärbung (zur Ermittlung der Lebendzellanzahl, s.u.) überprüft. Die Antibiotikakonzentration, ab der mit beiden Tests keine lebenden Zellen mehr nachweisbar waren, wurde für die Selektion der transfizierten INS-1-Zellen verwendet.

MTS-Test

Mit dem MTS [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium Salz] – Test lässt sich die Anzahl der lebenden Zellen bestimmen. Da die Reduktion des MTS-Salzes zu gelbem Formazan von NADH und NADPH und somit von der Glykolyserate der Zellen abhängig ist, ist dieser Wert ein indirektes Maß für die Anzahl stoffwechselaktiver Zellen (entsprechend Lebendzellanzahl). Der Farbumschlag kann dann photometrisch bestimmt werden.

Nach der Inkubation der Zellen mit Antibiotika für 3 bis 7 d wurden 60 µl MTS (CellTiter96®; Promega GmbH, Mannheim, Deutschland) auf die Zellen gegeben. Nach 4-stündiger Inkubationszeit im Brutschrank unter Standardbedingungen wurden 37,5 µl 20% SDS pro *well* dazugegeben und die Extinktion bei 490 nm bestimmt.

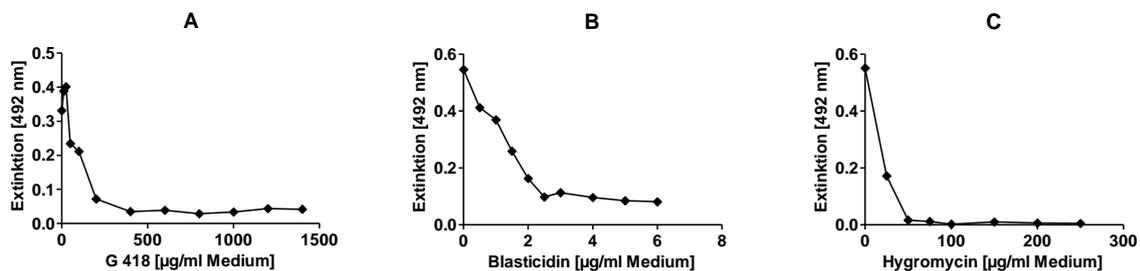


Abb. 6: MTS-Test der INS-1-Zellen nach Antibiotikabehandlung

(A) Extinktion der INS-1-Zellen nach 7 d Inkubation mit verschiedenen G418-Konzentrationen und anschließender Inkubation mit MTS. (B) Extinktion der INS-1-Zellen nach 72 h Inkubation mit verschiedenen Blastidicin-Konzentrationen und anschließender Inkubation mit MTS. (C) Extinktion der INS-1-Zellen nach 6 d Inkubation mit verschiedenen Hygromycin-Konzentrationen und anschließender Inkubation mit MTS.

Zellzählung und Vitalitätstest mit Trypanblau

Der Vitalitätstest mit Trypanblau basiert auf der veränderten Membrandurchlässigkeit abgestorbener Zellen, bei der Farbstoffe aufgenommen werden können, für die die Zellmembran vitaler Zellen normalerweise nicht durchlässig ist.

Nach der Inkubation mit Antibiotika wurden die Zellen einer weiteren Platte mit Trypsin abgelöst und nach Trypanblaufärbung im Neubauer Hämocytometer ausgezählt.

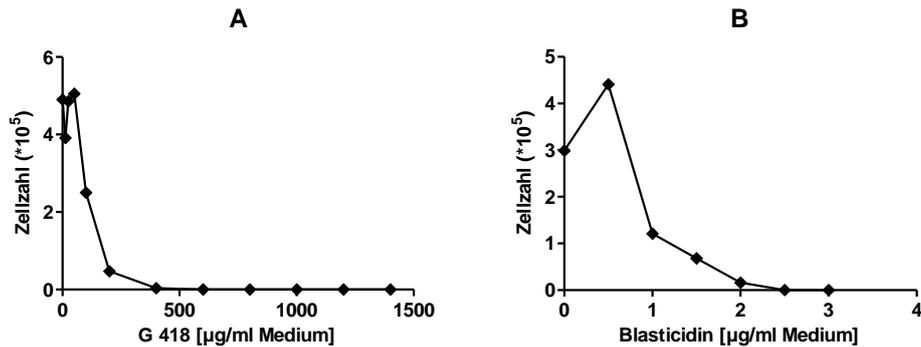


Abb. 7: Vitalitätstest der INS-1-Zellen nach Antibiotikabehandlung

(A) Anzahl der überlebenden INS-1-Zellen nach 7 d Inkubation mit verschiedenen G418-Konzentrationen. (B) Anzahl der überlebenden INS-1-Zellen nach 72 h Inkubation mit verschiedenen Blastizidin-Konzentrationen.

MTS- (Abb. 6) und Vitalitätstest (Abb. 7) ergaben, dass für die Selektion der mit dem humanen MT₂-Rezeptor transfizierten INS-1-Zellen (hMT₂-INS-1) und der mit dem Kontrollplasmid ohne humanen MT₂-Rezeptor transfizierten INS-1-Zellen (ΔhMT₂-INS-1) 400 µg G418 pro ml Medium notwendig sind und für die Selektion der mit dem rMT₁-shRNA-Plasmid transfizierten INS-1-Zellen (rMT₁-*knockdown* INS-1) sowie der mit dem Kontroll-shRNA-Plasmid transfizierten INS-1-Zellen (Kontroll-shRNA-INS-1) 50 µg Hygromycin pro ml Medium nötig sind. Um die Tetracyclin-regulierbare Expression des MT₂-Rezeptors zu gewährleisten, wurden die INS-1-Zellen zuerst mit dem Plasmid (pcDNA6/TR) transfiziert, welches den Repressor konstitutiv exprimiert. Diese Zellen wurden mit 2,5 µg Blastizidin pro ml Medium selektiert. Die Klone mit der höchsten Repressorexpression (gemessen durch quantitative RT-PCR) wurden anschließend mit dem hMT₂-Rezeptor transfiziert. Für die Selektion dieser Tet-hMT₂-INS-1-Zellen wurden dann 100 µg G418 und 1 µg Blastizidin pro ml Medium in Kombination eingesetzt.

2.4 Charakterisierung der stabil transfizierten Zelllinien

2.4.1 DNA-Extraktion

Die Zellen einer 25 cm² Kulturflasche wurden durch Trypsinierung und Zentrifugieren „geerntet“. Anschließend wurde das Zellpellet in 500 µl STE-Puffer (100 mM NaCl, 10 mM TRIS, 1 mM EDTA; pH 8,0) aufgenommen und mit 50 µl Proteinase K (Promega GmbH, Mannheim, Deutschland; 20 µg/µl) und 50 µl 20% SDS versetzt. Anschließend wurde der Ansatz auf einem Vortexer gemischt und 2 h bei 50°C inkubiert. Danach erfolgte die Zugabe von 600 µl Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25/24/1) und eine Zentrifugation für 15 min bei 12000 × g und Raumtemperatur zur Phasentrennung. Der wässrige Überstand, welcher die DNA enthält, wurde vorsichtig in ein neues Eppendorfgefäß übertragen. Zur Fällung erfolgte die Zugabe von 60 µl 3 M Natriumacetat und 1200 µl eiskaltem Ethanol zur DNA-Lösung und eine Inkubation über Nacht bei -20°C. Danach wurde 15 min bei 12000 × g und Raumtemperatur zentrifugiert. Das so entstandene DNA-Pellet wurde mit 70% Ethanol gewaschen, getrocknet und in 500 µl TE-Puffer (siehe 2.3.3.4 Plasmidextraktion) aufgenommen. Anschließend erfolgte die Messung der Konzentration mit einem Photometer.

2.4.2 RNA-Extraktion und RNA-Gelelektrophorese

Vor Isolierung der Gesamt-RNA aus den INS-1-Zellen musste ein Zellaufschluss erfolgen. Dafür wurden die tiefgefrorenen Proben mit 1 ml PeqGOLD TriFast™ (Gemisch aus Phenol und Guanidinisothiocyanat; PEGLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland) versetzt. Im Anschluss wurden die Zellen homogenisiert. Nach Zugabe von Chloroform, entsprechend einem 1/5 des Volumens an PeqGOLD TriFast™, wurde gemischt und anschließend 2 min bei Raumtemperatur inkubiert. Zur Trennung der RNA von Proteinen, Kohlenhydraten, Fetten und DNA erfolgte eine Zentrifugation bei 10000 x g und 4°C für 15 min. Für die RNA-Präzipitation wurde die obere wässrige Phase in sterile Eppendorfgefäße überführt. Nach Zugabe von Isopropanol (jeweils die Hälfte des Volumens an PeqGOLD TriFast™), wurde gemischt und die Nukleinsäuren 15 min bei Raumtemperatur präzipitiert. Um ein Pellet zu erhalten, wurde anschließend bei 10000 x g und 4°C für 15 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgegossen und die RNA durch Zugabe von 75% Ethanol, jeweils das Volumen wie PeqGOLD TriFast™, gewaschen. Dazu wurde kurz gemischt und erneut bei 10000 x g und 4°C für 15 min zentrifugiert. Der Überstand wurde vollständig abgenommen und das Pellet unter dem Abzug getrocknet. Anschließend wurden die RNA-Pellets über Nacht in Nuklease-freiem Wasser gelöst. Die gelöste RNA wurde bei -80°C gelagert.

Die RNA-Konzentration wurde im Spectrophotometer bestimmt. Dazu wurde die Extinktion der RNA-Lösung bei den Wellenlängen 260 nm und 280 nm gemessen. Der Quotient aus der Extinktion bei 260 nm und 280 nm gilt als Maß für die Reinheit der RNA. Zur Berechnung der Konzentration fand folgende Formel Verwendung:

$$\text{RNA } [\mu\text{l/ml}] = \text{Extinktion}_{260} \times 40 \times \text{Verdünnungsfaktor}$$

Die Qualität der RNA wurde durch Agarose-Gelelektrophorese überprüft. Dazu wurden 0,6 g Agarose in 33 ml destilliertem Wasser unter Hitze gelöst. Nach dem Abkühlen wurden 4,6 ml 10x MOPS-Puffer (200 mM MOPS, 50 mM Natriumacetat, 10 mM EDTA; pH 7) sowie 1,3 ml Formaldehyd dazugegeben. Das Gel wurde dann in die mit Kamm vorbereitete Kammer gegossen und nach Aushärtung mit 1x MOPS-Laufpuffer bedeckt. Vor dem Auftrag der Proben wurden diese mit je 2,5 µl 10x MOPS-Puffer, 12 µl Formamid und 4 µl Formaldehyd pro 6 µl Probe versetzt und bei 55°C für 15 min denaturiert; nach Abkühlen auf Eis erfolgte die Zugabe von je 4 µl *Blue juice* (siehe 2.3.2.2 Agarose-Gelelektrophorese). Die Auftrennung erfolgte bei 80 V und dauerte etwa 90 min. Im Anschluss wurde das Gel 10 min in einer Ethidiumbromid-Lösung gefärbt und dann in Wasser über Nacht entfärbt. Die Detektion der RNA-Banden erfolgte anschließend mittels einer UV-Fotoeinrichtung.

2.4.3 Northern Blot-Verfahren

Mit dem Northern Blot-Verfahren lässt sich eine bestimmte RNA in einem RNA-Gemisch nachweisen. Dazu wurden die RNA-Proben, wie unter 2.4.2 RNA-Extraktion und RNA-Gelelektrophorese beschrieben, behandelt und aufgetrennt. Anschließend wurde die RNA vom Gel auf eine Nylonmembran übertragen. Der Filter wurde dann mit einer markierten DNA-Sonde inkubiert.

Schließlich können die RNA-DNA-Hybride durch Chemolumineszenz auf einem Röntgenfilm nachgewiesen werden.

2.4.3.1 Kapillarer RNA Transfer auf Membranen, „Blotting“

Das RNA-Gel wurde für 20 min und die Nylonmembran für 5 min in 10x Saline-sodium citrate (SSC) Transferpuffer (1,5 M NaCl, 0,15 M Na₃Citrat x 2H₂O; pH 7,0) äquilibriert. Der Blot (TurboblotterTM; Whatman Schleicher & Schuell GmbH, Dassel, Deutschland) wurde wie folgt aufgebaut: 20 Blätter dickes Blotting-Papier auf die untere Schale setzen, darauf 4 Blätter dünnes Blotting Papier, dann ein befeuchtetes, dünnes Blatt Blotting-Papier, anschließend die Nylon-Transfer-Membran (GE Healthcare Life Science, München, Deutschland), darauf luftblasenfrei das Gel, dann 3 Blätter befeuchtetes, dünnes Blotting-Papier, die befeuchtete Pufferbrücke und schließlich die Abdeckplatte. Die Rinne der oberen Schale wurde mit 10x SSC-Puffer gefüllt. In dieser Rinne endeten die Enden der Pufferbrücke, so dass der Blotting-Puffer von oben nach unten durch den Blot diffundieren konnte und dabei die RNA aus dem Gel auf die Membran übertrug. Der Transfer wurde nach ca. 6 h beendet. Unter der UV-Fotoeinrichtung wurde überprüft, ob die RNA quantitativ auf die Membran transferiert worden war. Um die RNA auf der Membran zu fixieren, wurde diese 1,5 h bei 80°C im Trockenschrank (Kelvitron[®]; Heraeus Holding GmbH, Hanau, Deutschland) hitzefixiert.

2.4.3.2 Herstellen von DNA-Sonden

Mit dem PCR DIG Probe Synthesis Kit (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland) kann ein bestimmtes Amplikon mit Digoxigenin (DIG) markiert werden. Dazu wurden während einer PCR DIG-11-Desoxyuridintriphosphate in die vervielfältigte cDNA-Sequenz eingebaut. Die PCR wurde, wie unter 2.4.5 Real-time RT-PCR beschrieben, nach Angaben des Herstellers, durchgeführt. Dazu wurden pro Ansatz 46 µl Mastermix (siehe Tabelle 6) mit 4 µl cDNA versetzt. Bis zur Verwendung wurde die DIG-markierte DNA bei -20°C gelagert.

Tabelle 6: einfacher PCR-Mastermix zur DIG-Sonden Generierung

Reagenz	Volumen [µl]
Enzym-Mix ¹	0,75
10x PCR-DIG Probe Synthesis Mix ¹	5
10x PCR-Puffer ¹	5
Nuklease-freies Wasser	33,25
Vorwärts-Primer (25 µM) ²	1
Rückwärts-Primer (25 µM) ²	1
Eva Green ^{®3}	0,5
gesamt	46

¹ Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland

² Primer TipMolBiol, Berlin, Deutschland oder Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland

³ Biotum, Hayward, USA

1x SSC (0,1% SDS): 150 mM NaCl
15 mM Na₃Citrat x 2H₂O
3,47 mM SDS
pH 7,0
autoklaviert, filtriert (0,45µm)

0,2x SSC (0,1% SDS): 30 mM NaCl
3 mM Na₃Citrat x 2H₂O
3,47 mM SDS
pH 7,0
autoklaviert, filtriert (0,45µm)

Puffer 1 für DIG-Farbnachweis (Waschpuffer): 0,1 M Maleinsäure
0,15 M NaCl
0,3% (v/v) Tween 20
pH 7,5 mit NaOH eingestellt
autoklaviert

Puffer 2 für DIG-Farbnachweis (Blockierungslösung): 1% Blocking-Reagenz in Puffer 1
autoklaviert

Puffer 3 für DIG-Farbnachweis (Detektionslösung): 0,1 M TRIS
0,1 M NaCl
0,05 M MgCl₂·6H₂O
pH 9,5 mit HCl eingestellt

2.4.4 cDNA-Synthese für RT-PCR

Vor der Reverse-Transkriptase-Reaktion führte ein DNase-Verdau mittels DNase-Kit (DNA-free™; Ambion, Austin, Texas, USA) zur vollständigen Elimination verbleibender eukaryotischen DNA in den RNA-Extrakten. Durch das Enzym Reverse Transkriptase kann aus der gereinigten RNA die dazu komplementäre cDNA hergestellt werden. Mit der PCR lässt sich diese cDNA vervielfältigen. Mittels Genexpressionsanalyse lässt sich die Expressionsrate der jeweils zugrundeliegenden RNA bestimmen, so dass sich Unterschiede in der Genexpression von verschiedenen Proben nachweisen lassen. Für die cDNA-Synthese wurden jeweils 1 µg gelöste RNA mit Nuklease-freiem Wasser auf 10 µl aufgefüllt und nach 10-minütiger Inkubation bei 70°C im Thermoblock zur thermischen Denaturierung und Abkühlen auf Eis mit 10 µl Mastermix (siehe Tabelle 7, Reverse-Transkriptase-Kit) versetzt. Die enzymatische Reaktion fand im Wasserbad innerhalb einer Stunde bei 37°C statt. Im Anschluss wurde die Temperatur für 5 min auf 95°C erhöht, um die Reverse Transkriptase zu inaktivieren. Nach Abkühlung der Proben auf Eis wurden sie mit 80 µl Nuklease-freiem Wasser verdünnt und bei -20°C aufbewahrt.

Tabelle 7: Einfacher Ansatz des Mastermixes für die cDNA-Synthese

Reagenz	Volumen [μ l]
MgCl ₂ ¹ , 25 mM	4
Reverse Transkriptase ¹ , 10x Puffer	2
dNTP Mix ¹ , 10 mM	2
Recombinanter Ribonuklease-Inhibitor ¹ (RNasin)	0,5
Oligo(dT)15 Primer ¹ (0.5 μ g/ μ l)	1
AMV Reverse Transcriptase ¹ (30 U/ μ l)	0,5
Summe	10

¹Reverse Transcription System; Promega GmbH, Mannheim, Deutschland

2.4.5 Real-time RT-PCR

Die Methode der real-time RT-PCR wurde für die quantitative Erfassung von Expressionsunterschieden genutzt. Die PCR beginnt mit einer initialen Denaturierung der cDNA bei 95°C für 2 min. In den folgenden Zyklen wird die cDNA durch Erhitzen auf 94°C für 30 s in die DNA-Einzelstränge zerlegt. In der anschließenden Phase der Primerhybridisierung erfolgt die Anlagerung der Vorwärts- und Rückwärtsprimer an den zu amplifizierenden DNA-Abschnitt („Annealing“). Diese Phase findet bei 64°C statt und dauert 30 s. In den folgenden 5 Zyklen wird die Annealingtemperatur schrittweise um je 1°C auf 59°C gesenkt. In der folgenden 30-sekündigen Elongationsphase füllt die Taq-Polymerase bei 72°C die fehlenden Stränge mit freien Nukleotiden auf. Durch unspezifische Einlagerung des Fluoreszenzfarbstoffes EvaGreen und Fluoreszenzemission ausschließlich in der Doppelstrangphase der Elongation kann bei der real-time PCR die Entstehung von amplifizierter DNA im Verlauf der PCR-Reaktion in Echtzeit verfolgt werden. Die Messung der Fluoreszenz dauert 15 s und erfolgt am Ende der Synthesephase bei 80°C. Am Ende des PCR-Laufes wird eine Schmelzkurve aufgenommen, um zu überprüfen, ob im Ansatz nur ein spezifisches PCR-Produkt amplifiziert wurde. Dazu wird die Temperatur schrittweise von 50°C auf 95°C erhöht.

Die real-time-PCR wurde im *Thermocycler* (Rotorgene 6000; Corbett Research, Mortlake, Australien) durchgeführt. Pro Ansatz wurden 16 μ l Mastermix (siehe Tabelle 8) mit 4 μ l cDNA bzw. 4 μ l Nuklease-freiem Wasser, bei der *Non-template-control*, versetzt. Die verwendeten Primer und deren Sequenzen sind in Tabelle 9 dargestellt. Im Anschluss an die PCR wurden die Produkte bei -20°C gelagert.

Tabelle 8: Einfacher Ansatz des Mastermixes für die real-time RT-PCR

Reagenz	Volumen [μ l]
PCR-Mastermix ¹	10
Nuklease-freies Wasser	4,75
Vorwärts Primer ² (25 μ M)	0,5
Rückwärts Primer ² (25 μ M)	0,5
Eva Green ^{®3}	0,25
gesamt	16

¹ Promega GmbH, Mannheim, Deutschland

² Primer TipMolBiol, Berlin, Deutschland oder Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland

³ Biotum, Hayward, USA

Für die Bestimmung der mRNA-Konzentration wurde der *cycle threshold* (Ct-Wert) der einzelnen Proben mit Hilfe der Analysesoftware des Rotorgenes 6000 ermittelt. Die relative mRNA-Konzentration wurde dann nach der $\Delta\Delta$ -Ct-Methode (Livak und Schmittgen, 2001; Pfaffl, 2001) bestimmt.

2.4.5.1 DNA-Gelelektrophorese

Um zu kontrollieren, ob sich bei der PCR jeweils nur ein spezifisches Produkt gebildet hat, wurden die PCR-Produkte anschließend stichprobenartig einer DNA-Gelelektrophorese unterzogen.

Dazu wurden Agarose und 40 ml 1× TAE-Puffer kurz aufgekocht und nach Abkühlung wurde das Gel in der Gelelektrophoresekammer gegossen und nach Aushärtung im 1× TAE-Puffer äquilibriert. Je nach erwarteter Anzahl der Basenpaare des DNA-Abschnittes (Molekülgröße) variierte der Anteil der Agarose, wobei höhere Agarosekonzentrationen zur Auftrennung kleiner Fragmente und niedrigere zur Auftrennung größerer Fragmente verwendet wurden.

Die PCR-Produkte (10 µl) oder 5 µl eines Längenstandards (Bench Top 100 bp DNA Ladder; Promega GmbH, Mannheim, Deutschland) wurden mit 5 µl *Blue juice* (siehe 2.3.2.2 Agarose-Gelelektrophorese) versetzt und auf das Gel aufgetragen. Die Auftrennung der Produkte erfolgte durch Anlegen einer Spannung von 80 V für ca. 3 h. Nach vollendeter Auftrennung der Proben wurde das Gel 10 min in einer Ethidiumbromidlösung gefärbt und anschließend gewässert. Die Banden auf dem Gel wurden in einer Fotokammer unter UV-Licht sichtbar gemacht und mittels der Software Bio1D ausgewertet.

2.4.5.2 Restriktionsanalysen

Zur Bestätigung der Identität der PCR-Produkte wurden zusätzlich Restriktionsanalysen durchgeführt. Da Restriktionsenzyme die DNA-Sequenz an charakteristischen Stellen schneiden, entstehen durch die Restriktion Fragmente mit spezifischem Molekulargewicht. Für einen Restriktionsansatz wurden je 10 µl des zu analysierenden PCR-Produktes, 6 µl RNase-freies Wasser, 2 µl des Restriktionsenzym (Fermentas GmbH, St.-Leon-Rot, Deutschland) und 2 µl des zugehörigen Puffers gemischt und im Wasserbad entsprechend den Angaben der Hersteller inkubiert. Im Anschluss wurden die Ausgangs-PCR-Produkte und der Restriktionsansatz auf ein Gel aufgetragen und gelelektrophoretisch aufgetrennt. So ließen sich die Fragmente in Relation zu den Ausgangs-PCR-Produkten bzw. einem Molekulargewichts-Standard (O`Gene Ruler UltraLowRange; Fermentas GmbH, St.-Leon-Rot, Deutschland) identifizieren. Die verwendeten Enzyme, Größe der Amplifikationsprodukte und die Größe der erwarteten Spaltungsprodukte sind in Tabelle 10 aufgeführt.

Tabelle 9: Angaben zu den für die real-time RT-PCR verwendeten Primern

Gen	Zitation	Genbank-Nummer	Primer-Sequenz 5' → 3'	Amplicon (bp)
βActin	(Mühlbauer et al., 2004)	NM031144	vorwärts ACTCCTACGTGGGCGACGAGG rückwärts CAGGTCCAGACGCAGGATGGC	389
hMT ₂	(Peschke et al., 2007)	NM_005959	vorwärts TGCCTCATCTGGCTCCTCAC rückwärts TAGGGAGGAGGAAGTGGATG	154
rMT ₂	(Mühlbauer et al., 2011)	NM_001100641	vorwärts GCAAGCTGCGGAACGCAGGTAA rückwärts AGGCTCGGTGGTAGGTCGCA	249
rMT ₁	(Mühlbauer und Peschke, 2007)	NM_053676	vorwärts CAACCTGCAAACCGGAACCTC rückwärts GGAAAACCACCAGGGCAAT	101
rMT ₁	(Mühlbauer et al., 2012)	NM_053676	vorwärts CCGGACAGCAAACCCAAAC rückwärts CCGATCTGAGGCCACAATAAG	129
rIns1	(Mühlbauer et al., 2011)	NM_019129	vorwärts AGCAAGCAGGTCATTGTTCC rückwärts GACGGGACTTGGGTGTGTAG	189
rIns2	(Mühlbauer et al., 2009)	NM_019130	vorwärts TCTTCTACACACCCATGTCCC rückwärts GGTGCAGCACTGATCCAC	149
Gnai1		NM_013145.1	vorwärts CGGGAGGACGGAGAGAAGGCA rückwärts CATCATCCGCACGAGCAGCGT	241
Gnai2		NM_031035.3	vorwärts CCAGCGTGCGGATGATGCCA rückwärts CTTACACGGGTCCGCAGCA	250
Gnai3		NM_013106.1	vorwärts GCTGCTCGGCGCTGGAGAAT rückwärts GTCGGGCATCATCCGCTCTGG	206
NeoRes			vorwärts TGAATGAACTGCAGGACGAG rückwärts ATACTTTCTCGGCAGGAGCA	171
BlaRes			vorwärts ATCAACAGCATCCCCATCTC rückwärts ATGCAGATCGAGAAGCACCT	246
TetR			vorwärts TGCCCTTTAGAAGGGGAAAG rückwärts AAAGTAAAATGCCCCACAGC	224
HygRes			vorwärts ATAGGTCAGGCTCTCGCTGA rückwärts GATGTAGGAGGGCGTGGATA	150

Tabelle 10: Verwendete Restriktionsenzyme und deren Reaktionsbedingungen sowie spezifische Spaltungs-Produkte von Amplikons

Gen	Restriktionsenzym	Inkubationstemperatur [°C]	Inkubationsdauer [h]	Amplikon (bp)	Restriktionsfragmente (bp)
hMT ₂	EcoRII	37	5	154	56, 98
rMT ₂	EcoRII	37	5	249	52, 197
rMT ₁	Bsrl	65	5	101	22, 36, 43
rMT ₁	Apal	37	5	129	39, 90
rIns1	Avall	37	16	189	38, 151
rIns2	Avall	37	16	149	35, 114
Gnai1	Bsrl	65	5	241	165, 76
Gnai2	EcoRII	37	5	250	183, 50, 17
Gnai3	NcoI	37	5	206	150, 56
NeoRes	Bsrl	65	5	171	105, 66
BlaRes	Avall	37	16	246	143, 103
TetR	Mva1269I	37	16	224	189, 35
HygRes	Bsh1285	37	16	150	90, 60

2.4.6 Immunzytochemie

Diese Methode zum Nachweis von Proteinen/Peptiden auf Gewebedünnschnitten oder in Zellkulturzellen beruht auf der Bindung eines Primärantikörpers an das jeweilige Antigen. Die Antigen-Antikörper-Komplexe können durch einen, an ein fluoreszierendes Farbstoffmolekül (z.B. Cyanin 3 oder Cyanin 2) gekoppelten Sekundärantikörper sichtbar gemacht werden. In eine 24-well-Platte wurden Deckplättchen (Thermo Scientific, Braunschweig, Deutschland) eingelegt, darauf die entsprechende Anzahl Zellen (ca. 2 bis $2,5 \times 10^5$ pro well) ausgesät und mit Kulturmedium bedeckt. Die Inkubation der Zellen erfolgte unter Standardbedingungen (5% CO₂ und 37°C) für ca. 48 h. Anschließend wurde das Medium entfernt und die Plättchen wurden mit 1× PBS (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10,1 mM Na₂HPO₄, 1,8 mM KH₂PO₄; pH 7,4) gespült. Danach wurden die Zellen fixiert, indem sie mit 500 µl 5% Paraformaldehyd in 1× PBS für 15 min inkubiert wurden. Im Anschluss an 2 Waschschriffe mit 1× PBS wurde mit destilliertem Wasser gespült. Schließlich wurden die adhärenen Zellen auf den Plättchen durch Zugabe von 2 ml 70% Alkohol fixiert und bis zur Immunmarkierung im Kühlschrank gelagert. Vor der Immunmarkierung wurden die Plättchen mit destilliertem Wasser und 1× PBS gespült. Dann wurden die Plättchen für 1 h in PBS mit 0,3% Triton X-100 (Sigma Aldrich Chemie, Taufkirchen, Deutschland) und 5% Ziege- oder Esel-Normalserum (abhängig von der Wahl des Sekundärantikörpers) bei Raumtemperatur inkubiert. Dadurch wurden nicht spezifische Bindungsstellen geblockt. Es folgte eine Inkubation der Plättchen in verdünnter Primärantikörperlösung (siehe Tabelle 11) bei 4°C über Nacht. Nach dreimaligem Spülen mit 1× PBS, zum Entfernen von ungebundenem Antikörper, wurden die Plättchen für 1 h mit Fluorochrom Cy3-konjugierten Sekundärantikörpern (siehe Tabelle 11) inkubiert. Nach erneutem Spülen mit 1× PBS und destilliertem Wasser wurden die Plättchen luftgetrocknet und schließlich mit Entellan® (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) auf Objektträgern eingebettet. Die Lagerung der Objektträger erfolgte bei 4°C. Die Auswertung erfolgte mit einem konfokalen Laserscanningmikroskop (TCS SP; Leica, Heidelberg, Deutschland). Es wurde ein 40× Ölimmersionsoberktiv mit einem Scanbereich von 250 × 250 µm verwendet. Die Scantiefe betrug jeweils 7 µm. Für Übersichtsaufnahmen wurde ein Zoomfaktor von 1 gewählt, der für Detailaufnahmen entsprechend erhöht wurde. Es wurden jeweils 30 bis 50 einzelne Konfokalbilder aufgenommen und in einem Gesamtbild zusammengefasst. Nach Aufnahme mehrerer Bildserien unter jeweils konstanten Scanbedingungen konnte die Immunreaktion in beiden Zelllinien verglichen werden. Zur besseren Beurteilung der Intensität der Immunreaktion wurden verschiedene Farbskalen verwendet.

Tabelle 11: Antikörper für Immunzytochemie

Primär-antikörper	Spezies	Verdünnung	Sekundärantikörper	Verdünnung
MT ₂ GTX70723 ¹	Kaninchen	1 : 100 in 5% Ziege- Normalserum ³	Ziege-anti-Kaninchen- Cy3 ³	20 µg/ml in 2% BSA/PBS
MT ₁ sc-13186 ²	Ziege	1 : 10 in 5% Esel-Normalserum ³	Esel-anti-Ziege-Cy3 ³	20 µg/ml in 2% BSA/PBS

¹Gene Tex Inc., San Antonio, TX, USA

²Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, USA

³Dianova GmbH, Hamburg, Deutschland

2.5 Inkubationsversuche

2.5.1 *Batch*-Versuche an INS-1-Zellen

Die INS-1-Zellen und die transfizierten Zellen wurden in 24-*well*-Zellkulturplatten ($2,5 \times 10^5$ Zellen pro *well*) ausgesät und ca. 48 h unter Standardbedingungen inkubiert, so dass sie zu 60 bis 80% konfluent waren. Danach wurden die Zellen mit frischem Medium gewaschen. Nach Zugabe von Medium mit Testsubstanzen wurden die Zellen unter Standardbedingungen inkubiert.

Um die Funktion des hMT₂-Rezeptors für die β -Zellen zu untersuchen, wurden die Zellen für 6 h mit Melatonin (1 nM oder 100 nM) behandelt. Dabei betrug der Glukosegehalt des Mediums 11,1 mM oder er wurde durch Zugabe von Glukose auf 17,1 mM erhöht. Zusätzlich wurde die Wirkung des MT₂-Rezeptor-Antagonisten 4P-PDOT untersucht, wofür die Zellen für 30 min mit 4P-PDOT (1 nM) vorinkubiert und anschließend für 6 h mit Melatonin (1 nM) inkubiert wurden. In einem weiteren Versuch wurden die Zellen mit dem Phosphodiesterase-Hemmer IBMX (10 μ M) behandelt und mit Melatonin (100 pM, 1 nM, 10 nM, 100 nM) für 6 h koinkubiert. Einige *wells* wurden zusätzlich für 24 h mit 250 ng/ml PTX vorinkubiert, um die G_i-Protein-Kopplung des hMT₂-Rezeptors zu testen.

Um den Einfluss des rMT₁-Rezeptors auf die Insulinsekretion der INS-1-Zellen zu untersuchen, wurden die Zellen für 1 h mit 100 nM Glucagon oder 10 nM GLP-1 stimuliert und mit 100 nM Melatonin koinkubiert. In einem anderen Versuchsansatz wurden die Zellen mit IBMX (100 μ M) behandelt und mit Melatonin (1 nM oder 100 nM) für 6 h koinkubiert. Um zu untersuchen, ob der rMT₁-Rezeptor an einer Sensitivierung der β -Zellen beteiligt ist, wurden die Zellen für 6 h mit 100 nM Melatonin vorinkubiert, anschließend mit DPBS-Puffer gewaschen und für 1 h in frischem Medium inkubiert oder mit 10 nM GLP-1 stimuliert.

In allen Versuchen wurden die Kontroll-Zellen mit Medium inkubiert, welches die gleiche Menge an Lösungsmittel wie die Testsubstanzen enthielt. Am Ende der Stimulationszeit wurden die Überstände abgenommen und zur Insulinbestimmung mittels Radioimmunoassay verwendet. Bis dahin wurden sie bei -80°C gelagert.

2.5.2 Festphasen-Radioimmunoassay

Die Methodik des angewandten Festphasen-Radioimmunoassays (Coat-A-Count[®] Insulin; Siemens AG, München, Deutschland) basiert darauf, dass ¹²⁵I-markiertes Insulin mit dem Insulin der Probe um die Antikörperbindungsstellen auf der Innenwand des Polypropylen-Röhrchens konkurriert. Dazu wurden je 100 μ l der Proben mit 100 μ l Medium verdünnt und in die Polypropylen-Röhrchen pipettiert. Innerhalb von 45 min erfolgte die Zugabe von je 1 ml ¹²⁵I-markierten Insulins. Nach 22-stündiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde der Überstand entfernt und die an die Antikörper gebundene Fraktion im γ -Counter (DPC Biermann, Bad Nauheim, Deutschland) gemessen. Die ermittelten *Counts* waren dabei umgekehrt proportional zur Konzentration des Insulins. Aus den Ergebnissen der mitgeführten Standards ließ sich eine Eichreihe erstellen, durch diese ließen sich dann die Konzentrationen der Proben berechnen.

Die Standards des Insulin-RIAs deckten einen Messbereich zwischen 36 pM und 5,3 nM ab; durch die Verdünnung mit Medium lagen alle Proben in diesem Bereich.

2.5.3 Proteinextraktion und Protein-Konzentrationsbestimmung

Um die basale Sekretion der INS-1-Zellen ermitteln zu können, wurde der Gesamt-Proteingehalt der Zellen bestimmt. Die Zellen wurden mit Trypsin abgelöst, in ein Zentrifugenröhrchen übertragen und für 10 min bei 1500 x g und Raumtemperatur zentrifugiert. Das Zellpellet wurde mit DPBS gewaschen und erneut zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und das Zellpellet bis zur Proteinbestimmung bei -20°C gelagert. Zum Aufschluss wurde das Pellet in 50 µl DPBS aufgenommen und mit Ultraschall behandelt, sodass die Proteine austreten konnten. Anschließend erfolgte die Proteinbestimmung mit einem Assay (Bio-Rad Protein Assay; Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland), basierend auf der Bradford-Methode. Bei dieser wird durch die quantitative Bindung des Farbstoffs Coomassie® Brilliant Blue G 250 an Proteine das Absorptionsmaximum des Farbstoffes von 465 nm auf 595 nm verschoben. Durch Ermittlung der Extinktion bei 595 nm kann dann der Proteingehalt der Probe bestimmt werden. Der Assayfarbstoff wurde 1:4 mit destilliertem Wasser verdünnt und filtriert. Außerdem wurden aus in DPBS gelösten BSA Standards von 0 bis 1,4 µg/µl hergestellt. Vom verdünnten Farbstoff wurden je 250 µl in die *wells* einer 96 *well* Platte vorgelegt. Anschließend erfolgte die Zugabe je 5 µl Standard oder Proteinlösung. Nach mindestens 5 min Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Absorption bei 595 nm gemessen. Anhand der Standard-Eichkurve ließ sich die Konzentration der Proben bestimmen.

