

Aus dem Institut für Anatomie und Zellbiologie der Medizinischen Fakultät der
Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

(Direktor: Prof. Dr. med. Dr. agr. Bernd Fischer)

**Einfluss des Pinealhormons Melatonin auf
Calciumsignalproteine und pCREB in der
pankreatischen β -Zelle von Säugern**

HABILITATIONSSCHRIFT

zur Erlangung des akademischen Grades

Dr. rer. nat., rer. medic. habil.

für das Fachgebiet Anatomie

vorgelegt

der Medizinischen Fakultät

der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von: **Dr. rer. nat. Ivonne Bazwinsky-Wutschke**

geboren am 21.11.1974 in Weißenfels

Gutachter/in

1. Prof. Dr. phil. nat. Freifrau Charlotte von Gall

2. Prof. Dr. med. Sigurd Lenzen

Datum der Vorlesung: 13. Oktober 2014

Datum der Verteidigung: 14. Oktober 2014

REFERAT

Die pankreatische β -Zelle von LANGERHANSschen Inseln der Bauchspeicheldrüse verfügt über ein Netzwerk von Calciumsignalwegen, die entscheidend für die Insulinbiosynthese und Insulinausschüttung sind. Calcium-bindende Proteine (CaBPs) wie Calreticulin, Calbindin-D28k, Secretagogen und Calmodulin, die überwiegend in der pankreatischen Insel und dort nachweislich in bestimmten Inselzelltypen (α - und β -Zellen) lokalisiert sind, repräsentieren einen wichtigen Bestandteil dieser Netzwerke. Der Nachweis der genannten CaBPs in den Inseln von Typ-2-diabetischen Goto-Kakizaki-Ratten belegt eine Alteration in ihrer Expression und Verteilung, die im Zusammenhang mit einer diabetischen Stoffwechsellage und Diabetogenese stehen. Ein für die Signalwegbeziehungen der Insel besonders bedeutsames CaBP mit hohem Expressionsniveau im Inselorgan ist das Calmodulin, von dem die Beteiligung seiner Calcium/Calmodulin-abhängigen Signalkaskaden an der Insulinsekretion als gesichert gilt.

Die Insulinsekretion selbst unterliegt einer Beeinflussung durch äußere Faktoren wie dem Pinealhormon Melatonin. Mediert über G_i -gekoppelte Melatoninrezeptorisoformen (MT1 und MT2), deren Existenz in der pankreatischen Insel von Rodentern und Mensch als auch in der Ratteninsulinomazelle INS-1 auf molekularbiologischer und immunhistochemischer Ebene nachgewiesen ist, übt Melatonin in der β -Zelle einen überwiegend hemmenden Einfluss auf die Insulinausschüttung aus. Koinzident dazu senkt Melatonin signifikant die Transkriptmengen der Calcium/Calmodulin-abhängigen Proteinkinasen (Camks) Camk2d und CamkIV, die in Prozesse der Insulinbiosynthese und Insulinsekretion eingebunden sind. Veränderte experimentelle Bedingungen während der Stimulation der Insulinsekretion der INS-1 Zelle, einem anerkannten β -Zellmodell, ermöglicht die Erfassung differentieller Effekte von Melatonin auf die Camk2d- und CamkIV-Transkripte. Pharmakologische Experimente an einem Melatoninrezeptor(MT2)-überexprimierten β -Zellmodell (hMT2-INS-1) liefern weiterhin Belege, dass über Veränderungen des Rezeptorgehalts der inhibierende Einfluss von Melatonin auf diese Transkripte noch deutlich verstärkt wird. Der Nachweis von Camk2d- und CamkIV-mRNA an Melatoninrezeptor-*knockout*-Mausmodellen zeigt die Abhängigkeit der Transkriptexpression von der Präsenz der jeweiligen Melatoninrezeptorisoform. Da die zuvor dokumentierten Veränderungen der Transkriptmengen auch auf Proteinebene der CAMK2D erfassbar sind, besitzen sie eine funktionelle Relevanz für die β -Zelle.

Änderungen in der Genexpression werden über Transkriptionsfaktoren, wie beispielsweise das *cyclic AMP-response element-binding protein* (CREB), vermittelt. Für die pankreatische β -Zelle kann mit vorliegender Arbeit erstmals gezeigt werden, dass Melatonin die Phosphorylierung und damit Aktivierung von CREB (pCREB) reguliert. Unter Insulin-stimulierenden Einflüssen induziert Melatonin, vermittelt über MT1- und MT2-Rezeptoren, unter Nutzung des cAMP/PKA-Weges, eine deutliche Verminderung von pCREB. Gentechnisch veränderte β -Zellmodelle belegen eine Abhängigkeit zwischen dem Rezeptorgehalt und der Menge von gebildetem pCREB. Dies hat funktionelle Konsequenzen, da bei einer diabetischen Stoffwechsellage ein veränderter Melatoninrezeptor-Status im Sinne einer Erhöhung von MT1 und MT2 (z.B. beim Typ-2-Diabetes) vorliegt. Zudem sind, da die Gene beider Camks mit der CRE-Sequenz die Bindungsstelle für pCREB besitzen, die durch Melatonin induzierten Änderungen im Transkriptniveau von Camk2d und CamkIV erklärbar.

Die Ergebnisse der vorliegenden Schrift tragen zum besseren Verständnis der komplexen Melatoninwirkung auf die pankreatische β -Zelle und der daran beteiligten Signalwege bei. Sie könnten perspektivisch Ansätze für die Entwicklung neuer Behandlungsstrategien beim Typ-2-Diabetes liefern.

Dr. Bazwinsky-Wutschke, Ivonne: Einfluss des Pinealhormons Melatonin auf Calciumsignalproteine und pCREB in der pankreatischen β -Zelle von Säugern, Halle (Saale), Univ., Med. Fak., Habil., 57 Seiten, dazu 5 Originalarbeiten im Anhang, 2014

I INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG UND ZIELSTELLUNG	1
1.1	Die glukoseinduzierte Insulinsekretion und deren Regulation in der pankreatischen β -Zelle.....	2
1.2	Die Regulation der Insulinsekretion in der pankreatischen β -Zelle durch Melatonin.....	5
1.3	Zielstellungen.....	7
2	MATERIAL UND METHODIK	9
2.1	Versuchstiere und Probengewinnung.....	9
	Tiermodelle.....	9
	Humane Gewebeproben.....	10
2.2	Zellkultur und Inkubationsexperimente.....	10
	Zellmodelle.....	10
	Zellkultur und <i>batch</i> -Versuche.....	11
2.3	Immunhistochemie.....	11
2.4	Westernblot.....	11
2.5	Konfokalmikroskopie.....	11
2.6	RNA Extraktion und semi-quantitative <i>real-time</i> RT-PCR.....	12
2.7	Radioimmunoassaybestimmungen.....	12
2.8	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i> (ELISA).....	12
2.9	<i>Calcium-Imaging</i>	12
3	ERGEBNISSE	13
3.1	Expression und Vorkommen ausgewählter Calciumsignalproteine in der pankreatischen Insel vom Säuger	13
3.1.1	Immunhistochemische Untersuchungen zur Lokalisation und molekularbiologische Analyse der Expression von Calciumsignalproteinen.....	13
3.1.2	Einfluss einer Typ-2-diabetischen Stoffwechsellage auf die Expression und Verteilung von Calciumsignalproteinen.....	15

3.2	Expressionsänderungen ausgewählter Calciumsignalproteine unter dem Einfluss von Melatonin.....	17
3.2.1	Untersuchungen zur Expression von CamkIV und Camk2d am pankreatischen β -Zellmodell der INS-1 Zelle.....	18
3.2.2	Die differentielle Beeinflussung der Expression von CamkIV und Camk2d durch Melatonin.....	20
3.3	Die Rolle von pCREB bei Melatonin-vermittelten Effekten auf Calciumsignalkomponenten in der pankreatischen β-Zelle.....	24
3.3.1	Untersuchungen von pCREB-Veränderungen am INS-1 Zellmodell nach Melatoninapplikation.....	24
3.3.2	Untersuchungen von pCREB-Veränderungen an genetisch veränderten INS-1 Zellmodellen durch Melatoninapplikation.....	26
3.3.3	Untersuchungen an pankreatischen Inseln der Wistar-Ratte zum Einfluss von Melatonin auf pCREB.....	29
4	DISKUSSION.....	30
4.1	Expression und Vorkommen ausgewählter Calciumsignalproteine in der pankreatischen Insel vom Säuger.....	30
4.2	Expressionsänderungen ausgewählter Calciumsignalproteine unter dem Einfluss von Melatonin.....	31
4.3	Die Rolle von pCREB bei Melatonin-vermittelten Effekten auf Calciumsignalkomponenten in der pankreatischen β-Zelle.....	33
5	ZUSAMMENFASSUNG.....	36
6	LITERATURVERZEICHNIS.....	40
7	THESEN.....	50
ANLAGEN	53

II VERZEICHNIS DER VERWENDETEN ABKÜRZUNGEN

4P-PDOT	4-Phenyl-2-propionamidotetralin
AC	Adenylatzyklase
ADP	Adenosindiphosphat
ATP	Adenosintriphosphat
CaBPs	Calcium-bindende Proteine
CALM	Calmodulin (Protein)
Calm1	Calmodulin 1 (Transkript)
CAMK2D	Isoform 2D der CAMKs (Protein)
Camk2d	Isoform 2d der Camks (Transkript)
CAMKIV	Typ IV der CAMKs (Protein)
CamkIV	Typ IV der Camks (Transkript)
CAMKs	Calcium/Calmodulin-abhängige Proteinkinasen
cAMP	zyklisches 3`-5`-Adenosinmonophosphat
cGMP	zyklisches 3`-5`-Guanosinmonophosphat
CRE	<i>cAMP-response element</i> (Bindungsstelle)
CREB	<i>cyclic AMP response element binding protein</i>
DNA	<i>deoxyribose nucleic acid</i>
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
Fsk	Forskolin
GC	Guanylatzyklase
GDP	Guanosindiphosphat
Gi	inhibitorisches G-Protein
GIP	gastroinhibitorisches Peptid
GK-Ratte	Goto-Kakizaki-Ratte
GLP-1	<i>glukagon-like peptide-1</i>
GLUT2	Glukosetransporter 2
G-Protein	Guaninnukleotid-bindendes Protein
Gs	stimulatorisches G-Protein
GTP	Guanosintriphosphat
GTP	Guanosintriphosphat
hMT2-INS-1 Zelle	INS-1 Zelle mit Überexpression des humanen MT2-Rezeptors
IBMX	3-Isobutyl-1-methylxanthin
INS-1-Zelle	Ratteninsulinomazelle
IP ₃	Inositol-1,4,5-triphosphat
K ⁺ -Kanal	Kaliumkanal
KCl	Kaliumchlorid
L	Molekulargewichtsstandard
MAP-2	<i>microtubule-associated protein-2</i>
mRNA	<i>messenger ribonucleic acid</i>
MT1	MT1-Melatoninrezeptorisoform
MT1/2ko	MT1/2-Rezeptor-Doppelknockout
MT1ko	MT1-Rezeptor- <i>knockout</i>
MT2	MT2-Melatoninrezeptorisoform
MT2ko	MT2-Rezeptor- <i>knockout</i>
NSY-Maus	<i>Nagoya-Shibata-Yasuda mouse</i>
OETF-Ratten	<i>Otsuka-Long-Evans-Tokushima-fatty rats</i>
pCREB	phosphoryliertes CREB
PD	<i>pars distalis</i>
PDE3	Phosphodiesterase3
PKA	Proteinkinase A
PLC	Phospholipase C
PT	<i>pars tuberalis</i>
RIA	<i>radioimmunoassay</i>

rMT1- <i>knockdown</i>	INS-1 Zelle mit <i>knockdown</i> des MT1-Rezeptors
RNA	<i>ribonucleic acid</i>
ROR (α , β , γ)	<i>nuclear receptors of the retinoic-acid-related receptors</i>
RT-PCR	<i>reverse-transcription polymerase chain reaction</i>
RXR α	<i>retinoic-acid related receptor</i>
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i>
SERCA3	<i>sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase isoform 3</i>
SNPs	<i>single nucleotide polymorphisms</i>
VAMP	<i>vesicle-associated membrane protein</i>
VDCCs	<i>voltage dependent calcium channels</i>
VIP	vasoaktives intestinales Peptid
WR	Wistar
WT	Wildtyp

Fremdsprachige Begriffe und Bezeichnungen von Genen sind kursiv gedruckt.

1 EINLEITUNG UND ZIELSTELLUNG

Die pankreatischen β -Zellen kommen in etwa einer Million LANGERHANS-Inseln im Pankreas des Menschen vor und sorgen durch Produktion sowie Freisetzung des von ihnen gebildeten Insulins für eine adäquate Glukoseversorgung der entsprechenden Zielorgane, insbesondere von Leber, Muskulatur und Fettgewebe (Waldhäusl und Lenzen 2007). Die pankreatischen β -Zellen nehmen etwa 70-80 % der Zellmasse einer humanen pankreatischen Insel (Übersicht in Panten 2005), aber auch einer Ratteninsel ein und sind damit unter den bisher bekannten Inselzelltypen der dominierende Zelltyp (Abb. 1).

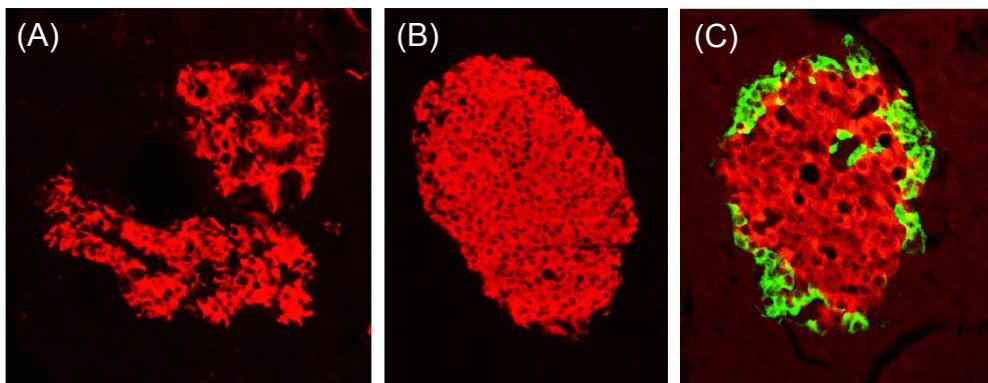


Abb. 1 Insulinimmunmarkierung (rot) einer humanen pankreatischen Insel (**A**), einer pankreatischen Insel der Maus (**B**) und der Ratte (**C**). Die grün dargestellten, ringförmig angeordneten Zellen in der pankreatischen Insel der Ratte (**C**) repräsentieren beispielhaft die anteilmäßig unterlegenen α -Zellen.

Fehlfunktionen der pankreatischen β -Zelle wie beispielsweise Störungen in der Insulinproduktion und -sekretion oder der Verlust der Glukoseresponsivität liegen diabetischen Stoffwechsellagen wie dem Typ-1- und Typ-2-Diabetes zugrunde. Trotz einer gemeinsamen Grundsymptomatik handelt es sich beim Typ-1- und Typ-2-Diabetes um zwei verschiedene polygenetische Erkrankungen mit unterschiedlich verantwortlichen Krankheitsmechanismen (Cnop et al. 2005, Lenzen 2011). Lenzen zufolge (2011) ist der Typ-2-Diabetes eine chronisch degenerative Erkrankung, bei der es infolge einer ernährungsbedingten Überlast der β -Zellen zu einer vorzeitigen Insuffizienz kommt. Der Typ-1-Diabetes hingegen ist ein Krankheitsbild mit Autoimmunogenese und einer selektiv auf die β -Zellen des Pankreas gerichteten Toxizität von proinflammatorischen Zytokinen sowie einer zytotoxischen zellulären Immunantwort. Diese führt im Krankheitsverlauf, individuell unterschiedlich schnell, zu einer kontinuierlichen Abnahme der β -Zellen im Pankreas (Lenzen 2011).

Der *Diabetes mellitus* gehört in Deutschland bereits im Kindes- und Jugendalter zur häufigsten Stoffwechselerkrankung mit einer rapide zunehmenden Inzidenz. In Bezug

auf den Typ-1-Diabetes, der durch genetische Faktoren, Umwelteinflüsse, aber auch frühes Abstillen begünstigt wird, liegen die Schätzungen dahingehend, dass etwa i) 30000 Kinder und Jugendliche unter 19 Jahren erkrankt sind, ii) sich die Diabetesinzidenz bei Kindern unter fünf Jahren bis 2020 verdoppeln wird und iii) 12000 Kinder mit Insulinanaloga und mehr als 3000 mit Insulinpumpen behandelt werden (Zylka-Menhorn 2012).

Auch der Typ-2-Diabetes wird durch die Zunahme von Übergewicht, Fehlernährung und Bewegungsmangel immer häufiger – bereits im Kindesalter – diagnostiziert. So hat sich die Anzahl der pädiatrischen Typ-2-Neuerkrankungen in den letzten zehn Jahren verfünffacht. Betroffen sind meist adipöse Jugendliche, wobei das weibliche Geschlecht mit 67 % überwiegt. Diese Zahlen spiegeln allerdings nur die Spitze des Eisbergs wider, denn circa 10 % der adipösen Jugendlichen weisen bereits eine gestörte Glukosetoleranz auf (Zylka-Menhorn 2012).

Die Untersuchung von Signalkaskaden der Pankreasinsel, die in die Insulinbiosynthese und Insulinausschüttung involviert sind und deren Regulation durch hormonelle Einflüsse sind daher von zunehmender Bedeutung und klinischer Relevanz. Ein Hormon, das eng im Zusammenhang mit dem Typ-2-Diabetes diskutiert wird, ist das von den Pinealozyten der Epiphyse insbesondere während der Nacht ausgeschüttete Neurohormon Melatonin (Peschke et al. 2007, Lyssenko et al. 2009, Peschke et al. 2013). Melatonin spielt eine zentrale Rolle bei der (durch Glukose, KCl, Forskolin, IBMX) stimulierten Insulinsekretion (Peschke et al. 2013).

1.1 Die glukoseinduzierte Insulinsekretion und deren Regulation in der pankreatischen β -Zelle

Die glukoseinduzierte Insulinausschüttung ist ein mittlerweile gut verstandener Mechanismus (Lenzen 2011). Glukose gelangt über den Insulin-unabhängigen Glukosetransporter GLUT2 in die β -Zelle. Wollheim und Maechler (2002) zufolge ruft hierbei ein Anstieg der Blutglukosekonzentration eine Steigerung der Versorgung der Atmungskette mit reduzierenden Äquivalenten hervor und verursacht dadurch eine Zunahme der Phosphorylierung von ADP zu ATP. Die erhöhte ATP-Konzentration und die verminderte ADP-Konzentration bewirken das Schließen sogenannter ATP-empfindlicher K^+ -Kanäle (K_{ATP} -Kanäle), wodurch die Plasmamembran depolarisiert und spannungsabhängige Calciumkanäle (VDCCs) vom L-Typ geöffnet werden, über die Calciumionen in die Zelle einströmen (McClenaghan und Flatt 1999, Gribble und Reimann 2002). Die Erhöhung der Calciumkonzentration zu Beginn ist ausreichend für die Initiation der Insulinsekretion, jedoch sind für eine vollständige Aktivierung des

Sekretionsvorganges zusätzliche Calciuminteraktionen erforderlich (Gembal et al. 1992, Kelley et al. 1994).

Nach derzeitigen Vorstellungen ist an die Erhöhung des intrazellulären Calciums noch eine Vielzahl Calcium-abhängiger Signalwege gekoppelt. Transduktion und Effizienz dieser intrazellulären Calcium-abhängigen Signalwege hängen wesentlich von intrazellulären Calciumsignalkomponenten ab, zu denen beispielsweise die Calcium-bindenden Proteine (CaBPs) gehören. CaBPs werden generell als Schlüsselkomponenten und zentrale Mediatoren für Calciumsignalwege innerhalb verschiedener Zellen diskutiert (Übersicht in Andressen et al. 1993, Celio et al. 1996, Niki und Hidaka 1999, Schwaller 2010), aber für die pankreatische β -Zelle sind sie im Hinblick auf die Regulation der Insulinsekretion von besonderer Bedeutung (Übersicht in Niki und Hidaka 1999). Die Bindung von Calcium an ein CaBP bewirkt eine Konformationsänderung, in deren Folge das Protein in eine biologisch aktive Form überführt wird, die es ihm ermöglicht, Wechselwirkungen mit anderen Zielproteinen einzugehen und konsekutiv Proteininteraktionen und/oder Enzymaktivitäten effektiv zu modulieren (Übersichten Niki et al. 1996, Niki und Hidaka 1999). Basierend auf einer Einteilung von Niki und Mitarbeitern (1996) repräsentiert die EF-Hand¹-Proteinfamilie die größte unter den bisher beschriebenen, strukturell diversen Gruppen von CaBPs (zu weiteren Gruppen zählen Calcium/Phospholipid-bindende Proteine und Calciumspeicherproteine).

Dem zurückliegend beschriebenen Calmodulin als funktionellem Protein der pankreatischen β -Zelle (Sugden et al. 1979) wird durch seine Interaktion mit den Calcium/Calmodulin-abhängigen Proteinkinase (CAMKs) als sog. *downstream*-Enzymen eine essentielle Rolle in der Regulation der Insulinausschüttung, besonders in der 2. Sekretionsphase, zugewiesen (Landt et al. 1992, Easom 1999, Neshar et al. 2002). Befunde, welche die Bedeutung der CAMKs für die pankreatische β -Zelle unterstreichen, zeigen, dass die Insulinsekretion durch Blockierung der CAMK2 inhibiert wird (Wenham et al. 1992). Weiterhin verdeutlichten Studien an pankreatischen Inseln transgener Mäuse, in denen mutiertes Calmodulin keine Interaktionen mit den CAMKs eingehen kann, eine Reduktion der zweiphasigen Insulinausschüttung (Ribar et al. 1995). Aus dieser und auch neueren Studien lässt sich ableiten, dass bereits eine Störung im intrazellulären Calciumstoffwechsel ausreicht, um auf die Insulinsekretion einzuwirken (Übersicht in Seino et al. 2013).

¹ Proteine dieser Familie besitzen eine Calciumbindungsstelle mit dem gemeinsamen Strukturmotiv der EF-Hand. „E“ und „F“ sind zwei alpha-Helices verbunden über eine Calcium-bindende Schleife aus 12 Aminosäuren (Lewit-Bentley und Retry 2000).

Die Regulation der Insulinsekretion wird über äußere Faktoren (Hormone, kleine Peptide, extrazelluläre *messenger*) eingeleitet, die mittels Bindung über ihre Rezeptoren in der Plasmamembran die glukoseinduzierte Insulinsekretion in der pankreatischen β -Zelle verstärken oder hemmen.

Ein bedeutender Signalweg, über den die durch Glukose oder andere Stimuli induzierte Insulinsekretion verstärkt wird, ist die Aktivierung der cAMP-abhängigen Proteinkinase A (PKA), wobei das aus dem Glukosemetabolismus entstehende ATP als Ausgangssubstrat für die Adenylatzyklase (AC) dient, um cAMP für die Aktivierung der PKA bereitzustellen (Blanpied und Augustine 1999, Takahashi et al. 1999, Nesher et al. 2002).

Zu den Substanzen, welche die Biosynthese und Sekretion von Insulin unter physiologischen Bedingungen durch gezielte Aktivierung der Adenylatzyklase verstärken, gehören Hormone aus dem Pankreas und Dünndarm wie GIP, GLP-1 oder Glukagon (Perry und Greig 2003) sowie Neurotransmitter wie VIP (Ahren 2000). Das aus der Pflanze *Coleus forskohlii* extrahierte und für Zellinkubationsexperimente häufig eingesetzte Diterpen Forskolin aktiviert pharmakologisch bis auf die Isoform 9 alle AC-Isoformen (Hanoune und Defer 2001).

Die Bindung dieser Agonisten an die entsprechenden Rezeptoren stimuliert über G_s die Adenylatzyklase und der daraus resultierende cAMP-Anstieg aktiviert die PKA, wodurch die Transkription und Biosynthese von Präproinsulin sowie die Insulinsekretion gesteigert werden (Übersicht in Panten 2005). Generell ist das cAMP ein wichtiger Mediator/Modulator der β -Zellfunktionen, wobei unter anderem die PKA als ein zentraler Vermittler der cAMP-Effekte auf zelluläre Prozesse zu verstehen ist (Furman et al. 2010). So liegen einer Steigerung der Insulinsekretion teilweise Wirkungen der PKA auf spannungsabhängige Calciumkanäle und auf intrazelluläre Calciumspeicher zugrunde, die zum Anstieg der zytosolischen Calciumkonzentration beitragen. Sekretionssteigerungen werden aber auch über distale PKA-Wirkungen und Wirkungen auf das so genannte *priming* erreicht (Sharp 1996, Rorsman et al. 2000, Barg 2003, Übersicht in Panten 2005). Eine weitere Wirkung der PKA ist die Einflussnahme auf Gene über die Phosphorylierung einer Vielzahl von Transkriptionsfaktoren (Übersicht in Taskén und Aandahl 2003).

Einer der am besten charakterisierten Transkriptionsfaktoren, das *cAMP-response element-binding protein* (CREB) (Mayr und Montminy 2001, Carlezon et al. 2005) wird unter anderem durch die in den Kern translozierte PKA am Ser133 phosphoryliert (Shaywitz und Greenberg 1999), wodurch das phosphorylierte CREB die Transkription von Genen aktiviert, welche die *cAMP-response element* (CRE)-spezifische

Bindungsstelle besitzen (Mayr und Montminy 2001). In der pankreatischen β -Zelle ist CREB essentiell für deren Insulingenexpression und Insulinsekretion, aber auch deren Überlebensfähigkeit (Dalle et al. 2011).

1.2 Die Regulation der Insulinsekretion in der pankreatischen β -Zelle durch Melatonin

Ein externer Faktor, von zentraler Bedeutung für die Kontrolle und Regulation der Insulinsekretion der β -Zellen, ist das Melatonin. Melatonin (N-Acetyl-5-methoxytryptamin) wird von der Zirbeldrüse (*Epiphysis cerebri*) synthetisiert, wobei nächtlich eine erhöhte Synthese und Ausschüttung für das Neurohormon dokumentiert sind (Korf et al. 1998, 2003).

Vermittelt werden die Melatonineffekte beim Säuger im Wesentlichen über 2 Typen hochaffiner Membranrezeptoren, den MT1-Rezeptor (Mel1a, Reppert et al. 1994) und den MT2-Rezeptor (Mel1b, Reppert et al. 1995), die – meist co-existent als Heterodimere – in verschiedenen Geweben vorkommen (Übersicht in Slominski et al. 2012). Die lipophile Eigenschaft von Melatonin befähigt dieses Hormon aber ebenso, über die Passage der Membran (passiv oder aktiv) intrazelluläre Bindungen einzugehen (Costa et al. 1995, Hevia et al. 2008). Diese intrazellulären, gegenüber der Bindung an die bekannten beschriebenen Membranrezeptoren MT1 und MT2, eher niedrigaffinen Bindungsstellen sollen für physiologische, bei erhöhten Konzentrationen von Melatonin ablaufende, Signalübertragungen wichtig sein (Übersicht in Hardeland 2008). Bisher untersucht ist die seit längerem beschriebene Bindung von Melatonin an Calmodulin (Benitez-King et al. 1991, Pozo et al. 1997, Romero et al. 1998) und Calreticulin (Macias et al. 2003). Außerdem werden Bindungen zwischen Melatonin und nukleären Orphanrezeptoren diskutiert (Übersicht in Carlberg 2000, Slominski et al. 2012). Eigene Studien konnten zeigen, dass solche nukleären Rezeptoren (ROR α , ROR β , ROR γ , RXR α) überwiegend in der pankreatischen Insel und den dort vorhandenen Zelltypen (vorwiegend β - und α -Zelle) vorkommen (Mühlbauer et al. 2013).

Als bisher gesichert gilt, dass für die Vermittlung von Melatonineffekten an der pankreatischen β -Zelle die an der Membran angesiedelten Melatoninrezeptoren verantwortlich sind. Die pankreatische Insel, und hier im Besonderen die β -Zelle, verfügt über zwei membranständige Melatoninrezeptorisoformen: den MT1-Rezeptor (Peschke et al. 2000, 2002, Peschke 2008) und MT2-Rezeptor (Mühlbauer und Peschke 2007, Peschke et al. 2007, Peschke 2008). In Abhängigkeit von Gewebe und Spezies moduliert Melatonin über Bindung an solche G-Protein (GTP-bindende heterotrimere Proteine)-gekoppelte Membranrezeptoren verschiedene *second-*

messenger-Kaskaden (Reppert et al. 1994, 1995, Dubocovich und Markowska 2005, Jockers et al. 2008) und vermittelt so viele seiner biologischen Effekte. In der pankreatischen β -Zelle wurden zurückliegend unter Nutzung von molekularbiologischen, autoradiographischen und funktionellen Untersuchungen sowie Superfusionsexperimenten verschiedene Signalkaskaden identifiziert, über die Melatonin die Insulinsekretion moduliert (Übersicht in Peschke 2008, Peschke und Mühlbauer 2010, Peschke et al. 2013).

So bewirkt Melatonin MT1-Rezeptormediert über trimere inhibitorische G-Proteine (G_i), die Adenylatzyklase, das cAMP und die PKA eine Verminderung der Insulinausschüttung in pankreatischen Inseln neonataler Ratten (Peschke et al. 1997, 2000, Csernus et al. 1998) als auch an Ratteninsulinomazellen INS-1 (Peschke 2004, Peschke et al. 2006a, b). Melatonin senkt über den AC/cAMP-Weg die Glukose-, KCl- und Forskolin-stimulierte Insulinsekretion (Peschke et al. 2002, Kemp et al. 2002, Picinato et al. 2002a, b). Eine Insulin-senkende Wirkung von Melatonin wird außerdem über den MT2-Rezeptor und die daran hauptsächlich GC/cGMP-gekoppelte Signalkaskade vermittelt (Stumpf et al. 2008, 2009).

Ein Insulin-steigernder Einfluss von Melatonin auf die β -Zelle wird, unter besonderen experimentellen Bedingungen (z.B. nach kurzzeitiger Prä-Applikation von Melatonin), MT1-Rezeptormediert über eine Aktivierung des G_q -PLC-IP₃-Weges und einer Erhöhung des intrazellulären Calciumgehaltes erreicht, wobei die physiologische Bedeutung dieses Nebenwegs bisher noch nicht bekannt ist (Bach et al. 2005). Darüber hinaus ist durch Studien an neuronalem Gewebe bekannt, dass Melatonineffekte auch über den Calcium/Calmodulin-abhängigen Signalweg vermittelt werden (Del Rio et al. 2004, De Almeida-Paula et al. 2005, Schuster et al. 2005) oder über inhibitorische Einflüsse von Melatonin auf die CAMK2 im Rattenhirn (Benitez-King et al. 1996, Fukanaga et al. 2002).