2.5.4 Bestimmungen von cAMP- und cGMP-Konzentrationen

Die INS-1-Zellen und die stabil transfizierten klonalen Linien wurden in 96-*well*-Zellkulturplatten (1×10^5 Zellen pro *well*) ausgesät und ca. 48 h unter Standardbedingungen inkubiert, bis sie zu 60 bis 80% konfluent waren. Danach wurden die Zellen mit frischem Medium gewaschen. Nach Zugabe von Medium, welches die Testsubstanzen enthielt, wurden die Zellen für 1 h unter Standardbedingungen inkubiert. Als Testsubstanzen dienten IBMX (1 mM), zur Verhinderung des cAMP- und cGMP-Abbaus durch Phosphodiesterasen, und Melatonin (1 nM und 100 nM). Als Kontrolle dienten bei allen Versuchen Zellen, die in Medium mit der gleichen Menge vom Lösungsmittel der Testsubstanzen inkubiert wurden. Am Ende der Stimulationszeit wurden die Überstände eingesammelt und der darin enthaltene Insulingehalt mittels Radioimmunoassay bestimmt. Bis zur Messung wurden die Überstände bei -80°C gelagert. Für die cAMP-Bestimmung wurden die Zellen durch Zugabe von 200 µl Lysis-Reagenz 1B und 10 min Inkubation im Schüttler bei Raumtemperatur lysiert, so dass das intrazelluläre cAMP mit einem cAMP-spezifischen ELISA-Kit bestimmt werden konnte. Es wurde weiterhin das gesamtzelluläre cGMP bestimmt. Dazu wurde der Überstand nach der Stimulation auf den Zellen belassen. Anschließend erfolgte durch die Zugabe von 20 µl Puffer A und 10 min Inkubation im Schüttler bei Raumtemperatur eine Zelllyse. Danach wurde dem Zellysate 20 µl Acetylierungsreagenz (2

Teile Triethylamin, 1 Teil Essigsäureanhydrid) zugefügt, um cGMP zu stabilisieren. Das Zelllysate wurde dann zur cGMP-Bestimmung eingesetzt.

2.5.4.1 cAMP-ELISA

Das Prinzip des verwendeten cAMP-ELISA-Kits (cAMP Biotrak™ Enzymeimmunoassay System; GE Healthcare Life Science, München, Deutschland) beruht auf der Konkurrenz von cAMP in den Proben oder Standards sowie Peroxidase-gekoppeltem cAMP um die Bindung am Kaninchen-anti-cAMP-Antikörper. Der gebildete Komplex bindet dann am Affe-anti-Kaninchen-Immunglobulin, mit dem die Assay-Platte beschichtet war. Dazu wurden je 100 µl Standard oder Zelllysate in die *wells* der Assay-Platte pipettiert. Danach erfolgte die Zugabe von je 100 µl Antiserum. Um nichtspezifische Bindungen zu ermitteln wurden 100 µl Lysis-Reagenz 2B und 100 µl Lysis-Reagenz 1B in die *non-specific binding-wells* pipettiert. Anschließend wurde die Platte im Schüttler 2 h bei 4°C inkubiert. Es folgte die Zugabe von 50 µl Konjugat und eine weitere 1-stündige Inkubation der Platte bei 4°C im Schüttler. Im Anschluss wurde der Überstand entfernt und die *wells* 4 Mal mit je 400 µl Waschpuffer gewaschen. Nach dem Abtropfen wurden je 150 µl Enzymsubstrat in alle *wells* der Assay-Platte gegeben und im Schüttler 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Der im Enzymsubstrat enthaltene Farbstoff 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin konnte von der Peroxidase zu einem blauen Tetramethylbenzidin-Derivat oxidiert werden. Am Ende der Inkubationszeit erfolgte die Zugabe von 100 µl 1M Schwefelsäure. Dadurch fand ein Farbumschlag ins Gelbe statt. Die Farbintensität war indirekt proportional zum cAMP-Gehalt in den Proben. Die Extinktion wurde sodann bei 450 nm im ELISA-Reader gemessen, die Auswertung erfolgte mit folgender Formel:

$$\%B/B_0 = \left(\frac{\text{optische Dichte}_{\text{Standard oder Probe}} - \text{optische Dichte}_{\text{non-specific binding}}}{\text{optische Dichte}_{\text{Nullstandard}} - \text{optische Dichte}_{\text{non-specific binding}}} \right) * 100$$

Aus der Standardkurve, welche als Funktion $\%B/B_0 = \log \text{cAMP-Konzentration}$ dargestellt wurde, konnte die cAMP-Konzentration in den Proben berechnet werden. Der Messbereich des cAMP-ELISAs lag zwischen 12,5 und 3200 fmol pro *well*.

2.5.4.2 cGMP-ELISA

Der cGMP-ELISA (cGMP Biotrak™ Enzymeimmunoassay System; GE Healthcare Life Science) funktioniert analog zum cAMP-ELISA. Abweichend wurden je 50 µl Standard oder Zelllysate in die *wells* der Assay-Platte pipettiert. Es folgte die Zugabe von je 100 µl Antiserum. Anschließend wurde die Platte im Schüttler 2 h bei 4°C inkubiert. Dann wurden 100 µl Konjugat dazugegeben und die Platte wurde im Schüttler 1 h bei 4°C inkubiert. Im Anschluss wurde der Überstand entfernt und die *wells* wurden 4 Mal mit je 400 µl Waschpuffer gewaschen. Nach dem Abtropfen wurden je 200 µl Enzymsubstrat in alle *wells* der Assay-Platte gegeben und im Schüttler 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe von 100 µl 1M Schwefelsäure wurde die Extinktion dann bei 450 nm im ELISA-Reader gemessen. Die Berechnung der cGMP-

Konzentration der Proben erfolgte analog der Berechnung der cAMP-Konzentration. Der Messbereich des cGMP-ELISAs lag zwischen 2 und 512 fmol pro *well*.

2.5.5 Calcium Imaging

INS-1-Zellen und transfizierte INS-1-Zellen wurden auf poly-L-Lysin beschichteten Deckplättchen ($2-2,5 \times 10^5$ Zellen pro Plättchen) ausgesät und 48 h unter Standardbedingungen inkubiert. Das mit Zellen bewachsene Plättchen wurde anschließend in einer Perfusionskammer (H. Saur Laborbedarf, Reutlingen, Deutschland) für 30 min mit Perfusionsmedium (140 mM NaCl, 5,6 mM KCl, 1,2 mM MgCl₂, 2,6 mM CaCl₂, 10 mM HEPES, 5,6 mM Glukose; pH 7,4) inkubiert, welches zusätzlich 2 µmol/l *Calcium Green*TM-1 AM (Molecular Probes[®], Invitrogen GmbH, Darmstadt, Deutschland) sowie 4,6 µmol *Fura Red*TM AM und 0,02% *Pluronic*[®] F-127 enthielt. Im Anschluss wurde mit Perfusionsmedium perfundiert. Die Fluoreszenz ließ sich durch einen Argonionenlaser (Excitation: 488 nm) anregen und ein Konfokales Laserscanningmikroskop (Leica TCS SP/DM IRBE; Leica, Heidelberg, Deutschland) mit 63x Wasser-Immersionsobjektiv detektieren. Während 5 min erfolgte alle 2 oder 2,5 s eine Aufnahme von 512 x 512 Pixel; dabei wurden die Zellen zunächst nur mit Perfusionsmedium, dann für 3 min zusätzlich mit 1 µM Melatonin und schließlich wieder nur mit Perfusionsmedium umspült. Das Verhältnis der Fluoreszenzintensität von *Calcium Green-1* bei 530 nm und der von *Fura Red* bei 650 nm wurde berechnet (Origin, Microcal Software; Northhampton, MA, USA). So konnten Veränderungen des intrazellulären freien Kalziums erfasst werden.

2.6 Batch-Versuche an Inseln von Melatoninrezeptor-*knockout*-Mäusen

2.6.1 Tiere

Als Versuchstiere standen uns Melatoninrezeptor-*knockout*-Tiere zur Verfügung, die freundlicherweise von Prof. Dr. Stehle von der Universität Frankfurt am Main zur Verfügung gestellt wurden und aus einem eigenen Auszuchtstamm stammen. Die Melatoninrezeptor-*knockout*-Mäuse: MT₁-Rezeptor-*knockout* (MT₁KO; Liu et al., 1997), MT₂-Rezeptor-*knockout* (MT₂KO; Jin et al., 2003) und MT₁MT₂-Rezeptor-Doppel-*knockout* (MT₁MT₂KO; Jin et al., 2003) sowie der Wildtyp (WT) entstanden ursprünglich durch Rückkreuzung der Linien 129/sv x C57BL/6 (einem Melatonin-defizienten Stamm) und C3H/He (einem Melatonin-profizienten Stamm) im Labor von Prof. Dr. Reppert (Harvard Medical School, Boston, Massachusetts). Die Tiere erhielten Futter und Wasser *ad libitum* und waren einem Lichtregime von L:D = 12:12 ausgesetzt.

2.6.2 Gewinnung der Langerhansschen Inseln aus Pankreata der Melatoninrezeptor-*knockout*-Mäuse

Pro Versuch wurden 7 neonate (10 – 14 Tage alte) Mäuse jeder Tierlinie durch Dekapitierung getötet. Den Mäusen wurde das Pankreas entnommen; das Organ wurde zerkleinert und in

eiskalte Hanks' Salzlösung mit 2 mg/ml BSA überführt. Anschließend wurde das Gewebe 6 min unter Schütteln bei 37°C in Kollagenase-Lösung (1 mg/ml Hanks' Salzlösung) verdaut. Der Verdau wurde durch Zugabe von kalter Hanks' Salzlösung abgestoppt. Nachdem sich die Inseln am Boden des Becherglases absetzen konnten, wurde der Überstand abpipettiert. Um weiteres exokrines Gewebe zu entfernen, wurden die Inseln 3 Mal mit Hanks' Salzlösung gewaschen. Nach Überführen in eine Petrischale wurden die Inseln aus dem verbleibenden exokrinen Gewebe unter dem Stereomikroskop (Stemi SV6; Zeiss, Oberkochen, Deutschland) mit einer Pasteurpipette heraus gesammelt.

2.6.3 Batch-Versuche an Inseln

Die Inseln wurden über Nacht im Brutschrank bei 5% CO₂ und 37°C in Medium 199 kultiviert. Dem Medium wurden 26,2 mM NaHCO₃, 80 mg/l Gentamycin sowie 1,75 g/l Bovines Serumalbumin zugesetzt. Am folgenden Morgen wurden die Inseln in 24-*well*-Zellkulturplatten verteilt (je 20 Inseln pro *well*) und in Medium 199 unter Zusatz von 3 mM Glukose und 100 nM Melatonin für 6 h inkubiert. Am Ende der Stimulationszeit wurden die Überstände gewonnen und der Insulinbestimmung zugeführt. Die Inseln wurden in ein Zentrifugenröhrchen übertragen und für 10 min bei 1500 × g und Raumtemperatur zentrifugiert. Das Inseln pellet wurde mit DPBS gewaschen und erneut zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und das Pellet zur Proteinbestimmung verwendet. In einem zweiten Versuch wurden die Inseln mit 10 µM IBMX behandelt und mit 100 nM Melatonin für 6 h inkubiert. In beiden Versuchen wurden die Kontroll-Inseln mit Medium inkubiert, welches die gleiche Menge an Lösungsmittel wie die Testsubstanzen enthielt.

2.7 Statistische Auswertungen

Die Auswertung der experimentell erhobenen Daten erfolgte mit dem Statistikprogramm GraphPadPrism5 (GraphPad Software, San Diego, Kalifornien, USA). Die Mittelwerte der Gruppen wurden mit Mann-Whitney-*U*-Test verglichen. Signifikante Unterschiede der Mittelwerte sind durch Sternchen (*) gekennzeichnet. Als Signifikanzgrenze wurde eine Irrtumswahrscheinlichkeit von 5% zugrunde gelegt. Die Ergebnisse wurden als Mittelwert ± Standardfehler dargestellt.

3 Ergebnisse

3.1 Funktion des humanen MT_2 -Rezeptors in der β -Zelle

3.1.1 Expression des humanen MT_2 -Rezeptors in INS-1-Zellen

Um den Einfluss des humanen MT_2 -Rezeptors auf die Funktion der β -Zelle zu untersuchen, wurde ein Plasmid mit der cDNA des humanen MT_2 -Rezeptors in die Ratteninsulinoma Zelllinie INS-1 transfiziert. Nach Selektion der transfizierten Zellen mit G418 (400 μ g/ml) und Expansion der Kolonien, wurden die aus den Kolonien entstandenen Klone zuerst auf die Expression des plasmidkodierten Neomycin-Resistenzgens untersucht, welches den Zellen G418-Resistenz verleiht. Wie in Abbildung 8A dargestellt, konnte die mRNA des Neomycin-Resistenzgens in den transfizierten Zellen nachgewiesen werden. Darüber hinaus wurde überprüft, ob das Plasmid in die DNA der INS-1-Zellen integriert wurde. Dazu wurde die DNA aus den Zellpellets der Klone extrahiert. Durch PCR und anschließende Gelelektrophorese konnte das Neomycin Resistenzgen im INS-1-Genom nachgewiesen werden (Abb. 8B).

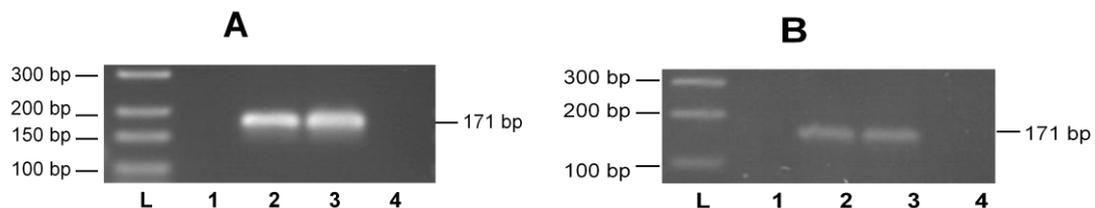


Abb. 8: Nachweis der Integration des pT-Rex-Dest30-Plasmids in die INS-1-DNA und Expression des Neomycin-Resistenzgens in INS-1-Zellen

(A) Darstellung des RT-PCR-Produktes des Neomycin-Resistenzgens im 1,5% Agarose-Gel nach gelelektrophoretischer Auftrennung und anschließender Ethidiumbromidfärbung: INS-1-Ausgangszellen (1), mit dem humanen MT_2 -Rezeptor transfizierte INS-1-Zellen (h MT_2 -INS-1, 2 und 3) sowie *Non Template Control* (4). (B) Das Agarose-Gel zeigt das PCR-Produkt des Neomycin-Resistenzgens nach Gelelektrophorese und Ethidiumbromidfärbung: DNA von INS-1-Ausgangszellen (1), DNA von h MT_2 -INS-1-Zellen (2 und 3) sowie die *Non Template Control* (4). bp, Basenpaare; L, 100 bp-Molekulargewichtsstandard.

Anschließend wurden die Klone auf die Expression des humanen MT_2 -Rezeptors überprüft. Wie in Abbildung 9A ersichtlich, bildete sich das Transkript des humanen MT_2 -Rezeptors nur in den transfizierten Zellen. Die Spezifität des Primers für den humanen MT_2 -Rezeptor konnte gesichert werden, da sich kein Amplikon bei den INS-1-Ausgangszellen bildete, da sie nur den endogenen Ratten- MT_2 -Rezeptor exprimieren. Auch im Northern-Blot (Abb. 9B) konnte der humane MT_2 -Rezeptor nachgewiesen werden, da die h MT_2 -Rezeptor-spezifische DIG-Sonde nur mit der geblotteten RNA der transfizierten Zellen hybridisierte. Dieser Nachweis gelang nicht in den INS-1-Ausgangszellen und auch nicht in den Zellen eines Klons, die mit einem zuvor generierten Kontrollplasmid, ohne vollständige h MT_2 -Rezeptor-cDNA, transfiziert worden waren. Die Rehybridisierung des gleichen Filters mit einer β -Actin mRNA-spezifischen Sonde deutet auf Grund ähnlicher Signalstärke auf eine gleichmäßige Beladung der *Slots* hin. Durch den Northern-Blot konnte bei den h MT_2 -INS-1-Zellen ein Transkript nachgewiesen werden, welches etwas größer als deren 18S rRNA (1,8 kb) ist. Somit ist davon auszugehen, dass sie das komplette polyadenylierte, also funktionelle, Transkript des humanen MT_2 -Rezeptors enthalten. Roca und Mitarbeiter (1996) konnten im Northern Blot das Transkript des MT_1 -

Rezeptors der Maus mit einer Molekülgröße von 1,8 kb nachweisen. Da der MT_2 -Rezeptor bei Säugern gering exprimiert ist, ist er mit dieser Technik schwer nachzuweisen; somit fehlen Literaturbelege über dessen Molekülgröße. Ähnlich zu der von uns gefundenen Transkriptgröße fanden Park und Mitarbeiter (2006) ein 1,9 kb großes Transkript des MT_2 -Rezeptors beim Kaninchenfisch (*Siganus guttatus*). Die etwas größere Transkriptgröße des MT_2 -Rezeptors im Vergleich zum MT_1 -Rezeptor erklärt sich aus der größeren cDNA-Sequenz des MT_2 -Rezeptors (1662 bp in NM_005959 für *MTNR1B* versus 1105 bp in NM_005958 für *MTNR1A*). Für die immunzytochemische Markierung (Abb. 9C) wurde ein Antikörper verwendet, der an die dritte zytoplasmatische Domäne des humanen MT_2 -Rezeptors bindet. Mit diesem Antikörper ist auch der MT_2 -Rezeptor der Ratte nachweisbar. Es zeigte sich eine verstärkte Immunreaktivität der transfizierten Zellen im Vergleich zu den INS-1-Ausgangszellen; dies deutete auf den erhöhten Rezeptorbesatz der h MT_2 -INS-1-Zellen hin.

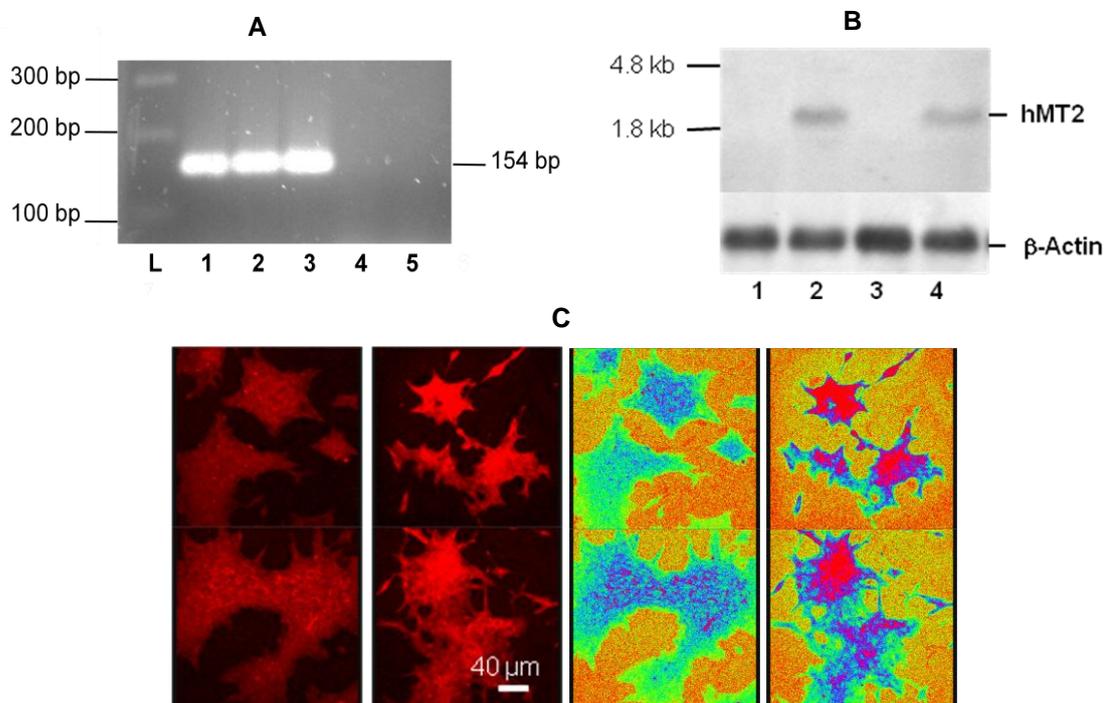


Abb. 9: Heterologe Expression des humanen MT_2 -Rezeptors in INS-1-Zellen

(A) Darstellung des RT-PCR-Produktes des humanen MT_2 -Rezeptors im 1,5% Agarose-Gel nach gelelektrophoretischer Auftrennung: mit dem humanen MT_2 -Rezeptor transfizierte INS-1-Zellen (h MT_2 -INS-1, 1-3), als Kontrolle INS-1-Ausgangszellen (4) sowie *Non Template Control* (5). (B) Der Northern Blot zeigt das komplette Transkript des humanen MT_2 -Rezeptors in den h MT_2 -INS-1-Zellen (2,4). Die Ausgangs-INS-1-Zellen (1) und die mit dem Kontrollplasmid transfizierten Zellen (3) zeigen keine Reaktion. (C) Immunzytochemische Darstellung des MT_2 -Rezeptors an INS-1-Zellen (links) und h MT_2 -INS-1-Zellen (Mitte links). Die Darstellung mit Falschfarben verdeutlicht die Unterschiede im Rezeptorbesatz von INS-1-Zellen (Mitte rechts) und h MT_2 -INS-1-Zellen (rechts). bp, Basenpaare; L, 100 bp-Molekulargewichtsstandard.

Wie aus Abbildung 10A ersichtlich, ist der MT_1 -Rezeptor in der INS-1-Ausgangszelle ca. 500-fach stärker exprimiert als der MT_2 -Rezeptor ($P = 0,0004$, $n = 7$ bis 13). Im Gegensatz zum MT_1 -Rezeptor-spezifischen Amplikon war das PCR-Produkt des endogenen MT_2 -Rezeptors auf dem Gel kaum nachweisbar (Abb. 10a). Somit ist davon auszugehen, dass die Melatoninwirkung auf die INS-1-Zelle überwiegend über den MT_1 -Rezeptor vermittelt wird. Nach Transfektion der Zellen mit dem humanen MT_2 -Rezeptor veränderte sich dieses Verhältnis zugunsten des MT_2 -Rezeptors. Die transfizierten Zellen wiesen nun eine ca. 190-fach höhere

Transkriptmenge des MT₂-Rezeptors im Vergleich zum MT₁-Rezeptor auf ($P = 0,0002$, $n = 8$ bis 13; Abb. 10B und 10b), wohingegen die relative mRNA-Konzentration des MT₁-Rezeptors durch die Transfektion unverändert blieb ($P = 0,082$, $n = 5$ bis 6; Abb. 10C und 10c). Da die endogene Expression des MT₂-Rezeptors sehr gering ist, kam es durch die Transfektion zu einer 10⁵-fachen Erhöhung der MT₂-Rezeptor-Expression ($P = 0,0009$, $n = 8$; Abb. 10D und 10d).

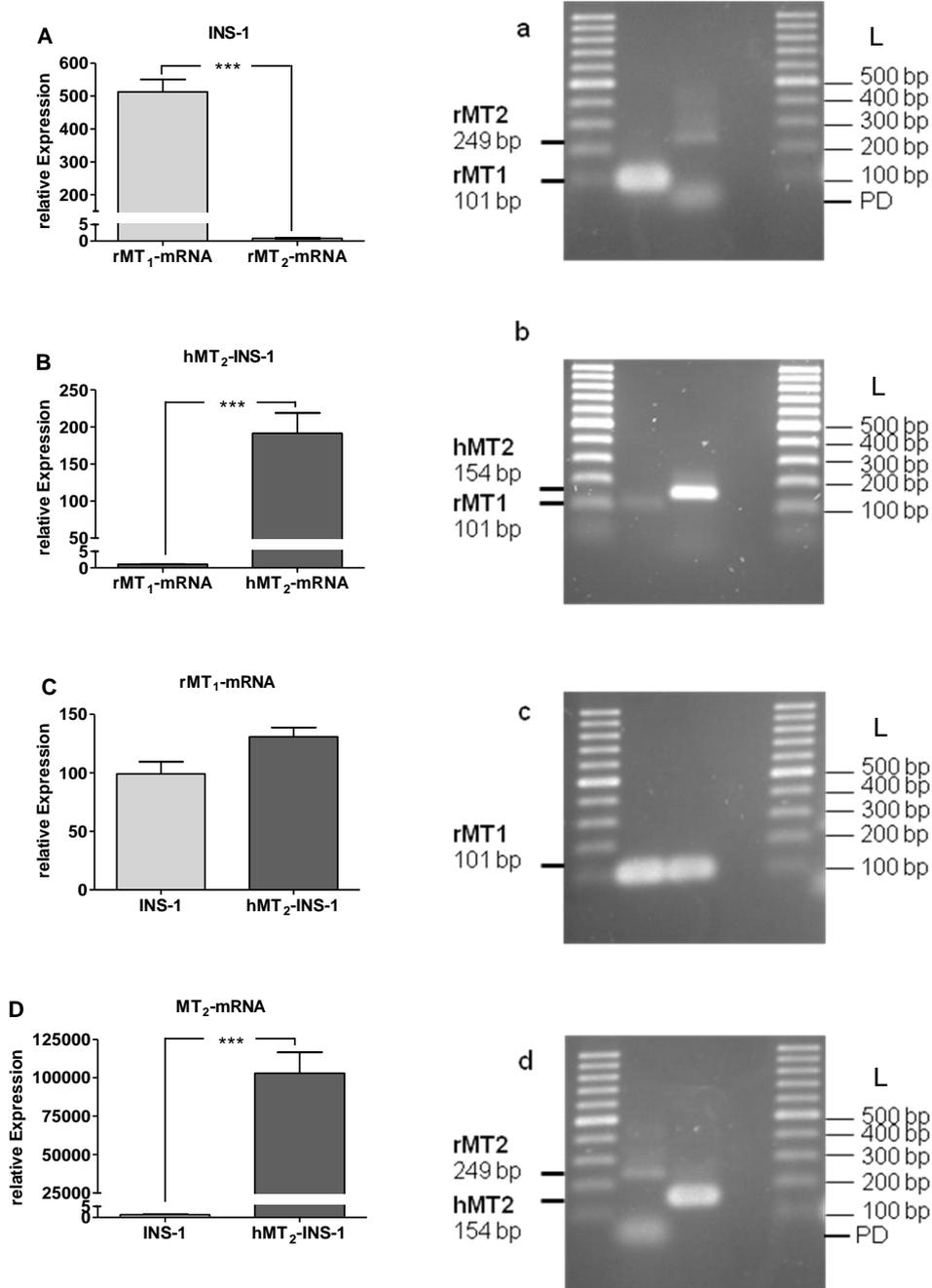


Abb. 10: Expressionsvergleich der Melatoninrezeptoren von INS-1- und hMT₂-INS-1-Zellen

(A-D, links) Quantitative Auswertung der RT-PCR Ergebnisse der relativen Expression des Melatoninrezeptors der Ratte Isoform 1 (rMT₁), Isoform 2 (rMT₂) oder des humanen MT₂-Rezeptors (hMT₂) in INS-1-Zellen und in den mit dem hMT₂-Rezeptor transfizierten INS-1-Zellen (hMT₂-INS-1). (a-d, rechts) Die korrespondierenden Gele zeigen die PCR-Produkte nach Gelelektrophorese und Ethidiumbromidfärbung. (A,a) Relative mRNA-Konzentrationen von MT₁- und MT₂-Rezeptoren in INS-1-Zellen. (B,b) Verhältnis der Transkriptmenge von MT₁- und MT₂-Rezeptoren in INS-1-Zellen nach Transfektion mit dem humanen MT₂-Rezeptor. (C,c) Vergleich der Expression des MT₁-Rezeptors bei INS-1- und hMT₂-INS-1-Zellen. (D,d) Vergleich der Expression des MT₂-Rezeptors in INS-1- und hMT₂-INS-1-Zellen. Die Balken repräsentieren Mittelwerte \pm SEM ($n = 5$ bis 13). *** $P < 0,001$; Mann-Whitney-*U*-Test. bp, Basenpaare; L, 100 bp-Molekulargewichtsstandard; PD, Primerdimere.

Als nächstes wurde das Expressionsniveau des hMT₂-Rezeptors in den stabil transfizierten Zellen bzw. den daraus selektierten Klonen geprüft. Im Vergleich zum Klongemisch wiesen einige Klone ein geringeres Expressionsniveau auf (nicht dargestellt), andere zeigten bis zu 2,6-fach höhere Transkriptlevel (Abb. 11A). Die Klone mit den höchsten mRNA-Konzentrationen wurden für weitere Untersuchungen ausgewählt. Dazu wurden die Zellen für 6 h mit Glukose stimuliert und gleichzeitig mit Melatonin inkubiert. Während die Insulinsekretion der INS-1-Zellen durch diese Inkubation um 20% reduziert wurde, reagierte Klon 8 mit einer 43%igen und somit signifikant stärkeren Senkung der Insulinsekretion ($P = 0,0003$, $n = 12$). Damit konnte gezeigt werden, dass eine Zunahme der MT₂-Rezeptor-Expression (Abb. 11A) auch zur Verstärkung der Melatoninwirkung auf die Insulinsekretion führt (Abb. 11B). Da Klon 8 die höchste Rezeptor-Expression aufwies, wurde er für alle nachfolgenden Untersuchungen verwendet.

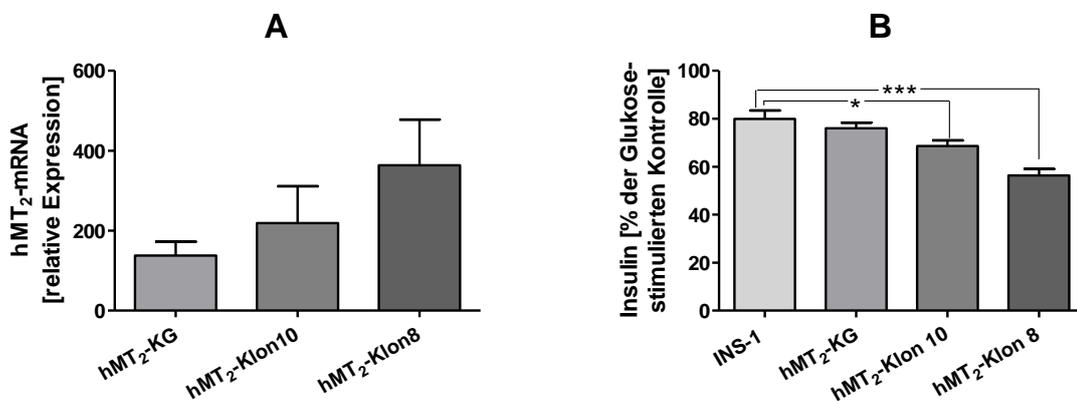


Abb. 11: Charakterisierung verschiedener hMT₂-INS-1-Klone

(A) Expressionsanalyse verschiedener mit dem humanen MT₂-Rezeptor transfizierter INS-1-Zellen (hMT₂-INS-1): Klongemisch (hMT₂-KG), Klon 10 (hMT₂-Klon10) und Klon 8 (hMT₂-Klon8). Die Balken repräsentieren Mittelwerte \pm SEM ($n = 6$ bis 9). (B) Insulinsekretion der INS-1-Zellen im Vergleich zur Insulinsekretion verschiedener hMT₂-INS-1-Klone nach 6-stündiger Inkubation mit 100 nM Melatonin. Die Balken repräsentieren Mittelwerte \pm SEM aus 3 unabhängigen Versuchen mit je $n = 4$ Batches (angegeben in Prozent relativ zu den 100%-gesetzten Glukose-stimulierten Zellen). * $P < 0,05$, *** $P < 0,001$; Mann-Whitney-U-Test.

3.1.2 Einfluss des hMT₂-Rezeptors auf die Expression der Insulingene und die basale Insulinsekretion

Da die Möglichkeit bestand, dass durch Expression des humanen MT₂-Rezeptors und dessen konstitutive Aktivität die Insulin-Expression und -sekretion der transfizierten β -Zellen beeinflusst wird, wurde zuerst die Expression der beiden Gene, die bei der Ratte für Insulin kodieren (*rlns1* und *rlns2*), untersucht. Im Vergleich zu den INS-1-Zellen zeigten die transfizierten Zellen keine signifikant veränderte Expression für *rlns1* ($P = 0,199$, $n = 15$; Abb. 12A). Auch die relative mRNA-Konzentration von *rlns2* war in beiden Gruppen annähernd gleich ($P = 0,111$, $n = 14$ bis 15 ; Abb. 12B). Zusätzlich wurde die basale Insulinsekretion der transfizierten Zellen mit der Insulinsekretion der INS-1-Ausgangszellen verglichen. Dazu wurde die Insulinkonzentration im Zellkulturüberstand nach 6 h Inkubation gemessen und auf die Proteinmenge der im *well*

enthaltenen Zellen bezogen. Es war kein Unterschied zwischen beiden Zelllinien nachweisbar ($P = 0,302$, $n = 9$; Abb. 12C).

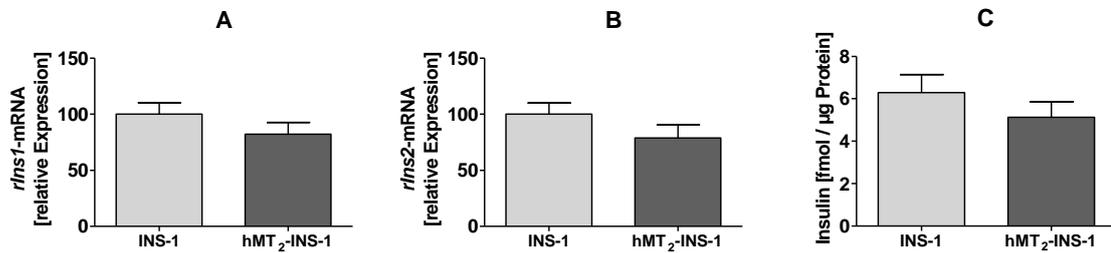


Abb. 12: Insulin-Expression und basale Insulinsekretion von INS-1- und hMT₂-INS-1-Zellen

(A + B) Vergleich der Expression der Insulingene der Ratte *rlns1* (A) und *rlns2* (B) von INS-1-Zellen und von mit dem humanen MT₂-Rezeptor transfizierten INS-1-Zellen (hMT₂-INS-1). Die Balken repräsentieren Mittelwerte ± SEM ($n = 14$ bis 15). (C) Basale Insulinsekretion von INS-1- und hMT₂-INS-1-Zellen bezogen auf deren Gesamtproteingehalt. Die Balken repräsentieren Mittelwerte ± SEM aus 3 unabhängigen Versuchen mit je $n = 3$ Batches.

3.1.3 Bedeutung des hMT₂-Rezeptors für die Insulinsekretion

Wie schon aus Superfusionsexperimenten und früheren *Batch*-Versuchen bekannt, senkt Melatonin die stimulierte Insulinsekretion. Auch im vorliegenden Versuch konnte gezeigt werden, dass eine 6-stündige Inkubation der INS-1-Zellen mit 1 nM Melatonin zu einer 22%igen Verminderung der Glukose-stimulierten Insulinsekretion führt ($P = 0,003$, $n = 11$; Abb. 13). Die Inkubation mit 100 nM Melatonin reduzierte die Insulinfreisetzung der INS-1-Zellen um 20% ($P = 0,003$, $n = 11$). Die hMT₂-INS-1-Zellen zeigten eine um 40% verminderte Insulinsekretion bei Inkubation mit 1 nM Melatonin ($P < 0,0001$, $n = 12$) und eine um 44% reduzierte Insulinfreisetzung bei 100 nM Melatonin ($P < 0,0001$, $n = 12$). Bei beiden Melatoninkonzentrationen wiesen die hMT₂-INS-1-Zellen im Vergleich zu den INS-1-Zellen eine statistisch signifikant verminderte Insulinsekretion nach Melatonininkubation auf ($P = 0,0151$ bei 1 nM, $P = 0,0003$ bei 100 nM). Somit konnte erstmals gezeigt werden, dass Melatonin auch über den humanen MT₂-Rezeptor die Glukose-stimulierte Insulinsekretion der β -Zelle senken kann.