Die inhibitorischen Melatonineffekte auf die pankreatische β -Zelle sind überwiegend MT1-Rezeptor-mediert. In Rezeptorverteilungsstudien konnte gezeigt werden, dass in pankreatischen Inseln der Ratte (Mühlbauer und Peschke 2007), in INS-1 Zellen (Mühlbauer et al. 2011) und auch in humanem Pankreasgewebe (Peschke et al. 2007) das Expressionsniveau des MT1-Rezeptors deutlich über dem des MT2-Rezeptors liegt. Demgegenüber berichten Lyssenko und Mitarbeiter (2009) über ein nahezu gleiches Expressionsniveau zwischen beiden Melatoninrezeptoren in der humanen pankreatischen Insel.

MT1-Rezeptor-vermittelt bewirkt Melatonin eine Aktivitätsminderung der PKA (Picinato et al. 2002b). Kemp und Mitarbeiter (2002) berichten, dass eine akute

Melatoninbehandlung über 4 h in Anwesenheit von Forskolin zu einer Verminderung der Insulinpromotoraktivität und der CRE-vermittelten Genexpression führt. Weitere Studien belegen einen deutlichen Einfluss von Melatonin auf die Phosphorylierung von CREB. So konnten McNulty und Mitarbeiter (1998) einen inhibitorischen Effekt von Melatonin auf die Forskolin-induzierte Phosphorylierung von CREB in den Zellen der *pars tuberalis* (PT) der Adenohypophyse nachweisen. Folgestudien an weiteren Hirnregionen bestätigten den Einfluss von Melatonin auf CREB (*suprachiasmatic nucleus*: von Gall et al. 2000, PT: Sheynzon und Korf 2006, Retina: Dinet und Korf 2007) und zeigten außerdem für die PT, dass Melatonin über den MT1-Rezeptor die Expression von Genen reguliert, die wiederum transkriptionelle Regulatoren codieren (Unfried et al. 2010). Hingegen bewirkte Melatonin in der *pars distalis* (PD) der Adenohypophyse keine Absenkungen der Forskolin-stimulierten Erhöhungen der nukleären pCREB-Kernmarkierung, was auf eine Gewebeabhängigkeit der Melatoninwirkung auf die CREB-Phosphorylierung hinweist (McNulty et al. 1994).

1.3 Zielstellungen

Eine zentrale Zielstellung der vorliegenden Arbeit bestand darin, festzustellen, ob eine durch Melatonin bedingte Verringerung der Insulinsekretion mit einer veränderten Expression von Calciumsignalkomponenten koinzidiert.

Unter Verwendung morphologischer Methoden sollte geklärt werden, i) welche CaBPs und CAMKs in der β -Zelle sowohl auf Transkript- als auch auf Proteinebene detektierbar sind. Hierfür wurden die Pankreata normoglykämischer Wistar-Ratten und Typ-2-diabetischer Goto-Kakizaki(GK)-Ratten verwendet, um eine Funktionseinbindung der CaBPs zu beschreiben.

Im Weiteren wurde geprüft, ii) ob an bestimmten Calciumsignalkomponenten wie den CAMKs Melatonineffekte nachweisbar sind, welche intrazellulären Signalwege für die Vermittlung der Effekte verantwortlich sind und ob die Präsenz bestimmter Melatoninrezeptorisoformen bzw. ein veränderter Melatoninrezeptorstatus Unterschiede in der Expression der untersuchten Calciumsignalkomponenten unter Melatonineinfluss bedingen. Schließlich sollte iii) die Bedeutung der für die Melatonin-induzierten Genexpressionsänderungen verantwortlichen Transkriptionsfaktoren wie pCREB, welches unter anderem einer Regulation durch den cAMP/PKA-Weg unterliegt, erfasst werden.

Das INS-1 Zellmodell wurde zur Untersuchung zellulärer Mechanismen von Melatonineffekten verwendet. Die INS-1 Zelle ist ein β -Zellmodell, das die typischen Eigenschaften der β -Zelle (*Glukose-responsiv*, Insulin-sekretierend) in sich vereint (Asfari et al. 1992). Zudem zeichnet sich die INS-1 Zelle durch das Vorkommen beider

Melatoninrezeptorisoformen (MT1, MT2) und Melatonin-beeinflussbare Signaltransduktionswege und Funktionsspektren aus (Peschke 2004, Mühlbauer und Peschke 2007). Um die Resultate aus den *batch*-Inkubationsversuchen der INS-1 Zelle mit Untersuchungen am Tiermodell zu ergänzen, wurden Melatoninrezeptor-*knockout*-Mäuse in die Studien mit einbezogen.

In den nachfolgenden Kapiteln werden die wissenschaftlichen Daten aus Originalarbeiten zusammenfassend dargestellt und anschließend diskutiert. Der letzte Abschnitt (Diskussion und Zusammenfassung) beinhaltet eine wissenschaftliche Einordnung der erzielten Ergebnisse hinsichtlich der zellulären Melatoninwirkung auf Calciumsignalkomponenten in der pankreatischen β -Zelle und ihrer funktionellen Konsequenzen.

2 MATERIAL UND METHODIK

Für die Bearbeitung der zuvor aufgeführten Zielstellungen wurden zahlreiche verschiedene Methoden und Techniken eingesetzt, die nachfolgend zusammenfassend dargestellt sind.

2.1 Versuchstiere und Probengewinnung

Tiermodelle

Als Versuchstiere für den Nachweis von CaBPs und CAMKs im Pankreasgewebe dienten metabolisch unauffällige, normoglykämische Wistar-Ratten (Auszucht: Han:Wist, Tierzucht Schönwalde GmbH, Schönwalde) und Typ-2-diabetische Goto-Kakizaki(GK)-Ratten (Inzucht; Taconic M&B, Ry, Dänemark) beiderlei Geschlechts (Bazwinsky-Wutschke et al. 2009, 2010). Vor Organentnahme (Pankreas, Gehirn, Leber) wurden jeweils Körpergewicht und Blutzucker der Ratten verschiedener Altersstufen bestimmt sowie das Serum für Insulinbestimmungen gewonnen.

Die GK-Ratte gehört zu den am besten charakterisierten Tiermodellen für normalgewichtige, Typ-2-diabetische Ratten (Portha 2005). Nach selektiver Zucht aus einem Wistar-Ratten-Stamm mit einer spontan gestörten Glukosetoleranz entstand ein Tiermodell mit einem polygenetisch determinierten Typ-2-Diabetes (Goto et al. 1988). Beide Geschlechter bilden im Gegensatz zu anderen diabetischen Tiermodellen [*Otsuka-Long-Evans-Tokushima-fatty* (OLETF)-Ratten und *Nagoya-Shibata-Yasuda* (NSY)-Maus] die Erkrankung in gleichem Umfang aus.

Charakteristische Ausprägungen des Typ-2-Diabetes bei der GK-Ratte sind Fibrosierung und Vernarbung der Inseln mit zunehmendem Lebensalter. Die Veränderungen sind mit einer Hyperglykämie nach dem Fasten, einer peripheren und hepatischen Insulinresistenz, verminderter glukoseinduzierter Insulinausschüttung, gestörter Glukosetoleranz sowie diabetischen Spätkomplikationen wie Angiopathie, Nephropathie, Neuropathie, Retinopathie assoziiert. Die Tiere sind durch eine sehr frühe Genese der Erkrankung gekennzeichnet: bereits bei Geburt ist die Anzahl von pankreatischen Inseln reduziert und spätestens im Alter von 2 Wochen entwickeln GK-Ratten eine Typ-2-diabetische Stoffwechsellage (Goto und Kakizaki 1981, Miralles und Portha 2001). Weiterhin zeichnen sich GK-Ratten dadurch aus, dass sie kein Übergewicht entwickeln und damit durch Adipositas verursachte Effekte ausgeschlossen werden können.

Weiterhin wurden weibliche und männliche Mäuse von drei Melatoninrezeptor-*knockout*-Mauslinien (beschrieben bei Liu et al. 1997, Jin et al. 2003) im Alter von 6 Wochen und 8-12 Monaten untersucht, die durch *knockout* entweder der MT1-

Rezeptorisoform (MT1ko), der MT2-Rezeptorisoform (MT2ko) oder beider Melatoninrezeptorisoformen (MT1/MT2ko) charakterisiert sind und deren Serum Melatonin enthielten (nähere Details siehe Bazwinsky-Wutschke et al. 2014). Melatoninrezeptor-assoziierte Melatonineinflüsse konnten an diesen *knockout*-Modellen bereits in früheren Studien nachgewiesen werden, so z.B. Einflüsse auf die Uhrengenenexpression (von Gall et al. 2005, Mühlbauer et al. 2009).

Als Kontrolltiere dienten Melatonin-profiziente Mäuse (WT) mit einer rhythmischen Melatoninsynthese und der Expression beider Melatoninrezeptoren. Von den Tieren wurden Serumproben (Entnahme jeweils in der Mitte des Tages und um Mitternacht) für die Insulin- und Melatoninbestimmung genommen sowie verschiedene Organe (Pankreas, Leber, Gehirn) für die Immunhistochemie und molekularbiologische Analysen asserviert.

Humane Gewebeproben

Das für die Untersuchungen als Ergänzung mitverwendete Pankreasgewebe stammte aus Operationsmaterial zur histologischen Befunderhebung, welches nach Resektion umgehend konserviert und asserviert wurde (Peschke et al. 2007).

2.2 Zellkultur und Inkubationsexperimente

Zellmodelle

Für morphologische und physiologische Zellinkubationsexperimente wurde die immortalisierte, Insulin-produzierende Ratteninsulinoma-Zelllinie INS-1 verwendet (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. Wollheim von der Universität Genf, Schweiz). Die INS-1 Zelle wurde aus β -Zellen eines durch Röntgenstrahlen induzierten Ratteninsulinoms entwickelt, die (unter Zusatz von β -Mercapthoethanol zur Erhaltung des Differenzierungsgrades) adhären als Monolayer-Kultur mit einer Verdopplungszeit von ca. 100 h wachsen. Strukturelle und funktionelle Eigenschaften der INS-1 Zellen sollen bis zur 80. Passage unverändert bleiben (Asfari et al. 1992). In den vorliegenden Studien wurde generell auf niedrigere Passagen (10-40) zurückgegriffen. Weiterhin sind typische zellmorphologische Charakteristika der β -Zellen bei INS-1 Zellen erhalten. Proinsulin als auch Insulin sind nachweisbar, während andere Pankreashormone fehlen. Die Insulinsekretion in diesen Zellen kann durch verschiedenste Stimuli induziert und eine native Sekretionskinetik unter Konservierung physiologischer Signalkaskaden beobachtet werden. Im Gegensatz zu anderen etablierten β -Zelllinien wie RINm5F, HIT-T15 oder MIN6 sind INS-1 Zellen mit einem Insulingehalt von 20 % des Gehaltes nativer β -Zellen auch durch einen höheren Insulingehalt gekennzeichnet (Asfari et al. 1992). Weiterhin sind die Einflüsse des Melatonins auf die Insulinsekretion erhalten (Peschke et al. 2002, Bach et al. 2005,

Peschke et al. 2006a, Mühlbauer und Peschke 2007). Neben der INS-1 Zelle wurden gentechnisch veränderte INS-1 Zelllinien verwendet, die entweder den humanen MT2-Rezeptor überexprimierten oder einen *knockdown* des MT1-Rezeptors aufwiesen (Mühlbauer et al. 2011, 2012).

Zellkultur und *batch*-Versuche

Die INS-1 Zellen wurden über mehrere Tage kultiviert und dann $2,5 \times 10^5$ Zellen in 24-*well* Zellkulturplatten ausgesät. Für die Anwendung immunhistochemischer Techniken wurden zusätzlich in die 24-*well* Zellkulturplatten runde Glasplättchen eingebracht. Nach 2-4 Tagen erfolgten Zellinkubationsexperimente, wie in den zitierten Publikationen detailliert beschrieben (Bazwinsky-Wutschke et al. 2009, 2012, 2014). Der Zellüberstand aus diesen Versuchsansätzen wurde für Insulinbestimmungen gewonnen und das Zellpellet für RNA-Extraktionen gesammelt. Die auf Glasplättchen gewachsenen INS-1 Zellen wurden durch eine modifizierte Vorbehandlung für die Immunhistochemie vorbereitet (Bazwinsky-Wutschke et al. 2010, 2012).

2.3 Immunhistochemie und Immunogoldmarkierung

Von den in Paraffin eingebetteten Ratten- und Mausorganen (überwiegend Pankreata) sowie von humanen Pankreata wurden 5 µm dicke Schnitte angefertigt, wobei jeder Schnitt 4-6 pankreatische Inseln aufwies. Nach standardisierter Entparaffinierung der Gewebeschnitte schlossen sich Einzel- und Doppelimmunfluoreszenznachweise verschiedener Proteine an (Details dazu siehe Bazwinsky-Wutschke et al. 2007, 2009, 2010, 2011). In gleicher Weise wurde die Immunfluoreszenzmarkierung an INS-1 Zellen durchgeführt. Der Spezifitätsnachweis der einzelnen Primärantikörper erfolgte wie gefordert (Saper 2005, Burry 2011) mittels Westernblot und immunhistochemische Nachweise in Zellverbänden und Regionen, die für den jeweils verwendeten Antikörper bereits zweifelsfrei dokumentiert sind und als Positivregionen gelten können.

Zusätzlich wurden an einigen Ultramikrotom-Schnitten von Rattenpankreatata Immunogoldmarkierungen durchgeführt (Bazwinsky-Wutschke et al. 2011).

2.4 Westernblot

Für Westernblot Experimente wurde das Gesamtprotein aus verschiedenen Organen isoliert und über SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese aufgetrennt. Die Westernblot-technik wurde überwiegend für Spezifitätsnachweise von Primärantikörpern verwendet (Bazwinsky-Wutschke et al. 2010, 2012).

2.5 Konfokalmikroskopie

Bildaufnahmen zur Dokumentation der immunhistochemischen Daten wurden mittels einer CCD-Kamera (AxioCam, Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland) angefertigt. Für

detaillierte Aufnahmen und gegebenenfalls semiquantitative Auswertungen wurde ein konfokales Laserscanningmikroskop (Leica TCS SP, Wetzlar, Germany) mit entsprechend ausgestatteten Lasern und Software eingesetzt (Bazwinsky-Wutschke et al. 2009, 2010, 2012, 2014).

2.6 RNA Extraktion und semi-quantitative *real-time* RT-PCR

Die Präparation von Gesamt-RNA aus Organen und INS-1 Zellen erfolgte über die Trizol-basierte Extraktionsmethode. Nach DNase-Behandlung wurden 1 µg totale RNA in der *reverse* Transkriptionsreaktion eingesetzt, um im letzten Schritt die *real-time* RT-PCR an den verschiedenen Geweben und Zellen zu ermöglichen (Details siehe Bazwinsky-Wutschke et al. 2009, 2010, 2012, 2014). Die Spezifität der Amplifikationsprodukte wurde über Restriktionsanalysen bestimmt. Als Standard für die Normalisierung der Werte von Zielgenen diente, wenn nicht anders angegeben, β -Actin (Mühlbauer et al. 2004). Unterschiede im Expressionslevel von zwei zu vergleichenden Genen wurden entsprechend publizierter mathematischer Modelle vorgenommen (Livak und Schmittgen 2001, Pfaffl 2001).