Um auszuschließen, dass die verstärkte Reaktion auf Melatonin nicht durch das eingeführte Plasmid selbst vermittelt wird, wurden auch die Zellen, die mit einem Kontrollplasmid ohne komplette hMT₂-Rezeptor-cDNA (dem Rumpfplasmid oder Vektor) transfiziert wurden, in den Versuch eingeschlossen. Die Insulinsekretion dieser Zellen blieb sowohl bei Inkubation mit einer Melatoninkonzentration von 1 nM ($P = 0,1949$, $n = 8$; Abb. 13) als auch bei 100 nM ($P = 0,1949$, $n = 8$) unverändert. Bei gleichen Inkubationsbedingungen zeigten die Δ hMT₂-INS-1-Zellen verglichen mit den INS-1-Ausgangszellen eine signifikant verminderte Reaktion auf die Melatonininkubation ($P = 0,0352$ bei 1 nM, $P = 0,352$ bei 100 nM). Somit wiesen die Δ hMT₂-INS-1-Zellen auch im Vergleich zu den hMT₂-INS-1-Zellen eine signifikant verminderte Reaktion auf die Melatonininkubation auf ($P = 0,0014$ bei 1 nM, $P = 0,0002$ bei 100 nM).

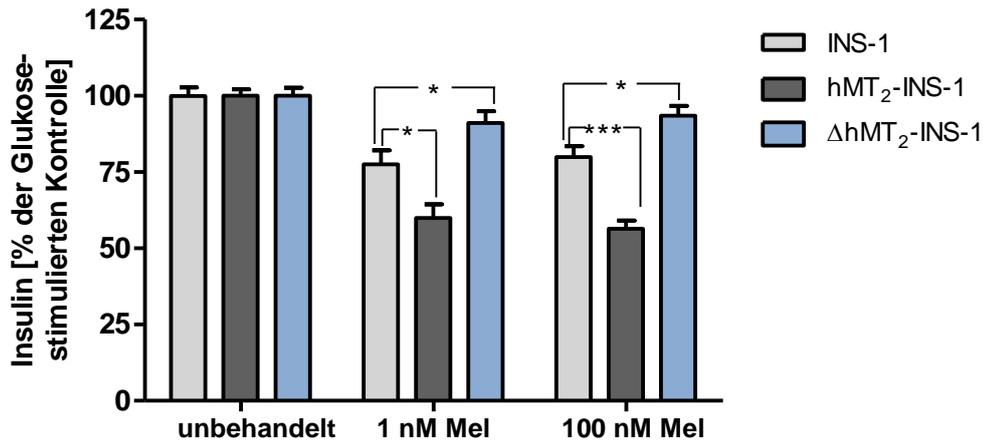


Abb. 13: Wirkung von Melatonin auf die Glukose-stimulierte Insulinsekretion von INS-1-, hMT₂-INS-1- und ΔhMT₂-INS-1-Zellen

Insulinsekretion der INS-1-Zellen im Vergleich zur Insulinsekretion der mit dem humanen MT₂-Rezeptor transfizierten INS-1-Zellen (hMT₂-INS-1) und der mit dem Kontrollplasmid transfizierten Zellen (ΔhMT₂-INS-1) nach 6-stündiger Inkubation mit 1 nM Melatonin (Mel) oder 100 nM Melatonin. Die Balken repräsentieren Mittelwerte ± SEM aus 3 unabhängigen Versuchen mit je n = 2 - 4 *Batches* (angegeben in Prozent relativ zu den 100%-gesetzten Glukose-stimulierten Zellen). * P < 0,05 und *** P < 0,001; Mann-Whitney-U-Test.

Als nächstes wurde die Wirkung des MT₂-Rezeptor-selektiven Antagonisten 4P-PDOT untersucht (Abb. 14). Während die Insulinsekretion der INS-1-Zellen nach 6-stündiger Inkubation mit 1 nM 4P-PDOT nahezu gleich blieb (P = 0,0659, n = 11), wurde die der hMT₂-INS-1-Zellen signifikant gesenkt (P = 0,0002, n = 11). Der Unterschied in der Reaktion der beiden Zelllinien war signifikant (P = 0,0004). In diesem Versuch war die Insulinsekretion der INS-1-Zellen nach 6 h Inkubation mit 1 nM Melatonin um 11% vermindert (P = 0,0417, n = 11), während die Insulinfreisetzung der hMT₂-INS-1-Zellen um 30% reduziert war (P < 0,0001, n = 11). Verglichen mit den INS-1-Zellen zeigten die hMT₂-INS-1-Zellen eine 3-fach stärkere Verringerung der Insulinsekretion (P = 0,0006).

Der Einsatz des MT₂-Rezeptor-Antagonisten 4P-PDOT sollte die insulinsenkende Melatoninwirkung aufheben. Stattdessen führte eine 30-minütige Vorinkubation mit 1 nM 4P-PDOT und eine anschließende Koinkubation von Melatonin (1 nM) und 4P-PDOT (1 nM) zu einer weiteren Senkung der Insulinfreisetzung der INS-1-Zellen um 40% (P < 0,0001, n = 11) und der hMT₂-INS-1-Zellen um 41% (P < 0,0001, n = 11). Verglichen mit den Zellen, die nur mit Medium inkubiert wurden, war die Insulinsekretion der INS-1-Zellen durch die Koinkubation mit Melatonin und 4P-PDOT um 52% (P < 0,0001) und die der hMT₂-INS-1-Zellen um 71% (P < 0,0001) reduziert. Auf diese Inkubationsbedingungen reagierten die hMT₂-INS-1-Zellen signifikant stärker als die INS-1-Zellen (P = 0,0025).

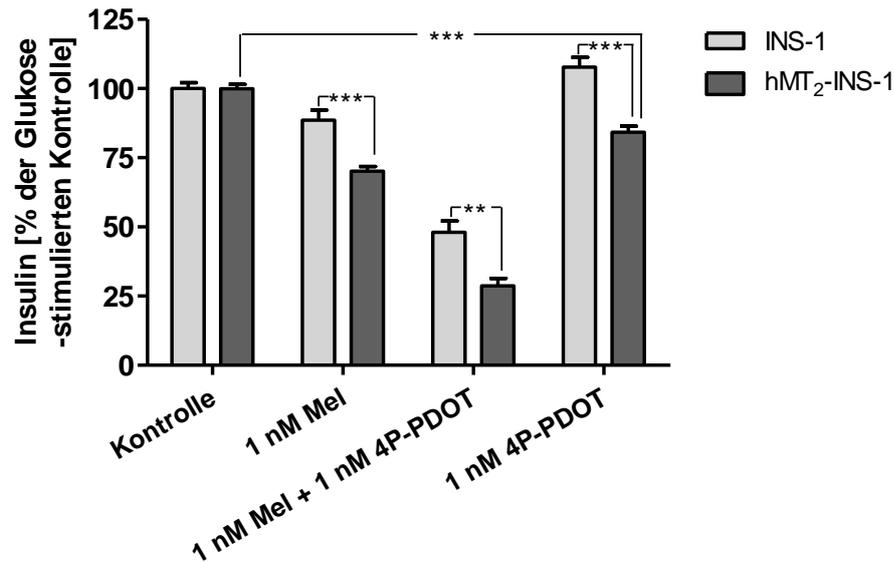


Abb. 14: Einfluss von 4P-PDOT auf die Insulinsekretion von INS-1- und hMT₂-INS-1-Zellen

Insulinsekretion der INS-1-Zellen im Vergleich zur Insulinsekretion der mit dem humanen MT₂-Rezeptor transfizierten INS-1-Zellen (hMT₂-INS-1) nach 6-stündiger Inkubation mit 1 nM Melatonin (Mel) oder 4P-PDOT sowie Koinkubation von Melatonin und 4P-PDOT. Die Balken repräsentieren Mittelwerte \pm SEM aus 3 unabhängigen Versuchen mit je $n = 3$ bis 4 *Batches* (angegeben in Prozent relativ zu den 100%-gesetzten Glukose-stimulierten Zellen). ** $P < 0,01$ und *** $P < 0,001$; Mann-Whitney-U-Test.

Um Melatonin-abhängige intrazelluläre Prozesse gezielt steuern zu können, wurde versucht, eine weitere β -Zelllinie zu generieren, die erst nach Tetracyclininkubation den humanen MT₂-Rezeptor exprimiert. Dazu wurden die INS-1-Zellen zuerst mit dem pcDNA6/TR-Plasmid transfiziert, welches neben dem Blastocidin-Resistenzgen den Tetracyclin-Repressor (TetR) konstitutiv unter Kontrolle des eukaryontischen CMV Promotors exprimiert. Nach Selektion dieser Zellen mit Blastocidin (2,5 $\mu\text{g/ml}$) und Expansion der Kolonien, wurde die mRNA-Expression des Blastocidin-Resistenzgens dieser Klone mittels RT-PCR untersucht. Wie in Abbildung 15A dargestellt, konnten die Transkripte des Blastocidin-Resistenzgens in den transfizierten Zellen nachgewiesen werden. Die Transkripte belegen die Aktivierung des Gens in den transfizierten Zellen, welche deren Blastocidinresistenz bedingt. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass diese Zellen den Tetracyclin-Repressor exprimieren (Abb. 15C). Außerdem wurde die Integration des pcDNA6/TR-Plasmids ins INS-1-Genom belegt, indem sowohl das Blastocidin-Resistenzgen (Abb. 15B) als auch das Tetracyclin-Repressorgen (Abb. 15D) in der DNA der transfizierten Zellen durch PCR und anschließende Gelelektrophorese nachgewiesen werden konnte.

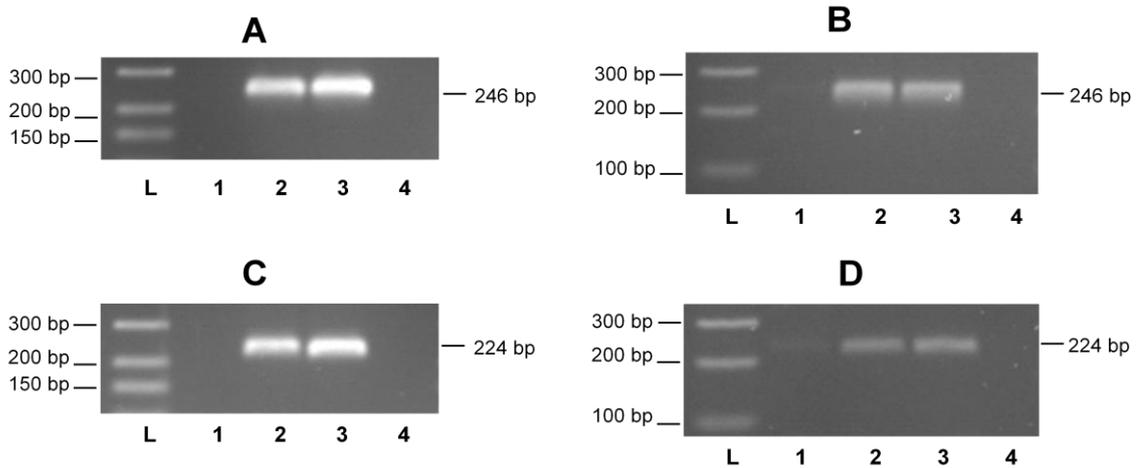


Abb. 15: Nachweis der Integration des pcDNA6/TR-Plasmids ins INS-1-Genom sowie Expression des Blasticidin-Resistenzgens und des TetR Gens

(A) Darstellung des RT-PCR-Produktes des Blasticidin-Resistenzgens im 1,5% Agarose-Gel nach gelelektrophoretischer Auftrennung und anschließender Ethidiumbromidfärbung: INS-1-Ausgangszellen (1), mit dem pcDNA6/TR-Plasmid transfizierte INS-1-Zellen (2 und 3) sowie *Non Template Control* (4). (B) Das Agarose-Gel zeigt das Amplikon des Blasticidin-Resistenzgens nach PCR mit genomischer DNA von INS-1-Ausgangszellen (1) und von mit dem pcDNA6/TR-Plasmid transfizierten INS-1-Zellen (2 und 3) sowie die *Non Template Control* (4). (C) Darstellung des RT-PCR-Produktes des Tetracyclin-Repressors (TetR) im 1,5% Agarose-Gel nach Gelelektrophoretischer Auftrennung und anschließender Ethidiumbromidfärbung: INS-1-Ausgangszellen (1), mit dem pcDNA6/TR-Plasmid transfizierte INS-1-Zellen (2 und 3) sowie *Non Template Control* (4). (D) Das Agarose-Gel zeigt das PCR-Produkt des Tetracyclin-Repressors (TetR) nach Gelelektrophorese und Ethidiumbromidfärbung: DNA von INS-1-Ausgangszellen (1), DNA von mit dem pcDNA6/TR-Plasmid transfizierte INS-1-Zellen (2 und 3) sowie die *Non Template Control* (4). bp, Basenpaare; L, 100 bp-Molekulargewichtsstandard.

Im Anschluss wurde derjenige Klon ausgewählt, der das höchste Niveau der Tetracyclin-Repressor-mRNA aufwies. Dieser wurde nachfolgend zusätzlich mit dem pT-REX-DEST30-Plasmid, welches die cDNA des humanen MT₂-Rezeptors enthält, transfiziert. Diese Zellen wurden sowohl mit Blasticidin (1 µg/ml) als auch mit G418 (100 µg/ml) selektiert. Nach Expansion der entstandenen Kolonien wurden die Klone (mit Tet-hMT₂-INS-1 bezeichnet) für 24 h mit Tetracyclin (1 µg/ml) inkubiert. Tetracyclin soll im eingesetzten T-REXTM-System die Transkription des humanen MT₂-Rezeptors induzieren, indem es an Tetracyclin-Repressor Homodimere bindet, was zu einer Konformationsänderung des Tetracyclin-Repressors führt und damit dessen Bindung an den Tetracyclin-Operator verhindert (Yao et al., 1998). Als Folge wird die Transkription ermöglicht. Durch RT-PCR-Analyse wurde untersucht, ob die Klone nach der Tetracyclin-Induktion eine erhöhte Expression des humanen MT₂-Rezeptors aufweisen. Abbildung 16A zeigt, dass Tetracyclininkubation zu einer 12-fach gesteigerten Expression des humanen MT₂-Rezeptors führte (P = 0,0003, n = 9).

Im Folgenden wurden die verschiedenen Zelllinien ohne zusätzliche Stimulation für 6 h mit verschiedenen Melatoninkonzentrationen (1 nM und 100 nM) inkubiert; die Ergebnisse sind folgend beschrieben und in Abbildung 16B dargestellt. Die Insulinsekretion der INS-1-Zellen konnte unter diesen Inkubationsbedingungen weder mit 1 nM (P = 0,2642, n = 11) noch mit 100 nM Melatonin (P = 0,5493, n = 10) signifikant gesenkt werden. Wohingegen die Insulinfreisetzung der hMT₂-INS-1-Zellen durch die Inkubation mit 1 nM Melatonin um 24% (P = 0,0003, n = 11) und mit 100 nM um 27% (P < 0,0001, n = 11) gesenkt wurde. Verglichen mit den INS-1-Zellen reagierten die gentechnisch modifizierten hMT₂-INS-1-Zellen auf die

Melatonininkubation bei beiden Melatoninkonzentrationen mit einer signifikant stärkeren Senkung der Insulinsekretion ($P = 0,0058$ bei 1nM, $P = 0,0028$ bei 100 nM). Daraus ergab sich, dass Melatonin über den hMT₂-Rezeptor die Insulinsekretion der β -Zelle auch ohne vorherige Stimulation senken kann.

Die Tet-hMT₂-INS-1-Zellen zeigten bei Inkubation mit 1 nM Melatonin eine um 27% verminderte Insulinfreisetzung ($P < 0,0001$, $n = 12$) und bei Inkubation mit 100 nM Melatonin eine Reduktion um 26% ($P = 0,0014$, $n = 12$). Durch die eingesetzten Melatoninkonzentrationen wurde die Insulinfreisetzung dieser Zellen signifikant stärker gesenkt als die der INS-1-Zellen ($P = 0,0006$ bei 1nM, $P = 0,0192$ bei 100 nM), da die Tet-hMT₂-INS-1-Zellen auch ohne Induktion den humanen MT₂-Rezeptor exprimierten (Daten nicht gezeigt). Diese basale Rezeptor-Expression war ausreichend, um die Melatoninwirkung zu verstärken. Zudem zeigten die Tet-hMT₂-INS-1-Zellen nach 24-stündiger Behandlung mit 1 μ g Tetracyclin pro ml Medium eine um 33% geringere Insulinsekretion als die gleichen Zellen ohne Tetracyclinbehandlung ($P < 0,0001$, $n = 12$). Offensichtlich senkte allein die Tetracyclininkubation die Insulinsekretion. Die Insulinsekretion der Tetracyclin-induzierten Tet-hMT₂-INS-1-Zellen wurde weder durch Inkubation mit 1 nM ($P = 0,3122$, $n = 12$) noch 100 nM Melatonin ($P = 0,3707$, $n = 12$) signifikant vermindert. Im Vergleich zu den Tet-hMT₂-INS-1-Zellen zeigten die Tetracyclin-induzierten Tet-hMT₂-INS-1-Zellen bei Inkubation mit 1 nM Melatonin eine um 13% signifikant reduzierte Insulinsekretion ($P = 0,0194$), während bei Inkubation mit 100 nM kein Unterschied in der Insulinsekretion der beiden Zelllinien nachzuweisen war ($P = 0,1410$). Verglichen mit den INS-1-Zellen reagierten die Tetracyclin-induzierten Tet-hMT₂-INS-1-Zellen auf die Melatonininkubation bei beiden Melatoninkonzentrationen mit einer signifikant stärkeren Senkung der Insulinsekretion ($P < 0,001$).

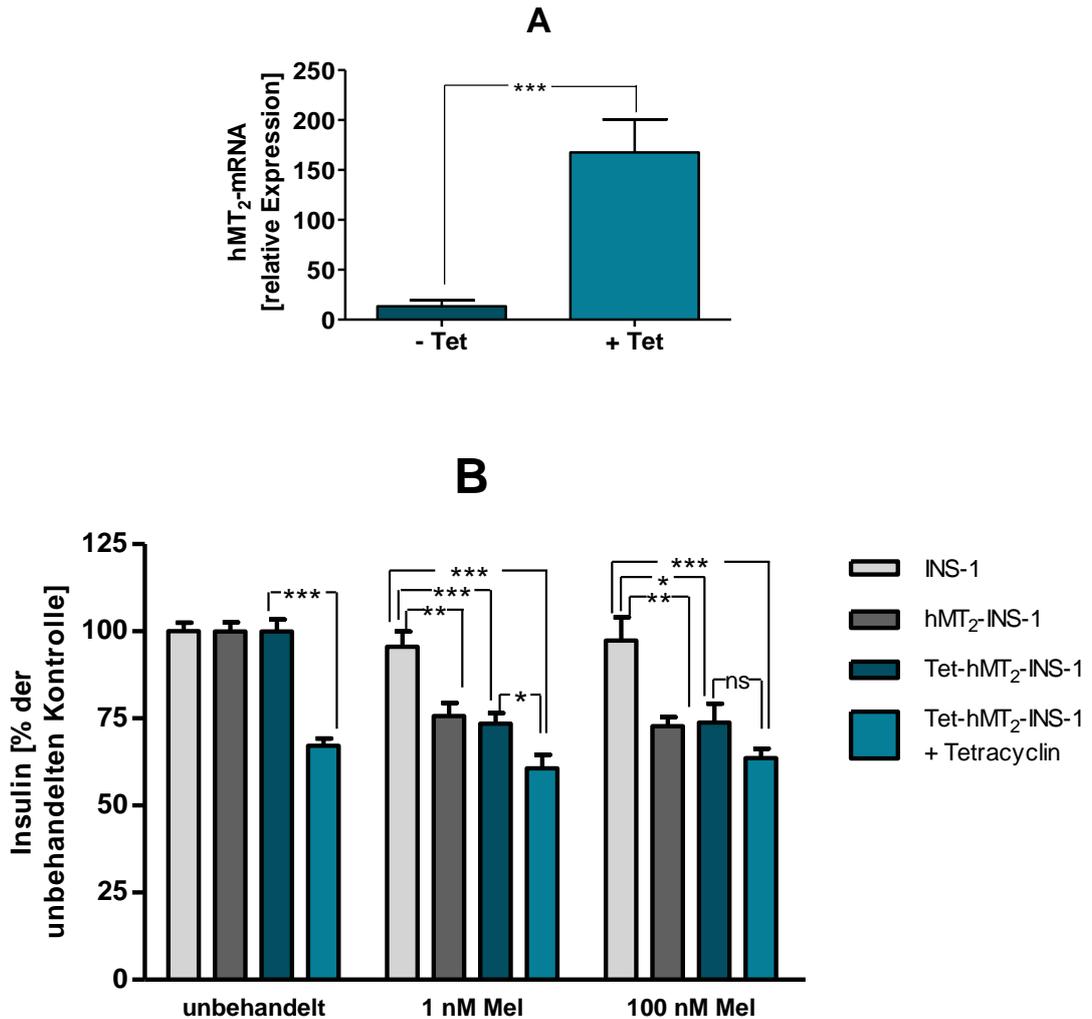


Abb. 16: Tetracyclinregulierbare hMT₂-Rezeptor-Expression

(A) Expressionsanalyse des humanen MT₂-Rezeptors (hMT₂) in Zellen, die sowohl mit dem Tetracyclin-Repressor als auch mit dem humanen MT₂-Rezeptor transfiziert wurden (Tet-hMT₂-INS-1). Gezeigt ist der Vergleich der basalen Expression (-Tet) und der Expression nach Tetracyclin-Induktion (24-stündige Behandlung mit 1 µg Tetracyclin pro ml Medium; +Tet). Die Balken repräsentieren Mittelwerte ± SEM (n = 9). (B) Insulinsekretion der INS-1-Zellen im Vergleich zur Insulinsekretion der mit dem humanen MT₂-Rezeptor transfizierten INS-1-Zellen (hMT₂-INS-1), der Tet-hMT₂-INS-1-Zellen sowie der Tet-hMT₂-INS-1-Zellen mit Tetracyclin-Induktion nach 6-stündiger Inkubation mit verschiedenen Melatoninkonzentrationen (Mel, 1 nM, 100 nM). Die Balken repräsentieren Mittelwerte ± SEM aus 3 unabhängigen Versuchen mit je n = 3 bis 4 *Batches* (angegeben in Prozent relativ zu den 100%-gesetzten unbehandelten Zellen). * P < 0,05, ** P < 0,01 und *** P < 0,001; Mann-Whitney-U-Test.

Der unspezifische Phosphodiesterase-Hemmer IBMX hemmt den Abbau der *second messenger* cAMP und cGMP. In der β-Zelle führt der Anstieg der Konzentrationen der *second messenger* zu einer gesteigerten Insulinsekretion. Verglichen mit den Zellen, die mit Kontrollmedium behandelt wurden, führte die 6-stündige Inkubation der INS-1-Zellen mit 10 µM IBMX zu einer Steigerung der Insulinsekretion um 45% (P = 0,0002, n = 8; Abb. 17A). Die gleiche Inkubation der hMT₂-INS-1-Zellen erhöhte deren Insulinfreisetzung um 39% (P < 0,0001, n = 12). Die gleichzeitige Inkubation der INS-1-Zellen mit einer physiologischen Melatoninkonzentrationen von 100 pM Melatonin führte zu einer leichten jedoch nicht signifikanten Senkung der Insulinsekretion von 9% (P = 0,1605, n = 8). Die Reduktion betrug 8% bei Koinkubation mit 1 nM Melatonin (P = 0,1575, n = 12). Erst durch höhere

Melatoninkonzentrationen konnte die Insulinsekretion der INS-1-Zellen signifikant gesenkt werden. So führte die Koinkubation der INS-1-Zellen mit IBMX und 10 nM Melatonin zu einer 17%igen Reduktion der Insulinfreisetzung ($P = 0,0289$, $n = 7$) und die Koinkubation mit 100 nM Melatonin zu einer Senkung um 17% ($P = 0,0148$, $n = 8$). Hingegen zeigten die hMT₂-INS-1-Zellen schon bei gleichzeitiger Inkubation von 10 μ M IBMX und 100 pM Melatonin eine um 21% verminderte Insulinsekretion ($P = 0,0007$, $n = 12$). Die Koinkubation dieser Zellen mit 1 nM Melatonin senkte die Insulinsekretion um 35% ($P < 0,0001$, $n = 11$). Eine weitere Erhöhung der Melatoninkonzentration führte zu einer Senkung der Insulinfreisetzung um 41% bei 10 nM ($P = 0,0005$, $n = 7$) und um 39% bei Einsatz von 100 nM ($P < 0,0001$, $n = 12$). Die Insulinsekretion der hMT₂-INS-1-Zellen wurde also im Vergleich zu derjenigen der INS-1-Zellen sowohl durch physiologische ($P = 0,0409$ bei 100 pM) als auch pharmakologische Melatoninkonzentrationen ($P < 0,0001$ bei 1 nM, $P = 0,0006$ bei 10 nM, $P = 0,0004$ bei 100 nM) signifikant stärker gesenkt. Folglich konnte erstmals gezeigt werden, dass Melatonin über den humanen MT₂-Rezeptor die IBMX-stimulierte Insulinsekretion der β -Zelle senken kann.

Um zu untersuchen ob der heterolog exprimierte hMT₂-Rezeptor an inhibitorische G-Proteine der INS-1-Zelle koppelt, wurden die Zellen mit dem G_i-Protein Blocker PTX vorbehandelt. Nach 24-stündiger Vorinkubation mit 250 ng/ml PTX erfolgte eine 6-stündige Inkubation mit 10 μ M IBMX oder eine Koinkubation mit 10 μ M IBMX und 1 nM Melatonin (Abb. 17B). Im Vergleich zur alleinigen IBMX-Inkubation wurde die Insulinsekretion der INS-1-Zellen bei der Koinkubation nur gering um 4% reduziert ($P = 0,3527$, $n = 10$), während die der hMT₂-INS-1-Zellen signifikant um 8% gesenkt wurde ($P = 0,0021$, $n = 10$). Der Unterschied in der Reaktion der beiden Zelllinien war jedoch nicht signifikant ($P = 0,1051$). Obwohl Melatonin auch nach der PTX-Vorinkubation die Insulinsekretion der hMT₂-INS-1-Zellen noch signifikant senken konnte, führte die PTX-Behandlung dennoch zu einer deutlich verminderten Melatoninwirkung bei den hMT₂-INS-1-Zellen (35%ige Senkung ohne PTX vs. 8% Senkung mit PTX), daher ist von einer G_i-Protein-Kopplung des heterolog exprimierten hMT₂-Rezeptors in der INS-1-Zelle auszugehen.

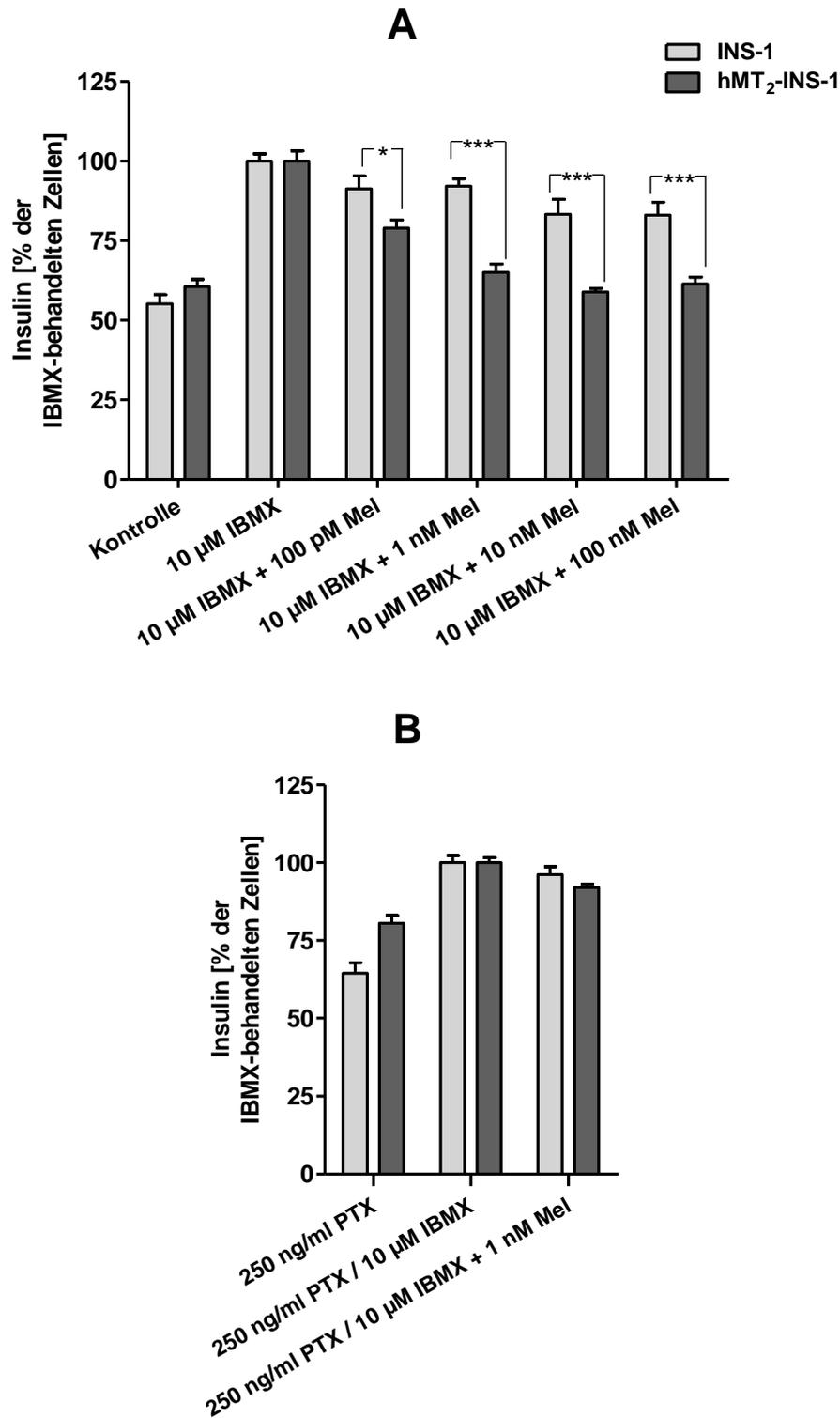


Abb. 17: Einfluss von PTX auf die Insulinsekretion von INS-1- und hMT₂-INS-1-Zellen

(A) Insulinsekretion der INS-1-Zellen im Vergleich zur Insulinsekretion der mit dem humanen MT₂-Rezeptor transfizierten INS-1-Zellen (hMT₂-INS-1) nach 6-stündiger Inkubation mit 10 µM IBMX oder Koinkubation mit 10 µM IBMX und verschiedenen Melatoninkonzentrationen (Mel, 100 pM, 1 nM, 10 nM, 100 nM). (B) Insulinsekretion der INS-1-Zellen im Vergleich zur Insulinsekretion der hMT₂-INS-1-Zellen nach 24-stündiger Vorinkubation mit 250 ng PTX und anschließender 6-stündiger Inkubation mit 10 µM IBMX oder Koinkubation 10 µM IBMX und 1 nM Melatonin. Die Balken repräsentieren Mittelwerte ± SEM aus 3 unabhängigen Versuchen mit je n = 2 bis 4 *Batches* (angegeben in Prozent relativ zu den 100%-gesetzten IBMX behandelten Zellen). * P < 0,05 und *** P < 0,001; Mann-Whitney-U-Test.

Aus Versuchen anderer Arbeitsgruppen ist bekannt, dass PTX durch Adenosindiphosphat-Ribosylierung die α -Untereinheiten ausschließlich von G_i -Proteinen modifiziert und beispielsweise die G_i -abhängige Melatonin-signaltransduktion hemmt. Im Folgenden wurde untersucht, welche der 3 bekannten α -Untereinheiten der G_i -Proteine in der INS-1-Zelle exprimiert sind. Es konnten die Transkripte aller 3 α -Untereinheiten in der INS-1-Zelle nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Abbildung 18 zeigt, dass die α_2 -Untereinheit am stärksten exprimiert wird. Dabei war die Expression der α_2 -Untereinheit ca. 5-fach so hoch wie die der α_1 -Untereinheit ($P = 0,0009$, $n = 8$) und ca. 2,8-fach so hoch wie die der α_3 -Untereinheit ($P = 0,0006$, $n = 8$).

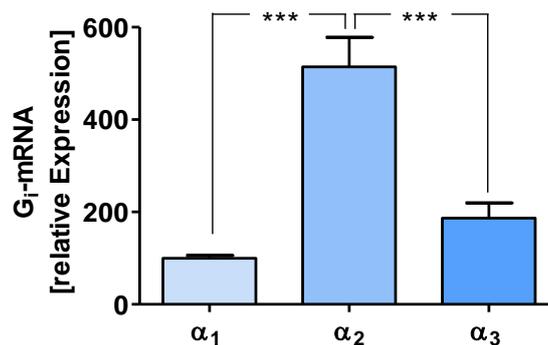


Abb. 18: Expressionsvergleich der G_i -Proteine in INS-1-Zellen

Relative mRNA-Konzentrationen der α -Untereinheiten 1-3 (α_{1-3}) der inhibitorischen G-Proteine (G_i) in INS-1-Zellen. Die Balken repräsentieren Mittelwerte \pm SEM ($n = 8$).

3.1.4 hMT₂-Rezeptor assoziierte Signalwege in der β -Zelle

Um zu untersuchen, über welche Signaltransduktionskaskaden die inhibierende Wirkung des hMT₂-Rezeptors auf die Insulinsekretion ausgeübt wird, wurden zusätzlich zur Insulinkonzentration die Konzentrationen der *second messenger* cAMP und cGMP bestimmt. Da cAMP und cGMP in den Zellen schnell durch Phosphodiesterasen abgebaut werden, wurde auch hier der unspezifische Phosphodiesterashemmer IBMX eingesetzt. Die 1-stündige Inkubation von INS-1-Zellen mit 1 mM IBMX führte zu einer ca. 5-fach höheren cAMP-Konzentration ($P = 0,0003$, $n = 11$; Abb. 19A), während sie bei den hMT₂-INS-1-Zellen zu einer ca. 11-fach höheren cAMP-Konzentration ($P = 0,0001$, $n = 11$) führte. Die Koinkubation von INS-1-Zellen mit 1 mM IBMX und 1 nM Melatonin führte zu einer Reduktion der cAMP-Konzentration um 25% ($P = 0,0001$, $n = 10$). Die gleichzeitige Inkubation mit 100 nM Melatonin reduzierte die cAMP-Konzentration sogar um 37% ($P = 0,0001$, $n = 10$). Die cAMP-Konzentration von hMT₂-INS-1-Zellen wurde durch Koinkubation mit 1 nM Melatonin um 54% ($P = 0,0001$, $n = 11$) und durch 100 nM Melatonin um 53% ($P = 0,0003$, $n = 10$) reduziert. Somit trat bei den hMT₂-INS-1-Zellen bei beiden Melatoninkonzentrationen eine stärkere Senkung des IBMX-stimulierten intrazellulären cAMPs auf, als bei den INS-1-Ausgangszellen ($P = 0,0001$ bei 1 nM, $P = 0,0068$ bei 100 nM).

Eine 1-stündige Inkubation von INS-1-Zellen mit 1 mM IBMX führte zu einer 15%igen, jedoch nicht signifikanten Erhöhung der gesamtzellulären cGMP-Konzentration ($P = 0,2055$, $n = 10$;

Abb. 19B), während durch diese Inkubation die gesamtzelluläre cGMP-Konzentration der hMT₂-INS-1-Zellen signifikant um 23% anstieg (P = 0,0206, n = 9). Die gleichzeitige Inkubation der INS-1-Zellen mit 1 mM IBMX und 1 nM Melatonin veränderte deren cGMP-Konzentration kaum (P = 0,8749, n = 6). Die gleiche Behandlung der hMT₂-INS-1-Zellen führte jedoch zu einer 43% Senkung der cGMP-Konzentration (P = 0,0120, n = 6). Der Unterschied zwischen INS-1- und hMT₂-INS-1-Zellen in der Reaktion auf diese Koinkubation war signifikant (P = 0,0411).

Parallel zu den *second messengern* wurde die Insulinkonzentration im Zellkulturüberstand der behandelten Zellen bestimmt. Die 1-stündige Inkubation der INS-1-Zellen mit 1 mM IBMX erhöhte deren Insulinsekretion um 63% (P < 0,0001, n = 10) und die der hMT₂-INS-1-Zellen um 60% (P < 0,0001, n = 10). Weder die Koinkubation der INS-1-Zellen mit 1 nM Melatonin (P = 0,9698, n = 10) noch die gleichzeitige Inkubation mit 100 nM Melatonin (P = 0,6230, n = 10) veränderten die Insulinsekretion dieser Zellen. Während die Koinkubation der hMT₂-INS-1-Zellen mit 1 mM IBMX und 1 nM Melatonin deren Insulinfreisetzung um 38% reduzierte (P < 0,0001, n = 10) und eine Koinkubation mit 100 nM Melatonin zu einer 47%igen Senkung der Insulinsekretion führte (P < 0,0001, n = 10). Somit konnte gezeigt werden, dass beide getesteten Melatoninkonzentrationen bei den hMT₂-INS-1-Zellen zu einer stärkeren Senkung des IBMX-stimulierten cAMPs und cGMPs führten als bei den INS-1-Ausgangszellen; dies resultierte dann auch in einer stärkeren Senkung der IBMX-stimulierten Insulinsekretion der hMT₂-INS-1-Zellen im Vergleich zu den INS-1-Zellen (P < 0,0001). Damit konnte belegt werden, dass die Senkung der Insulinsekretion durch den hMT₂-Rezeptor über eine Reduktion der cAMP- und cGMP-Konzentrationen vermittelt wird.

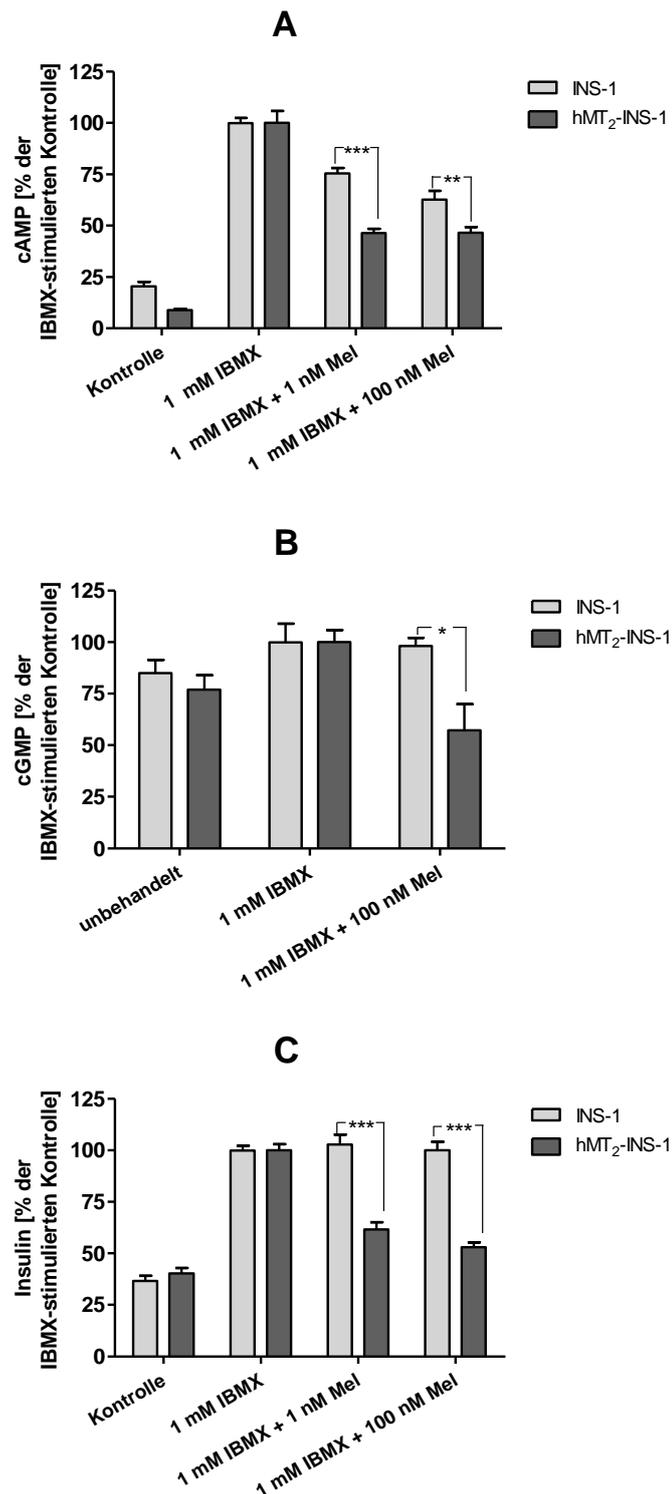


Abb. 19: cAMP- und cGMP-Konzentration sowie Insulinsekretion von INS-1- und hMT₂-INS-1-Zellen

(A) Intrazelluläre cAMP-Konzentration der INS-1-Zellen im Vergleich zur intrazellulären cAMP-Konzentration der mit dem humanen MT₂-Rezeptor transfizierten INS-1-Zellen (hMT₂-INS-1) nach 1-stündiger Inkubation mit 1 mM IBMX oder Koinkubation von 1 mM IBMX und verschiedenen Melatoninkonzentrationen (Mel, 1 nM, 100 nM). (B) Vergleich der gesamtzellulären cGMP-Konzentration der INS-1-Zellen und der hMT₂-INS-1-Zellen nach 1-stündiger Inkubation mit 1 mM IBMX oder Koinkubation mit 1 mM IBMX und 100 nM Melatonin. (C) Insulinsekretion der INS-1-Zellen verglichen mit hMT₂-INS-1-Zellen nach 1-stündiger Inkubation mit 1 mM IBMX oder Koinkubation von 1 mM IBMX und verschiedenen Melatoninkonzentrationen (1 nM, 100 nM). Die Balken repräsentieren Mittelwerte ± SEM aus 3 unabhängigen Versuchen mit je n = 2 bis 4 Batches (angegeben in Prozent relativ zu den 100%-gesetzten mit IBMX behandelten Zellen). * P < 0,05, ** P < 0,01, *** P < 0,001; Mann-Whitney-U-Test.

Aus zurückliegenden Versuchen der Arbeitsgruppe ist bekannt, dass Melatonin zu einer Auslösung der IP_3 -Kaskade und nachfolgend, durch Stimulation von zellulären IP_3 -Rezeptoren am Endoplasmatischen Retikulum, zu einer IP_3 -medierten Ca^{2+} -Freisetzung führen kann. Diese Versuche wurden an INS-1-Zellen durchgeführt, die hauptsächlich den MT_1 -Rezeptor exprimieren (siehe oben). Es wurde deshalb vermutet, dass diese Melatoninwirkung über den MT_1 -Rezeptor vermittelt wird. Im Folgenden sollte nun untersucht werden, ob auch durch den humanen MT_2 -Rezeptor die Kalziumkonzentration der Zelle beeinflusst werden kann. Dazu wurden die Zellen in einer Perfusionskammer mit den kalziumsensitiven Fluoreszenzfarbstoffen *Calcium Green-1* und *Fura Red* beladen. Während der Messung wurden die Zellen für 3 min mit 1 μ M Melatonin stimuliert. Dabei wurden die Fluoreszenzintensitäten beider Farbstoffe nach Anregung durch einen Argonionenlaser detektiert. Das Verhältnis der Fluoreszenzintensitäten ist ein Maß für die Änderung der Kalziumionenkonzentration. Abbildung 20A zeigt Beispiele, wie einzelne der INS-1-Zellen auf die Melatoninbehandlung mit einer Erhöhung der Kalziumionenkonzentration reagierten. Bei einem Teil der h MT_2 -INS-1-Zellen führte die Melatonininkubation ebenfalls zu einem Anstieg des intrazellulären Kalziums (Abb. 20B). Diese Erhöhung der Kalziumionenkonzentration bei Melatoninbehandlung zeigten 32% der INS-1-Zellen und 34% der h MT_2 -INS-1-Zellen (Abb. 20C). Darüber hinaus wurde überprüft, wie viele Zellen eine spontane Aktivität, also eine Änderung der intrazellulären Kalziumkonzentration ohne Stimulation, zeigen. Von den INS-1-Zellen reagierten 35% spontan wohingegen nur 18% der h MT_2 -INS-1-Zellen diese spontane Aktivität zeigten. Der Unterschied der beiden Zelllinien war signifikant ($P = 0,0191$; Abb. 20D).

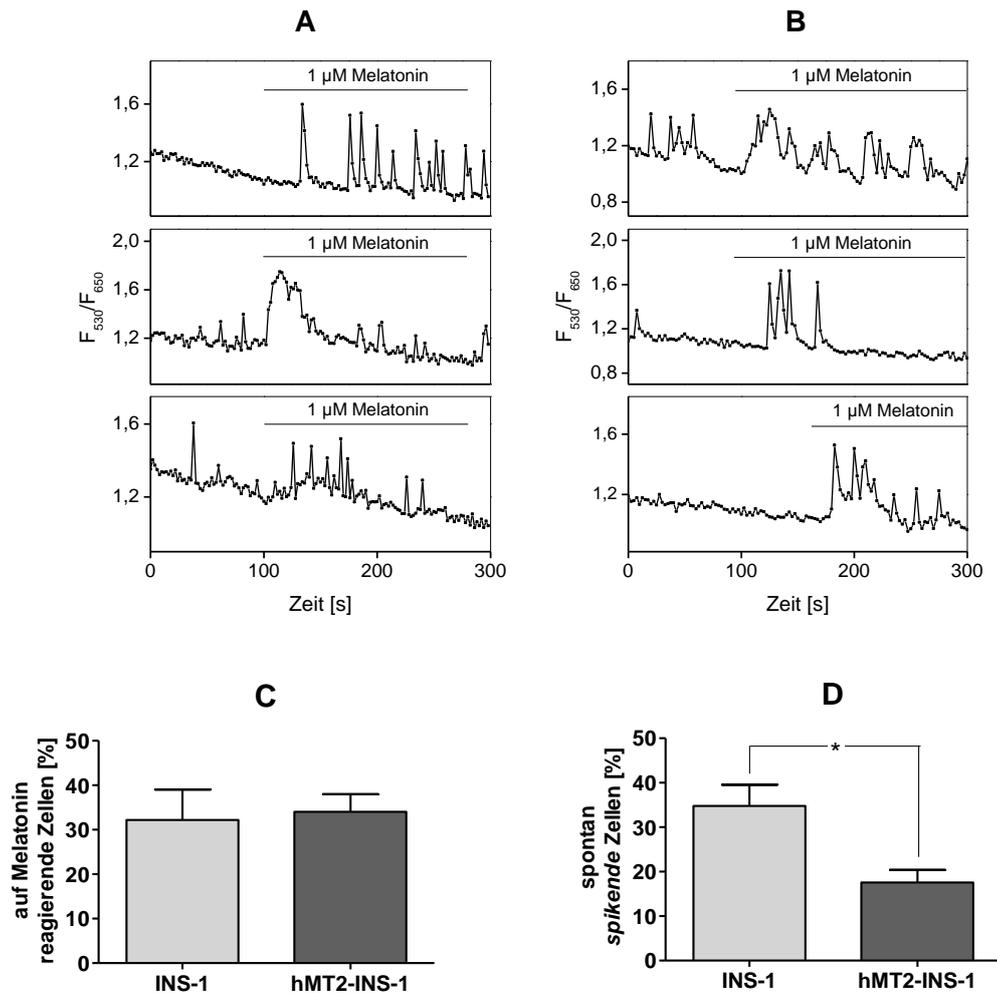


Abb. 20: Calcium Imaging von INS-1- und hMT₂-INS-1-Zellen

(A) Beispiele für die Reaktion einzelner INS-1-Zellen und (B) einzelner mit dem humanen MT₂-Rezeptor transfizierter INS-1-Zellen (hMT₂-INS-1) auf Melatonin. Die Zellen wurden mit den kalziumsensitiven Fluoreszenzfarbstoffen *Calcium Green-1* und *Fura Red* beladen. Die Fluoreszenz wurde durch einen Argonionenlaser angeregt und durch ein Konfokales Laserscanningmikroskop detektiert. Dargestellt ist das Verhältnis der Fluoreszenzintensitäten beider Farbstoffe. Es ist ein Maß für die Änderung der Kalziumionenkonzentration. (C) Die Zellen wurden kurzzeitig mit Melatonin stimuliert, dabei reagierten 32% der INS-1-Zellen und 34% der hMT₂-INS-1-Zellen mit einer Erhöhung der intrazellulären Kalziumionenkonzentration. (D) 35% der INS-1-Zellen zeigten eine spontane Änderung der Ca²⁺-Konzentration (*Spikes*), während nur 18% der hMT₂-INS-1-Zellen diese Aktivität zeigten. Die Balken repräsentieren Mittelwerte ± SEM aus 5 bis 10 unabhängigen Versuchen. * P < 0,05; Mann-Whitney-U-Test.

3.2 Funktion des MT₁-Rezeptors in der INS-1-Zelle

3.2.1 *knockdown* des MT₁-Rezeptors in INS-1-Zellen

Um den Einfluss des MT₁-Rezeptors auf die Funktion der INS-1-Zelle zu untersuchen, wurden die INS-1-Zellen mit einem shRNA-Plasmid transfiziert, welches durch Interferenz auf transkriptioneller Ebene einen *knockdown* des MT₁-Rezeptors bewirken soll (rMT₁-shRNA-Plasmid). Nach Selektion der transfizierten Zellen mit Hygromycin (1 μg/ml) und Expansion der Kolonien, wurden die aus den Kolonien entstandenen Klone zuerst auf die Expression des Hygromycin-Resistenzgens untersucht. Wie in Abbildung 21A dargestellt konnte die mRNA des Hygromycin-Resistenzgens nur in den transfizierten Zellen nachgewiesen werden; demgegenüber war in den INS-1-Zellen kein Transkript des Gens nachweisbar. Darüber hinaus

wurde überprüft, ob das Plasmid in die DNA der INS-1-Zellen integriert wurde. Dazu wurde die DNA aus den Zellpellets der Klone extrahiert. Durch PCR und anschließende Gelelektrophorese konnte das Hygromycin-Resistenzgen im Genom der transfizierten Zellen nachgewiesen werden (Abb. 21B), während die DNA der gentechnisch unveränderten INS-1-Zellen dieses Gen nicht aufweist.

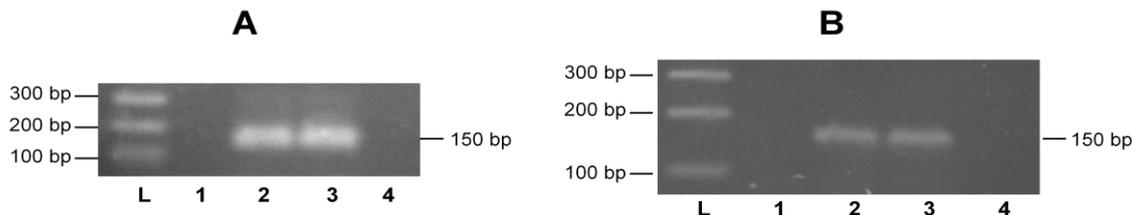


Abb. 21: Nachweis der Integration des shRNA-Plasmids ins INS-1-Genom und Expression des Hygromycin-Resistenzgens in INS-1-Zellen

(A) Darstellung des RT-PCR-Produktes des Hygromycin-Resistenzgens im 1,5% Agarose-Gel nach gelelektrophoretischer Auftrennung und anschließender Ethidiumbromidfärbung: INS-1-Ausgangszellen (1), mit dem Kontroll-shRNA-Plasmid transfizierte INS-1-Zellen (Kontroll-shRNA-INS-1; 2), mit dem rMT₁-shRNA-Plasmid transfizierte INS-1-Zellen (rMT₁-knockdown INS-1; 3) sowie *Non Template Control* (4). (B) Das Agarose-Gel zeigt das PCR-Produkt des Hygromycin-Resistenzgens nach Gelelektrophorese und Ethidiumbromidfärbung: DNA der INS-1-Ausgangszellen (1), DNA der Kontroll-shRNA-INS-1-Zellen (2), DNA der rMT₁-knockdown INS-1-Zellen (3) sowie *Non Template Control* (4). bp, Basenpaare; L, 100 bp-Molekulargewichtsstandard.

Anschließend wurde durch RT-PCR getestet, ob die Klone eine veränderte MT₁-Rezeptor-Expression aufweisen. Die meisten untersuchten Klone zeigten eine geringere MT₁-Rezeptor-Expression. Ein Klon, der mit dem shRNA-Plasmid 3 transfiziert wurde, wies die geringste MT₁-Rezeptor Transkriptmenge auf und wurde für nachfolgende Untersuchungen verwendet (rMT₁-knockdown INS-1). Im Vergleich zu den INS-1-Zellen war die MT₁-Rezeptor-mRNA der rMT₁-knockdown INS-1-Zellen um 69% reduziert ($P < 0,0001$, $n = 17$; Abb. 22A). Da die Transfektion mit dem Kontrollplasmid ebenfalls zu einem *knockdown* des MT₁-Rezeptors führte (Daten nicht gezeigt), konnten diese Klone nicht als Kontrolle dienen. Als Kontrolle wurde deshalb ein Klon verwendet, der mit dem shRNA-Plasmid 2 transfiziert wurde (Kontroll-shRNA-INS-1). Diese Kontroll-shRNA-INS-1-Zellen wiesen, verglichen mit den INS-1-Zellen, eine geringe, nicht signifikante Reduktion der MT₁-Rezeptor Transkripte um 12% auf ($P = 0,1837$, $n = 11$). Auch durch die Darstellung im Agarose-Gel (Abb. 22B) konnte gezeigt werden, dass die Transkriptmenge der Kontroll-shRNA-INS-1-Zellen im Vergleich zu den INS-1-Zellen nur gering, die der rMT₁-knockdown INS-1-Zellen jedoch deutlich verringert wurde.

Für die immunzytochemische Markierung (Abb. 22C) wurde ein Antikörper verwendet, der nahe des C-Terminus des MT₁-Rezeptors der Ratte bindet. Es zeigte sich eine verminderte Immunreaktivität der rMT₁-knockdown INS-1-Zellen im Vergleich zu den INS-1-Ausgangszellen. Dies deutete auf den verminderten MT₁-Rezeptorbesatz der rMT₁-knockdown INS-1-Zellen hin. Verglichen mit den INS-1-Zellen zeigten die Kontroll-shRNA-INS-1-Zellen eine annähernd gleiche Immunmarkierung für den MT₁-Rezeptor. Die Darstellung der gleichen Gruppe von Zellen in Falschfarben verdeutlicht diese Beobachtung.

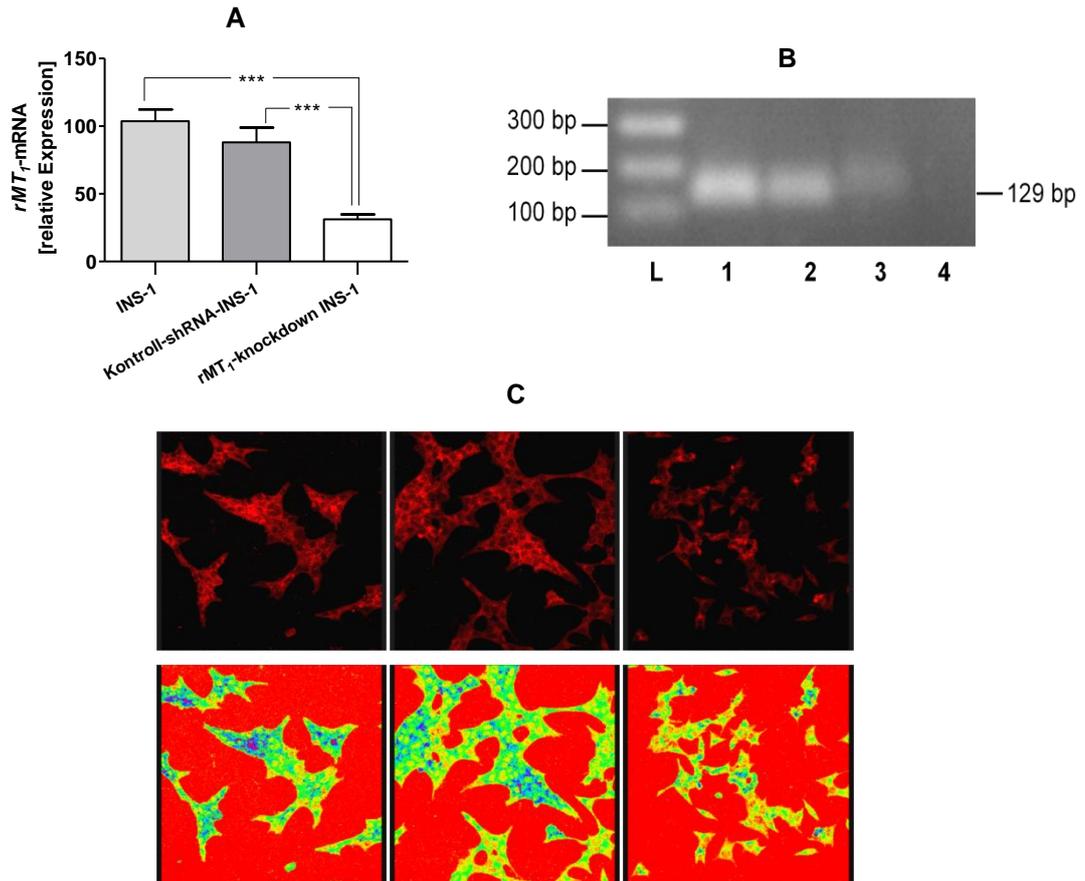


Abb. 22: knockdown des rMT₁ in INS-1-Zellen

(A) Quantitative Auswertung der RT-PCR Ergebnisse zur relativen Expression der Melatoninrezeptor-Isoform 1 der Ratte (rMT₁) in INS-1-Zellen und in Zellen, die mit dem Kontrollplasmid transfiziert wurden (Kontroll-shRNA-INS-1) sowie in mit dem rMT₁-shRNA-Plasmid transfizierten Zellen (rMT₁-knockdown INS-1). Die Balken repräsentieren Mittelwerte \pm SEM (n = 11 bis 17). *** P < 0,001; Mann-Whitney-U-Test. (B) Das Agarose-Gel zeigt die PCR-Produkte nach Gelelektrophorese und Ethidiumbromidfärbung: INS-1-Zellen (1), Kontroll-shRNA-INS-1-Zellen (2), rMT₁-knockdown INS-1-Zellen (3) und *Non Template Control* (4). bp: Basenpaare, L: 100 bp-Molekulargewichtsstandard. (C) Immunocytochemische Darstellung des rMT₁-Rezeptors an INS-1-Zellen (links, oben) und an Kontroll-shRNA-INS-1-Zellen (Mitte, oben) sowie rMT₁-knockdown INS-1-Zellen (rechts, oben). Die Darstellung in Falschfarben verdeutlicht die Unterschiede im Rezeptorbesatz von INS-1-Zellen (links, unten), Kontroll-shRNA-INS-1-Zellen (Mitte, unten) und rMT₁-knockdown INS-1-Zellen (rechts, unten).

3.2.2 Einfluss des MT₁-Rezeptors auf die Expression der Insulingene und die basale Insulinsekretion

Im Folgenden wurde überprüft, ob über den MT₁-Rezeptor die Expression der beiden Gene, die bei Rodentia wie der Ratte für Insulin kodieren (*rIns1* und *rIns2*), beeinflusst wird. Im Vergleich zu den INS-1-Zellen zeigten die rMT₁-knockdown INS-1-Zellen eine um 33% höhere Transkriptmenge an *rIns1* (P = 0,0265, n = 11; Abb. 23A), wohingegen sich die relative mRNA-Konzentration von *rIns1* der INS-1-Zellen und der Kontroll-shRNA-INS-1-Zellen nicht signifikant unterschied (P=0,2912, n = 12). Die relative mRNA-Konzentration von *rIns2* war bei den INS-1-Zellen und den rMT₁-knockdown INS-1-Zellen gleich (P = 0,8182, n = 11; Abb. 23B). Ebenso war kein Unterschied in der Transkriptmenge an *rIns2* zwischen den Kontroll-shRNA-INS-1-Zellen und den INS-1-Zellen nachzuweisen (P = 1,00, n = 11). Außerdem wurde die basale Insulinsekretion der transfizierten Zellen mit derjenigen der INS-1-Ausgangszellen verglichen. Dazu wurde die Insulinkonzentration im Zellkulturüberstand nach 6-stündiger Inkubation gemessen und auf die Proteinmenge der im *well* enthaltenen Zellen bezogen. Dabei wiesen die

rMT₁-*knockdown* INS-1-Zellen im Vergleich zu den INS-1-Zellen eine um 76% erhöhte basale Insulinsekretion ($P < 0,0001$, $n = 12$; Abb. 23C) und im Vergleich zu den Kontroll-shRNA-INS-1-Zellen eine um 73% erhöhte basale Insulinsekretion auf ($P = 0,0003$, $n = 12$; Abb. 23C). Hingegen bestand zwischen den INS-1-Zellen und den Kontroll-shRNA-INS-1-Zellen kein signifikanter Unterschied ($P = 0,5252$, $n = 12$). Mit diesen Ergebnissen konnte gezeigt werden, dass über den rMT₁-Rezeptor sowohl die Expression von *rlns1* als auch die basale Insulinsekretion der INS-1-Zelle beeinflusst werden.

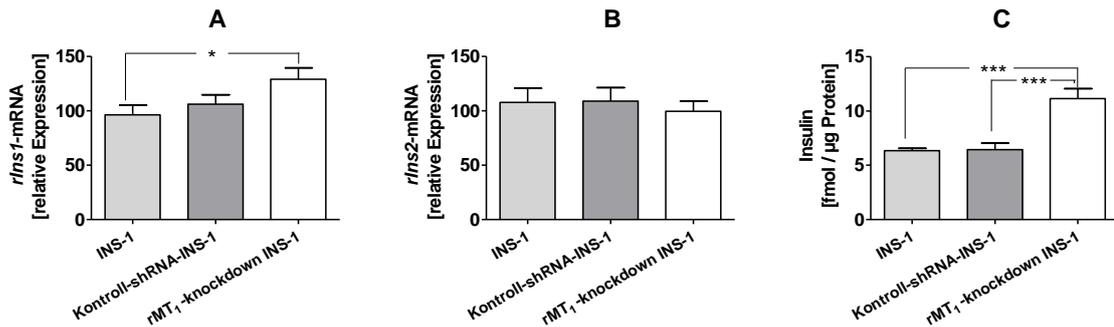


Abb. 23: Insulin-Expression und basale Insulinsekretion von INS-1-, Kontroll-shRNA-INS-1- und rMT₁-knockdown INS-1-Zellen

(A + B) Vergleich der Expression der Insulingene der Ratte *rlns1* (A) und *rlns2* (B) von INS-1-Zellen und von Zellen, die mit dem Kontrollplasmid transfiziert wurden (Kontroll-shRNA-INS-1) sowie von mit dem rMT₁-shRNA-Plasmid transfizierten Zellen (rMT₁-knockdown INS-1). Die Balken repräsentieren Mittelwerte \pm SEM ($n = 11$ bis 12). (C) Basale Insulinsekretion von INS-1-, Kontroll-shRNA-INS-1- und rMT₁-knockdown INS-1-Zellen bezogen auf deren Gesamtproteingehalt. Die Balken repräsentieren Mittelwerte \pm SEM aus 3 unabhängigen Versuchen mit je $n = 3$ bis 4 *Batches*. *** $P < 0,001$; Mann-Whitney-U-Test.

3.2.3 Bedeutung des MT₁-Rezeptors für die Insulinsekretion

Nachfolgend wurden entweder Glucagon oder GLP-1 eingesetzt, um die Insulinsekretion der INS-1-Zellen zu erhöhen.

Verglichen mit den Zellen, die mit Kontrollmedium behandelt wurden, führte die 1-stündige Inkubation der INS-1-Zellen mit 100 nM Glucagon zu einer signifikanten Steigerung der Insulinsekretion um 24% ($P = 0,0054$, $n = 19$; Abb. 24A). Durch gleichzeitige Inkubation der INS-1-Zellen mit 100 nM Melatonin konnte der Glucagon-induzierte Anstieg der Insulinsekretion statistisch signifikant um 22% gesenkt werden ($P = 0,0006$, $n = 20$). Die 1-stündige Inkubation der Kontroll-shRNA-INS-1-Zellen mit 100 nM Glucagon führte, verglichen mit deren Kontrollen, zu einer 19%igen Erhöhung ihrer Insulinsekretion ($P = 0,0037$, $n = 7$). Die Koinkubation dieser Zellen mit 100 nM Melatonin senkte ihre Glucagon-stimulierte Insulinfreisetzung um 17% ($P = 0,0022$, $n = 8$). Die INS-1-Zellen und die Kontroll-shRNA-INS-1-Zellen reagierten somit ähnlich auf die Melatonin-Koinkubation ($P = 0,7797$). Die Inkubation der rMT₁-knockdown INS-1-Zellen mit 100 nM Glucagon erhöhte deren Insulinfreisetzung um 18% ($P = 0,0045$, $n = 13$). Die Koinkubation mit 100 nM Melatonin konnte die Glucagon-stimulierte Insulinfreisetzung dieser Zellen jedoch nicht reduzieren ($P = 0,5538$, $n = 16$). Somit reagierten die INS-1-Zellen und die rMT₁-knockdown INS-1-Zellen signifikant unterschiedlich auf die Melatonin-Koinkubation ($P = 0,0015$). Ebenso bestand ein signifikanter Unterschied in der Reaktion der Kontroll-shRNA-INS-

1-Zellen und der *rMT₁-knockdown* INS-1-Zellen ($P = 0,0005$), so dass dieser Unterschied auf den *knockdown* des *MT₁*-Rezeptors zurückzuführen war.

Die 1-stündige Inkubation der INS-1-Zellen mit 10 nM GLP-1 führte im Vergleich zu den INS-1-Zellen, die nur mit Medium behandelt wurden, zu einer 24%igen signifikanten Erhöhung der Insulinsekretion ($P = 0,0018$, $n = 20$; Abb. 24B). Die Koinkubation der INS-1-Zellen mit 10 nM GLP-1 und 100 nM Melatonin senkte deren Insulinsekretion um 27% ($P < 0,0001$, $n = 20$) verglichen mit den GLP-1-stimulierten INS-1-Zellen. Auch die 1-stündige Inkubation der Kontroll-shRNA-INS-1-Zellen mit 10 nM GLP-1 führte, verglichen mit deren Kontrollen, zu einer 20%igen Erhöhung der Insulinsekretion ($P = 0,0499$, $n = 8$). Die Koinkubation dieser Zellen mit 100 nM Melatonin senkte die GLP-1-stimulierte Insulinfreisetzung um 18% ($P = 0,0401$, $n = 7$). Die INS-1-Zellen und die Kontroll-shRNA-INS-1-Zellen reagierten somit ähnlich auf die Melatonin-Koinkubation ($P = 0,2132$). Die Inkubation der *rMT₁-knockdown* INS-1-Zellen mit 10 nM GLP-1 erhöhte ihre Insulinfreisetzung um 19% ($P = 0,0176$, $n = 20$). Die GLP-1-stimulierte Insulinsekretion der *rMT₁-knockdown* INS-1-Zellen konnte durch gleichzeitige Inkubation mit 100 nM Melatonin jedoch nicht gesenkt werden ($P = 0,4569$, $n = 20$). Die INS-1-Zellen und die *rMT₁-knockdown* INS-1-Zellen reagierten also signifikant unterschiedlich auf die Melatonin-Koinkubation ($P < 0,0001$). Ebenso bestand ein signifikanter Unterschied in der Reaktion der Kontroll-shRNA-INS-1-Zellen und der *rMT₁-knockdown* INS-1-Zellen ($P = 0,0138$). Ein *knockdown* des *MT₁*-Rezeptors führte also zu einer Aufhebung der inhibitorischen Melatoninwirkung nach Glucagon- oder GLP-1-Stimulation der Insulinsekretion.

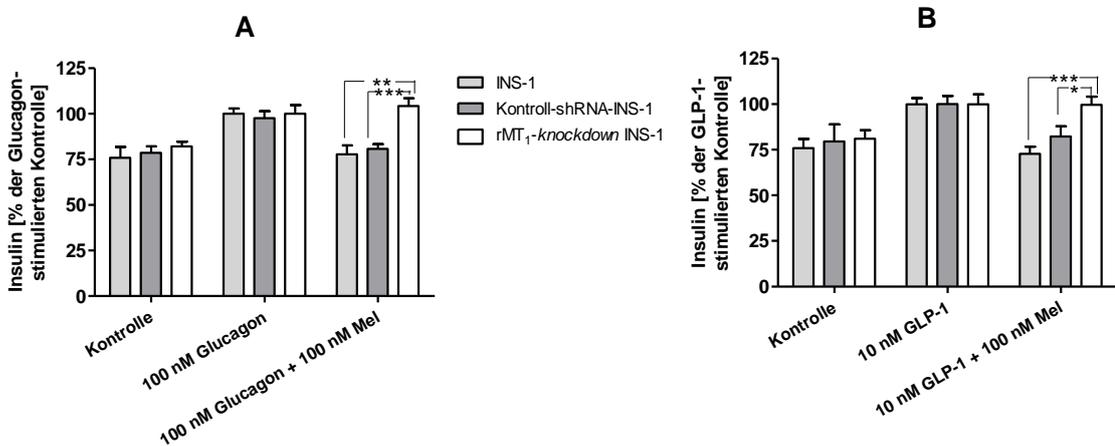


Abb. 24: Wirkung von Melatonin auf die Glucagon- oder GLP-1-stimulierte Insulinsekretion von INS-1-, Kontroll-shRNA-INS-1- und *rMT₁-knockdown* INS-1-Zellen

(A) Insulinsekretion der INS-1-Zellen im Vergleich zur Insulinsekretion der Zellen, die mit dem Kontrollplasmid transfiziert wurden (Kontroll-shRNA-INS-1) und der mit dem *rMT₁-shRNA*-Plasmid transfizierten Zellen (*rMT₁-knockdown* INS-1) nach 1-stündiger Inkubation mit 100 nM Glucagon sowie Koinkubation von 100 nM Glucagon und 100 nM Melatonin (Mel). (B) Insulinsekretion der INS-1-Zellen im Vergleich zur Insulinsekretion der Kontroll-shRNA-INS-1-Zellen und *rMT₁-knockdown* INS-1-Zellen nach 1-stündiger Inkubation mit 10 nM *Glucagon-like Peptide 1* (GLP-1) sowie Koinkubation von 10 nM GLP-1 und 100 nM Melatonin. Die Balken repräsentieren Mittelwerte \pm SEM aus mindestens 3 unabhängigen Versuchen mit je $n = 2$ bis 4 *Batches* (angegeben in Prozent relativ zu den 100%-gesetzten stimulierten Zellen). * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ und *** $P < 0,001$; Mann-Whitney-U-Test.

3.2.4 MT₁-Rezeptor gekoppelte Signalwege in der β -Zelle

Um zu überprüfen, ob der cAMP-Signalweg die inhibierende Wirkung des MT₁-Rezeptors auf die Insulinsekretion vermittelt, wurde erneut der unspezifische Phosphodiesterase-Hemmer IBMX eingesetzt. Die 1-stündige Inkubation der INS-1-Zellen mit 100 μ M IBMX führte, verglichen mit den Kontrollen, zu einem 50%igen Anstieg des intrazellulären cAMP ($P = 0,0003$, $n = 11$ bis 15 ; Abb. 25A). Die Koinkubation der Zellen mit 1 nM Melatonin reduzierte den IBMX-induzierten Anstieg von cAMP um 22% ($P < 0,0001$, $n = 14$ bis 15). Die gleichzeitige Inkubation der INS-1-Zellen mit 100 nM Melatonin senkte den IBMX-stimulierten Anstieg des cAMP um 28% ($P = 0,0006$, $n = 14$ bis 15). Durch 1-stündige Inkubation der Kontroll-shRNA-INS-1-Zellen mit 100 μ M IBMX wurde ihr intrazelluläres cAMP, im Vergleich mit deren Kontrollen, um 40% erhöht ($P = 0,0001$, $n = 10$). Die Koinkubation dieser Zellen mit 1 nM Melatonin reduzierte das IBMX-stimulierte cAMP um 19% ($P = 0,0068$, $n = 10$) und die gleichzeitige Inkubation mit 100 nM Melatonin senkte es um 19% ($P = 0,0011$, $n = 10$). Die Kontroll-shRNA-INS-1-Zellen reagierten somit ähnlich auf die Melatonin-Koinkubation wie die INS-1-Zellen ($P = 0,953$ bei 1 nM, $P = 0,0841$ bei 100 nM). Im Vergleich zu den rMT₁-*knockdown* INS-1-Zellen, die nur mit Medium behandelt wurden, erhöhte eine 1-stündige IBMX-Inkubation das intrazelluläre cAMP der rMT₁-*knockdown* INS-1-Zellen um 32% ($P < 0,0001$, $n = 9$ bis 10). Weder die simultane Inkubation dieser Zellen mit 1 nM Melatonin ($P = 0,4359$, $n = 10$) noch die Koinkubation mit 100 nM Melatonin ($P = 0,3150$, $n = 10$) führten zu einer signifikanten Senkung des IBMX-induzierten Anstieg von cAMP. Demnach reagierten die INS-1-Zellen und die rMT₁-*knockdown* INS-1-Zellen signifikant unterschiedlich auf die Melatonin-Koinkubation ($P = 0,0002$ bei 1 nM, $P = 0,0092$ bei 100 nM). Ebenso bestand ein signifikanter Unterschied in der Reaktion von Kontroll-shRNA-INS-1-Zellen und rMT₁-*knockdown* INS-1-Zellen ($P = 0,0002$ bei 1 nM, $P = 0,0433$ bei 100 nM Melatonin). Das zeigt, dass die Senkung der cAMP-Konzentration durch Melatonin über den MT₁-Rezeptor vermittelt wird.