2.7 Radioimmunoassaybestimmungen (RIA)

Quantitative Bestimmungen von Insulin (Siemens Healthcare Diagnostics GmbH, Eschborn, Deutschland) in den gewonnenen Seren und Zellkulturüberständen wurden entsprechend den Anweisungen des Herstellers durchgeführt. Für Melatoninkonzentrationsbestimmungen im Plasma von Mäusen wurde ein von Welp et al. (2010) entwickelter sensitiver und hochspezifischer Radioimmunoassay verwendet.

2.8 Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

Für die Bestimmung des Proteingehaltes der CAMK2D in den INS-1 Zellen kam ein spezifischer ELISA zum Einsatz (Hölzel, Deutschland), der entsprechend den Arbeitsanweisungen des Herstellers durchgeführt wurde. Für eine ausreichende Proteingewinnung erfolgte die Kultivierung von INS-1 Zellen in 6-*well* Zellkulturplatten.

2.9 Calcium-Imaging

An INS-1 Zellen wurden Messungen der intrazellulären Calciumkonzentration unter Forskolin- oder IBMX-Behandlung durchgeführt, indem die Zellen mit spezifischen fluoreszierenden Calciumindikatoren beladen und nachfolgend einer radiometrischen Auswertung unterzogen wurden (Bazwinsky-Wutschke et al. 2009).

3 ERGEBNISSE

3.1 Expression und Vorkommen ausgewählter Calciumsignalproteine in der pankreatischen Insel vom Säuger

Das Vorkommen und die Verteilungsmuster der CaBPs Calmodulin, Calreticulin, Secretagogin und Calbindin-D28k wurden im Pankreasgewebe von normoglykämischen Wistar-Ratten und in INS-1 Zellen sowohl immunhistochemisch als auch molekularbiologisch (Transkriptanalysen) untersucht.

Chronische Veränderungen im Calciumhaushalt der pankreatischen β -Zelle tragen maßgeblich zur Entwicklung einer diabetischen Stoffwechsellage bei. In der frühen Pathogenese des Typ-2-Diabetes sind Störungen im Calciumstoffwechsel, die der pulsatilen Insulinsekretion unterliegen, typisch (Polonsky et al. 1998).

Um die funktionelle Bedeutung der einzelnen CaBPs herauszustellen, wurde vergleichend das Pankreasgewebe von Typ-2-diabetischen GK-Ratten zu Analysen herangezogen.

Frese T, **Bazwinsky** I, Mühlbauer E, Peschke E. Circadian and age-dependent expression patterns of GLUT2 and glucokinase in the pancreatic beta-cell of diabetic and nondiabetic rats. *Horm Metab Res* 2007; 39:567-574.

Bazwinsky-Wutschke I, Wolgast S, Mühlbauer E, Peschke E. Distribution patterns of calcium-binding proteins in pancreatic tissue of non-diabetic as well as type 2 diabetic rats and in rat insulinoma beta-cells (INS-1). *Histochem Cell Biol* 2010; 134:115-127.

Bazwinsky-Wutschke I, Mühlbauer E, Litvak L, Peschke E. Calciumsignal-komponenten der pankreatischen Insel unter dem Einfluss von Melatonin. *Nova Acta Leopold (NF114)* 2011; 389:207-213.

3.1.1 Immunhistochemische Untersuchungen zur Lokalisation und molekularbiologische Analyse der Expression von Calciumsignalproteinen

Die in den Pankreata von 6 Wochen alten Wistar-Ratten untersuchten CaBPs Calbindin-D28k, Secretagogin, Calmodulin und Calreticulin sind auf mRNA-Ebene sowohl im Pankreasgewebe als auch in isolierten pankreatischen Ratteninseln nachweisbar (Calm1, Abb. 2A), wobei Calmodulin das höchste Expressionsniveau aufweist. Bei der Immunmarkierung des Pankreasgewebes wurde eine, gegenüber dem exokrinen Gewebe, deutlich verstärkte Immunreaktivität aller vier CaBPs in der pankreatischen Insel, gezeigt am Beispiel von Calmodulin, nachgewiesen (Abb. 2C). Hierbei sind die CaBPs durch differentielle Verteilungsmuster in der Immunmarkierung einer pankreatischen Insel gekennzeichnet.

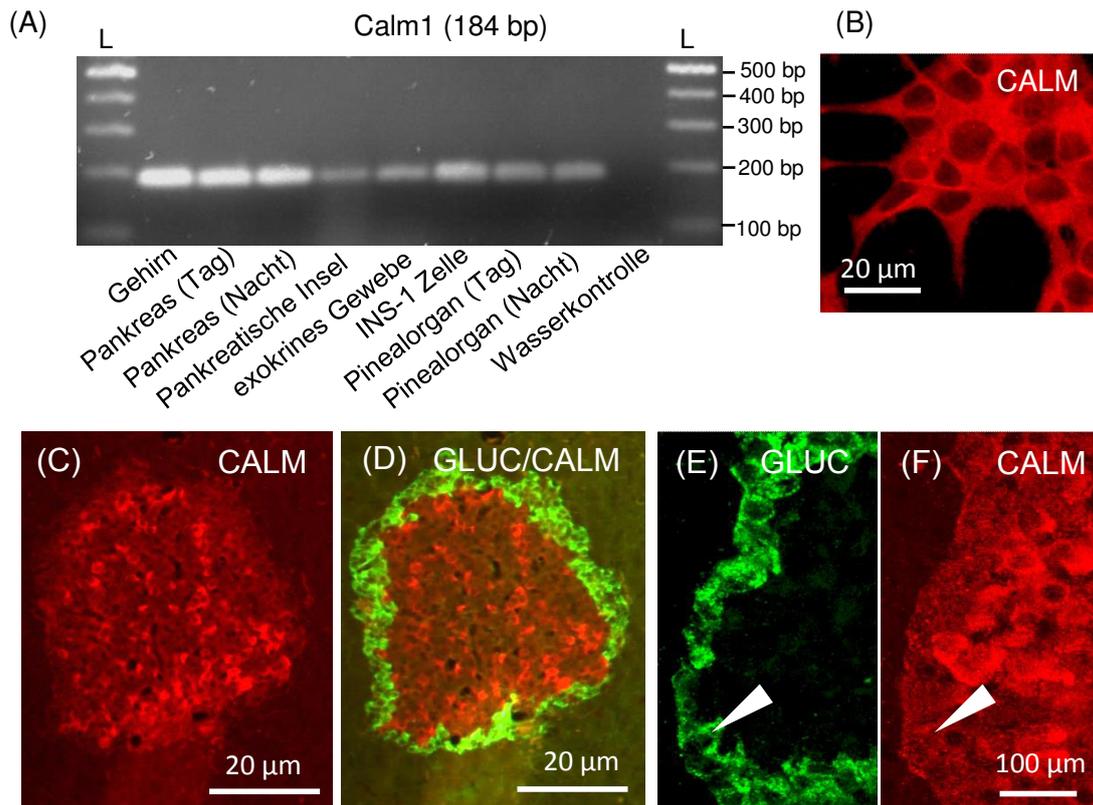


Abb. 2 (A) RT-PCR-Produkte von Calmodulin (Calm1) nach Gelelektrophorese mit Lokalisation in der pankreatischen Insel und in den INS-1 Zellen. Die Molekulargrößen der PCR-Produkte sind in Relation zum Molekulargrößenstandard (LS) gesetzt. **(B)** Zytosolische Verteilung von Calmodulin (CALM) in den INS-1 Zellen. **(C-F)** Immunhistochemische Darstellung von CALM im Pankreasgewebe der Wistar-Ratte. **(C)** CALM verteilt sich ungleichmäßig innerhalb der Insel. **(D)** Die Glukagon-positiven α -Zellen verteilen sich in der Peripherie der Insel. **(E-F)** Die Doppelmarkierung von Glukagon (GLUC, grün) und CALM (rot) zeigt, dass CALM sowohl in den α -Zellen (Pfeile) als auch in den β -Zellen lokalisiert ist.

Beim immunhistochemischen Nachweis von Secretagogen blieb das exokrine Gewebe gegenüber der Insel gänzlich unmarkiert. Ein vergleichbares Immunmarkierungsmuster mit einer deutlichen Präsenz der Immunmarkierung in der pankreatischen Insel konnte auch über den Nachweis der einzelnen Proteine am humanen Pankreasgewebe erzielt werden (Bazwinsky-Wutschke et al. 2007).

Das Vorkommen eines einzelnen CaBP innerhalb der pankreatischen Insel der Ratte erstreckt sich sowohl auf die zu etwa 70-80 % vorkommenden β -Zellen in der Insel, als auch auf die in den Ratteninseln typisch ringförmig angeordneten α -Zellen, wie die Immundoppelmarkierung von Glukagon und dem entsprechenden CaBP belegen (Abb. 2C-F).

Die beschriebenen CaBPs (Calbindin-D28k, Secretagogen, Calmodulin und Calreticulin) konnten sowohl auf mRNA als auch immunhistochemisch auf Proteinebene in INS-1 Zellen nachgewiesen werden (Fig. 2B).

Ergänzende Immunogoldmarkierungen an pankreatischen β -Zellen der Wistar-Ratte lieferten zusätzliche Informationen über die subzelluläre Lokalisation der CaBPs in den β -Zellen. So konzentrierte sich die Immunogoldmarkierung von Secretagogin hauptsächlich auf die Region der Sekretgranula während Calmodulin bis auf den Zellkern in nahezu allen Kompartimenten der Zelle angesiedelt war.

3.1.2 Einfluss einer Typ-2-diabetischen Stoffwechsellage auf die Expression und Verteilung von Calciumsignalproteinen

Hierfür eigneten sich die Typ-2-diabetischen GK-Ratten im Alter von 6 Wochen, die hinsichtlich metabolischer Parameter (GLUT2, Glukokinase, Insulin, Blutzucker) unter Anwendung von *real-time* RT-PCR und immunhistochemischer Analysen eingehend charakterisiert wurden. Infolge ihrer diabetischen Stoffwechsellage sind bei GK-Ratten dieser Altersstufe ein erhöhter Blutzuckerspiegel, Hypoinsulinämie sowie deutlich reduzierte GLUT2-, Insulin- und Glukokinase-Immunreaktivität in den pankreatischen Inseln im Vergleich zu den normoglykämischen Wistar-Ratten feststellbar.

Eine vergleichende immunhistochemische Analyse von Pankreasgewebe 6 Wochen alter nicht-diabetischer Wistar-Ratten und dem Typ-2-diabetischer GK-Ratten hinsichtlich der CaBPs ließ deutliche Verteilungsunterschiede in der Immunmarkierung der Inseln mit dem jeweiligen CaBP erkennen, hier gezeigt am Beispiel vom Calmodulin in konfokalmikroskopischen Aufnahmen (Abb. 3A, B). Über die molekularbiologische Auswertung der Transkripte der CaBPs anhand von *real-time* RT-PCR konnte ein signifikanter Anstieg der CaBPs-Transkripte sowohl im Pankreasgewebe als auch in isolierten pankreatischen Inseln diabetischer GK-Ratten ermittelt werden (Abb. 3C, D). Das Calmodulin-Transkript wies hierbei das höchste Expressionsniveau auf (Fig. 3C).

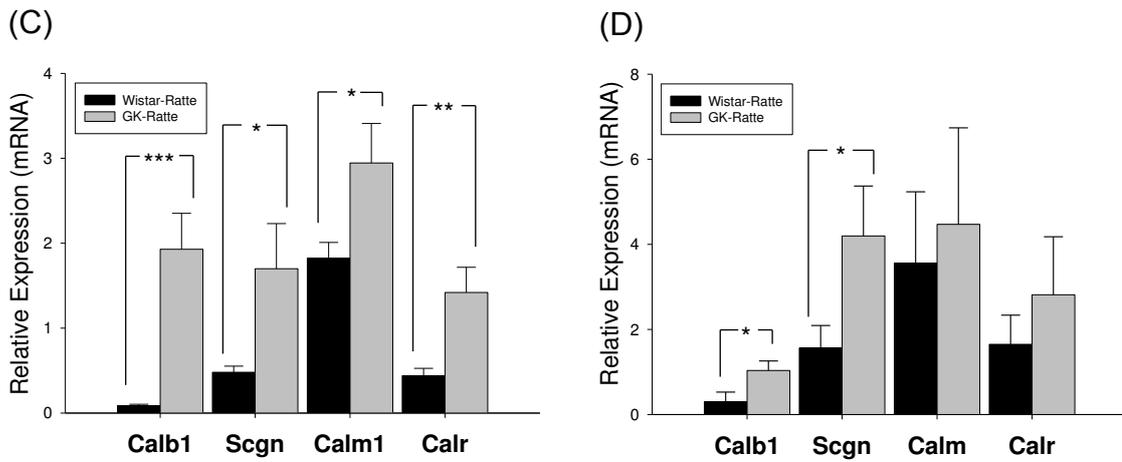
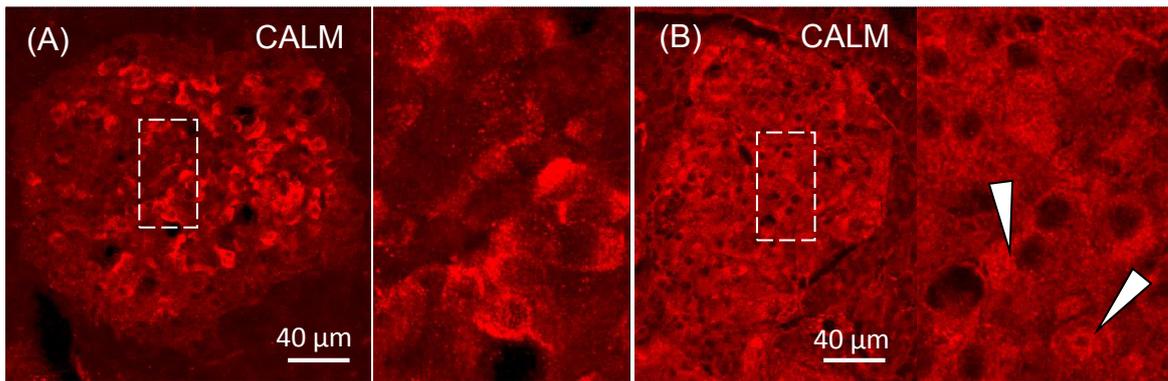


Abb. 3 (A) In Wistar-Ratten enthalten die pankreatischen Inseln stark CALM-immunreaktive Ansammlungen von β -Zellen zwischen schwächer immunmarkierten Zellen im Zentrum und in der Peripherie der Insel. Über einen Vergrößerungsausschnitt der gleichen Insel werden schwach und stark CALM-immunreaktive Bereiche im Zytosol der Zellen sichtbar. **(B)** In pankreatischen Inseln der GK-Ratte zeigt Calmodulin ein homogeneres Verteilungsmuster. Die Vergrößerung verweist auf Zellen mit zytoplasmatischer Immunreaktivität, aber auch auf einige immunreaktive Zellkerne (Pfeilspitzen). **(C)** Die relativen Transkriptmengen der CaBPs sind im pankreatischen Gewebe der GK-Ratten im Vergleich zu den Wistar-Ratten signifikant erhöht. Die Sterne kennzeichnen signifikante Gruppendifferenzen bei $n = 16$, * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$; gepaarter und ungepaarter t- test. **(D)** In isolierten pankreatischen Inseln der GK-Ratte sind die Transkriptmengen der CaBPs ebenfalls erhöht im Vergleich zu den Wistar-Ratten ($n = 5$, * $P < 0,05$; gepaarter und ungepaarter t-test).