Neben dem intrazellulären cAMP wurde die Insulinkonzentration im Zellkulturüberstand der behandelten Zellen bestimmt. Verglichen mit den Zellen, die nur mit Medium behandelt wurden, führte die 1-stündige Inkubation der INS-1-Zellen mit 100 μ M IBMX zu einem 52%igen Anstieg des Insulins im Zellkulturüberstand ($P < 0,0001$, $n = 18$, Abb. 25B). Die Koinkubation dieser Zellen mit 1 nM Melatonin reduzierte den IBMX-induzierten Anstieg des Insulins um 16% ($P = 0,0011$, $n = 13$ bis 18). Die gleichzeitige Inkubation der INS-1-Zellen mit 100 nM Melatonin senkte das IBMX-stimulierte Insulin um 17% ($P < 0,0001$, $n = 18$ bis 22). Verglichen mit den Kontroll-shRNA-INS-1-Zellen, die nur mit Medium inkubiert wurden, erhöhte die 1-stündige Inkubation dieser Zellen mit 100 μ M IBMX deren Insulinfreisetzung um 35% ($P < 0,0001$, $n = 17$). Die Koinkubation dieser Zellen mit 1 nM Melatonin reduzierte diese IBMX-stimulierte Insulinsekretion um 18% ($P = 0,0112$, $n = 10$ bis 17) und die gleichzeitige Inkubation mit 100 nM Melatonin senkte sie um 18% ($P = 0,0002$, $n = 17$). Die Kontroll-shRNA-INS-1-Zellen reagierten folglich ähnlich auf die Melatonin-Koinkubation wie die INS-1-Zellen ($P = 0,9259$ bei 1 nM, $P = 0,9661$ bei 100 nM). Eine 1-stündige Inkubation der rMT₁-*knockdown* INS-1-Zellen erhöhte ihre Insulinsekretion um 29% ($P < 0,0001$, $n = 17$) verglichen mit deren Kontrollen. Weder die simultane Inkubation dieser Zellen mit 1 nM Melatonin ($P = 0,6663$, $n = 9$ bis 17) noch die

Koinkubation mit 100 nM Melatonin ($P = 0,7048$, $n = 17$) führten zu einer signifikanten Senkung des IBMX-induzierten Anstieg von Insulin. Somit reagierten die INS-1-Zellen und die *rMT₁-knockdown* INS-1-Zellen signifikant unterschiedlich auf die Melatonin-Koinkubation ($P = 0,0062$ bei 1 nM, $P < 0,0001$ bei 100 nM). Ebenso bestand ein signifikanter Unterschied in der Reaktion der Kontroll-shRNA-INS-1-Zellen und der *rMT₁-knockdown* INS-1-Zellen ($P = 0,0021$ bei 1 nM, $P < 0,0001$ bei 100 nM Melatonin). Dieser Unterschied zeigt, dass die Melatonin-induzierte Senkung der IBMX-stimulierten Insulinsekretion der INS-1-Zelle über den *MT₁*-Rezeptor vermittelt wird.

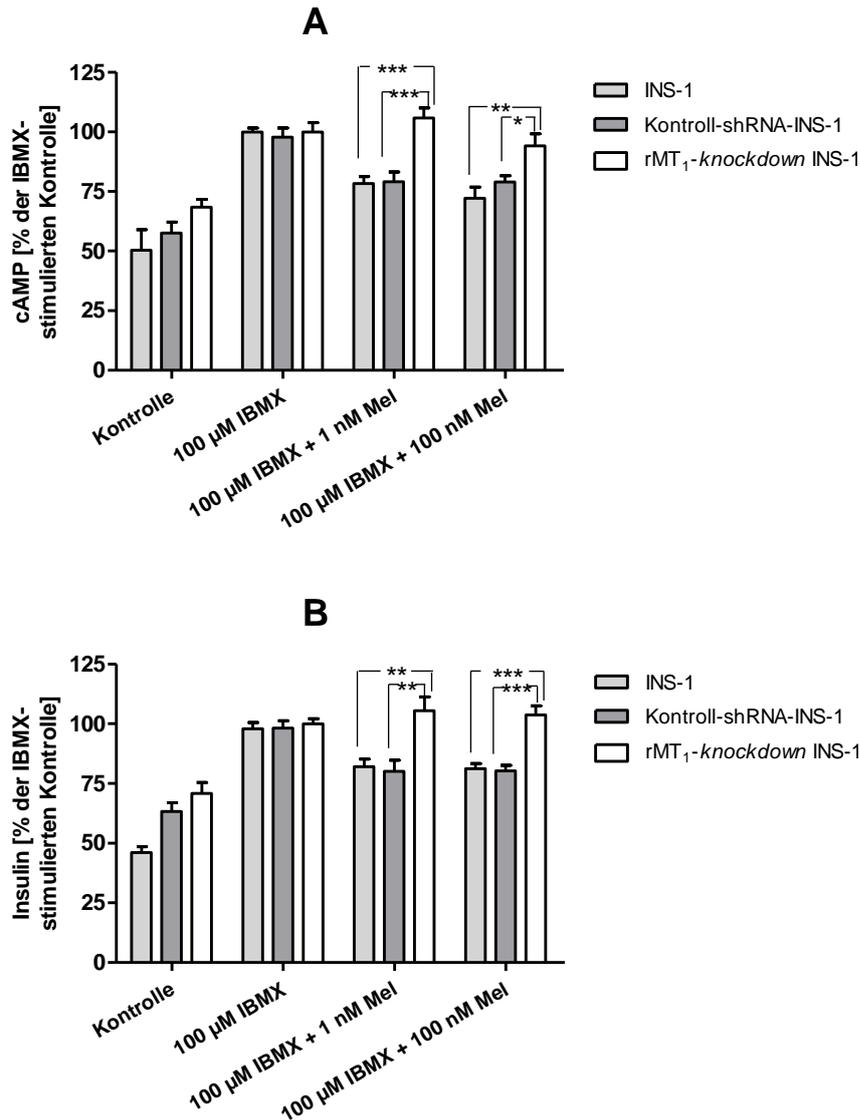


Abb. 25: cAMP-Konzentration und Insulinsekretion von INS-1-, Kontroll-shRNA-INS-1- und *rMT₁-knockdown* INS-1-Zellen

(A) Intrazelluläre cAMP-Konzentration der INS-1-Zellen im Vergleich zur intrazellulären cAMP-Konzentration der Zellen, die mit dem Kontrollplasmid transfiziert wurden (Kontroll-shRNA-INS-1) und der mit dem *rMT₁-shRNA*-Plasmid transfizierten Zellen (*rMT₁-knockdown* INS-1) nach 1-stündiger Inkubation mit 100 µM IBMX oder Koinkubation von 100 µM IBMX und verschiedenen Melatoninkonzentrationen (Mel, 1 nM, 100 nM). (B) Insulinsekretion der INS-1-Zellen verglichen zu der der Kontroll-shRNA-INS-1-Zellen und der *rMT₁-knockdown* INS-1-Zellen nach 1-stündiger Inkubation mit 100 µM IBMX oder Koinkubation mit 100 µM IBMX und verschiedenen Melatoninkonzentrationen (1 nM, 100 nM). Die Balken repräsentieren Mittelwerte \pm SEM aus mindestens 3 unabhängigen Versuchen mit je $n = 3$ bis 4 *Batches* (angegeben in Prozent relativ zu den 100%-gesetzten IBMX-behandelten Zellen). * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$; Mann-Whitney-*U*-Test.

Eine Versuchsreihe von Kemp und Mitarbeitern (2002) ergab, dass durch Melatoninvorinkubation über einen längeren Zeitraum, die der nächtlichen Melatoninexposition entspricht, die Insulinsekretion der INS-1-Zellen gesteigert werden kann. Im Folgenden wurde geprüft, ob dieser „sensitivierende“ Effekt einer chronischen Melatoninbehandlung über den MT_1 -Rezeptor vermittelt wird. Dazu wurden die Zellen für 6 h mit 100 nM Melatonin inkubiert und der Insulingehalt im Zellkulturüberstand im Anschluss an eine 1-stündige Inkubation in frischem Medium ohne Stimulanzen bestimmt. Die Vorinkubation der INS-1-Zellen mit Melatonin erhöhte signifikant deren Insulinsekretion um 50% ($P = 0,0017$, $n = 16$; Abb. 26A) gegenüber solchen INS-1-Zellen, die mit melatoninfreiem Medium vorinkubiert wurden. Durch 6-stündige Vorinkubation der Kontroll-shRNA-INS-1-Zellen mit 100 nM Melatonin konnte deren Insulinfreisetzung um 34% gesteigert werden ($P = 0,0317$, $n = 10$ bis 11). Die Kontroll-shRNA-INS-1-Zellen reagierten demnach ähnlich auf die Melatoninvorinkubation wie die INS-1-Zellen ($P = 0,3613$). Die rMT_1 -*knockdown* INS-1-Zellen hingegen zeigten nach Melatoninvorinkubation, verglichen mit deren Kontrollen, keine signifikant veränderte Insulinsekretion ($P = 0,3738$, $n = 15$ bis 16). Im Gegensatz zu den INS-1-Zellen konnte die Insulinsekretion der rMT_1 -*knockdown* INS-1-Zellen durch die Melatoninvorinkubation nicht stimuliert werden ($P = 0,0056$). Der Unterschied in der Reaktion der Kontroll-shRNA-INS-1-Zellen und der rMT_1 -*knockdown* INS-1-Zellen war nicht signifikant ($P = 0,0642$). Damit konnte belegt werden, dass der „sensitivierende“ Effekt einer chronischen Melatoninbehandlung über den MT_1 -Rezeptor vermittelt wird.

In einer zweiten Versuchsreihe wurden die Zellen nach 6-stündiger Vorinkubation mit 100 nM Melatonin für eine Stunde mit 10 nM GLP-1 stimuliert. Durch diese Behandlung konnte die Insulinsekretion der INS-1-Zellen, gegenüber den INS-1-Zellen, die mit melatoninfreiem Medium vorinkubiert wurden, um 35% erhöht werden ($P = 0,0029$, $n = 12$; Abb. 26B). Die 6-stündige Vorinkubation der Kontroll-shRNA-INS-1-Zellen mit 100 nM Melatonin und anschließende 1-stündige GLP-1-Stimulation erhöhte deren Insulinsekretion um 29% ($P = 0,0140$, $n = 7$ bis 8). Damit reagierten die Kontroll-shRNA-INS-1-Zellen ähnlich wie die INS-1-Zellen auf diese Inkubationsbedingungen ($P = 0,3749$). Demgegenüber wurde die Insulinfreisetzung der rMT_1 -*knockdown* INS-1-Zellen durch diese Versuchsbedingungen nicht verändert ($P = 0,9370$, $n = 15$ bis 16). Die rMT_1 -*knockdown* INS-1-Zellen konnten im Vergleich zu den INS-1-Zellen durch die Melatoninvorinkubation nicht „sensitiviert“ werden ($P = 0,0481$). Der Unterschied in der Reaktion zwischen Kontroll-shRNA-INS-1-Zellen und rMT_1 -*knockdown* INS-1-Zellen war nicht signifikant ($P = 0,1586$). Auch dieser Befund zeigt, dass der „sensitivierende“ Effekt einer chronischen Melatoninbehandlung über den MT_1 -Rezeptor vermittelt wird.

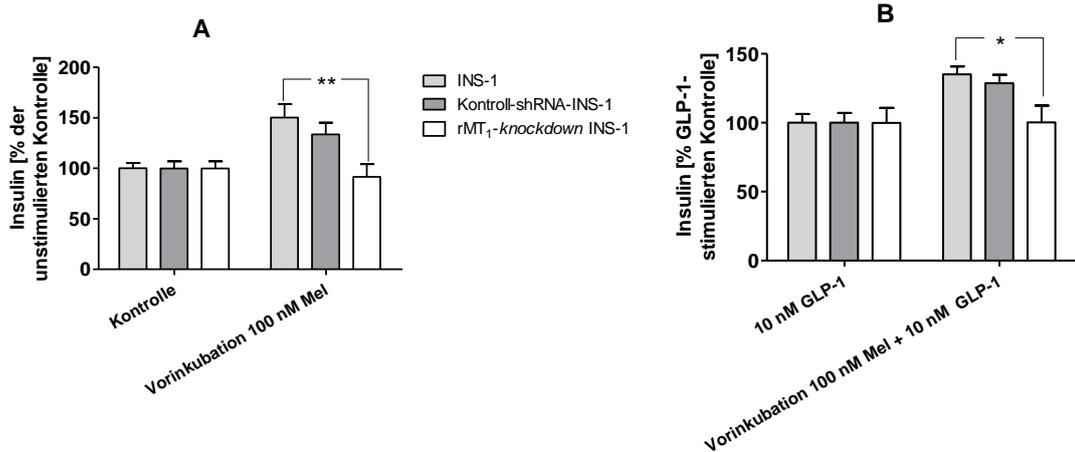


Abb. 26: Wirkung einer Melatonin-Vorinkubation auf die Insulinsekretion von INS-1-, Kontroll-shRNA-INS-1- und rMT₁-knockdown INS-1-Zellen

(A) Insulinsekretion von INS-1-Zellen verglichen mit Zellen, die mit dem Kontrollplasmid transfiziert wurden (Kontroll-shRNA-INS-1) und mit rMT₁-shRNA-Plasmid transfizierten Zellen (rMT₁-knockdown INS-1) nach 6 h Vorinkubation mit 100 nM Melatonin (Mel) und anschließender 1-stündiger Inkubation. (B) Insulinsekretion der INS-1-Zellen im Vergleich zu der von Kontroll-shRNA-INS-1-Zellen und rMT₁-knockdown INS-1-Zellen nach 6 h Vorinkubation mit 100 nM Melatonin und anschließender 1-stündiger Inkubation mit 10 nM *Glucagon-Like Peptide 1* (GLP-1). Die Balken repräsentieren Mittelwerte \pm SEM aus mindestens 3 unabhängigen Versuchen mit je $n = 2$ bis 4 *Batches* (angegeben in Prozent relativ zu den 100%-gesetzten Zellen ohne Melatoninbehandlung). * $P < 0,05$ und ** $P < 0,01$; Mann-Whitney-*U*-Test.

3.3 Einfluss der Melatoninrezeptoren auf die Insulinsekretion der pankreatischen Insel

Um die Übertragbarkeit der Ergebnisse an der β -Zelllinie (INS-1) auf die pankreatischen Insel zu testen, wurden Melatonin-Inkubationsexperimente mit isolierten Inseln von Wildtyp- und MT-Rezeptor-*knockout*-Mäusen in *Batch*-Kultur durchgeführt. Die Inkubation der Inseln aller untersuchten 4 Tierlinien mit 10 μ M IBMX erhöhte die Insulinsekretion ($P < 0,001$; Abb. 27). Die gleichzeitige Inkubation der Inseln der Wildtyp-Mäuse mit 100 nM Melatonin senkte die IBMX-stimulierte Insulinsekretion signifikant um 15% ($P = 0,0470$, $n = 22$ bis 23). Hingegen führte die Melatonininkubation der Inseln der verschiedenen MT-Rezeptor-*knockout*-Mäuse (MT₁KO, MT₂KO, MT₁MT₂KO) zu keiner signifikanten Senkung der IBMX-stimulierten Insulinsekretion ($P = 0,2358$ bei MT₁KO, $P = 0,8005$ bei MT₂KO, $P = 0,1556$ bei MT₁MT₂KO).

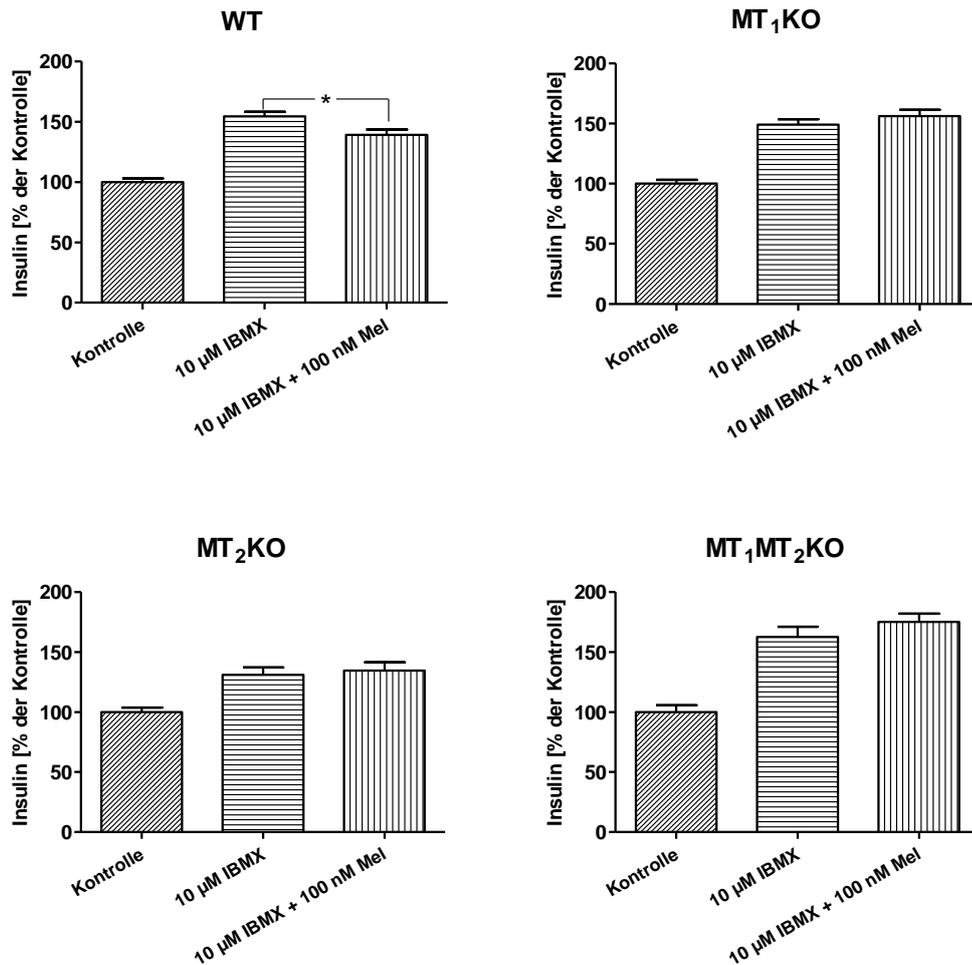


Abb. 27: Wirkung von Melatonin auf die IBMX-stimulierte Insulinsekretion der Inseln von Wildtyp-, MT₁-knockout-, MT₂-knockout- und MT₁MT₂-Doppel-knockout-Mäusen.

Nach Isolation wurden die Inseln über Nacht in Medium 199 inkubiert. Danach wurden sie in 24-well-Zellkulturplatten verteilt und mit IBMX (10 μM) und Melatonin (Mel, 100 nM) für 6 h inkubiert. Die Balken repräsentieren Mittelwerte ± SEM aus mindestens 3 unabhängigen Versuchen mit je n = 4 Batches (angegeben in Prozent relativ zur 100%-gesetzten Kontrolle). * P < 0,05; Mann-Whitney-U-Test. WT, Wildtyp-Mäuse; MT₁KO, MT₁-Rezeptor-knockout-Mäuse; MT₂KO, MT₂-Rezeptor-knockout-Mäuse; MT₁MT₂KO, MT₁MT₂-Rezeptor-Doppel-knockout-Mäuse.

In einer weiteren Versuchsreihe wurden die Inseln ohne zusätzliche Stimulation mit Melatonin inkubiert. Nach 6 h Inkubation wurde die Insulinkonzentration im Zellkulturüberstand gemessen und mit dem Wert der Proteinmenge der im *well* enthaltenen Inseln korreliert. Die Inkubation der Inseln der Wildtyp-Mäuse mit 100 nM Melatonin für 6 h führte zu einer 39%igen signifikanten Senkung der Insulinsekretion (P = 0,0044, n = 24; Abb. 28), wohingegen durch Melatonininkubation die Insulinsekretion der Inseln der MT₁-Rezeptor-knockout-Mäuse weitgehend unverändert blieb (96% verglichen mit 100% der Kontrolle; P = 0,7966, n = 24). Im Gegensatz dazu führte die Inkubation der Inseln der MT₂-Rezeptor-knockout-Mäuse zu einer Senkung der Insulinsekretion um 40%, die jedoch außerhalb der Signifikanzgrenze blieb (P = 0,1427, n = 12). Auch die Inkubation der Inseln der MT₁MT₂-Rezeptor-Doppel-knockout-Mäuse konnte deren Insulinsekretion kaum beeinträchtigen (96% verglichen mit 100% der Kontrolle; P = 0,5143, n = 15). Damit konnte nachgewiesen werden, dass ebenso wie in der INS-1-Zelle,

auch in der pankreatischen Insel der Maus der Einfluss von Melatonin auf die Insulinsekretion hauptsächlich über den MT_1 -Rezeptor vermittelt wird.

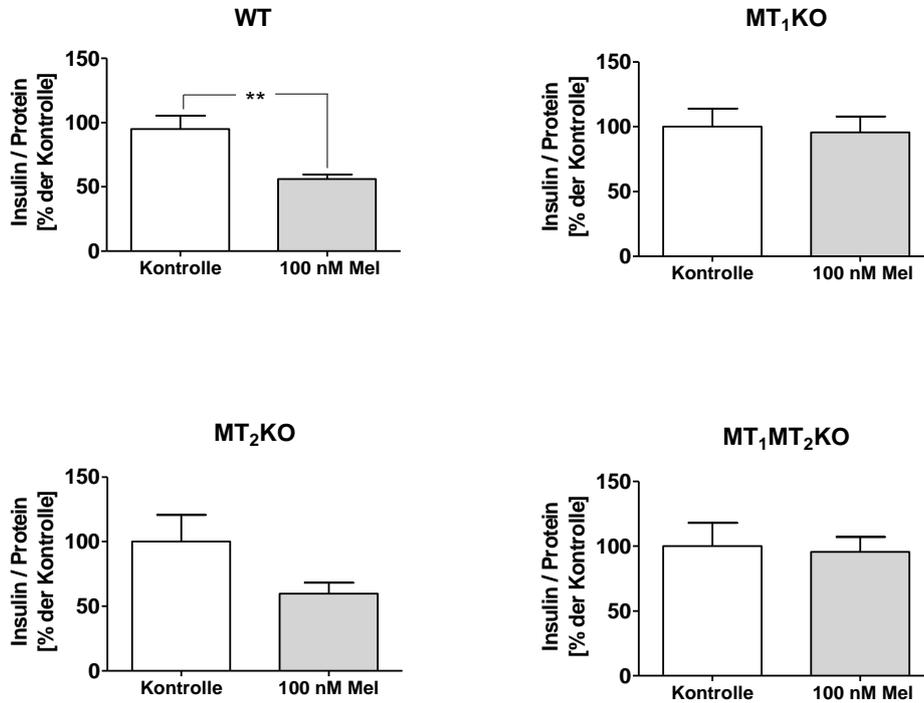


Abb. 28: Wirkung von Melatonin auf die Insulinsekretion der Inseln von Wildtyp-, MT_1 -Rezeptor-*knockout*-, MT_2 -Rezeptor-*knockout*- und MT_1MT_2 -Rezeptor-Doppel-*knockout*-Mäusen.

Nach Isolation wurden die Inseln über Nacht in Medium 199 inkubiert, danach wurden sie in 24-*well*-Zellkulturplatten verteilt und mit Melatonin (Mel, 100 nM) für 6 h inkubiert. Im Anschluss wurde der Proteingehalt der Inseln aus jedem *well* bestimmt und mit dem im Mediumüberstand bestimmten Insulin korreliert. Die Balken repräsentieren Mittelwerte \pm SEM aus mindestens 3 unabhängigen Versuchen mit je $n = 4$ *Batches* (angegeben in Prozent relativ zur 100%-gesetzten Kontrolle). ** $P < 0,01$; Mann-Whitney-*U*-Test. WT, Wildtyp-Mäuse; MT_1 KO, MT_1 -Rezeptor-*knockout*-Mäuse; MT_2 KO, MT_2 -Rezeptor-*knockout* Mäuse; MT_1MT_2 KO, MT_1MT_2 -Rezeptor-Doppel-*knockout* Mäuse.

4 Diskussion

4.1 Funktion des humanen MT₂-Rezeptors in der β -Zelle

Zahlreiche Arbeiten der Arbeitsgruppe Peschke belegen einen Zusammenhang zwischen Melatonin und Typ2-Diabetes (Peschke et al., 2006, 2007). Unter anderem konnte gezeigt werden, dass Melatoninrezeptoren im Pankreas von Typ2-diabetischen Patienten erhöht exprimiert werden (Peschke et al., 2007). Ebenso belegen Genom-weite Assoziationsstudien, dass SNPs im humanen MT₂-Rezeptorgen mit erhöhten Nüchtern-glukosespiegeln im Plasma, pathologisch veränderter Insulinsekretion sowie einem erhöhten Typ2-Diabetes Risiko assoziiert sind (Staiger et al., 2008; Bouatia-Naji et al., 2009; Chambers et al., 2009; Lyssenko et al., 2009; Prokopenko et al., 2009; Ronn et al., 2009). Erste Untersuchungen zur Bedeutung des MT₂-Rezeptors für die β -Zelle wurden ebenfalls in der Peschkegruppe durchgeführt (Mühlbauer und Peschke, 2007; Peschke et al., 2007). Durch Einsatz des Melatoninrezeptor-Antagonisten Luzindol und des spezifischeren MT₂-Rezeptor-Antagonisten 4P-PDOT konnte gezeigt werden, dass der insulinhemmende Effekt von Melatonin auf die stimulierte Insulinsekretion in INS-1-Zellen vermutlich auch über den MT₂-Rezeptor vermittelt wird (Stumpf et al., 2008). Folgeversuche belegen zudem den Einfluss von Melatonin auf die cGMP-Signaltransduktionskaskade der β -Zelle (Stumpf et al., 2009). Bislang liegen keine Untersuchungen zur Wirkungsweise des humanen MT₂-Rezeptors in der β -Zelle vor. In der vorliegenden Studie sollte deshalb dessen Bedeutung für die β -Zelle und somit dessen Einflussnahme auf die Insulinsekretion untersucht werden. Zum Versuchszeitpunkt war eine gut etablierte humane β -Zelllinie nicht verfügbar. Als Modell diente daher die Ratteninsulinoma β -Zelllinie INS-1, die nach Transfektion der cDNA des humanen MT₂-Rezeptors, diesen funktionell exprimiert. Durch *Batch*-Inkubationsexperimente sollte im Rahmen dieser Dissertation geklärt werden, ob und über welche Signalkaskaden der humane MT₂-Rezeptor die Insulinsekretion der β -Zelle beeinflussen kann.

Im ersten Schritt konnte durch PCR-Analysen, Northern-Blot und Immunzytochemie nachgewiesen werden, dass die selektierten hMT₂-INS-1-Klone das transfizierte Plasmid enthalten und dieses stabil im Genom integriert wurde. Die Charakterisierung der verschiedenen hMT₂-INS-1-Klone ergab, dass eine Zunahme der MT₂-Rezeptor-Expression zur Verstärkung der Melatoninwirkung auf die Insulinsekretion führte. Je höher der MT₂-Rezeptor exprimiert war, desto stärker konnte die Insulinsekretion durch Melatonin gehemmt werden.

In der vorliegenden Studie konnte ferner gezeigt werden, dass die heterologe Expression des humanen MT₂-Rezeptors und dessen mögliche konstitutive Aktivität weder die Expression der beiden Insulingene der Ratte noch die basale Insulinsekretion der INS-1-Zelle beeinflusst. Dass Melatoninrezeptoren konstitutiv, also auch ohne Ligand, aktiv sein können, konnte von anderen durch Untersuchungen verschiedener Zelltypen mit heterologer MT-Rezeptor-Expression belegt werden. Roka und Mitarbeiter (1999) wiesen an humanen embryonalen Nierenzellen (HEK-293) mit heterologer Expression des humanen MT₁-Rezeptors nach, dass der MT₁-Rezeptor auch in

Abwesenheit eines Agonisten an G_i-Proteine koppelt. Dass es sich bei dieser konstitutiven Aktivität um einen Artefakt handelt, der durch Überexpression des Rezeptors entsteht, schlossen die Autoren aus, da die Höhe der MT₁-Rezeptor-Expression etwa der entsprach, die in hypothalamischen Zellen nachgewiesen wurde. Devavry und Mitarbeiter (2012) konnten an Ovarialzellen des Chinesischen Hamsters (CHO) und einer murinen Neuroblastomzelllinie (Neuro2A) außerdem belegen, dass sowohl der humane MT₁- als auch der MT₂-Rezeptor konstitutiv aktiv sein können und dass diese konstitutive Aktivität hauptsächlich durch Kopplung des Rezeptors an G_i-Proteine vermittelt wird. In der letztgenannten Studie betrug die konstitutive Aktivität 25% der maximalen Aktivität des MT₁-Rezeptors und 46% der maximalen Aktivität des MT₂-Rezeptors, bei heterologer Expression in CHO-Zellen und sogar 80 bis 90% der maximalen Aktivität beider Melatoninrezeptoren, bei heterologer Expression in Neuro2A-Zellen. Auch in der eigenen Untersuchung ist eine konstitutive Aktivität des humanen MT₂-Rezeptors nicht auszuschließen. Dennoch reicht diese offenbar nicht aus, um die Insulin-Expression und Insulinsekretion zu beeinflussen.

Aus Superfusionsexperimenten mit pankreatischen Inseln der Ratte ist bekannt, dass Melatonin die Glukose-, KCl- und Forskolin-stimulierte Insulinsekretion senken kann (Peschke et al., 1997, 2000; Picinato et al., 2002b). Ebenso wurde an INS-1-Zellen, sowohl durch Superfusions- als auch *Batch*-Versuche, eine Melatonin-induzierte Senkung der durch Forskolin oder Glukose stimulierten Insulinsekretion belegt (Peschke et al., 2002, 2006b; Stumpf et al., 2008; Lysenko et al., 2009). Auch in der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass Melatonin die Glukose-stimulierte Insulinsekretion von INS-1-Zellen senken kann. Da hier ferner nachgewiesen wurde, dass die INS-1-Zellen den endogenen rMT₂-Rezeptor nur gering exprimieren, ist davon auszugehen, dass die Melatoninwirkung in der INS-1-Zelle hauptsächlich über den rMT₁-Rezeptor vermittelt wird. Auch frühere Untersuchungen zeigten, dass der rMT₂-Rezeptor im Pankreas der Ratte eher gering exprimiert ist (Mühlbauer und Peschke, 2007). Im Vergleich zu den INS-1-Zellen konnte die Glukose-stimulierte Insulinsekretion der hMT₂-INS-1-Zellen durch Inkubation mit Melatonin signifikant stärker gesenkt werden. Somit wurde im Rahmen dieser Arbeit erstmals nachgewiesen, dass auch über den hMT₂-Rezeptor die stimulierte Insulinfreisetzung reduziert werden kann. Die Insulinsekretion der Zellen, die das Kontrollplasmid (Δ hMT₂-INS-1) exprimieren, konnte durch die Melatonininkubation kaum beeinflusst werden, was belegt, dass die verstärkte Melatoninwirkung nicht durch Nebeneffekte über das eingeführte Plasmid sondern durch die Expression des hMT₂-Rezeptors verursacht wird.

Des Weiteren machen die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchung deutlich, dass die alleinige Inkubation mit dem MT₂-Rezeptor-Antagonisten 4P-PDOT die Insulinsekretion der INS-1-Zellen nicht beeinflusst, die der hMT₂-INS-1-Zellen jedoch hemmt. Auch Versuche von Stumpf und Mitarbeitern (2008) zeigten, dass die alleinige Inkubation mit 4P-PDOT die Insulinsekretion der INS-1-Zellen nicht verändert. In der letztgenannten Studie konnte durch die 4P-PDOT-Inkubation der Melatonin-induzierte Abfall der durch Forskolin-stimulierten Insulinsekretion

aufgehoben werden. Auch in einer Untersuchung von MacKenzie und Mitarbeitern (2002) an CHO-Zellen mit heterologer hMT₂-Rezeptor-Expression wurde durch 4P-PDOT-Inkubation der hemmende Einfluss von Melatonin auf das Forskolin-stimulierte cAMP aufgehoben, obwohl auch in dieser Studie die alleinige Inkubation mit 4P-PDOT keinen Effekt auf die Forskolin-stimulierte cAMP-Akkumulation hatte. Im eigenen Versuch hingegen führte die Koinkubation von Melatonin und 4P-PDOT zu einer verstärkten Senkung der Glukose-stimulierten Insulinsekretion in beiden untersuchten Zelltypen. Schon in mehreren Studien wurde festgestellt, dass 4P-PDOT je nach Zellsystem auch als Agonist wirken kann (Nonno et al., 1999; Browning et al., 2000). Browning und Mitarbeiter (2000) konnten an CHO-Zellen mit heterologer Expression des hMT₂-Rezeptors zeigen, dass 4P-PDOT die Forskolin-stimulierte cAMP-Akkumulierung hemmt. Ebenso wurde von Nonno und Mitarbeitern (1999) an Maus-Fibroblasten-Zellen (NIH 3T3) mit heterologer Expression des hMT₂-Rezeptors durch G-Protein-Bindungsstudien belegt, dass 4P-PDOT auch als Agonist wirken kann. Die Autoren vermuteten, dass die unterschiedliche Wirkung von 4P-PDOT durch die unterschiedlich hohe MT-Rezeptor-Expression und die Kopplung an unterschiedliche Signalkaskaden in den verschiedenen Zellsystemen zu begründen sei. Besonders in Zellsystemen mit hoher MT-Rezeptor-Expression wirkt 4P-PDOT offenbar eher als Agonist (Nonno et al., 1999; Browning et al., 2000). Diese Beobachtung könnte auch die Wirkung von 4P-PDOT bei den hMT₂-INS-1-Zellen erklären. Warum die INS-1-Zellen im eigenen Versuch anders reagierten als in der Untersuchung von Stumpf und Mitarbeitern (2008), lässt sich dadurch allerdings nicht erklären. Möglicherweise spielt die Verwendung unterschiedlicher 4P-PDOT-Konzentrationen eine Rolle. Denkbar wäre auch, dass sich die Zellen in verschiedenen Wachstumsphasen befanden und in verschiedenen Wachstumsphasen eine unterschiedlich hohe Rezeptor-Expression aufweisen.