3.2 Expressionsänderungen ausgewählter Calciumsignalproteine unter dem Einfluss von Melatonin

Von denen zuvor im Inselorgan charakterisierten CaBPs wurde das Calmodulin als zentraler Vermittler von Calciumsignalen angesehen, betrachtet man seine vielfältigen bekannten Verknüpfungen mit den Signalwegen der β -Zelle (Übersicht in Chin und Means 2000). Diesbezüglich sind für die pankreatische β -Zelle die Interaktionen zwischen Calmodulin und seinen *downstream*-Effektoren, den sogenannten CAMKs dokumentiert (Hisatomi et al. 1996, Niki und Hidaka 1999), wobei insbesondere 2 Typen der CAMKs - die CAMK2 und CAMKIV - für die Signalwegbeziehungen innerhalb der pankreatischen β -Zelle bedeutsam sind. Von beiden CAMKs ist bekannt, dass sie über Transkriptionsfaktoren die Insulintranskription, aber auch über Phosphorylierungen den Sekretionsprozess des Insulins direkt beeinflussen können (Easom 1999, Yamamoto et al. 2003, Persaud et al. 2011).

Um die Bedeutung des Melatonins auf die Expression von CAMKs zu analysieren, wurden Transkriptanalysen am Modell der INS-1-Zelle durchgeführt. Hierbei sollte auch die Wirkung eines veränderten Melatoninrezeptorstatus auf mögliche, durch Melatonin induzierte, Transkriptmengenänderungen untersucht werden. In Ergänzung zu den *batch*-Inkubationsversuchen an INS-1-Zellen wurden zudem die Auswirkungen auf die Transkripte in Melatoninrezeptor-*knockout*-Tiermodellen untersucht.

Bazwinsky I, Mühlbauer E, Wolgast S, Peschke E. 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* 2009; 41:805-813.

Bazwinsky-Wutschke I, Mühlbauer E, Litvak L, Peschke E. Calciumsignal-komponenten der pankreatischen Insel unter dem Einfluss von Melatonin. *Nova Acta Leopold (NF114)* 2011; 389:207-213.

Bazwinsky-Wutschke I, Bieseke L, Mühlbauer E, Peschke E. Influence of melatonin receptor signalling on parameters involved in blood glucose regulation. *J Pineal Res* 2014; 56:82-96.

Bazwinsky-Wutschke I, Mühlbauer E, Albrecht E, Peschke E. Calcium-signalling components in rat insulinoma β -cells (INS-1) and pancreatic islets are differentially influenced by melatonin. (eingereicht)

3.2.1 Untersuchungen zur Expression von CamkIV und Camk2d am pankreatischen β -Zellmodell der INS-1 Zelle

Zu Beginn der Untersuchungen erfolgte eine Gesamtanalyse bekannter CAMKs-Typen bzw. Isoformen (Camk2a, Camk2b, Camk2d, CamkIV, Camkk1) hinsichtlich ihres organ- und gewebespezifischen Vorkommens sowie ihrer quantitativen Expressionsniveaus in INS-1 Zellen und pankreatischen Inseln der Ratte. Immunhistochemische Untersuchungen in Kombination mit *real-time* RT-PCR Analysen bestätigten die Lokalisation von Camk2d/CAMK2D und CamkIV/CAMKIV (Transkript/Protein) sowohl in der pankreatischen Insel als auch in der INS-1 Zelle (Abb. 4A, B). Immunhistochemische Markierungen am Pankreasgewebe konnten hierbei eine bevorzugte Lokalisation beider CAMKs in der gesamten pankreatischen Insel der Ratte und damit in den, über die ganze Insel verteilten, β -Zellen aufzeigen. Das exokrine Gewebe trat demgegenüber durch eine deutlich abgeschwächte Immunreaktion in den Hintergrund.

Der cAMP-Aufbau bzw. cAMP-Abbau wird über Adenylatzyklasen bzw. Phosphodiesterasen reguliert (Furman et al. 2010). Vorausgegangene Superfusionsexperimente an INS-1 Zellen konnten zeigen, dass pharmakologisch durch eine Behandlung mit Forskolin als Aktivator der AC bzw. mit IBMX als unspezifischem Inhibitor der Phosphodiesteraseaktivität eine Steigerung der cAMP-Konzentration und zeitgleich auch der Insulinsekretion bei INS-1 Zellen zu erreichen ist (Peschke et al. 2002). Durch IBMX-Applikation wurde zusätzlich auch ein Anstieg der cGMP-Konzentration beobachtet (Mühlbauer et al. 2011). Die *batch*-Versuche mit INS-1 Zellen wurden unter Verwendung von 1 μ M Forskolin und 10 μ M IBMX durchgeführt. Verschiedene Konzentrationen dieser beiden Substanzen und ihre Wirkung auf die Insulinsekretion wurden zuvor in Superfusionsexperimenten ausgetestet (Peschke et al. 2002).

Infolge der Forskolin- oder IBMX-Behandlung wurden bei den INS-1 Zellen ein signifikanter Anstieg der Insulinsekretion und eine signifikante Erhöhung der Camk2d- und CamkIV-Transkripte nach 6 h induziert. Die Behandlung mit Melatonin (100 nM und 1 μ M) über 6 h in Anwesenheit von Forskolin oder IBMX verursachte eine signifikante Abnahme der Insulinausschüttung und führte gleichzeitig zu einer signifikanten Verminderung der Transkriptmengen von Camk2d und CamkIV. Die Zugabe vom Melatoninrezeptor-Antagonisten Luzindol hob die Melatonin-induzierte Verminderung der Transkriptmengen von CamkIV und Camk2d weitgehend auf (Abb. 4C-F). Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass der Einfluss von Melatonin auf diese Transkripte Melatoninrezeptor-mediiert erfolgt.

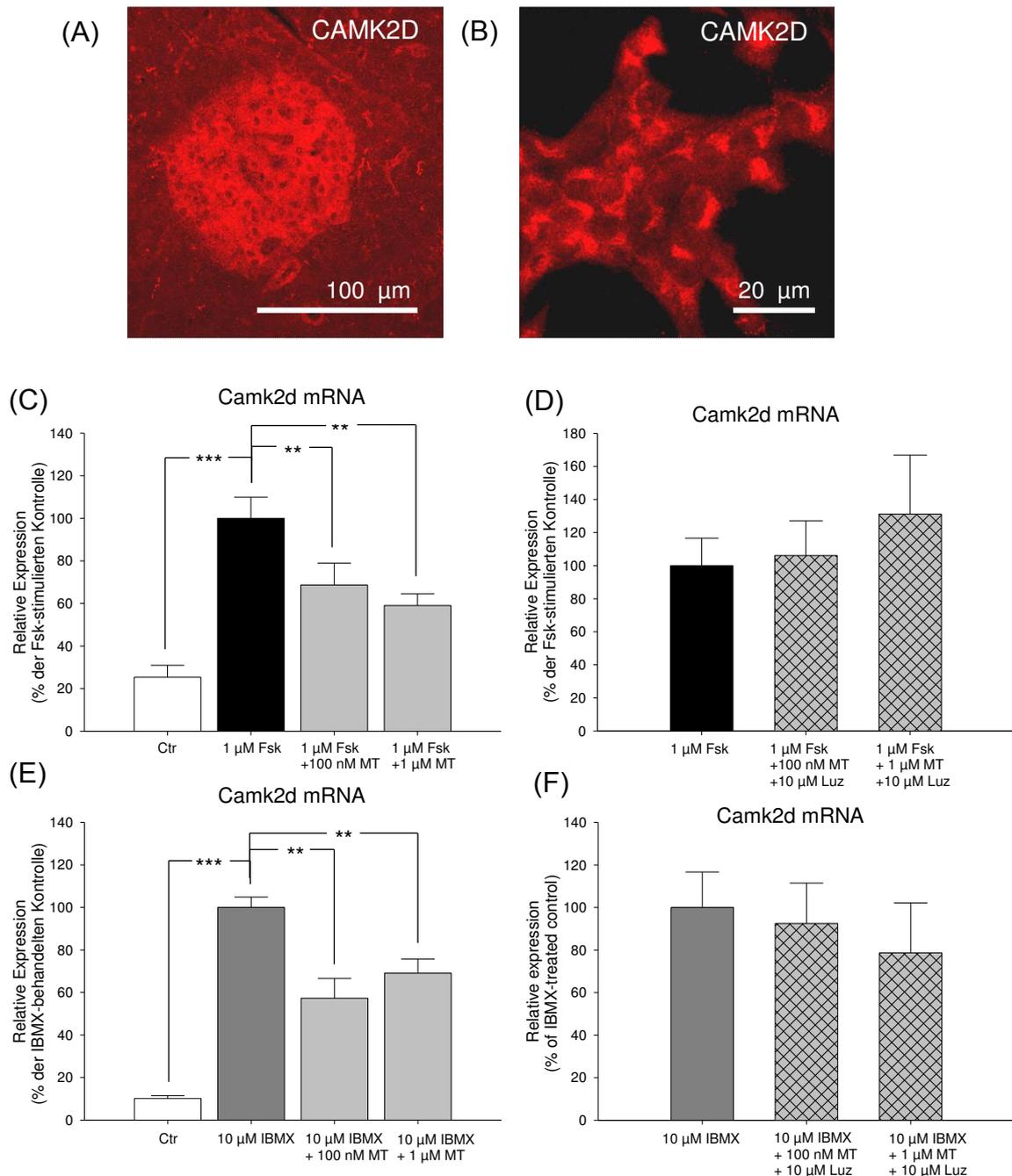


Abb. 4 (A) Das Protein der CAMK2D ist vorzugsweise in der pankreatischen Insel der Wistar-Ratte lokalisiert, das exokrine Gewebe weist demgegenüber eine deutlich schwächere Immunreaktivität auf. (B) Eine β -Zell-spezifische Lokalisation wird durch das Vorkommen von CAMK2D in den INS-1 Zellen bestätigt. (C-F) *Real-time* RT-PCR Analyse der Camk2d-mRNA in INS-1 Zellen. (C,E) Die Behandlung mit 1 μ M Forskolin (Fsk) oder 10 μ M 3-Isobutyl-1-methylxanthin (IBMX) über 6 h führt zu einer Erhöhung der Transkriptmenge von Camk2d verglichen mit der Transkriptmenge der unbehandelten Zellen (Ctr). Die Melatoninbehandlung (MT) während der Fsk- oder IBMX-Applikation verursacht eine signifikante Abnahme des Camk2d-Transkripts im Vergleich zu den nur mit Fsk- oder IBMX-behandelten INS-1 Zellen. (D, F) Die zusätzliche Behandlung mit Luzindol (Luz) hebt den Melatonin-reduzierenden Effekt auf die Camk2d-mRNA fast vollständig auf. Die Daten repräsentieren den Mittelwert \pm SEM aus 8 unabhängigen Zellinkubationsversuchen. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$.

Die vorgestellten Befunde deuten darauf hin, dass Melatonin die Genexpression von Signalproteinen wie CamkIV und Camk2d beeinflusst, von denen bekannt ist, dass sie in die Insulingenexpression und Insulinsekretion gleichermaßen involviert sind.

3.2.2 Die differentielle Beeinflussung der Expression von CamkIV und Camk2d durch Melatonin

Mit dem Ziel, den Einfluss einer erhöhten Expression der Melatoninrezeptorisoform MT2 auf die Transkripte von Camks und Calm1 zu untersuchen, wurde eine INS-1 Zelllinie (hMT2-INS-1), die den humanen MT2-R überexprimiert, verwendet (Mühlbauer et al. 2011). Durch alleinige Behandlung dieser Zelllinie mit Forskolin oder IBMX konnte eine Anhebung der Transkriptmengen von Calm und Camks erzielt werden. Demgegenüber erniedrigte die Applikation von Melatonin im Beisein von Forskolin oder IBMX signifikant die Transkriptmengen von Camks und Calm1. Die stärkste Abnahme wurde unter gleichzeitiger Zugabe von IBMX erreicht. Für das Camk2d-Transkript wurde in INS-1 Zellen eine 1,7-fache Abnahme der Transkriptmenge durch Melatonin unter einer IBMX-Behandlung gemessen, während eine 2,4-fache Erniedrigung in hMT2-INS-1 Zellen feststellbar war (Abb. 5A, B). Beim CamkIV-Transkript war in nicht transfizierten INS-1 Zellen eine 2-fache Reduktion messbar, wohingegen in den hMT2-INS-1 Zellen eine 3,6-fache Erniedrigung ermittelt wurde.

In einer weiteren Versuchsserie wurde Melatonin (ohne weitere Stimulation) in verschiedenen Konzentrationen (1 nM, 10 nM, 100 nM, 1 µM, 10 µM) über Zeiträume von 12 h, 24 h, 48 h und 72 h zu INS-1 Zellen hinzugegeben. Im Ergebnis war der Insulingehalt in den Überständen der Zellen, die eine Melatoninbehandlung erfahren hatten, zeit- und dosisabhängig erniedrigt. In denselben Zellen verursachte die Melatoninbehandlung nach 48 h eine Erniedrigung der CamkIV-Transkriptmengen. Demgegenüber blieben die Camk2d-Transkriptmengen jedoch unverändert (Abb. 5C, D).