Da eine konstitutive Aktivität des heterolog exprimierten MT₂-Rezeptors und damit dessen Einflussnahme auf Melatonin-abhängige intrazelluläre Prozesse nicht auszuschließen ist, sollte eine Zelllinie geschaffen werden, die den humanen Rezeptor fakultativ, also erst nach Tetracyclininduktion exprimiert. Mittels molekularbiologischer Untersuchungen konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass durch Tetracyclininkubation die Expression des hMT₂-Rezeptors der hier generierten Zelllinie um das 12-fache gesteigert wurde. Leider führte die Tetracyclininkubation aber auch zu einer deutlichen Senkung der Insulinfreisetzung dieser Tet-hMT₂-INS-1-Zellen. Übereinstimmend mit den eigenen Ergebnissen wurde in einer *in vitro* Studie an isolierten Langerhansschen Inseln von Ratten durch Tetracyclin (2 oder 20 µM) die Adenylatcyclaseaktivität und die Glukose-stimulierte Insulinsekretion gesenkt (El-Denshary et al., 1977). Auch Poltorak (1984) konnte sowohl *in vitro* als auch *in vivo* zeigen, dass hohe Dosen von Tetracyclin die Glukose-stimulierte Insulinsekretion senken. Hingegen beobachteten Shewade und Mitarbeiter (2001) nach 24-stündiger bis 30-tägiger Tetracyclininkubation (2,5 µg / ml) von isolierten Mäuse-Inseln nur eine leichte Senkung der basalen und stimulierten Insulinsekretion. Russell und Morgan (2011) verwendeten einen Vektor mit Tetracyclin-responsivem Promotor, um INS-1-Zellen zu transfizieren. Dieser Vektor ist mit dem im vorliegenden Versuch genutzten vergleichbar. Im Versuch von Russell und Morgan wurde bei

verschiedenen Glukosekonzentrationen keine Senkung der Insulinsekretion durch Tetracyclin festgestellt. Allerdings exprimierten Russell und Morgan ein Protein, welches die erste Phase der Insulinsekretion offenbar erhöht. Im vorliegenden Versuch sollte die Wirkung des humanen MT_2 -Rezeptors auf die Insulinsekretion untersucht werden. Da allein die Tetracyclininkubation die Insulinfreisetzung der Tet-h MT_2 -INS-1-Zellen deutlich reduzierte, konnte durch zusätzliche Melatonininkubation die Insulinsekretion dieser Zellen kaum noch weiter gesenkt werden. Außerdem war die Hemmung der h MT_2 -Rezeptor-Expression durch den Tet-Repressor nicht vollständig, sodass auch ohne Tetracyclininduktion eine h MT_2 -Rezeptor-Expression nachgewiesen wurde. Im Ergebnis wurde die Insulinfreisetzung der Tet-h MT_2 -INS-1-Zellen durch Melatonin signifikant stärker gesenkt, als die der INS-1-Zellen. Daher erschien dieses Zellsystem trotz der offensichtlichen Vorteile einer induzierbaren Expression für die eigenen Untersuchungen nicht geeignet.

Die Ergebnisse der hier aufgeführten Inkubationsexperimente deuten darauf hin, dass Melatonin über den hoch exprimierten humanen MT_2 -Rezeptor die Insulinsekretion schon bei der Glukosekonzentration des Standardmediums (11,1 mM) beeinflussen kann. Im Gegensatz dazu konnte Melatonin bei dieser Glukosekonzentration die Insulinfreisetzung der INS-1-Zellen nicht beeinträchtigen. Auch Kemp und Mitarbeiter (2002) stellten fest, dass Melatonin die basale, unstimulierte Insulinsekretion der INS-1-Zellen nur gering beeinflussen kann.

RT-PCR-Analysen und immunhistochemische Untersuchungen ergaben ferner, dass der MT_2 -Rezeptor in humanen Inseln vor allem in β -Zellen lokalisiert ist (Bouatia-Naji et al., 2009; Lyssenko et al., 2009). So könnte der humane MT_2 -Rezeptor beim tagaktiven Menschen durch die hohen Melatoninspiegel in der Nacht trotz der niedrigen Glukosespiegel aktiviert werden und einen inhibierenden Einfluss auf die Insulinsekretion ausüben (Boden et al., 1996; Peschke et al., 2006). Dagegen treten bei nachtaktiven Nagern nachts hohe Glukosespiegel, hohe Melatoninspiegel und hohe Insulinspiegel auf. Bei Nagern könnte die Beeinflussung der Insulinfreisetzung auch ausschließlich über den MT_1 -Rezeptor erfolgen. Untersuchungen von Melatoninrezeptor-*knockout*-Mäusen ergaben, dass obwohl MT_1 -Rezeptor-*knockout*-, MT_2 -Rezeptor-*knockout*- und MT_1MT_2 -Rezeptor-Doppel-*knockout*-Mäuse im Vergleich zum Wildtyp erniedrigte Insulinspiegel im Plasma aufweisen, nur MT_1 -Rezeptor-*knockout*-Mäuse im Vergleich zum Wildtyp leicht erhöhte Blutglukosewerte haben (Mühlbauer et al., 2009). Gerdin und Mitarbeiter (2003) vermuten, dass das circadiane *Phase-Shifting* über den MT_2 -Rezeptor vermittelt wird. Ob dieser Zusammenhang ebenfalls für die β -Zelle oder Insel zutrifft, muss allerdings in zukünftigen Arbeiten noch untersucht werden. Im Perifusionsexperiment konnte bereits 1998 Melatonin-induziertes *Phase-Shifting* der Insulinsekretion von isolierten Ratten-Inseln nachgewiesen werden (Peschke und Peschke, 1998). In der zitierten Arbeit konnte diese Melatoninwirkung keinem Rezeptortyp zugeordnet werden, es liegt aber nahe, dass sie über den MT_2 -Rezeptor vermittelt worden ist. Unterstützend wiesen Nagorny und Mitarbeiter (2011) nach, dass der MT_2 -Rezeptor in der pankreatischen Insel ausschließlich in β -Zellen von Nagern exprimiert wird. Ebenso belegte eine Arbeit zur Expression von Uhrengenen im Pankreas von Melatoninrezeptor-*knockout*-Mäusen, dass vor allem MT_2 -Rezeptor-*knockout*- und MT_1MT_2 -

Rezeptor-Doppel-*knockout*-Mäuse Veränderungen im *Phase-Shifting* und in der Amplitude zeigten (Mühlbauer et al., 2009).

Gerdin und Mitarbeiter (2003) beobachteten bereits nach 10-minütiger Inkubation mit 10 nM Melatonin das Phänomen der Rezeptor-Desensitivierung bei MT_2 , nicht aber bei MT_1 -Rezeptoren, welche in CHO-Zellen exprimiert wurden. Neben einer verminderten Melatoninbindung vermochte Melatonin die Forskolin-stimulierte cAMP-Akkumulation weniger stark zu senken; zusätzlich kam es zur Internalisierung des Rezeptors. In einer weiteren Arbeit wurde gezeigt, dass die Melatoninbindung an den MT_2 -Rezeptor bereits nach 1-stündiger Inkubation mit einer physiologischen Melatoninkonzentration von 300 pM vermindert wird; die Melatoninbindung an den MT_1 -Rezeptor hingegen wurde auch nach 8-stündiger Inkubation mit 300 pM Melatonin nicht reduziert (Gerdin et al., 2004). Demgegenüber konnten MacKenzie und Mitarbeiter (2002) eine Desensitivierung beider Melatoninrezeptoren nach 5-stündiger Inkubation mit pharmakologischen Melatoninkonzentrationen (1 μ M) beobachten. Kokkola und Mitarbeiter (2007) stellten fest, dass besonders in Zellen mit hoher Rezeptor-Expression eine Desensitivierung schon nach kurzer Zeit auftreten kann. Somit kann auch im hier verwendeten Zellsystem eine Desensitivierung des heterolog exprimierten h MT_2 -Rezeptors nicht ausgeschlossen werden.

In den vorliegenden Inkubationsversuchen war der Einsatz pharmakologischer Melatoninkonzentrationen notwendig, um die IBMX-stimulierte Insulinsekretion der INS-1-Zellen zu senken. Übereinstimmend dazu konnte auch in einer Studie von Bazwinsky-Wutschke und Mitarbeitern (2009) die IBMX-stimulierte Insulinfreisetzung der INS-1-Zellen durch ähnlich hohe Melatoninkonzentrationen reduziert werden. Demgegenüber führte schon der Einsatz sehr niedriger Melatoninkonzentrationen (100 pM) zur Hemmung der IBMX-stimulierten Insulinsekretion in den hier verwendeten h MT_2 -INS-1-Zellen, wodurch nachgewiesen wurde, dass der humane MT_2 -Rezeptor auch durch physiologische Melatoninkonzentrationen aktiviert werden kann.

Pertussistoxin katalysiert die Adenosindiphosphat-Ribosylierung der α -Untereinheiten der G_i -Proteine und hemmt so die G_i -abhängige Melatoninsignaltransduktion (Burns, 1988). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte nachgewiesen werden, dass Melatonin nach PTX-Vorinkubation die IBMX-stimulierte Insulinsekretion der INS-1-Zellen nicht mehr senkt. Übereinstimmend zu den eigenen Ergebnissen wurde auch in früheren Untersuchungen festgestellt, dass nach PTX-Vorinkubation das Forskolin-stimulierte cAMP und die Insulinsekretion von INS-1-Zellen durch Melatonin nicht mehr vermindert wurde (Kemp et al., 2002; Peschke et al., 2006b). Studien an h MT_1 -Rezeptor exprimierenden HEK-293-Zellen belegen, dass der MT_1 -Rezeptor durch Kopplung an PTX-sensitive $G_{i\alpha 2}$ - und $G_{i\alpha 3}$ -Proteine die Adenylatzyklen inhibieren kann (Brydon et al., 1999). In der vorliegenden Untersuchung wurden alle 3 α -Untereinheiten der G_i -Proteine in der INS-1-Zelle nachgewiesen, wobei $G_{i\alpha 2}$ am höchsten exprimiert ist. Deshalb kann angenommen werden, dass der MT_1 -Rezeptor auch in INS-1-Zellen, hauptsächlich an $G_{i\alpha 2}$ -Proteine bindet. Ferner führte die PTX-Vorinkubation zu

einer deutlich verminderten Melatoninwirkung bei den hMT₂-INS-1-Zellen. Damit wurde belegt, dass im hier untersuchten β -Zellsystem auch der hMT₂-Rezeptor an inhibitorische G-Proteine binden kann.

Die Ergebnisse der vorgestellten Kurzzeitinkubationsexperimente zeigen, dass bereits nach einer Stunde die IBMX-stimulierte Insulinsekretion der hMT₂-INS-1-Zellen durch Melatonin gesenkt werden konnte, die Insulinsekretion der INS-1-Zellen durch diese Inkubation jedoch nicht nachweisbar beeinflusst wurde. Die Befunde belegen, dass bereits eine kurzzeitige Melatoninexposition zur Aktivierung des hMT₂-Rezeptors ausreicht, die Melatoninrezeptoren der INS-1-Ausgangszelle jedoch nicht aktivieren kann. Dies lässt vermuten, dass der inhibitorische Effekt auf die Insulinsekretion in den transfizierten Zellen durch den hMT₂- und nicht durch den rMT₁-Rezeptor vermittelt wird. Die Analyse von cAMP zeigte bereits nach 1-stündiger Melatonininkubation eine Senkung des IBMX-induzierten cAMP-Anstiegs sowohl bei hMT₂-INS-1- als auch bei INS-1-Zellen, obwohl bei den INS-1-Zellen keine Senkung des Insulinspiegels zu beobachten war. Nach 6-stündiger Melatonininkubation hingegen wurde bei beiden Zelllinien ein Effekt auf die Insulinsekretion festgestellt. Das bedeutet, dass zur Stimulation des rMT₁-Rezeptors eine physiologisch lange Melatoninexposition, wie sie nachts auftritt, nötig sein muss. Im Gegensatz dazu ist zur Aktivierung des hMT₂-Rezeptors offenbar eine kurze Melatoninexposition ausreichend.

Übereinstimmend zu den Resultaten dieser Arbeit belegen frühere Studien, dass Melatonin durch Hemmung der cAMP-Kaskade die Forskolin-stimulierte Insulinsekretion von INS-1-Zellen senkt (Peschke et al., 2002, 2006b). Zusätzlich konnte in der vorliegenden Arbeit ein hemmender Effekt des hMT₂-Rezeptors auf die cAMP-Level nachgewiesen werden, da durch Melatonin das intrazelluläre cAMP der hMT₂-INS-1-Zellen stärker gesenkt wurde als bei den INS-1-Zellen. Der Einfluss des hMT₂-Rezeptors auf cAMP-Konzentrationen in der pankreatischen Insel wurde auch in einer Studie von Ramracheya und Mitarbeitern (2008) untersucht. Die Autoren fanden keinen signifikant hemmenden Effekt von Melatonin auf das Forskolin-stimulierte cAMP in humanen Inseln, jedoch eine deutliche Melatonin-induzierte cAMP-Reduktion in Maus-Insulinomazellen MIN6. Bei Inkubation mit Melatonin unter stimulatorischen oder substimulatorischen Glukosekonzentrationen zeigten die humanen Inseln in dieser Studie einen transienten Anstieg der Insulinsekretion. In Gegensatz dazu trat bei den MIN6-Zellen eine Senkung der Insulinfreisetzung auf.

Übereinstimmend zu den hier vorliegenden Ergebnissen konnten auch vorhergehende Studien an NIH 3T3-, CHO- und HEK-293-Zellen mit heterologer Expression des humanen MT₂-Rezeptors belegen, dass diese Rezeptor-Isoform einen inhibitorischen Einfluss auf das Forskolin-stimulierte cAMP hat (Reppert et al., 1995b; Petit et al., 1999; MacKenzie et al., 2002). Auch an humanen PAZ6 Adipozyten, die den MT₂-Rezeptor natürlicherweise exprimieren, wurde eine Hemmung der Forskolin-stimulierten cAMP-Level durch Melatonin beobachtet (Brydon et al., 2001).

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit belegen außerdem eine Senkung der IBMX-induzierten cGMP-Akkumulation durch Melatonin in den hMT₂-INS-1-Zellen, während in den INS-1-Ausgangszellen ein eher geringer Effekt auf die cGMP-Konzentration festgestellt wurde. Dies

deutet auf einen Einfluss des hMT₂-Rezeptors auf diesen Signalweg hin. Übereinstimmend konnten auch frühere Studien einen Einfluss des MT₂-Rezeptors auf die cGMP-Kaskade in INS-1-Zellen nachweisen (Stumpf et al., 2008, 2009). Auch an HEK-293-Zellen mit heterologer hMT₂-Rezeptor-Expression wurde eine inhibierende Wirkung des hMT₂-Rezeptors auf die durch IBMX-stimulierten cGMP-Level belegt (Petit et al., 1999). Hingegen konnte bei demselben Zelltyp mit Expression des humanen MT₁-Rezeptors kein Effekt auf die cGMP-Spiegel beobachtet werden (Petit et al., 1999). Übereinstimmend mit der Wirkung an INS-1-Zellen und HEK-293-Zellen führte Melatonin in humanen PAZ6-Adipozyten mit natürlicher Expression des MT₂-Rezeptors zu einer Hemmung der IBMX-stimulierten cGMP-Level (Brydon et al., 2001).

Aus zurückliegenden Versuchen der Arbeitsgruppe ist bekannt, dass Melatonin die IP₃-Bildung stimuliert und somit durch Aktivierung von zellulären IP₃-Rezeptoren am Endoplasmatischen Retikulum zu einer IP₃-getriggerten Kalzium-Freisetzung führen kann. Durch *Calcium Imaging* im kalziumfreien Perfusionsmedium konnte ein Einfluss von extrazellulärem Kalzium ausgeschlossen werden (Bach et al., 2005). Sowohl die $\beta\gamma$ -Untereinheit der G_i-Proteine als auch die α -Untereinheit von G_{q/11} sollen in die Mobilisierung von Kalzium über den Inositol-spezifischen Phospholipase C-Signalweg involviert sein (Fields und Casey, 1997). Brydon und Mitarbeiter (1999) zeigten an HEK-293-Zellen mit heterologer Expression des humanen MT₁-Rezeptors eine Kopplung des MT₁-Rezeptors an G_{q/11}-Proteine und eine daraus resultierende Erhöhung der zytosolischen Kalziumkonzentration. Da die Erhöhung der zytosolischen Kalziumkonzentration auch nach PTX-Inkubation auftrat, schlossen die Autoren einen Einfluss PTX-sensitiver G_i-Proteine aus. Auch MacKenzie und Mitarbeiter (2002) wiesen eine Erhöhung der IP₃-Spiegel durch Melatonin nach, diese kann durch beide Melatoninrezeptor-Isoformen verursacht werden, da sie sowohl bei MT₁-exprimierenden CHO-Zellen als auch bei MT₂-exprimierenden CHO-Zellen nachgewiesen wurde, nicht hingegen bei der CHO-Ausgangszelle. Ramracheya und Mitarbeiter (2008) wiesen mittels *Calcium Imaging* eine vorübergehende Erhöhung des intrazellulären Kalziums an isolierten, dispergierten humanen Inselzellen nach, die mit Melatonin perfundiert wurden. Da nur bei 15% der Inselzellen ein Kalziumpeak auftrat, vermuteten die Autoren, dass ausschließlich die α -Zellen auf Melatonin reagierten. In der vorliegenden Arbeit konnte durch *Calcium Imaging* kein Unterschied in der Reaktion auf Melatonin zwischen INS-1- und hMT₂-INS-1-Zellen festgestellt werden. Etwa die gleiche Anzahl von Zellen beider Zelltypen reagierte mit einem Anstieg des intrazellulären Kalziums auf die Melatoninapplikation. Das bedeutet, dass der humane MT₂-Rezeptor zumindest in der INS-1-Zelle keinen Einfluss auf die IP₃-Kaskade und damit die Kalziumfreisetzung hat. Möglicherweise sind in HEK-293- und CHO-Zellen andere Untereinheiten der G-Proteine stärker exprimiert, woraus dann eine Kopplung des hMT₂-Rezeptors an G_{q/11}-Proteine resultiert.

Beim *Calcium Imaging* war zudem auffällig, dass mehr INS-1- als hMT₂-INS-1-Zellen auch ohne Stimulation eine spontane Änderung der Ca²⁺-Konzentration (*Spikes*) zeigten. An Hypophysenzellen neonater Ratten wurde bereits nachgewiesen, dass Melatonin den Kalziumeinstrom hemmt (Vanecek und Klein, 1992; Slanar et al., 2000). Die Autoren schließen daraus, dass der MT-Rezeptor durch Stimulation PTX-sensitiver G-Proteine die cAMP-

abhängige Phosphorylierung spannungsabhängiger Kalziumkanäle senken kann und damit den Kalziumeinstrom reduziert. Somit könnte es auch bei den hMT₂-INS-1-Zellen zu einem verminderten Kalziumeinstrom durch die konstitutive Aktivität des hMT₂-Rezeptors kommen. Allerdings ist die Verminderung des Kalziumeinstroms offenbar eher gering, da sie die basale Insulinsekretion der hMT₂-INS-1-Zellen nicht beeinflusst und kein Unterschied zwischen den basalen Insulinsekretionsraten von INS-1- und hMT₂-INS-1-Zellen festgestellt werden konnte.

In der hier vorgestellten Arbeit konnte nachgewiesen werden, dass der humane MT₂-Rezeptor die Insulinsekretion der INS-1-Zelle senken kann, indem er durch Kopplung an G_i-Proteine die cAMP- und cGMP-Kaskade hemmt. Mit dieser Studie wird erstmals untersucht, welche Bedeutung der humane MT₂-Rezeptor im Kontext einer Insulin produzierenden und glukose-responsiven β -Zelle hat. Weiterführende Untersuchungen sollten an humanen β -Zellen durchgeführt werden. Dabei sollte geklärt werden, ob die humane β -Zelle möglicherweise eine andere G-Protein Ausstattung als die INS-1-Zelle aufweist, woraus sich mögliche Unterschiede in der Wirkungsweise des Rezeptors erklären ließen.

4.2 Funktion des MT₁-Rezeptors in der INS-1-Zelle

Zahlreiche Untersuchungen belegen, dass Melatonin die cAMP-Level und somit die Insulinsekretion von Ratten-Inseln und INS-1-Zellen senken kann (Peschke et al., 1997, 2000, 2002; Kemp et al., 2002; Picinato et al., 2002b). Weitere Studien zeigten durch Blockierung inhibitorischer G-Proteine in INS-1-Zellen, dass der inhibitorische Effekt von Melatonin durch Aktivierung spezifischer Rezeptoren erfolgt, die an inhibitorische G-Proteine binden (Kemp et al., 2002). Ein Anstieg des intrazellulären cAMPs triggert die Insulinsekretion über PKA-abhängige und PKA-unabhängige Signalwege (Renstrom et al., 1997). Der PKA-unabhängige Signalweg beinhaltet cAMP-bindende, die Sekretion unterstützende Zwischenproteine *cAMP-regulated guanine nucleotide exchange factor II* (Epac 2; Ozaki et al., 2000). Funktionelle Epac-Proteine konnten in Inseln und INS-1-Zellen nachgewiesen werden. Sie modulieren ATP-abhängige Kaliumkanäle und vermitteln so cAMP-Veränderungen und somit die Insulinantwort (Kang et al., 2006). Erste Arbeiten zur Melatoninwirkung an der β -Zelle konnten ausschließlich den MT₁-Rezeptor nachweisen und nahmen deshalb an, dass die Melatoninwirkung auf die β -Zelle ausschließlich über den MT₁-Rezeptor vermittelt wird (Kemp et al., 2002; Peschke et al., 2002). Nachdem die Expression des MT₂-Rezeptors in Inseln und INS-1-Zellen belegt wurde, muss diese Annahme validiert werden (Mühlbauer und Peschke, 2007; Peschke et al., 2007; Lyssenko et al., 2009). In der vorliegenden Arbeit sollte nun geklärt werden, welcher Anteil am Einfluss von Melatonin auf die Insulinsekretion dem MT₁-Rezeptor und welcher dem MT₂-Rezeptor zukommt. Da bislang kein selektiver MT₁-Rezeptor-Antagonist bekannt ist, sollte mittels eines shRNA-Vektors ein *knockdown* des MT₁-Rezeptors der INS-1-Zelle erfolgen. Im Anschluss sollte durch eine Reihe physiologischer Inkubationsexperimente die Melatoninwirkung auf Signalkaskaden und Insulinsekretion unter der Situation eines rMT₁-*knockdowns* bei INS-1-Zellen untersucht werden.

In der hier vorgestellten Arbeit konnte durch Charakterisierung der stabil transfizierten rMT₁-*knockdown* INS-1-Zellen gezeigt werden, dass eine Reduktion der rMT₁-mRNA auch zu einer Verminderung des rMT₁-Proteins führte. Dies konnte ausschließlich bei Transfektion des Vektorkonstruktes mit einer kurzen Antisense des rMT₁-Rezeptors beobachtet werden, nicht jedoch in den Zellen, die mit einem funktionell inaktiven, neutralen Antisense-Kontrollvektor transfiziert wurden.

Durch PCR-Analyse der Insulingene 1 und 2 in INS-1-Zellen konnte im Rahmen dieser Arbeit nachgewiesen werden, dass ein *knockdown* des rMT₁-Rezeptors zu einer verstärkten Genaktivierung von *rlns1* führt. Vermutlich steigt die Expression von *rlns1* durch eine Erhöhung des cAMPs, welche durch das Fehlen des rMT₁-Rezeptor Signals verursacht wird. Kemp und Mitarbeiter (2002) konnten an INS-1-Zellen bereits zeigen, dass GLP-1-Inkubation, welche zum Anstieg von cAMP führt, die Expression von *rlns1* erhöht. Obwohl sie nach Melatonininkubation keine Änderung der basalen Expression von *rlns1* feststellten, konnten sie nachweisen, dass Melatonin zumindest die GLP-1-stimulierte Expression von *rlns1* senken kann. Andere Autoren haben nachgewiesen, dass cAMP die Expression von *rlns1*, über CREs im Promotorbereich von *rlns1*, beeinflusst (Philippe und Missotten, 1990). Ebenso wurde gezeigt, dass *rlns1* durch CREB aktiviert werden kann (Chepurny et al., 2002). CREs wurden aber auch im Promotor von *rlns2* nachgewiesen (Crowe und Tsai, 1989). Der Mechanismus, wie cAMP die Insulingene reguliert, könnte sich dennoch unterscheiden, da im Promotorbereich von *rlns1* und *rlns2* unterschiedliche Varianten der CREs auftreten (Melloul et al., 2002). So könnte die eigene Beobachtung, dass der rMT₁-*knockdown* die *rlns2*-Expression nicht beeinflusst, durch die unabhängige Regulation der beiden Insulingene von Nagern erklärbar sein (Deltour et al., 1993). Übereinstimmend mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit konnte in einer Studie von Mühlbauer und Mitarbeitern (2009) keine Veränderung in der Expression von *rlns2* bei MT₁-Rezeptor-*knockout*-Mäusen im Vergleich zum Wildtyp festgestellt werden. Hingegen zeigten, verglichen mit dem Wildtyp, MT₂-Rezeptor-*knockout*- und MT₁MT₂-Rezeptor-Doppel-*knockout*-Mäuse eine signifikant erhöhte Expression von *rlns2*.

Weiterführende eigene Untersuchungen belegen, dass ein *knockdown* des MT₁-Rezeptors auch die basale Insulinsekretion erhöht, dies könnte durch das Fehlen eines konstitutiv aktiven MT₁-Rezeptors verursacht sein (Roka et al., 1999; Devavry et al., 2012). Übereinstimmend dazu konnten Kemp und Mitarbeiter (2002) nachweisen, dass Melatonininkubation zu einer leichten Senkung der basalen Insulinsekretion von INS-1-Zellen führt.

Das von den α -Zellen der pankreatischen Insel gebildete Glucagon kann an Gs-Protein gekoppelte Glucagonrezeptoren der β -Zelle binden und dadurch den cAMP-Spiegel und die Insulinsekretion erhöhen (Jelinek et al., 1993; Huypens et al., 2000). Über das in der vorliegenden Arbeit verwendete Zellmodell der INS-1-Zelle ist bekannt, dass es Glucagonrezeptoren exprimiert und Glucagon binden kann (Kieffer et al., 1996). Dennoch fiel die Erhöhung der Insulinsekretion nach Inkubation mit 100 nM Glucagon bei einer

Glukosekonzentration von 11,1 mM in den eigenen Versuchen eher moderat aus. Ramracheya und Mitarbeiter (2008) konnten in ihrer Studie bei Einsatz der gleichen Glucagonkonzentration eine stärkere Erhöhung der Insulinsekretion beobachten. Dies könnte zum einen durch die Verwendung einer höheren Glukosekonzentration (20 mM), zum anderen durch die Verwendung eines anderen Zellmodells (MIN6-Zellen) verursacht sein. In der eigenen Untersuchung konnte sowohl bei INS-1-Zellen als auch bei den Kontroll-shRNA-INS-1-Zellen die Glucagon-stimulierte Insulinsekretion durch Melatonin gesenkt werden. Hingegen zeigte Melatonin in diesem Versuch bei den rMT₁-*knockdown* INS-1-Zellen keine Wirkung. Somit könnte die Senkung der Glucagon-stimulierten Insulinsekretion durch Melatonin über den rMT₁-Rezeptor vermittelt werden.

Durch verschiedene Studien wurde nachgewiesen, dass Melatonin *in vitro* und *in vivo* die Glucagonsekretion erhöhen kann (Ramracheya et al., 2008; Bähr et al., 2011). Ramracheya und Mitarbeiter (2008) konnten an perfundierten humanen Inseln eine Zunahme der Insulinsekretion durch Melatonininkubation beobachten und begründeten dies als parakrinen Sekundäreffekt durch die Erhöhung der Glucagonsekretion. Hingegen haben tierexperimentelle Untersuchungen an Wistarratten gezeigt, dass eine Langzeitmelatoninverabreichung über das Trinkwasser trotz Erhöhung der Plasmaglukagonspiegel zur Senkung der Plasmainsulinspiegel führt (Peschke et al., 2010; Bähr et al., 2011). Ob es sich hierbei um Spezies-spezifische Unterschiede handelt, wie Ramracheya (2008) vermutete, oder ob *in vivo* noch andere Faktoren die Insulinsekretion beeinflussen, muss noch geklärt werden.

Das im Darm gebildete Peptid GLP-1 verstärkt in Abhängigkeit vom Glukosegehalt, die Nahrungs-induzierte Insulinsekretion über spezifische Rezeptoren an der β -Zelle. Der GLP-1-Rezeptor koppelt an stimulatorische G-Proteine und aktiviert dadurch die Adenylatzyklase (Mayo et al., 2003). Der Anstieg von cAMP aktiviert die PKA, die zum einen durch Phosphorylierung spannungsabhängiger Kalziumkanäle vom L-Typ zum Kalziumeinstrom führt und zum anderen durch Stimulation von Ryanodin-Rezeptoren Kalzium aus intrazellulären Speichern mobilisiert (Holz et al., 1999). PKA-unabhängig kann GLP-1 die intrazelluläre Kalziumkonzentration durch Aktivierung von Epac2 erhöhen (Kang et al., 2001).

Chan und Mitarbeiter (1997) konnten nach Transfektion des GLP-1-Rezeptors in HEK-293-Zellen keinen Effekt von Melatonin auf die durch GLP-1 stimulierte cAMP-Konzentration beobachten, obwohl sie den MT₁-Rezeptor in dieser Zelllinie nachweisen konnten. Die hier aufgeführten Ergebnisse hingegen zeigen, dass durch GLP-1 die Insulinsekretion der INS-1-Zelle erhöht werden kann und dass Melatonin die stimulierende Wirkung von GLP-1 hemmt. Somit konnten die Befunde von Kemp und Mitarbeitern (2002) bestätigt werden, die eine erhöhte Insulinsekretion nach GLP-1 Inkubation und einen inhibitorischen Einfluss von Melatonin auf die durch GLP-1 stimulierte Insulinsekretion beschrieben. Trotz Einsatz der gleichen GLP-1-Konzentration fiel die stimulatorische Wirkung von GLP-1 in der eigenen Studie jedoch geringer aus. Wie die vorliegenden Resultate belegen, ist die modulierende Rolle von Melatonin auf die GLP-1-stimulierte Insulinsekretion von der Expression des MT₁-Rezeptors abhängig. Der MT₂-Rezeptor Signalweg spielt zumindest im zellulären Kontext der INS-1-Zelle

in diesem Zusammenhang offenbar keine Rolle. Einige Studien deuten darauf hin, dass der MT_2 -Rezeptor der Schlüsselfaktor zur Übermittlung des Melatoninsignals in humanen Inseln ist und deuten damit auf Spezies-spezifische Unterschiede hin (Bouatia-Naji et al., 2009; Lyssenko et al., 2009). Ramracheya und Mitarbeiter (2008) äußerten, dass Melatonin eine inhibierende Wirkung bei Nagern, jedoch einen indirekten stimulatorischen Effekt auf humane Inseln ausübt. Ob diese Speziesunterschiede durch unterschiedliche Rezeptorausstattung der Inselzelltypen oder durch die unterschiedliche tag- bzw. nachtaktive Lebensweise bedingt sind, muss noch geklärt werden.

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass schon durch annähernd physiologische Melatoninkonzentrationen von 1 nM Melatonin die cAMP-Spiegel in INS-1- und in Kontroll-shRNA-INS-1-Zellen nach IBMX-Stimulation gesenkt werden. Eine Erhöhung der Melatoninkonzentration auf 100 nM konnte die Hemmung nur gering verstärken. Bei beiden Melatoninkonzentrationen fehlte bei den *rMT₁-knockdown* INS-1-Zellen die inhibierende Wirkung. Somit kann davon ausgegangen werden, dass der reduzierende Effekt von Melatonin auf das intrazelluläre cAMP der INS-1-Zelle durch Stimulation des MT_1 -Rezeptors vermittelt wird. Übereinstimmend dazu konnten Reppert und Mitarbeiter (1994) an NIH 3T3 Zellen mit heterologer Expression des ovinen MT_1 -Rezeptors nachweisen, dass Melatonin die Forskolin-stimulierte cAMP-Akkumulation senkt. Ebenso wurde an HEK-293-Zellen und CHO-Zellen mit heterologer Expression des humanen MT_1 -Rezeptors eine Senkung der Forskolin-stimulierten cAMP-Spiegel nach Melatonininkubation beobachtet (Brydon et al., 1999; Petit et al., 1999; MacKenzie et al., 2002).

Parallel zur cAMP-Messung wurde im Rahmen dieser Arbeiten die Insulinkonzentration nach IBMX- und Melatonininkubation bestimmt. Auch hier konnte bei den INS-1- und den Kontroll-shRNA-INS-1-Zellen ein hemmender Einfluss beider Melatoninkonzentrationen nachgewiesen werden. Ebenso wurde bei den *rMT₁-knockdown* INS-1-Zellen keine Melatoninwirkung festgestellt. Die Versuche zeigten, dass in der INS-1-Zelle die Melatonin-induzierten Effekte nach IBMX-Stimulation auf die cAMP-Konzentration und die Insulinsekretion nur bei MT_1 -Rezeptor-Expression auftreten. Übereinstimmend dazu wurde in vorausgegangenen Perfusionsexperimenten an pankreatischen Inseln von Ratten sowie an INS-1-Zellen eine inhibierende Wirkung von Melatonin auf die durch Forskolin stimulierten cAMP-Spiegel und die Insulinsekretion nachgewiesen (Peschke et al., 2000, 2002, 2006b; Picinato et al., 2002b). Bereits in diesen früheren Arbeiten wurde ein Einfluss des MT_1 -Rezeptors vermutet, da die beschriebenen Wirkungen von Melatonin bei Verwendung des Melatoninrezeptorblockers Luzindol aufgehoben wurden (Peschke et al., 2000, 2002). Nachdem der MT_2 -Rezeptor 2007 auf der β -Zelle nachgewiesen wurde (Mühlbauer und Peschke, 2007), deutete eine spätere Studie durch Einsatz des Melatoninrezeptorblockers 4P-PDOT auch auf einen Einfluss des MT_2 -Rezeptors auf die Insulinsekretion der INS-1-Zelle hin (Stumpf et al., 2008). Zwar haben sowohl Luzindol als auch 4P-PDOT eine höhere Affinität für den MT_2 -Rezeptor (Browning et al., 2000; Dubocovich et al., 2010), dennoch kann eine Hemmung des MT_1 -Rezeptors, besonders in einer Zelllinie, die hauptsächlich den MT_1 -Rezeptor exprimiert, nicht gänzlich ausgeschlossen

werden. So könnte auch in der Studie von Stumpf und Mitarbeitern (2008) die inhibierende Wirkung von Melatonin auf die Insulinsekretion hauptsächlich über den MT₁-Rezeptor vermittelt worden sein.

Des Weiteren muss in einer Zelle, in der beide Melatoninrezeptoren koexprimiert sind, die Möglichkeit einer Heterodimerbildung aus MT₁- und MT₂-Rezeptor berücksichtigt werden. Ayoub und Mitarbeiter (2004) konnten an HEK-293-Zellen mit heterologer Expression beider Melatoninrezeptoren belegen, dass es drei- bis viermal häufiger zur Bildung von MT₁/MT₂-Heterodimeren als zur Bildung von MT₂-Homodimeren kommt. Darüber hinaus fanden sie heraus, dass Melatonin sowohl an MT₂-Homodimere als auch an MT₁/MT₂-Heterodimere bindet. Hingegen weisen Luzindol und 4P-PDOT eine ähnliche oder sogar höhere Affinität für MT₁/MT₂-Heterodimere auf (Ayoub et al., 2004). Somit wäre auch in der INS-1-Zelle eine Bildung von MT₁/MT₂-Heterodimeren möglich. Damit könnte erklärt werden, warum in der Studie von Stumpf und Mitarbeitern (2008), trotz geringer MT₂-Rezeptor-Expression in der INS-1-Zelle, durch 4P-PDOT die inhibierende Melatoninwirkung auf die Insulinsekretion aufgehoben werden konnte. Allerdings gibt es bisher keine Untersuchungen, die die Bildung von MT₁/MT₂-Heterodimeren in nativen Geweben belegen. Zur Beurteilung der Relevanz von MT₁/MT₂-Heterodimeren in der INS-1-Zelle sind deshalb weiterführende Untersuchungen nötig.