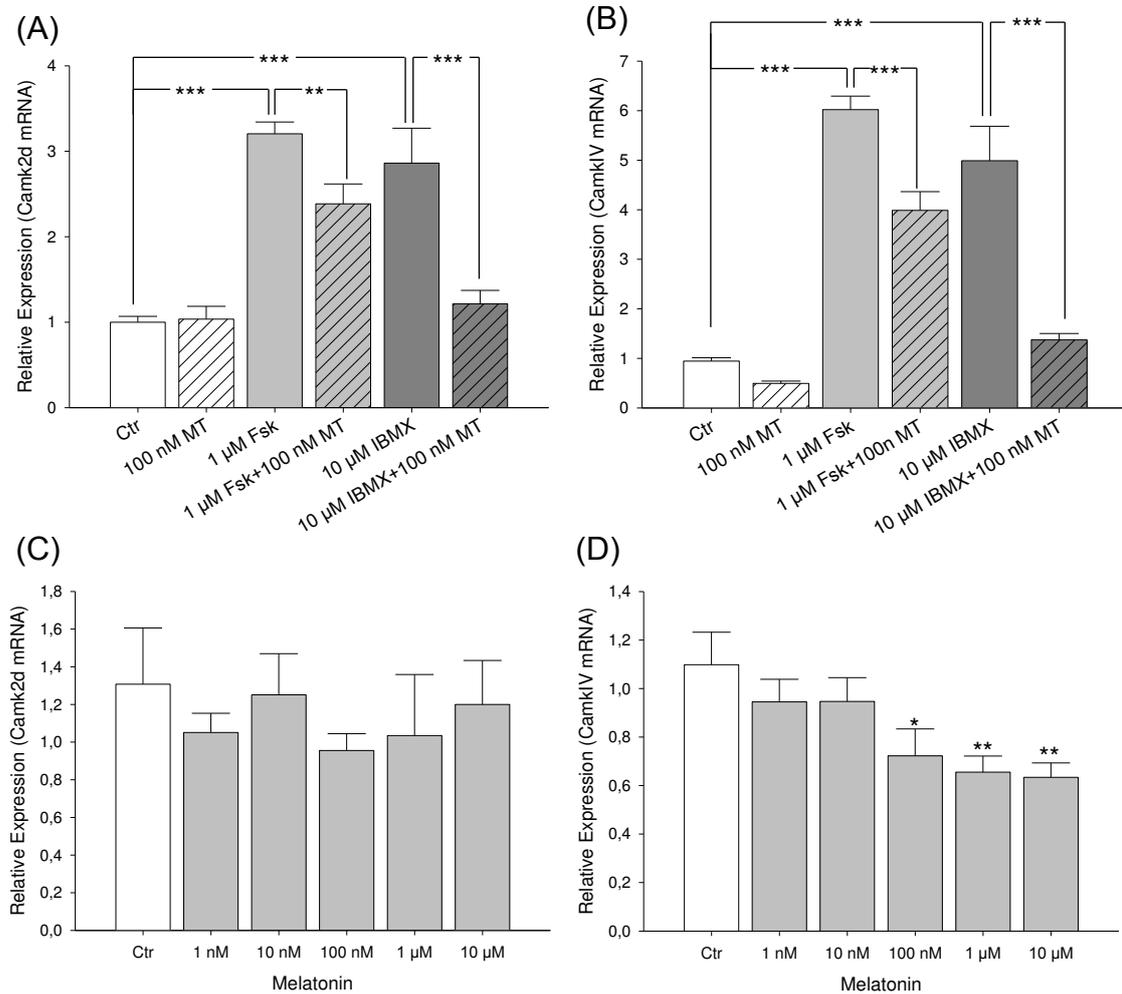


Abb. 5 Transkriptmengenänderungen von Camk2d und CamkIV in hMT2-INS-1 (**A, B**) und INS-1 (**C, D**) unter verschiedenen Bedingungen. (**A**) Die Transkriptmenge von Camk2d wird während der Forskolin- oder IBMX-Behandlung von hMT2-INS-1 durch gleichzeitige Melatoninapplikation signifikant reduziert. (**B**) Die Menge der CamkIV mRNA wird in noch stärkerem Ausmaß durch eine gleichzeitige Melatoninbehandlung von hMT2-INS-1 während einer Forskolin- oder IBMX-Behandlung herabgesetzt. Melatonin allein senkt signifikant das CamkIV-Transkript. (**C**) Die Camk2d mRNA zeigt nach 48 h unter Melatonin in verschiedenen Konzentrationen keine Veränderungen in INS-1 Zellen. (**D**) Die CamkIV mRNA nimmt mit zunehmender Konzentration von Melatonin nach 48 h signifikant in INS-1 Zellen ab. Die Daten repräsentieren den Mittelwert \pm SEM aus $n = 10$ batches. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$.

Um zu prüfen, ob sich transkriptionelle, Melatonin-induzierte Effekte bis auf die Proteinebene verfolgen lassen und somit als funktionell einzuordnen sind, kam ein spezifischer CAMK2D ELISA zum Einsatz. Dabei zeigte sich, dass eine alleinige Forskolin- oder IBMX-Behandlung zu einer Erhöhung der Proteinmenge führte, jedoch unter Melatonin-Einwirkung eine signifikante Verminderung der Proteinmenge der

CAMK2D festzustellen ist. Der ANOVA-Signifikanztest bestätigte einen signifikanten Einfluss der Melatoninbehandlung auf den Proteingehalt von CAMK2D ($P = 0,01$).

Die Transkriptanalysen von *Calm1*, *Camk2d* und *CamkIV* wurden auf das Pankreasgewebe von Melatoninrezeptor-defizienten Mäusen im Alter von 8-12 Monaten erweitert. Hierfür erfolgte im Vorfeld an 8-12 Monate alten Melatoninrezeptor-*knockout*-Mäusen vergleichend zu Wildtypmäusen die Bestimmung der Insulinspiegel im Plasma, der Blutglukosewerte und der Körpergewichte. Dabei stellte sich heraus, dass die *MT1ko*-Mäuse und die *MT1/MT2ko*-Mäuse signifikant erniedrigte Blutglukosespiegel, erhöhte Insulinplasmagehalte und erniedrigte Körpergewichte aufwiesen.

Die immunhistochemische Darstellung der Proteine von *CALM*, *CAMK2D* und *CAMKIV* im pankreatischen Gewebe der Wildtypmaus führte zu einer deutlichen Darstellung der pankreatischen Insel, wobei das exokrine Gewebe demgegenüber eine deutlich verminderte (auf einzelne Acini, Blutgefäße beschränkte) Immunmarkierung aufwies (Abb. 6A). Diese Ergebnisse entsprechen auch histologischen Befunden an humanem Pankreasgewebe und Pankreasgewebe der Ratte. Damit sind molekularbiologische Analysen der *Camks* und *Calm1* am Gesamtpankreasgewebe (Abb. 6B) auf die pankreatische Insel zu beziehen und Transkriptmengenänderungen von *Calm1*, *Camk2d* und *CamkIV* vorrangig im Zusammenhang mit Funktionsbeziehungen der Insel zu diskutieren. So konnten durch die Verwendung von Pankreasgewebe der Wildtypmaus und Melatoninrezeptor-*knockout*-Mäuse Rezeptor-gekoppelte Effekte auf Transkriptebene von *Calm1*, *Camk2* und *CamkIV* nachgewiesen werden (gezeigt am Beispiel der *Camk2d*, Abb. 6C).

Allerdings waren diese Transkriptlevel-Änderungen differentieller Art, verursacht durch den Verlust des jeweiligen Rezeptors. Durch Wegfall des *MT1*-Rezeptors (*MT1ko*, *MT1/MT2ko*) kam es am Beispiel der *Camk2d* zu einer bis zu 2-fachen, signifikanten Erhöhung der Transkripte im Vergleich zum Wildtyp (Abb. 6C), was verdeutlicht, dass die Melatonin-vermittelten Effekte auf die *Camk2d*-mRNA *MT1*-Rezeptor-mediiert sind.

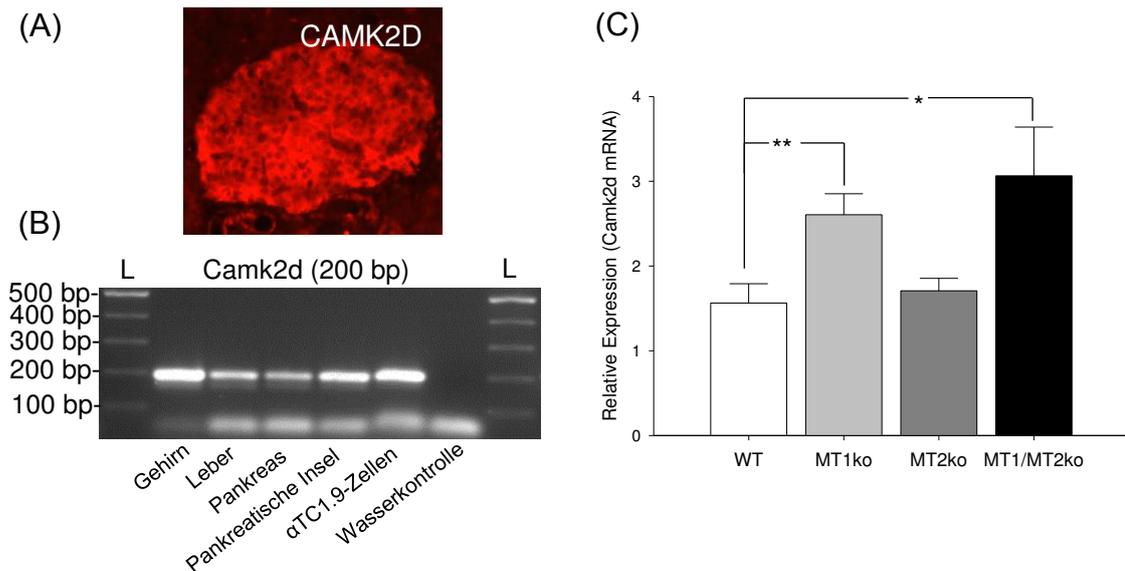


Abb. 6 (A) Die CAMK2D ist vorzugsweise in der pankreatischen Insel lokalisiert, wobei das exokrine Gewebe deutlich schwächer immunreaktiv erscheint. **(B)** Dargestellt sind die RT-PCR-Produkte der Camk2d nach Gelelektrophorese mit Expression im pankreatischen Gewebe und in der Insel. Die Molekulargrößen der PCR-Produkte sind in Relation zum Molekulargrößenstandard (L) gesetzt. **(C)** Bestimmung der Camk2d-Transkripte im Pankreasgewebe der Wildtypmaus (WT) und Melatoninrezeptor-*knockout*-Mauslinien (MT1ko, MT2ko, MT1/MT2ko). Die Daten repräsentieren den Mittelwert \pm SEM aus $n = 12$. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$; gepaarter und ungepaarter t-test.

Zusammengenommen belegen die Ergebnisse i) einen differentiellen Einfluss von Melatonin auf Transkriptmengenänderungen der Camk2d und CamkIV in Abhängigkeit von den äußeren Bedingungen, ii) eine Abhängigkeit der Transkriptmenge von der Expressionshöhe einer Melatoninrezeptorisoform, iii) eine Abhängigkeit der Transkriptmenge vom Vorhandensein einer entsprechenden Melatoninrezeptorisoform. Einflüsse des Melatonins auf Transkriptmengen werden damit generell spezifisch Melatoninrezeptor-gebunden vermittelt.

3.3 Die Rolle von pCREB bei Melatonin-vermittelten Effekten auf Calciumsignalkomponenten in der pankreatischen β -Zelle

Veränderungen von Transkriptmengen werden unter der Mitwirkung von Transkriptionsfaktoren induziert. Eine erhebliche Anzahl von Studien identifizierte ein Promotorelement, welches die transkriptionale Aktivierung als Antwort auf intrazellulär erhöhtes cAMP vermittelt, die sog. *cAMP-response element* (CRE)-Sequenz (Ziff 1990, Lalli und Sassone-Corsi 1994). An diese CRE-Sequenz, die charakteristischerweise auch in den hier untersuchten Camk2d und CamkIV vorhanden ist (Zhang et al. 2005), bindet unter anderem der Transkriptionsfaktor CREB.

Es wurde daher die Phosphorylierung von CREB unter dem Einfluss von Melatonin analysiert und Änderungen in Transkriptmengen von Calciumsignalkomponenten wie Camk2d und CamkIV nach kürzeren Zeiträumen bestimmt.

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

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

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

3.3.1 Untersuchungen von pCREB-Veränderungen am INS-1 Zellmodell nach Melatoninapplikation

Der Phosphorylierungsgrad von CREB kann unter Verwendung von Antikörpern, die spezifisch gegen Ser133-phosphoryliertes CREB gerichtet sind, ermittelt werden (Shaywitz und Greenberg 1999). Die Stimulation von Zellen mit beispielsweise Forskolin oder cAMP-Analoga führt zu einer Phosphorylierung von CREB durch Aktivierung des PKA-Signalweges (Montminy und Bilezikijan 1987, Gonzalez und Montminy 1989), welche in einer typischen Kernmarkierung von pCREB in Zellen zum Ausdruck kommt (Wicht et al. 1999).

Die basale Immunreaktivität der unbehandelten INS-1 Zellen wurde durch Zugabe von Forskolin (1 μ M) oder IBMX (10 μ M) zum Zellkulturmedium deutlich gesteigert (Abb. 7A, B, D).

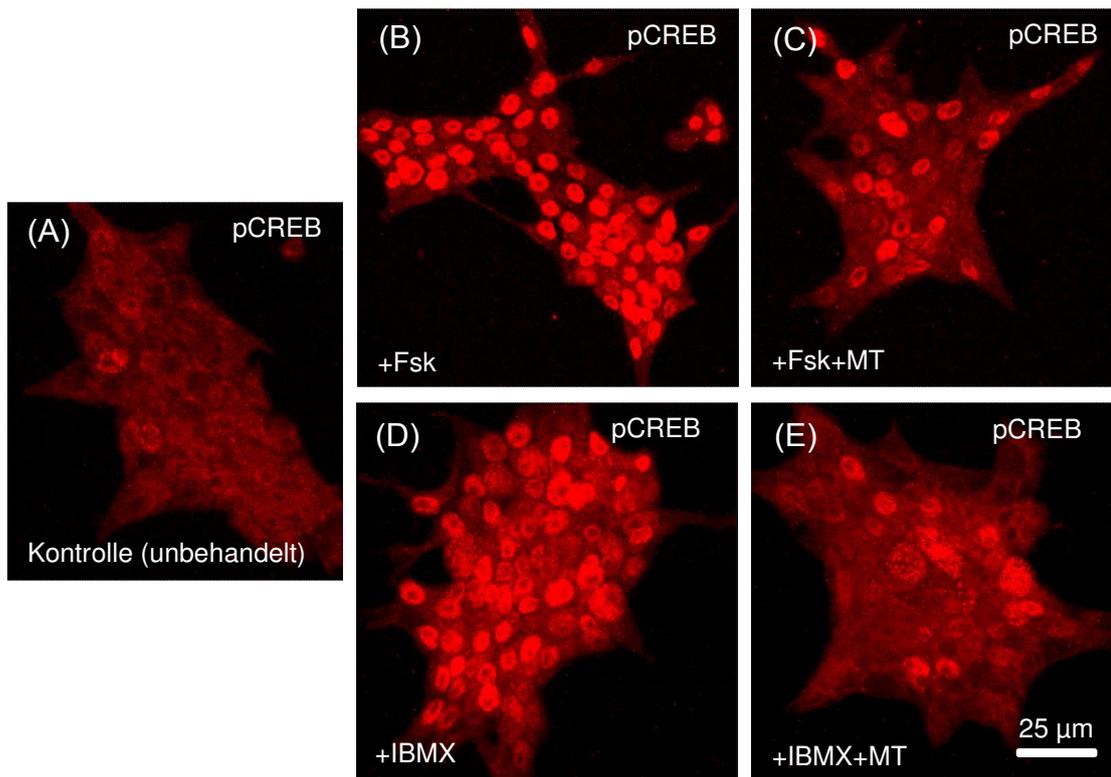


Abb. 7 Konfokalmikroskopische Aufnahmen zur Immunfluoreszenzmarkierung von phosphoryliertem CREB (pCREB) in INS-1 Zellen. **(A)** Unbehandelte INS-1 Zellen (Kontrollzellen) weisen eine schwache pCREB-Immunmarkierung in den Zellkernen auf. **(B)** Phosphoryliertes CREB akkumuliert durch die Fsk-Behandlung in den Zellkernen. **(C)** Melatonin unter Fsk-Stimulation senkt die pCREB-Immunfluoreszenz in den Zellkernen ab. **(D)** Die IBMX-Behandlung induziert eine intensive pCREB-Immunmarkierung der Zellkerne. **(E)** Die gleichzeitige Behandlung mit Melatonin schwächt die Immunreaktion von pCREB in den Zellkernen deutlich ab.

Die mittleren Immunfluoreszenzintensitäten der Zellkerne wurden unter Verwendung laserscanmikroskopischer Aufnahmen semiquantitativ über eine in der Bedienungssoftware des konfokalen Laser-Scanning-Mikroskops integrierte Softwarefunktion (TCS SP, Leica) ausgewertet. Die Zugabe zunehmender Konzentrationen von Forskolin oder IBMX zum Zellkulturmedium resultierten in einer dosisabhängigen Erhöhung der mittleren Fluoreszenzintensität der nukleären pCREB-Immunmarkierung von INS-1 Zellen.

Die gleichzeitige Gabe von 100 nM Melatonin während der Forskolin- oder IBMX-Stimulation führte zu einer signifikanten Abnahme der pCREB-Immunmarkierung in den INS-1 Zellkernen nach 15 min, 30 min, 1 h und 3 h Einwirkdauer (Abb. 7C, E, Abb. 8). Die Applikation des unspezifischen kompetitiven Melatoninrezeptor-Antagonisten Luzindol konnte die Melatonin-bedingte Verringerung der CREB-Phosphorylierung nach 30 min komplett aufheben (Abb. 8).

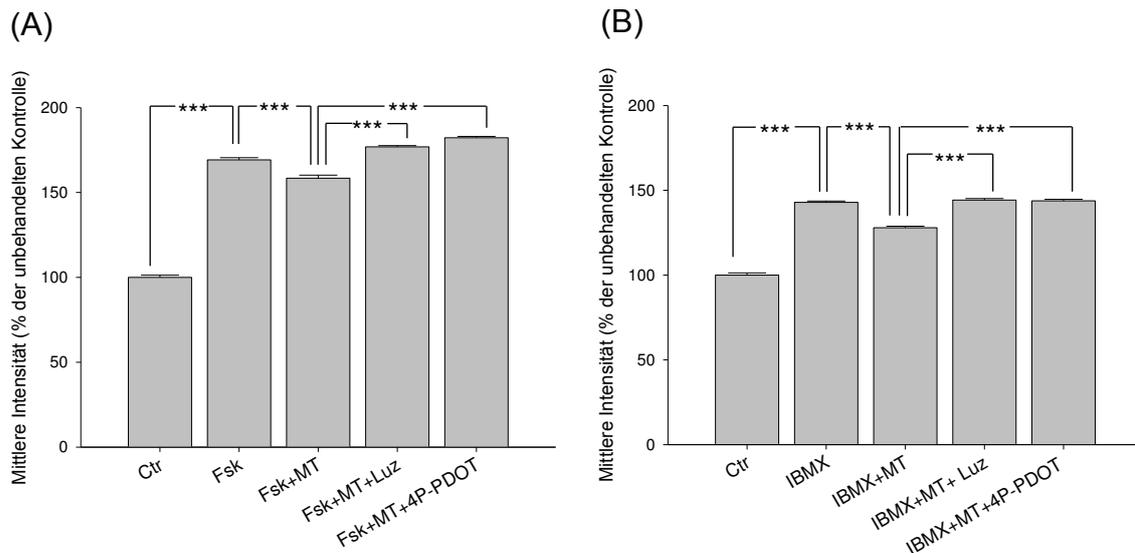


Abb. 8 Messung der mittleren Fluoreszenzintensität der pCREB-Immunmarkierung in den Zellkernen der INS-1 Zellen. Änderungen der mittleren Intensität von pCREB nach Behandlung mit 1 μ M Fsk **(A)** oder 10 μ M IBMX **(B)** allein oder in Kombination mit 100 nM Melatonin (MT) im Vergleich zu unbehandelten INS-1 Zellen (Ctr) nach 30 min. Die Behandlung mit 10 μ M Luzindol (Luz) oder 100 nM 4P-PDOT hebt den Melatonin-senkenden Effekt auf pCREB auf. Die mittleren Intensitätswerte stammen von 3 unabhängigen Experimenten, Zellkerne n = 800-1000 (**P < 0,001, t-test).

Eine Aufhebung des inhibierenden Effekts auf die CREB-Phosphorylierung durch Melatonin unter Forskolin- oder IBMX-Behandlung erfolgte auch über Applikation des MT2-selektiven Antagonisten 4-Phenyl-2-propionamidotetralin (4P-PDOT). Aus diesen Befunden konnte geschlossen werden, dass eine Melatonin-induzierte Verminderung der Phosphorylierung von CREB über beide Melatoninrezeptorisoformen (MT1 und MT2) vermittelt wird.

Die noch nach 3 h deutlich nachweisbare Verminderung von pCREB durch Melatonin unter Forskolin- oder IBMX-Einwirkung war gleichzeitig assoziiert mit einer statistisch signifikanten Abnahme der Camk2d- und CamkIV-Transkriptmenge. Im Vergleich zu den unbehandelten INS-1 Kontrollzellen führte eine Forskolin- oder IBMX-Behandlung nach 1 h und 3 h zu einer signifikanten Zunahme der Transkriptmenge von beispielsweise Camk2d, die durch Co-Applikation von Melatonin bereits nach 1 h wieder abgesenkt wurde und nach 3 h Einwirkungszeit eine signifikante Reduktion aufwies.

3.3.2 Untersuchungen von pCREB-Veränderungen an genetisch veränderten INS-1 Zellmodellen durch Melatoninapplikation

Eine Typ-2-diabetische pankreatische Insel exprimiert verstärkt beide Isoformen von Melatoninrezeptoren (MT1, MT2). Insbesondere Rezeptoranalysen an humanem Pankreasgewebe (Operationsmaterial) von Stoffwechsel-unauffälligen und Typ-2-diabetischen Patienten bestätigten sowohl auf Transkript- als auch auf Proteinebene eine erhöhte Expression von MT1- und MT2-Rezeptoren in humanen diabetischen Inseln (Peschke et al. 2007). Auch pankreatische Inseln der GK-Ratte wiesen im Vergleich zu Wistar-Ratten erhöhte Transkriptmengen von MT1 und MT2 auf (Peschke et al. 2006b, 2010). Klonale Linien gentechnisch modifizierter INS-1 Zellmodelle bieten daher die Möglichkeit, die Auswirkungen einer solchen Überexpression (aber auch Unterexpression) einer Melatoninrezeptorisoform unter verschiedenen experimentellen Bedingungen im *batch*-Versuch zu erfassen.

In einer permanent den humanen MT2-Rezeptor-überexprimierenden INS-1 (hMT2-INS-1) Zelllinie sowie in INS-1 Zellen mit einem *knockdown* des MT1-Rezeptors (rMT1-*knockdown*-INS-1) wurden die zuvor beschriebenen Daten überprüft.

Im hMT2-INS-1 Zellen konnte eine erhöhte Transkriptmenge des MT2-Rezeptors und ein erhöhter Anteil des MT2-Rezeptorproteins nachgewiesen werden.

Nach einer 30-minütigen Behandlung der hMT2-INS-1 wurde im Vergleich zu nicht transfizierten INS-1 Zellen ein deutlich stärkerer inhibitorischer Effekt von Melatonin auf die Forskolin-induzierte pCREB-Bildung gemessen, wobei dieser Effekt vollständig durch die Applikation von Luzindol oder 4P-PDOT aufgehoben wurde. Ebenfalls wurde die durch IBMX induzierte Anhebung der CREB-Phosphorylierung durch die gleichzeitige Gabe von Melatonin abgesenkt. Jedoch konnte hier durch Luzindol oder 4P-PDOT Gabe keine vollständige Aufhebung des inhibitorischen Effekts von Melatonin auf pCREB erzielt werden. Des Weiteren war der inhibitorische Effekt von Melatonin auf pCREB während der IBMX-Behandlung deutlich stärker ausgeprägt als während der Forskolinstimulation.

Auch nach einer Stunde Einwirkzeit von Forskolin oder IBMX konnte eine Absenkung des pCREB durch eine gleichzeitige Melatonin-Gabe erreicht werden. Der Effekt von Melatonin während der einstündigen Forskolinstimulation auf pCREB fiel bei den hMT2-INS-1 Zellen im Vergleich zu den INS-1 Zellen (11 %ige Absenkung von pCREB in hMT2-INS-Zellen versus 26 %iger Abnahme von pCREB in INS-1 Zellen) geringer aus. Eine Melatoninbehandlung während der 1-stündigen Einwirkung von IBMX verursachte die stärkste Abnahme der messbaren pCREB-Immunreaktivität (45 %ige Absenkung nach 30 min bei hMT2-INS-1-Zellen gegenüber 15 % bei INS-1-Zellen,

Abb. 9). Diese Ergebnisse lieferten den Beleg dafür, dass über einen erhöhten Melatoninrezeptorgehalt entscheidend die Phosphorylierung von CREB beeinflusst wird.

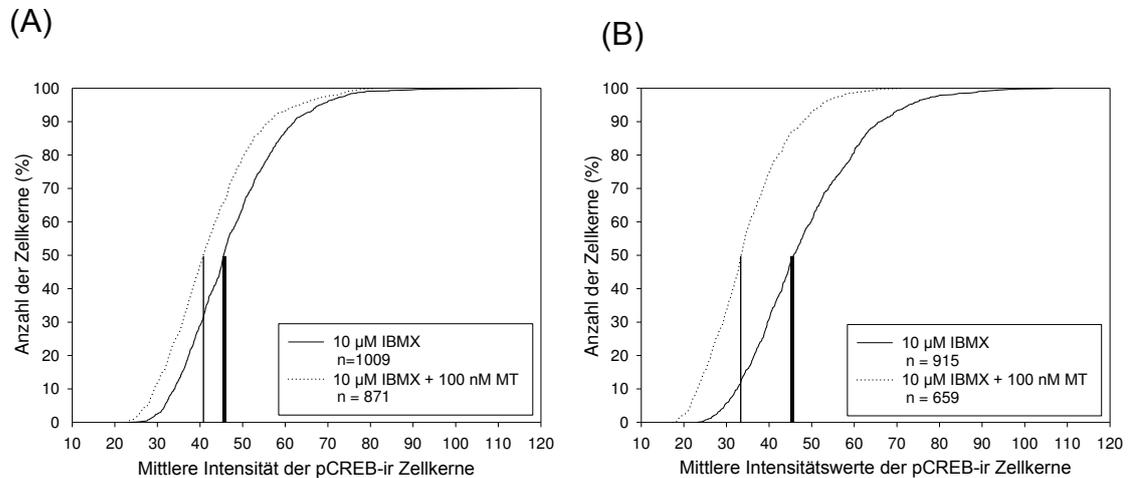


Abb. 9 Kumulative Verteilung der mittleren Intensitätswerte von pCREB in den Zellkernen von INS-1 Zellen **(A)** und in hMT2-INS-1 Zellen **(B)** nach 30minütiger Behandlung mit 10 μM IBMX allein oder in Kombination mit 100 nM Melatonin (MT) im Vergleich zu den jeweils unbehandelten Zellen (Ctr). Die Mediane der Intensitäten stammen von 3 unabhängigen Experimenten (***P < 0,001, t-test).

Einen weiteren Hinweis einer Einflussnahme der vorhandenen Rezeptormenge auf die CREB-Phosphorylierung wurde nach einem *rMT1-knockdown* im INS-1 Zellmodell mit einem signifikant reduzierten *rMT1* mRNA Expressionsniveau (69 % unter dem von nicht-transfizierten INS-1 Zellen) erbracht (Mühlbauer et al. 2012). In diesen *rMT1-knockdown* INS-1 Zellen konnte auch ein reduzierter MT1-Rezeptorgehalt nachgewiesen werden.

Die Behandlung der INS-1-Kontrollzellen (*control-shRNA-INS-1*) mit IBMX verursachte einen Anstieg der mittleren pCREB Immunfluoreszenzintensität auf 60 % über den der Kontrollwerte (100 %), wobei durch gleichzeitige Inkubation mit 100 nM Melatonin eine 16,5 %ige Erniedrigung gegenüber der IBMX-Applikation erreicht werden konnte.

Die IBMX-Behandlung in *rMT1-knockdown-INS-1* Zellen resultierte in einer Signalsteigerung der pCREB-Immunreaktion um 28 %, jedoch reduzierte eine gleichzeitige Melatoninapplikation die IBMX-vermittelte pCREB-Stimulation nur um 9 %. Dies belegt, dass zwar immer noch ein durch Melatonin verursachter inhibitorischer Einfluss auf die Phosphorylierung von CREB in den *rMT1-knockdown* INS-1 Zellen vorhanden ist, der aber durch den erniedrigten MT1-Rezeptorgehalt stark abgeschwächt in Erscheinung tritt.

Die Ergebnisse der gentechnisch veränderten INS-1 Zellmodelle zusammenfassend belegen, dass der Effekt von Melatonin auf pCREB über die anteilig vorhandenen

Rezeptorisoformen moduliert wird und damit der Melatoninrezeptorstatus entscheidend die Menge an phosphoryliertem CREB beeinflusst.

3.3.3 Untersuchungen an pankreatischen Inseln der Wistar-Ratte zum Einfluss von Melatonin auf pCREB

In einer weiteren Versuchsserie wurden aus Pankreata neonataler Wistar-Ratten pankreatische Inseln isoliert, um die auf Einzelzellebene erhobenen Befunde zur Beeinflussung von pCREB durch Melatonin auf die gesamte pankreatische Insel im Säugerorganismus zu übertragen.

Ein Teil der Inseln wurde mit Akutase behandelt und dadurch in kleinere Bruchstücke zerlegt. Die Inseln wurden dann für 48 h kultiviert und danach für 1 Stunde mit 10 μ M IBMX oder IBMX in Kombination mit 100 nM Melatonin behandelt. Von den Überständen wurde der Insulingehalt bestimmt und die Inseln mittels 4 % PFA fixiert, um nachfolgend immunhistochemisch pCREB in Kombination mit einer Insulin- bzw. Glukagon-Immunreaktion nachzuweisen. Erste Ergebnisse zeigten, dass es unter Einwirkung von IBMX und Melatonin zu einer Absenkung des Insulingehaltes im Medium kommt (Abb. 10A). Gleichzeitig ergab die Semiquantifizierung von pCREB in den Zellkernen von pankreatischen β -Zellen eine Erniedrigung von pCREB infolge der Melatonineinwirkung unter IBMX-Behandlung.

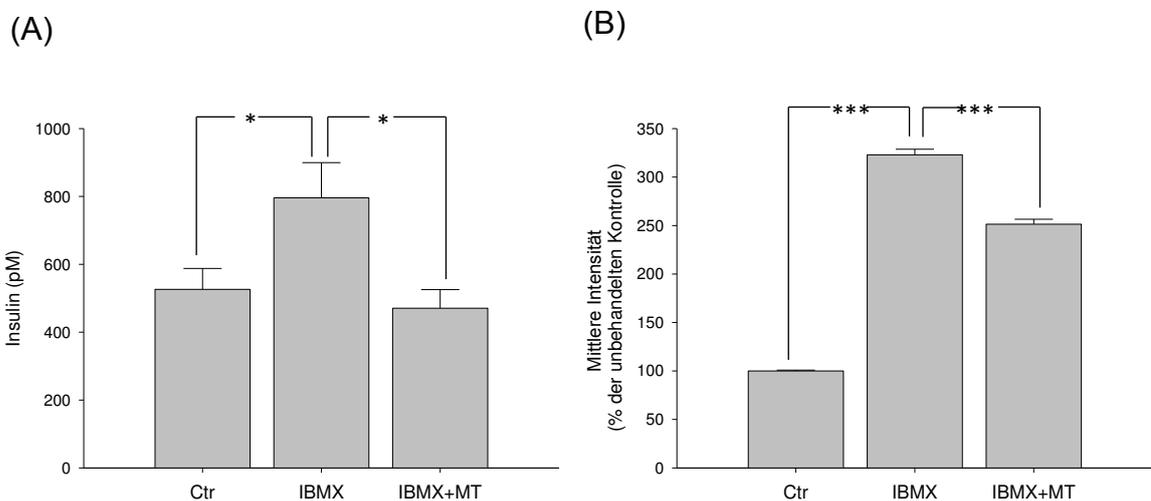


Abb. 10 (A) Insulinbestimmung von isolierten pankreatischen Inseln der Wistar-Ratte unter IBMX-Behandlung und Co-applikation von IBMX und Melatonin (MT) nach 1 h im Vergleich zu unbehandelten Inseln (Ctr); $n = 7$ batches, $*P < 0,05$, gepaarter t-test. **(B)** Bestimmung der mittleren Intensitäten von pCREB-immunreaktiven Zellkernen der β -Zellen dieser pankreatischen Inseln ($n = 300$ Zellkerne, $***P < 0,001$, t-test).