An Zellen der ovinen *Pars tuberalis* wurde durch verschiedene Arbeitsgruppen bereits belegt, dass eine 16-stündige Präinkubation mit Melatonin durch heterologe Sensitivierung zum Anstieg der basalen und Forskolin-stimulierten cAMP-Spiegel führt (Hazlerigg et al., 1993; Barrett et al., 2000). Ebenso konnten Pelisek und Vanecek (2000) an Hypophysenzellen neonater Ratten *in vitro* eine Erhöhung der Forskolin-stimulierten cAMP-Spiegel nach 16-stündiger Präinkubation mit Melatonin beobachten. Kemp und Mitarbeiter (2002) haben an INS-1-Zellen nachgewiesen, dass eine 12-stündige Präinkubation mit Melatonin die Insulinsekretion, die Insulinpromotoraktivität und die CRE-medierte Genexpression erhöht. Übereinstimmend zu deren Ergebnissen konnte in der vorliegenden Arbeit eine erhöhte Insulinsekretion nach Melatoninpräinkubation und anschließender GLP-1-Stimulation nachgewiesen werden. Anders als bei Kemp und Mitarbeitern (2002) führte die Melatoninpräinkubation im eigenen Versuch auch zu einer Erhöhung der basalen Insulinsekretion von INS-1- und Kontroll-shRNA-INS-1-Zellen. Eine Erhöhung der basalen Insulinsekretion nach Melatoninpräinkubation konnten Kemp und Mitarbeiter (2002) an isolierten pankreatischen Inseln von Ratten nachweisen. Die eigenen Ergebnisse deuten darauf hin, dass die heterologe Sensitivierung über den MT₁-Rezeptor vermittelt wird, da bei rMT₁-*knockdown* INS-1-Zellen kein sensitivierender Effekt von Melatonin beobachtet werden konnte. Übereinstimmend dazu haben auch Witt-Enderby und Mitarbeiter (1998) an CHO-Zellen mit heterologer Expression des humanen MT₁-Rezeptors nach 8-stündiger Präinkubation mit Melatonin eine Erhöhung der Forskolin-stimulierten cAMP-Spiegel nachweisen können. Hingegen beobachteten Witt-Enderby und Mitarbeiter an hMT₂-CHO-Zellen keine heterologe Sensitivierung. Da für die eigenen Untersuchungen eine Ratteninsulinomazelllinie verwendet wurde, konnte gesichert werden, dass nicht nur über den humanen (Witt-Enderby et al., 1998), sondern auch über den Ratten-MT₁-Rezeptor ein

sensitivierender Effekt vermittelt werden kann und sich die Rezeptoren, zumindest in Bezug auf diese Signalwirkung, nicht unterscheiden. Weiterführende Untersuchungen müssen klären, auf welche Weise diese Beeinflussung der Signalkaskaden der β -Zelle erfolgt. Kemp und Mitarbeiter (2002) vermuteten, dass die heterologe Sensitivierung entweder durch direkte molekulare Effekte auf die Adenylatzyklase oder indirekt durch Regulation der Expression der G-Proteine vermittelt wird. Witt-Enderby und Mitarbeiter (1998) konnten nach Melatoninentzug eine PKA-Aktivierung und verstärkte CREB-Phosphorylierung nachweisen. Darüber hinaus zeigten sie nach PTX-Behandlung eine verstärkte Ribosylierung von G_i - und G_o -Proteinen; die Proteinlevel der G-Proteine blieben hingegen unverändert. Die morgendliche Abnahme von Melatonin, die dem nächtlichen Anstieg folgt, könnte so auf physiologische Weise die Insulinsekretion tagaktiver Spezies verstärken (Kemp et al., 2002).

Die vorgestellten Befunde belegen, dass Melatonin die Insulinsekretion der INS-1-Zelle hauptsächlich über den MT_1 -Rezeptor beeinflusst. Die Inhibierung der Insulinsekretion wird dabei durch Senkung der cAMP-Spiegel vermittelt. Ebenso wurde gezeigt, dass über den MT_1 -Rezeptor die Expression von *rlns1* und die basale Insulinsekretion beeinflusst werden. Außerdem konnte erstmals nachgewiesen werden, dass der MT_1 -Rezeptor auch an der heterologen Sensitivierung der INS-1-Zelle beteiligt ist.

4.3 Einfluss der Melatoninrezeptoren auf die Insulinsekretion der pankreatischen Insel

Die bisherigen Ergebnisse wurden an INS-1-Zellen gewonnen. Die INS-1-Zelllinie entstand durch Bestrahlung eines Insulinoms der Ratte und besitzt die morphologischen Eigenschaften einer nativen β -Zelllinie. Der Insulingehalt dieser Zelllinie ist mit 20% des Insulingehaltes nativer β -Zellen relativ hoch. Außerdem reagiert die INS-1-Zelle auf physiologische Glukosekonzentrationen mit einem Anstieg der Insulinsekretion (Asfari et al., 1992). Allerdings handelt es sich bei den INS-1-Zellen nicht um eine klonale Zelllinie, daher verändern sich einige Eigenschaften dieser Zelle, z.B. das Ansprechen auf Glukose, im Laufe der Passagen (Hohmeier et al., 2000). Des Weiteren ist nicht auszuschließen, dass einige Eigenschaften der INS-1-Zelle ausschließlich auf die Transformation zur Immortalität zurückzuführen sind. Um die an dem β -Zellmodell gewonnenen Ergebnisse zu bestätigen und um sie im natürlichen Kontext der pankreatischen Insel zu betrachten, wurden in der vorliegenden Arbeit deshalb Inkubationsexperimente an isolierten Inseln von Melatoninrezeptor-*knockout*-Mäusen durchgeführt. Die Ergebnisse zeigen eine Melatonin-induzierte Senkung der Insulinsekretion IBMX-behandelter Wildtyp-Inseln, die beide Melatoninrezeptor-Isoformen exprimieren. Hingegen konnte die IBMX-stimulierte Insulinsekretion der Inseln von MT_1 -Rezeptor-*knockout*-, MT_2 -Rezeptor-*knockout*- und MT_1MT_2 -Rezeptor-Doppel-*knockout*-Mäusen durch Melatonin nicht beeinflusst werden. In weiteren Experimenten ohne IBMX-Stimulation konnte durch Melatonin die Insulinsekretion von Wildtyp- und MT_2 -Rezeptor-*knockout*-Mäusen, auch wenn bei letzteren nicht signifikant, deutlich gesenkt werden. Damit wird belegt, dass der inhibitorische

Effekt von Melatonin auch in der pankreatischen Insel über den MT₁-Rezeptor vermittelt wird und der MT₂-Rezeptor in diesem Zusammenhang eine untergeordnete Rolle spielt. Dies könnte unter anderem durch die relativ geringe Expression des MT₂-Rezeptors in Inseln von Nagern begründet sein (Mühlbauer und Peschke, 2007). Die MT₂-Rezeptor-Expression in Pankreas und in INS-1-Zellen ist so niedrig, dass sie durch frühe PCR-Untersuchungen nicht nachgewiesen werden konnte (Kemp et al., 2002; Peschke et al., 2002). Dennoch wurde durch immunzytochemische Markierung sowohl in humanen als auch in pankreatischen β -Zellen von Nagern MT₂-Rezeptorprotein nachgewiesen (Lyssenko et al., 2009). Weiterhin konnten Nagorny und Mitarbeiter (2011) durch immunzytochemische Markierung den MT₂-Rezeptor ausschließlich an der β -Zelle und den MT₁-Rezeptor ausschließlich an der α -Zelle nachweisen. Deshalb vertreten die Autoren die Auffassung, dass die Hemmung der Insulinsekretion über die MT₂-Rezeptoren an der β -Zelle vermittelt wird. Eine Untersuchung der pankreatischen α -Zelllinie der Maus (α TC1.9) zeigte, dass diese Zelllinie beide Melatoninrezeptoren exprimiert und Melatonin die Glucagonsekretion dieser Zellen stimulieren kann (Bähr et al., 2011). Ramracheya und Mitarbeiter (2008) beschreiben, dass die Melatoninrezeptoren in der α -Zelle an G_q-Proteine binden, da sie einen Melatonin-induzierten Anstieg des intrazellulären Kalziums beobachteten. In der letztgenannten Untersuchung stieg die Insulinsekretion humaner Inseln durch Melatonininkubation. Die Autoren diskutierten als Ursache eine parakrine Wirkung von Glucagon auf die β -Zelle, da eine Erhöhung der Glucagonsekretion durch Melatonininkubation nachgewiesen werden konnte. Im Gegensatz dazu fanden Ramracheya und Mitarbeiter (2008) bei Inkubation von MIN6-Zellen eine supprimierende Wirkung von Melatonin und können somit die eigenen Ergebnisse bestätigen. Obwohl Nagorny und Mitarbeiter (2011) an der β -Zelle nur den MT₂-Rezeptor nachweisen konnten, schließen auch sie einen indirekten Einfluss des MT₁-Rezeptors auf die Insulinsekretion nicht aus. Aufgrund der höheren Bindungsaffinität von Melatonin an den MT₁-Rezeptor als an den MT₂-Rezeptor, könnte der MT₁-Rezeptor der α -Zellen tagsüber trotz der niedrigen Melatoninkonzentrationen im Blut aktiviert werden, die dann erhöhte Glucagonsekretion könnte die Insulinsekretion der β -Zellen stimulieren. Die langfristige, wenn auch geringe, Stimulation des MT₁-Rezeptors der α -Zelle könnte nach Nagorny und Mitarbeitern durch Sensitivierung der cAMP-Kaskade zur Hemmung der Glucagonsekretion führen und in deren Folge zur Hemmung der Insulinsekretion der β -Zelle beitragen.

Die eigenen Versuche an pankreatischen Inseln konnten die Ergebnisse an der INS-1-Zelle zumindest bei Nagern bestätigen - die inhibierende Wirkung von Melatonin auf die Insulinsekretion wird über den MT₁-Rezeptor vermittelt. Vorausgehende Studien konnten bereits belegen, dass der MT₁-Rezeptor die Glukosehomeostase beeinflusst. Im Vergleich zum Wildtyp zeigten MT₁-Rezeptor-*knockout*-Mäuse erhöhte Blutglukosespiegel (Mühlbauer et al., 2009). In einer weiteren Untersuchung wurden bei MT₁-Rezeptor-*knockout*-Mäusen im Vergleich zum Wildtyp signifikant erhöhte Blutglukosespiegel nach intraperitonealer Applikation von Glukose oder Insulin festgestellt (Contreras-Alcantara et al., 2010). Deshalb diskutierten die Autoren, dass der gestörte Glukosemetabolismus dieser Tiere durch eine erhöhte Insulinresistenz verursacht wird. Devavry und Mitarbeiter (2012b) konnten zeigen, dass sich die

molekularbiologischen und pharmakologischen Eigenschaften der Melatoninrezeptoren der Maus nicht von denen des Menschen unterscheiden. Darüber hinaus belegen die Ergebnisse einer Genom-weiten Assoziationsstudie, dass sowohl homo- als auch heterozygote Träger einer bestimmten genetischen Variante des humanen MT₁-Rezeptors (SNP rs2119882) erhöhte Nüchternblutglukosespiegel und erhöhte Insulinlevel im oralen Glukosetoleranztest aufweisen (Li et al., 2011). Da mehrere Genom-weite Assoziationsstudien aber auch SNPs im humanen MT₂-Rezeptorgen mit erhöhten Nüchternblutglukosespiegeln im Plasma, pathologisch veränderter Insulinsekretion sowie einem erhöhten Typ2-Diabetes Risiko in Verbindung bringen und gezeigt wurde, dass beide Melatoninrezeptor-Isoformen in humanen Inseln annähernd gleiche Expressionslevel aufweisen bzw. dass in β -Zellen vor allem der MT₂-Rezeptor exprimiert ist (Staiger et al., 2008; Bouatia-Naji et al., 2009; Chambers et al., 2009; Lyssenko et al., 2009; Prokopenko et al., 2009; Ronn et al., 2009) könnte der MT₂-Rezeptor beim Menschen von größerer Bedeutung für die Insulinsekretion sein. Weiterführende Untersuchungen sollten klären wie und über welche Melatoninrezeptor-Isoform sich akute und chronische Melatoninbehandlungen auf die Insulinsekretion der humanen β -Zelle und Insel auswirken und damit die Glukosehomeostase des Menschen beeinflussen.

5 Zusammenfassung

In den letzten Jahrzehnten wurde durch zahlreiche Studien der Einfluss von Melatonin auf die pankreatische Insel belegt. Frühe Arbeiten an der β -Zelle konnten ausschließlich den MT_1 -Rezeptor nachweisen und nahmen deshalb an, dass die inhibierende Wirkung von Melatonin auf die β -Zelle über den G_i -Protein-gekoppelten MT_1 -Rezeptor durch Hemmung der cAMP-Kaskade vermittelt wird. Nachdem auch der MT_2 -Rezeptor in der β -Zelle detektiert wurde, konnte durch Inkubation mit Melatoninrezeptor-Antagonisten gezeigt werden, dass der hemmende Effekt von Melatonin auf die stimulierte Insulinsekretion in INS-1-Zellen vermutlich auch über den MT_2 -Rezeptor vermittelt wird.

Mehrere Arbeiten der Arbeitsgruppe Peschke deuten zudem auf eine Insulin-Melatonin-Interaktion, da bei diabetischer Stoffwechsellaage Veränderungen der Plasmamelatoninkonzentrationen und der Melatoninrezeptor-Expression im Pankreas nachgewiesen wurden. Ebenso belegen Genom-weite Assoziationsstudien Zusammenhänge zwischen bestimmten genetischen Varianten des humanen MT_2 -Rezeptors und erhöhten Nüchternblutglukosespiegeln sowie einem erhöhten Risiko an Typ2-Diabetes zu erkranken. Durch funktionelle Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass einige dieser Rezeptor-Varianten nur noch eingeschränkt funktionsfähig sind. Bisher noch ungeklärt blieb, wie über den humanen MT_2 -Rezeptor die Insulinsekretion der β -Zelle beeinflusst wird, und ob ein Funktionsverlust des Rezeptors zur Diabetesentstehung beiträgt.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit bestand darin zu untersuchen, wie und über welche Signalkaskaden der humane MT_2 -Rezeptor die β -Zelle beeinflussen kann. Am Modell der Ratteninsulinoma β -Zelllinie INS-1 mit heterologer Expression des humanen MT_2 -Rezeptors konnte durch *Batch*-Inkubationsexperimente erstmals gezeigt werden, dass Melatonin über den humanen MT_2 -Rezeptor sowohl die stimulierte als auch die basale Insulinsekretion der β -Zelle senken kann. Die Aktivierung des Rezeptors erfolgte dabei bereits durch kurzzeitige Melatoninexposition und physiologische Melatoninkonzentrationen. Zudem wurde nachgewiesen, dass die heterologe Expression des humanen MT_2 -Rezeptors und dessen mögliche konstitutive Aktivität weder die Expression der Insulingene der Ratte noch die basale Insulinsekretion der INS-1-Zelle beeinträchtigt. Ferner verhinderte die Inkubation mit Pertussistoxin die Melatoninwirkung im hier untersuchten β -Zellsystem, wodurch eine Kopplung des humanen MT_2 -Rezeptors an inhibitorische G-Proteine bestätigt wurde. Weitere in *Batch*-Kultur durchgeführte Versuche belegen, dass der humane MT_2 -Rezeptor die Insulinsekretion der INS-1-Zelle senken kann, indem er die cAMP- und cGMP-Kaskade hemmt. Darüber hinaus war im verwendeten Zellmodell nach Melatoninapplikation kein Einfluss des humanen MT_2 -Rezeptors auf das G_q /PLC/IP₃-System und damit die intrazelluläre Kalziumfreisetzung nachweisbar. Dennoch reduzierte die heterologe Expression des humanen MT_2 -Rezeptors die Anzahl der spontan *spikenden* INS-1-Zellen, wie die Auswertung des *Calcium Imaging* ergab.

Im zweiten Teil dieser Arbeit sollte geklärt werden, ob der MT_1 -Rezeptor und der MT_2 -Rezeptor die β -Zelle in gleicher Weise beeinflussen, oder ob die Modulierung der Insulinsekretion

hauptsächlich über eine der beiden Melatoninrezeptor-Isoformen erfolgt. Dazu erfolgte ein *knockdown* des MT₁-Rezeptors der INS-1-Zelle mittels eines stabil im Genom integrierten *antisense*-RNA codierenden Vektors. Durch eine Reihe physiologischer Inkubationsexperimente mit dieser rMT₁-*knockdown* INS-1-Zelllinie konnte nachgewiesen werden, dass Melatonin die Insulinsekretion der INS-1-Zelle hauptsächlich über den MT₁-Rezeptor beeinflusst. Dabei führte die akute, kurzfristige Melatonininkubation durch Senkung der cAMP-Spiegel zur Hemmung der Insulinsekretion. Eine chronische Melatoninpräinkubation hingegen erhöhte die basale und GLP-1-stimulierte Insulinsekretion nur bei den INS-1-Ausgangszellen, wodurch erstmals der Nachweis erbracht wurde, dass der MT₁-Rezeptor auch an der heterologen Sensitivierung der INS-1-Zelle beteiligt ist. Ebenso wurde festgestellt, dass Melatonin über den MT₁-Rezeptor die Expression von *rlns1* und die basale Insulinsekretion beeinflusst.

Im dritten Teil der vorliegenden Studie sollte untersucht werden, ob die an den β -Zellmodellen gewonnenen Erkenntnisse zur Rezeptor-medierten Melatoninwirkung auf die pankreatische Insel übertragbar sind. Dazu wurden Inkubationsversuche an isolierten Inseln von Melatoninrezeptor-*knockout*-Mäusen durchgeführt. Nach IBMX-Behandlung war eine Melatonin-induzierte Senkung der Insulinsekretion nur bei den Inseln der Wildtyp Mäuse nachweisbar. In einem weiteren Experiment ohne IBMX-Stimulation hingegen konnte durch Melatonininkubation die Insulinfreisetzung der Inseln von Wildtyp- und MT₂-Rezeptor-*knockout*-Mäusen, wenn auch bei letzteren nicht signifikant, gesenkt werden. Damit wurde belegt, dass der inhibitorische Effekt von Melatonin auf die Insulinsekretion auch in der pankreatischen Insel im Wesentlichen über den MT₁-Rezeptor vermittelt wird und der MT₂-Rezeptor zumindest bei Nagern in diesem Zusammenhang eine untergeordnete Rolle spielt.

Zusammenfassend konnte in der vorliegenden Arbeit festgestellt werden, dass der Einfluss von Melatonin auf die Insulin-Expression und -sekretion, zumindest bei Nagern, hauptsächlich über den MT₁-Rezeptor vermittelt wird, was durch eine geringe Expression des MT₂-Rezeptors in Inseln von Nagern begründet sein könnte. Hingegen wurden in vorausgegangenen Untersuchungen an humanen Inseln annähernd gleiche Expressionslevel der beiden Melatoninrezeptor-Isoformen nachgewiesen, wobei in β -Zellen vor allem der MT₂-Rezeptor exprimiert sein soll. Zudem konnte in der hier vorgestellten Arbeit gezeigt werden, dass über den humanen MT₂-Rezeptor die Insulinsekretion zumindest der INS-1-Zelle gesenkt werden kann. Weiterführende Studien sollten daher klären, wie und über welche Melatoninrezeptor-Isoform sich akute und chronische Melatoninbehandlungen auf die Insulinsekretion der humanen β -Zelle und Insel auswirken und damit die Glukosehomeostase des Menschen beeinflussen.

6 Summary

During the last decades, several studies have provided evidence for the influence of melatonin on the pancreatic islet. Early investigations showed that the melatonin receptor 1A (MT₁) is expressed in the β -cell and suggested, therefore, that the insulin-lowering effect of melatonin is mediated exclusively via the inhibitory guanine nucleotide-binding protein (G_i-protein)-coupled MT₁ receptor through inhibition of the cAMP cascade. Shortly thereafter, transcripts of the melatonin receptor 1B (MT₂) were detected in the β -cell. Incubation studies using melatonin receptor antagonists showed that the MT₂ receptor is also involved in mediating the insulin-inhibiting effect of melatonin in rat insulinoma β -cells (INS-1) via cGMP as a second messenger. Interestingly, several studies demonstrated an interaction between insulin and melatonin: diabetic rats as well as diabetic patients exhibit changes in plasma melatonin concentrations and pancreatic melatonin receptor expression. Moreover, genetic variations in the human melatonin receptor 1B gene are associated with increased fasting glucose levels and elevated risk of type 2 diabetes. Functional characterizations of some of these variations revealed that the receptor signaling was disturbed. However, it remains unknown how the human MT₂ receptor affects insulin secretion and whether its loss of function influences the genesis of diabetes.

The aim of the present study was to evaluate whether melatonin affects β -cell via human MT₂ receptor signaling and which signaling pathway is involved. Batch incubation experiments were performed using INS-1 cells heterologously expressing the human MT₂ receptor. For the first time, results clearly demonstrated that melatonin can reduce stimulated as well as unstimulated insulin release of the β -cell via the human MT₂ receptor. The receptor was activated already by a subphysiologically short melatonin exposure and by physiological melatonin concentrations. Moreover, the data showed that the heterologous expression of the human MT₂ receptor and its possible constitutive activity affect neither the expression of the endogenous insulin genes nor the basal insulin secretion of the INS-1 cell. As evidence for the coupling of the human MT₂ receptor to G_i-proteins, incubation with pertussis toxin prevented the inhibitory effect of melatonin in the investigated β -cell system. Furthermore, the results of incubation studies demonstrated that the human MT₂ receptor can reduce insulin secretion from INS-1 cells by inhibiting the cAMP and cGMP signaling cascade. In addition, after melatonin application, no influence of the human MT₂ receptor on the G_q/PLC/IP₃-system and thus on the release of intracellular calcium was detectable. Nevertheless, the heterologous expression of the human MT₂ receptor resulted in a reduced number of spontaneously spiking INS-1 cells, as revealed by evaluation of calcium-imaging experiments.

The second part of this work addressed the question whether the MT₁ receptor and the MT₂ receptor affect the β -cell in the same fashion, or whether the modulation of insulin secretion occurs mainly via one of the two melatonin receptor isoforms. A RNA interference technique was used to generate a permanent MT₁ receptor knockdown in INS-1 cells. Results of incubation experiments using this transgenic rMT₁-knockdown INS-1 cell line demonstrated that

melatonin affects insulin secretion mainly via the MT₁ receptor. Here it could be shown that acute, short-term melatonin exposure led to a reduction of insulin secretion by lowering cAMP levels. In contrast, long-term exposition followed by a short period of melatonin withdrawal resulted in an increase of basal and GLP-1-stimulated insulin secretion (sensitization) only in INS-1 cells but not in the genetically altered cells with an MT₁ knockdown. These data indicate that melatonin-triggered sensitization proceeds through MT₁-linked signaling. Moreover, results of quantitative RT-PCR measurements of rat insulin genes 1 and 2 (*rIns1* and *rIns2*) and determination of basal insulin secretion demonstrated that melatonin affects the expression of *rIns1* and basal insulin secretion predominantly via the MT₁ receptor.

To confirm and complement the results obtained from incubation experiments with β -cell models, incubation experiments with isolated islets of melatonin receptor knockout mice were performed. After IBMX treatment, melatonin-induced reduction of insulin secretion was only detectable in the islets of wild-type mice but not in mice lacking the melatonin receptors. In another set of experiments without IBMX stimulation, however, insulin release from islets of wild-type and MT₂ receptor knockout mice could be reduced by melatonin treatment, even though insulin release from the latter islets could not be reduced significantly. Thus, it was demonstrated that, in rodents, the inhibitory effect of melatonin on insulin secretion in the pancreatic islet is mediated via the MT₁ receptor, and the MT₂ receptor plays a subordinate role in this context.

In summary, the results of the present study demonstrated that the influence of melatonin on insulin expression and secretion, at least in rodents, is primarily mediated through the MT₁ receptor, which can be explained by the low expression of the MT₂ receptor in islets and β -cells. However, in previous studies on human islets approximately equal expression levels of both melatonin receptor isoforms were determined, and, in β -cells, particularly the MT₂ receptor was found to be expressed. Furthermore, it was shown in the present work that, at least in INS-1-cells, melatonin can reduce insulin secretion via the human MT₂ receptor. Further studies should assess which melatonin receptor isoform is involved in mediating acute and chronic melatonin effects on insulin secretion of the human β -cell and islet and thus influences glucose homeostasis in humans.

7 Literaturverzeichnis

- Ackermann, K., Bux, R., Rub, U., Korf, H. W., Kauert, G., und Stehle, J. H. (2006). Characterization of human melatonin synthesis using autoptic pineal tissue. *Endocrinology* *147*, 3235-3242.
- Andersson, S., Davis, D. L., Dahlback, H., Jornvall, H., und Russell, D. W. (1989). Cloning, structure, and expression of the mitochondrial cytochrome P-450 sterol 26-hydroxylase, a bile acid biosynthetic enzyme. *J Biol Chem* *264*, 8222-8229.
- Aschoff, J., und Wever, R. (1976). Human circadian rhythms: a multioscillatory system. *Fed Proc* *35*, 236-232.
- Asfari, M., Janjic, D., Meda, P., Li, G., Halban, P. A., und Wollheim, C. B. (1992). Establishment of 2-mercaptoethanol-dependent differentiated insulin-secreting cell lines. *Endocrinology* *130*, 167-178.
- Ayoub, M. A., Levoe, A., Delagrang, P., und Jockers, R. (2004). Preferential formation of MT1/MT2 melatonin receptor heterodimers with distinct ligand interaction properties compared with MT2 homodimers. *Mol Pharmacol* *66*, 312-321.
- Bach, A. G., Wolgast, S., Mühlbauer, E., und Peschke, E. (2005). Melatonin stimulates inositol-1,4,5-trisphosphate and Ca²⁺ release from INS1 insulinoma cells. *J Pineal Res* *39*, 316-323.
- Bähr, I., Mühlbauer, E., Schucht, H., und Peschke, E. (2011). Melatonin stimulates glucagon secretion in vitro and in vivo. *J Pineal Res* *50*, 336-344.
- Bailey, C. J., Atkins, T. W., und Matty, A. J. (1974). Melatonin inhibition of insulin secretion in the rat and mouse. *Horm Res* *5*, 21-28.
- Balsalobre, A., Brown, S. A., Marcacci, L., Tronche, F., Kellendonk, C., Reichardt, H. M., Schutz, G., und Schibler, U. (2000). Resetting of circadian time in peripheral tissues by glucocorticoid signaling. *Science* *289*, 2344-2347.
- Barrett, P., Choi, W. S., Morris, M., und Morgan, P. (2000). A role for tyrosine phosphorylation in the regulation and sensitization of adenylate cyclase by melatonin. *Faseb J* *14*, 1619-1628.
- Bazwinsky-Wutschke, I., Mühlbauer, E., Wolgast, S., und Peschke, E. (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*, 805-813.
- Becker-Andre, M., Wiesenberg, I., Schaeren-Wiemers, N., Andre, E., Missbach, M., Saurat, J. H., und Carlberg, C. (1994). Pineal gland hormone melatonin binds and activates an orphan of the nuclear receptor superfamily. *J Biol Chem* *269*, 28531-28534.
- Bizot-Espiard, J. G., Double, A., Cousin, B., Lesieur, D., Guardiola-Lemaitre, B., Delagrang, P., Ktorza, A., und Penicaud, L. (1998). Lack of melatonin effects on insulin action in normal rats. *Horm Metab Res* *30*, 711-716.
- Boden, G., Ruiz, J., Urbain, J. L., und Chen, X. (1996). Evidence for a circadian rhythm of insulin secretion. *Am J Physiol* *271*, E246-252.
- Bonnefond, A., Clement, N., Fawcett, K., Yengo, L., Vaillant, E., Guillaume, J. L., Dechaume, A., Payne, F., Roussel, R., Czernichow, S., *et al.* (2012). Rare MTNR1B variants impairing melatonin receptor 1B function contribute to type 2 diabetes. *Nat Genet* *44*, 297-301.
- Boshart, M., Weber, F., Jahn, G., Dorsch-Hasler, K., Fleckenstein, B., und Schaffner, W. (1985). A very strong enhancer is located upstream of an immediate early gene of human cytomegalovirus. *Cell* *41*, 521-530.

- Bouatia-Naji, N., Bonnefond, A., Cavalcanti-Proenca, C., Sparso, T., Holmkvist, J., Marchand, M., Delplanque, J., Lobbens, S., Rocheleau, G., Durand, E., *et al.* (2009). A variant near MTNR1B is associated with increased fasting plasma glucose levels and type 2 diabetes risk. *Nat Genet* *41*, 89-94.
- Browning, C., Beresford, I., Fraser, N., and Giles, H. (2000). Pharmacological characterization of human recombinant melatonin mt(1) and MT(2) receptors. *Br J Pharmacol* *129*, 877-886.
- Brunner, P., Sozer-Topcular, N., Jockers, R., Ravid, R., Angeloni, D., Fraschini, F., Eckert, A., Muller-Spahn, F., and Savaskan, E. (2006). Pineal and cortical melatonin receptors MT1 and MT2 are decreased in Alzheimer's disease. *Eur J Histochem* *50*, 311-316.
- Brydon, L., Roka, F., Petit, L., de Coppet, P., Tissot, M., Barrett, P., Morgan, P. J., Nanoff, C., Strosberg, A. D., and Jockers, R. (1999). Dual signaling of human Mel1a melatonin receptors via G(i2), G(i3), and G(q/11) proteins. *Mol Endocrinol* *13*, 2025-2038.
- Brydon, L., Petit, L., Delagrangé, P., Strosberg, A. D., and Jockers, R. (2001). Functional expression of MT2 (Mel1b) melatonin receptors in human PAZ6 adipocytes. *Endocrinology* *142*, 4264-4271.
- Bubis, M., and Zisapel, N. (1999). Involvement of cGMP in cellular melatonin responses. *Biol Cell* *91*, 45-49.
- Burns, D. L. (1988). Subunit structure and enzymic activity of pertussis toxin. *Microbiol Sci* *5*, 285-287.
- Chambers, J. C., Zhang, W., Zabaneh, D., Sehmi, J., Jain, P., McCarthy, M. I., Froguel, P., Ruokonen, A., Balding, D., Jarvelin, M. R., *et al.* (2009). Common genetic variation near melatonin receptor MTNR1B contributes to raised plasma glucose and increased risk of type 2 diabetes among Indian Asians and European Caucasians. *Diabetes* *58*, 2703-2708.
- Chan, A. S., Lai, F. P., Lo, R. K., Voyno-Yasenetskaya, T. A., Stanbridge, E. J., and Wong, Y. H. (2002). Melatonin mt1 and MT2 receptors stimulate c-Jun N-terminal kinase via pertussis toxin-sensitive and -insensitive G proteins. *Cell Signal* *14*, 249-257.
- Chan, C. W., Song, Y., Ailenberg, M., Wheeler, M., Pang, S. F., Brown, G. M., and Silverman, M. (1997). Studies of melatonin effects on epithelia using the human embryonic kidney-293 (HEK-293) cell line. *Endocrinology* *138*, 4732-4739.
- Chepurny, O. G., Hussain, M. A., and Holz, G. G. (2002). Exendin-4 as a stimulator of rat insulin I gene promoter activity via bZIP/CRE interactions sensitive to serine/threonine protein kinase inhibitor Ro 31-8220. *Endocrinology* *143*, 2303-2313.
- Contreras-Alcantara, S., Baba, K., and Tosini, G. (2010). Removal of melatonin receptor type 1 induces insulin resistance in the mouse. *Obesity (Silver Spring)* *18*, 1861-1863.
- Crowe, D. T., and Tsai, M. J. (1989). Mutagenesis of the rat insulin II 5'-flanking region defines sequences important for expression in HIT cells. *Mol Cell Biol* *9*, 1784-1789.
- Daulat, A. M., Maurice, P., Froment, C., Guillaume, J. L., Broussard, C., Monsarrat, B., Delagrangé, P., and Jockers, R. (2007). Purification and identification of G protein-coupled receptor protein complexes under native conditions. *Mol Cell Proteomics* *6*, 835-844.
- De Bacquer, D., Van Risseghem, M., Clays, E., Kittel, F., De Backer, G., and Braeckman, L. (2009). Rotating shift work and the metabolic syndrome: a prospective study. *Int J Epidemiol* *38*, 848-854.
- de Lima, L. M., dos Reis, L. C., and de Lima, M. A. (2001). Influence of the pineal gland on the physiology, morphometry and morphology of pancreatic islets in rats. *Braz J Biol* *61*, 333-340.

- Deltour, L., Leduque, P., Blume, N., Madsen, O., Dubois, P., Jami, J., und Bucchini, D. (1993). Differential expression of the two nonallelic proinsulin genes in the developing mouse embryo. *Proc Natl Acad Sci U S A* *90*, 527-531.
- Devavry, S., Legros, C., Brasseur, C., Delagrangé, P., Spadoni, G., Cohen, W., Malpoux, B., Boutin, J. A., und Nosjean, O. (2012). Description of the constitutive activity of cloned human melatonin receptors hMT(1) and hMT(2) and discovery of inverse agonists. *J Pineal Res* *53*, 29-37.
- Devavry, S., Legros, C., Brasseur, C., Cohen, W., Guenin, S. P., Delagrangé, P., Malpoux, B., Ouvry, C., Coge, F., Nosjean, O., und Boutin, J. A. (2012b). Molecular pharmacology of the mouse melatonin receptors MT(1) and MT(2). *Eur J Pharmacol* *677*, 15-21.
- Drew, J. E., Williams, L. M., Hannah, L. T., Barrett, P., und Abramovich, D. R. (1998). Melatonin receptors in the human fetal kidney: 2-[125I]iodomelatonin binding sites correlated with expression of Mel1a and Mel1b receptor genes. *J Endocrinol* *156*, 261-267.
- Drew, J. E., Barrett, P., Mercer, J. G., Moar, K. M., Canet, E., Delagrangé, P., und Morgan, P. J. (2001). Localization of the melatonin-related receptor in the rodent brain and peripheral tissues. *J Neuroendocrinol* *13*, 453-458.
- Drijfhout, W. J., van der Linde, A. G., Kooi, S. E., Grol, C. J., und Westerink, B. H. (1996). Norepinephrine release in the rat pineal gland: the input from the biological clock measured by in vivo microdialysis. *J Neurochem* *66*, 748-755.
- Dubocovich, M. L., Delagrangé, P., Krause, D. N., Sugden, D., Cardinali, D. P., und Olcese, J. (2010). International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXV. Nomenclature, classification, and pharmacology of G protein-coupled melatonin receptors. *Pharmacol Rev* *62*, 343-380.
- Dufourny, L., Levasseur, A., Migaud, M., Callebaut, I., Pontarotti, P., Malpoux, B., und Monget, P. (2008). GPR50 is the mammalian ortholog of Mel1c: evidence of rapid evolution in mammals. *BMC Evol Biol* *8*, 105.
- Ebisawa, T., Karne, S., Lerner, M. R., und Reppert, S. M. (1994). Expression cloning of a high-affinity melatonin receptor from *Xenopus* dermal melanophores. *Proc Natl Acad Sci U S A* *91*, 6133-6137.
- El-Denshary, E. S., Ismail, N. A., und Montague, W. (1977). Effects of tetracycline and diazepam on insulin secretion and adenylyl cyclase activity of isolated rat islets of Langerhans. *Diabete Metab* *3*, 3-6.
- Faillace, M. P., Keller Sarmiento, M. I., und Rosenstein, R. E. (1996). Melatonin effect on the cyclic GMP system in the golden hamster retina. *Brain Res* *711*, 112-117.
- Fields, T. A., und Casey, P. J. (1997). Signalling functions and biochemical properties of pertussis toxin-resistant G-proteins. *Biochem J* *321*, 561-571.
- Foster, R. G. (2004). Seeing the light in a new way. *J Neuroendocrinol* *16*, 179-180.
- Frankel, B. J., und Strandberg, M. J. (1991). Insulin release from isolated mouse islets in vitro: no effect of physiological levels of melatonin or arginine vasotocin. *J Pineal Res* *11*, 145-148.
- Ganguly, S., Weller, J. L., Ho, A., Chemineau, P., Malpoux, B., und Klein, D. C. (2005). Melatonin synthesis: 14-3-3-dependent activation and inhibition of arylalkylamine N-acetyltransferase mediated by phosphoserine-205. *Proc Natl Acad Sci U S A* *102*, 1222-1227.
- Gastel, J. A., Roseboom, P. H., Rinaldi, P. A., Weller, J. L., und Klein, D. C. (1998). Melatonin production: proteasomal proteolysis in serotonin N-acetyltransferase regulation. *Science* *279*, 1358-1360.

- Geary, G. G., Duckles, S. P., und Krause, D. N. (1998). Effect of melatonin in the rat tail artery: role of K⁺ channels and endothelial factors. *Br J Pharmacol* 123, 1533-1540.
- Gerdin, M. J., Masana, M. I., Ren, D., Miller, R. J., und Dubocovich, M. L. (2003). Short-term exposure to melatonin differentially affects the functional sensitivity and trafficking of the hMT1 and hMT2 melatonin receptors. *J Pharmacol Exp Ther* 304, 931-939.
- Gerdin, M. J., Masana, M. I., Rivera-Bermudez, M. A., Hudson, R. L., Earnest, D. J., Gillette, M. U., und Dubocovich, M. L. (2004). Melatonin desensitizes endogenous MT2 melatonin receptors in the rat suprachiasmatic nucleus: relevance for defining the periods of sensitivity of the mammalian circadian clock to melatonin. *Faseb J* 18, 1646-1656.
- Godson, C., und Reppert, S. M. (1997). The Mel1a melatonin receptor is coupled to parallel signal transduction pathways. *Endocrinology* 138, 397-404.
- Goodwin, E. C., und Rottman, F. M. (1992). The 3'-flanking sequence of the bovine growth hormone gene contains novel elements required for efficient and accurate polyadenylation. *J Biol Chem* 267, 16330-16334.
- Guerrero, H. Y., Gauer, F., Schuster, C., Pevet, P., und Masson-Pevet, M. (2000). Melatonin regulates the mRNA expression of the mt(1) melatonin receptor in the rat Pars tuberalis. *Neuroendocrinology* 71, 163-169.
- Guerrero, J. M., und Reiter, R. J. (2002). Melatonin-immune system relationships. *Curr Top Med Chem* 2, 167-179.
- Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* 166, 557-580.
- Hardeland, R. (2012). Melatonin in aging and disease -multiple consequences of reduced secretion, options and limits of treatment. *Aging Dis* 3, 194-225.
- Hazlerigg, D. G., Gonzalez-Brito, A., Lawson, W., Hastings, M. H., und Morgan, P. J. (1993). Prolonged exposure to melatonin leads to time-dependent sensitization of adenylate cyclase and down-regulates melatonin receptors in pars tuberalis cells from ovine pituitary. *Endocrinology* 132, 285-292.
- Hillen, W., und Berens, C. (1994). Mechanisms underlying expression of Tn10 encoded tetracycline resistance. *Annu Rev Microbiol* 48, 345-369.
- Hohmeier, H. E., Mulder, H., Chen, G., Henkel-Rieger, R., Prentki, M., und Newgard, C. B. (2000). Isolation of INS-1-derived cell lines with robust ATP-sensitive K⁺ channel-dependent and -independent glucose-stimulated insulin secretion. *Diabetes* 49, 424-430.
- Holz, G. G., Leech, C. A., Heller, R. S., Castonguay, M., und Habener, J. F. (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, 14147-14156.
- Hunt, A. E., Al-Ghoul, W. M., Gillette, M. U., und Dubocovich, M. L. (2001). Activation of MT(2) melatonin receptors in rat suprachiasmatic nucleus phase advances the circadian clock. *Am J Physiol Cell Physiol* 280, C110-118.
- Huypens, P., Ling, Z., Pipeleers, D., und Schuit, F. (2000). Glucagon receptors on human islet cells contribute to glucose competence of insulin release. *Diabetologia* 43, 1012-1019.
- Jelinek, L. J., Lok, S., Rosenberg, G. B., Smith, R. A., Grant, F. J., Biggs, S., Bensch, P. A., Kuijper, J. L., Sheppard, P. O., Sprecher, C. A., und et al. (1993). Expression cloning and signaling properties of the rat glucagon receptor. *Science* 259, 1614-1616.

-
- Jin, X., von Gall, C., Pieschl, R. L., Gribkoff, V. K., Stehle, J. H., Reppert, S. M., und Weaver, D. R. (2003). Targeted disruption of the mouse Mel(1b) melatonin receptor. *Mol Cell Biol* 23, 1054-1060.
- John, T. M., Viswanathan, M., George, J. C., und Scanes, C. G. (1990). Influence of chronic melatonin implantation on circulating levels of catecholamines, growth hormone, thyroid hormones, glucose, and free fatty acids in the pigeon. *Gen Comp Endocrinol* 79, 226-232.
- Kang, G., Chepurny, O. G., und Holz, G. G. (2001). cAMP-regulated guanine nucleotide exchange factor II (Epac2) mediates Ca²⁺-induced Ca²⁺ release in INS-1 pancreatic beta-cells. *J Physiol* 536, 375-385.
- Kang, G., Chepurny, O. G., Malester, B., Rindler, M. J., Rehmann, H., Bos, J. L., Schwede, F., Coetzee, W. A., und Holz, G. G. (2006). cAMP sensor Epac as a determinant of ATP-sensitive potassium channel activity in human pancreatic beta cells and rat INS-1 cells. *J Physiol* 573, 595-609.
- Karlsson, B., Alfredsson, L., Knutsson, A., Andersson, E., und Toren, K. (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, 30-35.
- Kemp, D. M., Ubeda, M., und Habener, J. F. (2002). Identification and functional characterization of melatonin Mel 1a receptors in pancreatic beta cells: potential role in incretin-mediated cell function by sensitization of cAMP signaling. *Mol Cell Endocrinol* 191, 157-166.
- Kieffer, T. J., Heller, R. S., Unson, C. G., Weir, G. C., und Habener, J. F. (1996). Distribution of glucagon receptors on hormone-specific endocrine cells of rat pancreatic islets. *Endocrinology* 137, 5119-5125.
- Kimura, M., Takatsuki, A., und Yamaguchi, I. (1994). Blastocidin S deaminase gene from *Aspergillus terreus* (BSD): a new drug resistance gene for transfection of mammalian cells. *Biochim Biophys Acta* 1219, 653-659.
- Knutson, K. L., Ryden, A. M., Mander, B. A., und Van Cauter, E. (2006). Role of sleep duration and quality in the risk and severity of type 2 diabetes mellitus. *Arch Intern Med* 166, 1768-1774.
- Koch, M., Mauhin, V., Stehle, J. H., Schomerus, C., und Korf, H. W. (2003). Dephosphorylation of pCREB by protein serine/threonine phosphatases is involved in inactivation of Aanat gene transcription in rat pineal gland. *J Neurochem* 85, 170-179.
- Kokkola, T., Vaittinen, M., und Laitinen, J. T. (2007). Inverse agonist exposure enhances ligand binding and G protein activation of the human MT1 melatonin receptor, but leads to receptor down-regulation. *J Pineal Res* 43, 255-262.
- Kopin, I. J., Pare, C. M., Axelrod, J., und Weissbach, H. (1961). The fate of melatonin in animals. *J Biol Chem* 236, 3072-3075.
- Korf, H. W., und Stehle, J. H. (2005). Das circadiane System der Säugetiere -integraler Bestandteil des neuroendokrinen Systems. In Peschke, E.: *Endokrinologie II, Vorträge im Rahmen des Projektes „Zeitstrukturen endokriner Systeme“*. Abh. Sächs. Akad. Wiss., Math.-nat. Kl., Band 63, Heft 2. S. Hirzel Stuttgart/Leipzig, S. 9-31.
- Kvetnoy, I. M. (1999). Extrapineal melatonin: location and role within diffuse neuroendocrine system. *Histochem J* 31, 1-12.
- Lerner, A. B., Case, J. D., Takahashi, Y., Lee, T. H., und Mori, W. (1958). Isolation of melatonin, the pineal gland factor that lightens melanocytes. *J Amer Chem Soc* 80, 2587.
- Lerner, A. B., Case, J. D., und Heinzelman, R. V. (1959). Structure of melatonin. *J Amer Chem Soc* 81, 6084-6092.

- Li, C., Shi, Y., You, L., Wang, L., und Chen, Z. J. (2011). Melatonin receptor 1A gene polymorphism associated with polycystic ovary syndrome. *Gynecol Obstet Invest* 72, 130-134.
- Liu, C., Weaver, D. R., Jin, X., Shearman, L. P., Pieschl, R. L., Gribkoff, V. K., und Reppert, S. M. (1997). Molecular dissection of two distinct actions of melatonin on the suprachiasmatic circadian clock. *Neuron* 19, 91-102.
- Livak, K. J., und Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25, 402-408.
- Lyssenko, V., Nagorny, C. L., Erdos, M. R., Wierup, N., Jonsson, A., Spegel, P., Bugliani, M., Saxena, R., Fex, M., Pulizzi, N., *et al.* (2009). Common variant in MTNR1B associated with increased risk of type 2 diabetes and impaired early insulin secretion. *Nat Genet* 41, 82-88.
- MacKenzie, R. S., Melan, M. A., Passey, D. K., und Witt-Enderby, P. A. (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, 587-595.
- Mäntele, S., Otway, D. T., Middleton, B., Bretschneider, S., Wright, J., Robertson, M. D., Skene, D. J., und Johnston, J. D. (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, e37123.
- Maronde, E., Pfeffer, M., Olcese, J., Molina, C. A., Schlotter, F., Dehghani, F., Korf, H. W., und Stehle, J. H. (1999). Transcription factors in neuroendocrine regulation: rhythmic changes in pCREB and ICER levels frame melatonin synthesis. *J Neurosci* 19, 3326-3336.
- Masana, M. I., Doolen, S., Ersahin, C., Al-Ghoul, W. M., Duckles, S. P., Dubocovich, M. L., und Krause, D. N. (2002). MT(2) melatonin receptors are present and functional in rat caudal artery. *J Pharmacol Exp Ther* 302, 1295-1302.
- Mayo, K. E., Miller, L. J., Bataille, D., Dalle, S., Goke, B., Thorens, B., und Drucker, D. J. (2003). International Union of Pharmacology. XXXV. The glucagon receptor family. *Pharmacol Rev* 55, 167-194.
- Mazzucchelli, C., Pannacci, M., Nonno, R., Lucini, V., Fraschini, F., und Stankov, B. M. (1996). The melatonin receptor in the human brain: cloning experiments and distribution studies. *Brain Res Mol Brain Res* 39, 117-126.
- McNamara, P., Seo, S. B., Rudic, R. D., Sehgal, A., Chakravarti, D., und FitzGerald, G. A. (2001). Regulation of CLOCK and MOP4 by nuclear hormone receptors in the vasculature: a humoral mechanism to reset a peripheral clock. *Cell* 105, 877-889.
- McNulty, S., Ross, A. W., Barrett, P., Hastings, M. H., und Morgan, P. J. (1994). Melatonin regulates the phosphorylation of CREB in ovine pars tuberalis. *J Neuroendocrinol* 6, 523-532.
- Melloul, D., Marshak, S., und Cerasi, E. (2002). Regulation of insulin gene transcription. *Diabetologia* 45, 309-326.
- Mühlbauer, E., Wolgast, S., Finckh, U., Peschke, D., und Peschke, E. (2004). Indication of circadian oscillations in the rat pancreas. *FEBS Lett* 564, 91-96.
- Mühlbauer, E., und Peschke, E. (2007). Evidence for the expression of both the MT1- and in addition, the MT2-melatonin receptor, in the rat pancreas, islet and beta-cell. *J Pineal Res* 42, 105-106.
- Mühlbauer, E., Gross, E., Labucay, K., Wolgast, S., und Peschke, E. (2009). Loss of melatonin signalling and its impact on circadian rhythms in mouse organs regulating blood glucose. *Eur J Pharmacol* 606, 61-71.

- Mühlbauer, E., Albrecht, E., Hofmann, K., Bazwinsky-Wutschke, I., und Peschke, E. (2011). Melatonin inhibits insulin secretion in rat insulinoma beta-cells (INS-1) heterologously expressing the human melatonin receptor isoform MT2. *J Pineal Res* 51, 361-372.
- Mühlbauer, E., Albrecht, E., Bazwinsky-Wutschke, I., und Peschke, E. (2012). Melatonin influences insulin secretion primarily via MT(1) receptors in rat insulinoma cells (INS-1) and mouse pancreatic islets. *J Pineal Res* 52, 446-459.
- Nagorny, C. L., Sathanoori, R., Voss, U., Mulder, H., und Wierup, N. (2011). Distribution of melatonin receptors in murine pancreatic islets. *J Pineal Res* 50, 412-417.
- Naji, L., Carrillo-Vico, A., Guerrero, J. M., und Calvo, J. R. (2004). Expression of membrane and nuclear melatonin receptors in mouse peripheral organs. *Life Sci* 74, 2227-2236.
- Nelson, C. S., Marino, J. L., und Allen, C. N. (1996). Melatonin receptors activate heteromeric G-protein coupled Kir3 channels. *Neuroreport* 7, 717-720.
- Nelson, J. A., Reynolds-Kohler, C., und Smith, B. A. (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, 4125-4129.
- Nijjima, A., Chun, S. J., Shima, T., Bizot-Espiard, J. G., Guardiola-Lemaitre, B., und Nagai, K. (1998). Effect of intravenous administration of melatonin on the efferent activity of the adrenal nerve. *J Auton Nerv Syst* 71, 134-138.
- Nonno, R., Pannacci, M., Lucini, V., Angeloni, D., Frascini, F., und Stankov, B. M. (1999). Ligand efficacy and potency at recombinant human MT2 melatonin receptors: evidence for agonist activity of some mt1-antagonists. *Br J Pharmacol* 127, 1288-1294.
- Nosjean, O., Ferro, M., Coge, F., Beauverger, P., Henlin, J. M., Lefoulon, F., Fauchere, J. L., Delagrangé, P., Canet, E., und Boutin, J. A. (2000). Identification of the melatonin-binding site MT3 as the quinone reductase 2. *J Biol Chem* 275, 31311-31317.
- Ozaki, N., Shibasaki, T., Kashima, Y., Miki, T., Takahashi, K., Ueno, H., Sunaga, Y., Yano, H., Matsuura, Y., Iwanaga, T., *et al.* (2000). cAMP-GEFII is a direct target of cAMP in regulated exocytosis. *Nat Cell Biol* 2, 805-811.
- Parhon, C. (1939). *Congrès d'Endocrinologie de Bucarest*. 1, 187.
- Park, Y. J., Park, J. G., Kim, S. J., Lee, Y. D., Saydur Rahman, M., und Takemura, A. (2006). Melatonin receptor of a reef fish with lunar-related rhythmicity: cloning and daily variations. *J Pineal Res* 41, 166-174.
- Pelisek, V., und Vanecek, J. (2000). Different effects of melatonin pretreatment on cAMP and LH responses of the neonatal rat pituitary cells. *J Pineal Res* 28, 234-241.
- Peschke, E., Peschke, D., Hammer, T., und Csernus, V. (1997). Influence of melatonin and serotonin on glucose-stimulated insulin release from perfused rat pancreatic islets in vitro. *J Pineal Res* 23, 156-163.
- Peschke, E., und Peschke, D. (1998). Evidence for a circadian rhythm of insulin release from perfused rat pancreatic islets. *Diabetologia* 41, 1085-1092.
- Peschke, E., Fauteck, J. D., Musshoff, U., Schmidt, F., Beckmann, A., und Peschke, D. (2000). Evidence for a melatonin receptor within pancreatic islets of neonate rats: functional, autoradiographic, and molecular investigations. *J Pineal Res* 28, 156-164.
- Peschke, E., Mühlbauer, E., Musshoff, U., Csernus, V. J., Chankiewitz, E., und Peschke, D. (2002). Receptor (MT(1)) mediated influence of melatonin on cAMP concentration and insulin secretion of rat insulinoma cells INS-1. *J Pineal Res* 33, 63-71.

-
- Peschke, E., Frese, T., Chankiewitz, E., Peschke, D., Preiss, U., Schneyer, U., Spessert, R., und Mühlbauer, E. (2006). Diabetic Goto Kakizaki rats as well as type 2 diabetic patients show a decreased diurnal serum melatonin level and an increased pancreatic melatonin-receptor status. *J Pineal Res* 40, 135-143.
- Peschke, E., Bach, A. G., und Mühlbauer, E. (2006b). Parallel signaling pathways of melatonin in the pancreatic beta-cell. *J Pineal Res* 40, 184-191.
- Peschke, E., Stumpf, I., Bazwinsky, I., Litvak, L., Dralle, H., und Mühlbauer, E. (2007). Melatonin and type 2 diabetes - a possible link? *J Pineal Res* 42, 350-358.
- Peschke, E., Wolgast, S., Bazwinsky, I., Ponicke, K., und Mühlbauer, E. (2008). Increased melatonin synthesis in pineal glands of rats in streptozotocin induced type 1 diabetes. *J Pineal Res* 45, 439-448.
- Peschke, E., Schucht, H., und Mühlbauer, E. (2010). Long-term enteral administration of melatonin reduces plasma insulin and increases expression of pineal insulin receptors in both Wistar and type 2-diabetic Goto-Kakizaki rats. *J Pineal Res* 49, 373-381.
- Peschke, E., Hofmann, K., Bähr, I., Streck, S., Albrecht, E., Wedekind, D., und Mühlbauer, E. (2011). The insulin-melatonin antagonism: studies in the LEW.1AR1-iddm rat (an animal model of human type 1 diabetes mellitus). *Diabetologia* 54, 1831-1840.
- Petit, L., Lacroix, I., de Coppet, P., Strosberg, A. D., und Jockers, R. (1999). Differential signaling of human Mel1a and Mel1b melatonin receptors through the cyclic guanosine 3'-5'-monophosphate pathway. *Biochem Pharmacol* 58, 633-639.
- Pfaffl, M. W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 29, e45.
- Philippe, J., und Missotten, M. (1990). Functional characterization of a cAMP-responsive element of the rat insulin I gene. *J Biol Chem* 265, 1465-1469.
- Picinato, M. C., Haber, E. P., Carpinelli, A. R., und Cipolla-Neto, J. (2002). Daily rhythm of glucose-induced insulin secretion by isolated islets from intact and pinealectomized rat. *J Pineal Res* 33, 172-177.
- Picinato, M. C., Haber, E. P., Cipolla-Neto, J., Curi, R., de Oliveira Carvalho, C. R., und Carpinelli, A. R. (2002b). Melatonin inhibits insulin secretion and decreases PKA levels without interfering with glucose metabolism in rat pancreatic islets. *J Pineal Res* 33, 156-160.
- Poltorak, V. V. (1984). Biosynthesis and secretion of insulin under the effect of an antibiotic of the tetracycline group. *Probl Endokrinol (Mosk)* 30, 57-61.
- Postle, K., Nguyen, T. T., und Bertrand, K. P. (1984). Nucleotide sequence of the repressor gene of the TN10 tetracycline resistance determinant. *Nucleic Acids Res* 12, 4849-4863.
- Prokopenko, I., Langenberg, C., Florez, J. C., Saxena, R., Soranzo, N., Thorleifsson, G., Loos, R. J., Manning, A. K., Jackson, A. U., Aulchenko, Y., *et al.* (2009). Variants in MTNR1B influence fasting glucose levels. *Nat Genet* 41, 77-81.
- Ramracheya, R. D., Muller, D. S., Squires, P. E., Brereton, H., Sugden, D., Huang, G. C., Amiel, S. A., Jones, P. M., und Persaud, S. J. (2008). Function and expression of melatonin receptors on human pancreatic islets. *J Pineal Res* 44, 273-279.
- Reiter, R. J. (1993). The melatonin rhythm: both a clock and a calendar. *Experientia* 49, 654-664.
- Renstrom, E., Eliasson, L., und Rorsman, P. (1997). Protein kinase A-dependent and -independent stimulation of exocytosis by cAMP in mouse pancreatic B-cells. *J Physiol* 502, 105-118.

-
- Reppert, S. M., Weaver, D. R., und Ebisawa, T. (1994). Cloning and characterization of a mammalian melatonin receptor that mediates reproductive and circadian responses. *Neuron* *13*, 1177-1185.
- Reppert, S. M., Weaver, D. R., Cassone, V. M., Godson, C., und Kolakowski, L. F., Jr. (1995). Melatonin receptors are for the birds: molecular analysis of two receptor subtypes differentially expressed in chick brain. *Neuron* *15*, 1003-1015.
- Reppert, S. M., Godson, C., Mahle, C. D., Weaver, D. R., Slaugenhaupt, S. A., und Gusella, J. F. (1995b). Molecular characterization of a second melatonin receptor expressed in human retina and brain: the Mel1b melatonin receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* *92*, 8734-8738.
- Reppert, S. M., Weaver, D. R., und Godson, C. (1996). Melatonin receptors step into the light: cloning and classification of subtypes. *Trends Pharmacol Sci* *17*, 100-102.
- Reuss, S. (1996). Components and connections of the circadian timing system in mammals. *Cell Tissue Res* *285*, 353-378.
- Roca, A. L., Godson, C., Weaver, D. R., und Reppert, S. M. (1996). Structure, characterization, and expression of the gene encoding the mouse Mel1a melatonin receptor. *Endocrinology* *137*, 3469-3477.
- Roka, F., Brydon, L., Waldhoer, M., Strosberg, A. D., Freissmuth, M., Jockers, R., und Nanoff, C. (1999). Tight association of the human Mel(1a)-melatonin receptor and G(i): precoupling and constitutive activity. *Mol Pharmacol* *56*, 1014-1024.
- Ronn, T., Wen, J., Yang, Z., Lu, B., Du, Y., Groop, L., Hu, R., und Ling, C. (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*, 830-833.
- Roseboom, P. H., und Klein, D. C. (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*, 439-449.
- Russell, M. A., und Morgan, N. G. (2011). Conditional expression of the FTO gene product in rat INS-1 cells reveals its rapid turnover and a role in the profile of glucose-induced insulin secretion. *Clin Sci (Lond)* *120*, 403-413.
- Sallinen, P., Saarela, S., Ilves, M., Vakkuri, O., und Leppaluoto, J. (2005). The expression of MT1 and MT2 melatonin receptor mRNA in several rat tissues. *Life Sci* *76*, 1123-1134.
- Savaskan, E., Olivieri, G., Meier, F., Brydon, L., Jockers, R., Ravid, R., Wirz-Justice, A., und Muller-Spahn, F. (2002). Increased melatonin 1a-receptor immunoreactivity in the hippocampus of Alzheimer's disease patients. *J Pineal Res* *32*, 59-62.
- Savaskan, E., Ayoub, M. A., Ravid, R., Angeloni, D., Fraschini, F., Meier, F., Eckert, A., Muller-Spahn, F., und Jockers, R. (2005). Reduced hippocampal MT2 melatonin receptor expression in Alzheimer's disease. *J Pineal Res* *38*, 10-16.
- Scheer, F. A., Hilton, M. F., Mantzoros, C. S., und Shea, S. A. (2009). Adverse metabolic and cardiovascular consequences of circadian misalignment. *Proc Natl Acad Sci U S A* *106*, 4453-4458.
- Schomerus, C., Laedtke, E., und Korf, H. W. (1995). Calcium responses of isolated, immunocytochemically identified rat pinealocytes to noradrenergic, cholinergic and vasopressinergic stimulations. *Neurochem Int* *27*, 163-175.
- Schomerus, C., Korf, H. W., Laedtke, E., Weller, J. L., und Klein, D. C. (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*, 2123-2132.

- Schuster, C., Gauer, F., Malan, A., Recio, J., Pevet, P., und Masson-Pevet, M. (2001). The circadian clock, light/dark cycle and melatonin are differentially involved in the expression of daily and photoperiodic variations in mt(1) melatonin receptors in the Siberian and Syrian hamsters. *Neuroendocrinology* 74, 55-68.
- Shewade, Y., Tirth, S., und Bhonde, R. R. (2001). Pancreatic islet-cell viability, functionality and oxidative status remain unaffected at pharmacological concentrations of commonly used antibiotics in vitro. *J Biosci* 26, 349-355.
- Shima, T., Chun, S. J., Nijijima, A., Bizot-Espiard, J. G., Guardiola-Lemaitre, B., Hosokawa, M., und Nagai, K. (1997). Melatonin suppresses hyperglycemia caused by intracerebroventricular injection of 2-deoxy-D-glucose in rats. *Neurosci Lett* 226, 119-122.
- Simonneaux, V., und Ribelayga, C. (2003). Generation of the melatonin endocrine message in mammals: a review of the complex regulation of melatonin synthesis by norepinephrine, peptides, and other pineal transmitters. *Pharmacol Rev* 55, 325-395.
- Slanar, O., Pelisek, V., und 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, 213-219.
- Slominski, R. M., Reiter, R. J., Schlabritz-Loutsevitch, N., Ostrom, R. S., und Slominski, A. T. (2012). Melatonin membrane receptors in peripheral tissues: distribution and functions. *Mol Cell Endocrinol* 351, 152-166.
- Southern, P. J., und 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, 327-341.
- Staiger, H., Machicao, F., Schafer, S. A., Kirchhoff, K., Kantartzis, K., Guthoff, M., Silbernagel, G., Stefan, N., Haring, H. U., und Fritsche, A. (2008). Polymorphisms within the novel type 2 diabetes risk locus MTNR1B determine beta-cell function. *PLoS One* 3, e3962.
- Steffens, F., Zhou, X. B., Sausbier, U., Sailer, C., Motejlek, K., Ruth, P., Olcese, J., Korth, M., und Wieland, T. (2003). Melatonin receptor signaling in pregnant and nonpregnant rat uterine myocytes as probed by large conductance Ca²⁺-activated K⁺ channel activity. *Mol Endocrinol* 17, 2103-2115.
- Stehle, J. H., von Gall, C., Schomerus, C., und Korf, H. W. (2001). Of rodents and ungulates and melatonin: creating a uniform code for darkness by different signaling mechanisms. *J Biol Rhythms* 16, 312-325.
- Stumpf, I., Mühlbauer, E., und Peschke, E. (2008). Involvement of the cGMP pathway in mediating the insulin-inhibitory effect of melatonin in pancreatic beta-cells. *J Pineal Res* 45, 318-327.
- Stumpf, I., Bazwinsky, I., und Peschke, E. (2009). Modulation of the cGMP signaling pathway by melatonin in pancreatic beta-cells. *J Pineal Res* 46, 140-147.
- Tamotsu, S., Schomerus, C., Stehle, J. H., Roseboom, P. H., und Korf, H. W. (1995). Norepinephrine-induced phosphorylation of the transcription factor CREB in isolated rat pinealocytes: an immunocytochemical study. *Cell Tissue Res* 282, 219-226.
- van Ooyen, A., van den Berg, J., Mantei, N., und Weissmann, C. (1979). Comparison of total sequence of a cloned rabbit beta-globin gene and its flanking regions with a homologous mouse sequence. *Science* 206, 337-344.
- Vanecek, J., und Vollrath, L. (1989). Melatonin inhibits cyclic AMP and cyclic GMP accumulation in the rat pituitary. *Brain Res* 505, 157-159.

Vanecek, J., und Klein, D. C. (1992). Melatonin inhibits gonadotropin-releasing hormone-induced elevation of intracellular Ca²⁺ in neonatal rat pituitary cells. *Endocrinology* 130, 701-707.

Vanecek, J. (1998). Cellular mechanisms of melatonin action. *Physiol Rev* 78, 687-721.

von Gall, C., Garabette, M. L., Kell, C. A., Frenzel, S., Dehghani, F., Schumm-Draeger, P. M., Weaver, D. R., Korf, H. W., Hastings, M. H., und Stehle, J. H. (2002). Rhythmic gene expression in pituitary depends on heterologous sensitization by the neurohormone melatonin. *Nat Neurosci* 5, 234-238.

Waldhauser, F., Weiszenbacher, G., Tatzer, E., Gisinger, B., Waldhauser, M., Schemper, M., und Frisch, H. (1988). Alterations in nocturnal serum melatonin levels in humans with growth and aging. *J Clin Endocrinol Metab* 66, 648-652.

Watts, V. J., und Neve, K. A. (2005). Sensitization of adenylate cyclase by Galpha i/o-coupled receptors. *Pharmacol Ther* 106, 405-421.

Witt-Enderby, P. A., Masana, M. I., und Dubocovich, M. L. (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, 3064-3071.

Witt-Enderby, P. A., MacKenzie, R. S., McKeon, R. M., Carroll, E. A., Bordt, S. L., und Melan, M. A. (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, 28-42.

Wu, Y. H., Zhou, J. N., Van Heerikhuize, J., Jockers, R., und Swaab, D. F. (2007). Decreased MT1 melatonin receptor expression in the suprachiasmatic nucleus in aging and Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 28, 1239-1247.

Yao, F., Svensjo, T., Winkler, T., Lu, M., Eriksson, C., und Eriksson, E. (1998). Tetracycline repressor, tetR, rather than the tetR-mammalian cell transcription factor fusion derivatives, regulates inducible gene expression in mammalian cells. *Hum Gene Ther* 9, 1939-1950.

Yasuo, S., Yoshimura, T., Ebihara, S., und Korf, H. W. (2009). Melatonin transmits photoperiodic signals through the MT1 melatonin receptor. *J Neurosci* 29, 2885-2889.

7.1 Eigene wissenschaftliche Beiträge

Publikationen

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

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

Mühlbauer, E.*, Albrecht, E.*, Bazwinsky-Wutschke, I., und Peschke, E. (2012). Melatonin influences insulin secretion primarily via MT(1) receptors in rat insulinoma cells (INS-1) and mouse pancreatic islets. *J Pineal Res* 52, 446-459. (*E.Mühlbauer und E.Albrecht, geteilte Erstauteurschaft)

Bazwinsky-Wutschke, I., Wolgast, S., Mühlbauer, E., Albrecht, E., und Peschke, E. (2012). Phosphorylation of cyclic AMP-response element-binding protein (CREB) is influenced by melatonin treatment in pancreatic rat insulinoma beta-cells (INS-1). *J Pineal Res* 53, 344-357.

Bähr, I., Mühlbauer, E., Albrecht, E., und Peschke, E. (2012). Evidence of the receptor-mediated influence of melatonin on pancreatic glucagon secretion via the Galphaq protein-coupled and PI3K signaling pathways. *J Pineal Res* 53, 390-398.

Kurzpublikationen

Peschke, E., Stumpf, I., Hofmann, K., Streck, S., Albrecht, E., Wolgast, S., Wedekind, D. und Mühlbauer, E. (2010). Melatonin-insulin interactions in type 1 diabetic rats. *Klin. Neuro.* 41 (ID24), 45.

Albrecht, E., Mühlbauer, E., Bazwinsky-Wutschke, I. und Peschke, E. (2010). Zur Expression und Funktion des humanen MT2-Rezeptors in der pankreatischen β -Zelle. *Diabetologie und Stoffwechsel* 5 - P312 DOI: 10.1055/s-0030-1255199. (Posterpräsentation zur 45. Jahrestagung der Deutschen Diabetes-Gesellschaft in Stuttgart).

Albrecht, E., Mühlbauer, E., Bazwinsky-Wutschke, I. und Peschke, E. (2010). The importance of the human MT2 receptor for the pancreatic β -cell. *Obes. Facts* 3 (suppl 1), 42. (Posterpräsentation zur 26. Jahrestagung der Deutschen Adipositas-Gesellschaft in Berlin).

Hofmann, K., Bähr, I., Streck, S., Albrecht, E., Wedekind, D., Mühlbauer, E. und Peschke, E. (2010). Insulin treatment of type 1-diabetic rats normalizes both the plasma melatonin and the expression of melatonin synthesizing enzymes. *Obes. Facts* 3 (suppl 1), 42. (Posterpräsentation zur 26. Jahrestagung der Deutschen Adipositas-Gesellschaft in Berlin).

Albrecht, E., Mühlbauer, E., Bazwinsky-Wutschke, I. und Peschke, E. (2011). The human MT2 receptor signaling is linked to cAMP and insulin secretion in INS1 cells. Abstract-CD 54. Symposium der Deutschen Gesellschaft für Endokrinologie 2011, PS1-02-2, ISSN 1862-1503. (Posterpräsentation zum 54. Symposium der Deutschen Gesellschaft für Endokrinologie in Hamburg).

Hofmann, K., Bähr, I., Albrecht, E., Streck, S., Wedekind, D., Mühlbauer, E. und Peschke, E. (2011). Plasma melatonin concentration and expression of melatonin synthesizing enzymes are compensated by insulin administration to spontaneously type 1-diabetic rats. Abstract-CD 54. Symposium der Deutschen Gesellschaft für Endokrinologie, PS1-02-1, ISSN 1862-1503. (Posterpräsentation zum 54. Symposium der Deutschen Gesellschaft für Endokrinologie in Hamburg).

Albrecht, E., Mühlbauer, E., Wolgast, S., Hofmann, K. und Peschke, E. (2011). Signalwege des humanen MT2-Rezeptors in der pankreatischen β -Zelle. *Diabetologie und Stoffwechsel* 6 - P292 DOI: 10.1055/s-0031-1280959. (Posterpräsentation zur 46. Jahrestagung der Deutschen Diabetes-Gesellschaft in Leipzig).

Albrecht, E., Mühlbauer, E., Bazwinsky-Wutschke, I., Hofmann, K. und Peschke, E. (2011). Einfluss des humanen MT2-Rezeptors auf die Insulinsekretion der pankreatischen β -Zelle. In: Peschke, E.: *Chronobiologie*. Nova Acta Leopoldina, NF, Band 114, Nr. 389. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft Stuttgart, S. 191–195. (Posterpräsentation zum Leopoldina-Symposium im Rahmen der 54. Wissenschaftlichen Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Klinische Neurophysiologie und Funktionelle Bildgebung in Halle/Saale).

Hofmann, K., Bähr, I., Streck, S., Mühlbauer, E., Albrecht, E., Wolgast, S., Wedekind, D. und Peschke, E. (2011). Melatonin-Insulin-Interaktionen bei Typ 1-diabetischen Ratten. In: Peschke, E.: *Chronobiologie*. Nova Acta Leopoldina, NF, Band 114, Nr. 389. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft Stuttgart, S. 221-226. (Posterpräsentation zum Leopoldina-Symposium im Rahmen der 54. Wissenschaftlichen Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Klinische Neurophysiologie und Funktionelle Bildgebung in Halle/Saale).

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Elke Albrecht
Geburtsdatum	18.07.1980
Geburtsort	Altenburg
Staatsangehörigkeit	deutsch

Schulausbildung

September 1987 – August 1991	Friedrich-Engels-Schule, Altenburg
September 1991 – Juli 1999	Friedrichgymnasium, Altenburg
Juli 1999	Abitur

Ausbildung

Oktober 1999 – März 2003	Ausbildung zur Krankenschwester im Klinikum Darmstadt
März 2003	Staatliche Prüfung in der Krankenpflege

Studium

Oktober 2004 – März 2009	Studium der Ernährungswissenschaften an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Halle (Saale)
Oktober 2008 – März 2009	Diplomarbeit am Institut für Agrar- und Ernährungswissenschaften der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg unter der Betreuung von Prof. Dr. G. Stangl Thema: Die Bedeutung des PPAR α für die Regulation der thyreotropen Achse
März 2009	Diplomprüfung

Promotionsstudium

April 2009	Beginn der Dissertation am Institut für Anatomie und Zellbiologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg unter der Betreuung von Prof. Dr. E. Peschke und unter Mitbeteiligung von Prof. Dr. G. Stangl Thema: Untersuchungen zur Bedeutung von Melatoninrezeptoren für die pankreatische β -Zelle
------------	--

Berufstätigkeit

April 2003 – September 2004

Krankenschwester an der Universitätsklinik für
Anästhesiologie und Operative Intensivmedizin der
Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

Oktober 2004 – März 2009

Krankenschwester im Altenpflegeheim am
Diakonissenhaus Leipzig

ab Mai 2009

Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für
Anatomie und Zellbiologie der Martin-Luther-
Universität Halle-Wittenberg

Halle/Saale, 09.04.2013

Elke Albrecht

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe. Es wurden keine anderen als die in der Arbeit angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt. Die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen sind als solche kenntlich gemacht.

Hiermit erkläre ich, dass ich noch keine vergeblichen Promotionsversuche unternommen habe und die vorliegende Dissertation nicht in der gegenwärtigen bzw. in einer anderen Fassung bereits einer anderen Fakultät / anderen wissenschaftlichen Einrichtung vorgelegt habe.

Hiermit erkläre ich, dass ich keine bestehenden Vorstrafen habe und gegen mich keine anhängigen Ermittlungsverfahren laufen.

Halle/Saale, 09.04.2013

Elke Albrecht

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die zur Realisierung dieser Arbeit beigetragen haben.

Herrn Prof. Dr. Dr. Bernd Fischer danke ich für die Möglichkeit meine Dissertation am Institut für Anatomie und Zellbiologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg anzufertigen.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Elmar Peschke für die Vergabe des interessanten Themas und die ausgezeichneten Möglichkeiten, es zu bearbeiten. Gleichzeitig möchte ich ihm für die persönliche Betreuung und Unterstützung danken.

Besonders herzlich möchte ich mich bei Herrn Dr. Eckhard Mühlbauer für die engagierte Betreuung während der gesamten Promotionszeit bedanken. Seine sachkundige Unterstützung bei der Planung, Durchführung und Auswertung der Versuche sowie die vielen anregenden Diskussionen mit ihm haben wesentlich zum Erstellen der vorliegenden Arbeit beigetragen.

Großer Dank gebührt auch allen weiteren Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Peschke für ihre Hilfsbereitschaft und freundliche Unterstützung. Allen voran möchte ich Frau Dr. Ina Bähr und Frau Diplom-Ernährungswissenschaftlerin Kathleen Hofmann für die freundschaftliche Zusammenarbeit und jeden anderen wertvollen, unterstützenden Beistand danken. Für die hervorragende technische Assistenz bei der Versuchsdurchführung möchte ich mich bei Frau Candy Rothgänger, Frau Beate Heydel und Frau Annika Jordan bedanken. Frau Dr. Ivonne Bazwinsky-Wutschke und Frau Dr. Sabine Wolgast danke ich für die Unterstützung bei der Durchführung der Immunzytochemie und des *Calcium Imaging*. Vielen Dank auch an Frau Diplom-Ernährungswissenschaftlerin Juliane Zibolka für das sorgfältige Korrekturlesen.

Nicht zuletzt gilt mein Dank meiner Familie, die mir durch ihre fortwährende Unterstützung diese Arbeit ermöglichen.