4 DISKUSSION

4.1 Expression und Vorkommen ausgewählter Calciumsignalproteine in der pankreatischen Insel vom Säuger

Die Verteilung der CaBPs Calbindin-D28k, Secretagogen, Calreticulin und Calmodulin wurde im Pankreasgewebe analysiert, wobei die CaBPs in Übereinstimmung mit früheren Studien verstärkt in der pankreatischen Insel nachgewiesen werden konnten (Sugden et al. 1979, Pochet et al. 1989, Wagner et al. 2000, Ahmed et al. 2005). Eine Insel-spezifische Lokalisation der CaBPs konnte – neben dem Nachweis der Transkripte im Pankreasgewebe – auch über deren Detektion in isolierten pankreatischen Inseln erfasst werden (Bazwinsky-Wutschke et al. 2010). Zudem waren die untersuchten CaBPs und ihre Transkripte in den INS-1 Zellen nachweisbar, was als Beleg für das Vorkommen der Proteine in den β -Zellen bewertet werden kann und sich durch zusätzliche Doppelmarkierungen bestätigte (Bazwinsky-Wutschke et al. 2010). Dass CaBPs eine funktionelle Bedeutung für die Sekretionsmechanismen der β -Zelle haben, wird für jedes einzelne der hier untersuchten CaBPs in der Literatur diskutiert (Calbindin-D28k: Reddy et al. 1997, Sooy et al. 1999; Secretagogen: Skovhus et al. 2006; Calreticulin: Oyadomari et al. 2001, Ahmed et al. 2005). Als gesichert gelten jedoch die Funktionen von Calmodulin innerhalb der β -Zelle (Niki und Hidaka 1999), das hier nicht nur das höchste Expressionsniveau aufwies, sondern ebenso durch deutliche Verteilungsunterschiede in der pankreatischen Insel der GK-Ratte gegenüber der Insel der Wistar-Ratte charakterisiert war (Bazwinsky-Wutschke et al. 2010). Veränderungen eines CaBP in den diabetischen Inseln sind mit Calciumveränderungen in diesen Inseln zu diskutieren. So zeigen die Inseln von Typ-2-diabetischen GK-Ratten einen zeitverzögerten und langsameren Anstieg des intrazellulären Calciums (Zaitsev et al. 1997) und niedrigere Maximalanstiege der Calciumlevel im Vergleich zu den Kontrolltieren (Kato et al. 1996). Die Expressionsänderungen einiger Calcium-abhängiger Signalkomponenten sollen für derartige Störungen verantwortlich sein, wie z. B. die Reduktion der SERCA3 Isoform der Calcium-ATPase (Váradi et al. 1996) oder eine verminderte Expression von Genen, welche für die α_2 Untereinheit des L-Typ Kanals spannungsabhängiger Calciumkanäle codieren (Roe et al. 1996). Eine Beteiligung der VDCCs an den Calciumveränderungen diabetischer Inseln wird auch in anderen Studien beschrieben (Kato et al. 1996, Wang et al. 1996).

Weitere diabetische Tiermodelle weisen hingegen für CaBPs wie Calbindin (D28k bzw. D9k) eine veränderte mRNA Expression oder Proteinmenge auf (Hamilton et al. 2000, Thongboonkerd et al. 2005). Eine Glukosestimulation von pankreatischen Inseln der Ratte verursachte unter anderem einen Anstieg der Calbindin-mRNA (MacDonald

1996). Das Calmodulin betreffend entwickeln transgene Mäuse mit einer spezifischen Überexpression von Calmodulin frühzeitig Diabetes mit einer deutlichen Hyperglykämie (Epstein et al. 1989). Darüber hinaus kommt es zu Defekten in der 2. Phase der Insulinsekretion (Epstein et al. 1992). In transgenen Mäusen, in denen mutiertes Calmodulin zwar Calcium bindet (CaM-8), aber die Interaktion mit Calcium/Calmodulin-aktivierten Enzymen verändert wird, entwickelte sich eine diabetische Stoffwechsellage einhergehend mit erhöhtem Blutzucker und gleichzeitig erniedrigtem Insulin in der Insel sowie im Plasma (Ribar et al. 1995).

Die Ergebnisse der eigenen Studie im Vergleich mit Literaturdaten zeigen deutlich, dass CaBPs und somit Calcium-abhängige Signalkaskaden mit pathologischen Veränderungen des Typ-2-Diabetes assoziiert sind und deshalb eine wesentliche Rolle für die Aufrechterhaltung der normalen β -Zell-Funktionen einnehmen.

4.2 Expressionsänderungen ausgewählter Calciumsignalproteine unter dem Einfluss von Melatonin

Für Calmodulin ist bekannt, dass es erst über die Interaktion mit sogenannten CAMKs seine Funktionen ausübt (Niki und Hidaka 1999, Wayman et al. 2011). Die eigenen Studien konnten das Vorhandensein der CAMKs (Transkript und Protein) spezifisch in den pankreatischen Inseln und in den hier überwiegenden β -Zellen sowie in INS-1 Zellen nachweisen, wobei die CamkIV und Camk2d zu den Kinasen mit dem höchsten Transkript-Expressionsniveau gehörten (Bazwinsky-Wutschke et al. 2009). Die Transkripte dieser beiden Camks wurden während der Forskolin- oder IBMX-induzierten Insulinsekretion der INS-1 Zellen erhöht, jedoch im Beisein von Melatonin wieder signifikant abgesenkt, verbunden mit einer erniedrigten Insulinausschüttung (Bazwinsky-Wutschke et al. 2009). Die Steigerung der Insulinsekretion, hervorgerufen durch IBMX- oder Forskolin-Applikation, und die hemmenden Effekte von Melatonin auf die Insulinsekretion während der Applikation von Forskolin oder IBMX decken sich mit den durch Superfusionsexperimente an INS-1 Zellen und pankreatischen Ratteninseln erhobenen Befunden (Peschke et al. 2002). Effekte von Melatonin auf Calcium-signalwege sind bisher beschrieben für die MCF-7 humane Brustkrebszelllinie (Dai et al. 2002) und neuronale Zellen (Schuster et al. 2005), wobei am Rattengehirn speziell ein Einfluss von Melatonin auf die CAMK2 nachgewiesen werden konnte (Benitez-King et al. 1996, Fukunaga et al. 2002).

An der pankreatischen β -Zelle werden die Melatonin-vermittelten Effekte auf die Transkripte unter anderem über den MT1-Rezeptor, möglicherweise auch MT2-Rezeptor, ausgeübt. Für einen solch Rezeptor-medierten Einfluss von Melatonin auf die Transkripte spricht die Tatsache, dass Luzindol, das antagonistisch auf MT1 und

MT2 Rezeptoren wirkt, den Transkript-senkenden Effekt auf die Camks aufhebt (Bazwinsky-Wutschke et al. 2009). Die Untersuchung am Tiermodell (MT-Rezeptor-*knockout*-Mäuse) erbrachte diesbezüglich den weiteren eindeutigen Beleg für eine Rezeptor-vermittelte Transkriptregulation: die Camk2d-Transkripte beispielsweise werden infolge eines MT1-Rezeptor-*knockouts* erhöht, die CamkIV-Transkripte infolge eines MT2-Rezeptor-*knockouts* erniedrigt (Bazwinsky-Wutschke et al. 2014). Dennoch kann eine generelle Beteiligung des MT2-Rezeptors an der Transkriptregulation nicht ausgeschlossen werden, da sich unter IBMX-Applikation in MT2-Rezeptor-überexprimierenden INS-1 Zellen (hMT2-INS-1) die Melatonin-induzierte Reduktion der Camk2d- bzw. CamkIV-Transkripte noch verstärkte. Als Ursache hierfür kommt eine stärkere Reduktion der cGMP- und cAMP-Level durch Melatonin (über den MT2-Rezeptor vermittelt) in Frage, allerdings nur unter IBMX-Behandlung, da unter Forskolin-Stimulation in den hMT2-INS-1 keine Verstärkung des MT-inhibierenden Effekts auf die Transkripte feststellbar war. Dafür sprechen Befunde von Mühlbauer und Mitarbeitern (2011), nach denen die Melatonin-reduzierenden Effekte während der IBMX-Behandlung auf die cAMP- und cGMP-Gehalte in hMT2-INS-1 Zellen sehr viel stärker ausgeprägt sind im Vergleich zu den INS-1 Zellen. Die gemessenen Transkriptmengenänderungen können zudem in einer deutlicheren Abnahme der CREB-Phosphorylierung (pCREB) in hMT2-INS-1 Zellen unter IBMX-Behandlung begründet sein (Bazwinsky-Wutschke et al. 2012). In dieser Studie wurde beim Vergleich der INS-1 mit der hMT2-INS-1 der stärkste Einfluss von Melatonin auf pCREB unter IBMX-Applikation in den hMT2-INS- Zellen gemessen (45 % Erniedrigung gegenüber 15 %).

Von funktionaler Relevanz für die β -Zelle sind die Befunde der CAMK2D Proteinbestimmung, denen zufolge Melatonin unter Forskolin- oder IBMX-Behandlung eine Abnahme des CAMK2D Proteins induziert und damit nachgewiesen werden konnte, dass sich Transkriptmengenänderungen bis auf die Proteinebene auswirken. Für die CAMK2 bzw. ihre Isoform CAMK2D gibt es eine Vielzahl überzeugender Studien, die zeigen, dass diese CAMK in die Phosphorylierung von Proteinen involviert ist, die den Sekretionsmechanismus betreffen (Synapsin: Wenham et al. 1994, Matsumoto et al. 1999), microtubule-associated protein-2 (MAP-2: Krueger et al. 1997), vesicle-associated membrane protein (VAMP/synaptobrevin: Nielander et al. 1995, Hirling und Scheller 1996) und synaptotagmin (Popoli 1993). Einige dieser in neuronalen Zellen vorkommenden Proteine wie das Synapsin I kommen auch in Ratteninseln oder β -Zelllinien vor (Matsumoto et al. 1999), und Synapsin Ib ist mit CAMK2D in Insulin-sekretorischen Vesikeln assoziiert (Möhlig et al. 1997). Damit übereinstimmend konnten Tabuchi und Mitarbeiter (2000) zeigen, dass die

Insulinausschüttung durch Überexpression der CAMK2 potenziert wurde. Die neuesten an der pankreatischen β -Zelle erhobenen Befunde belegen zudem einen Einfluss der CAMK2 auf die Insulingenexpression (Suefuji et al. 2012). Sie implizieren einen Mechanismus für eine CAMK2-abhängige Regulation des K_{ATP} -Kanals (Kline et al. 2013) oder demonstrieren die Phosphorylierung des in die Insulinsekretion involvierten Ryanodinrezeptor 2 durch CAMK2 (Dixit et al. 2013). Studien an Melatoninrezeptor-*knockout*-Mäusen zeigen, dass eine erhöhte *Camk2d*-Expression mit erhöhten Insulinwerten in diesen *knockout*-Mäusen und erniedrigten Blutzuckerspiegeln korreliert (Bazwinsky-Wutschke et al. 2014, accepted). Eine Aktivierung des CAMK2 Proteins und die Sekretion von Insulin scheinen zeit- und dosisabhängig zu korrelieren und eine pharmakologische Blockierung der CAMK2 die Insulinsekretion zu verringern (Easom et al. 1997, Bhatt et al. 2000, Vest et al. 2007).

Die Befunde verdeutlichen einerseits einen engen Zusammenhang zwischen der Insulinsekretion und der CAMK2D, heben damit aber auch andererseits die Bedeutung des Melatonineinflusses (Zeitabhängigkeit) auf diese CAMK für die Insulinregulation hervor, realisiert über die Einwirkungsmöglichkeiten von Melatonin auf das Funktionsspektrum einer solchen CAMK.

Bezüglich der Melatoninstimulation verhalten sich die Camks unterschiedlich. Während das *CamkIV*-Transkript unter alleiniger Melatonin-Stimulation durch Mengenänderungen reagiert, bleibt das *Camk2d*-Transkript unbeeinflusst. Diese Ergebnisse deuten auf eine differentielle Regulation der Camks-Transkripte durch Melatonin in Abhängigkeit von der an der β -Zelle vorliegenden Stimulationssituation.

Damit konnte für die pankreatische β -Zelle erstmalig gezeigt werden, dass die Melatonineffekte bis auf die Transkriptebene von Calciumsignalkomponenten nachweisbar sind. Dieser Einfluss eröffnet die Möglichkeit, dass Melatonin indirekt über die Calcium/Calmodulin-abhängigen Signalkaskaden die Insulinsekretion beeinflussen kann.

4.3 Die Rolle von pCREB bei Melatonin-vermittelten Effekten auf Calciumsignalkomponenten in der pankreatischen β -Zelle

Nach einer intrazellulären cAMP-Erhöhung kommt es unter anderem zu einer Aktivierung der PKA (Furman et al. 2010), die wiederum über die Phosphorylierung von CREB eine transkriptionale Aktivierung bestimmter Gene vornimmt (Dalle et al. 2011). CREB wird als bedeutender Faktor für die Glukoseregulation, Insulinausschüttung und Gentranskription in der pankreatischen β -Zelle beschrieben (Dalle et al. 2011). Der Einfluss von Melatonin auf die CREB-Aktivierung in der pankreatischen β -Zelle wurde bisher wenig untersucht, obwohl Kemp und Mitarbeiter (2002) erste Hinweise für eine

Verminderung der Insulinpromotoraktivität und der CRE-vermittelten Genexpression unter einer Melatoninbehandlung über 4 h in Anwesenheit von Forskolin lieferten. Studien am Gehirn zeigen, dass regionabhängig der Phosphorylierungsgrad von CREB unter Melatonineinfluss steht (McNulty et al. 1994, 1996). Für die INS-1 Zelle konnte nach Erhöhung der cAMP-Konzentration und Insulinsekretion (Peschke et al. 2002, Bazwinsky-Wutschke et al. 2009), eine gesteigerte nukleäre pCREB-Immunmarkierung nachgewiesen werden (Bazwinsky-Wutschke et al. 2012).

Die Senkung der Insulinsekretion in INS-1 Zellen durch Melatonin wird von einer Absenkung des intrazellulären cAMP-Spiegels und einer verminderten PKA-Aktivierung begleitet (Peschke et al. 2002, Picinato et al. 2002, Furman et al. 2010). Durch Forskolin oder IBMX werden zudem intrazelluläre Calciumänderungen induziert (Dyachok et al. 2006, Bazwinsky-Wutschke et al. 2009). Unterstützende Studien an der *pars tuberalis* zeigen ein Kopplung des MT1-Rezeptors mit Inhibition der Adenylatzyklase, die nachfolgend die Forskolin-induzierte Aktivierung der PKA and pCREB inhibiert (Morgan et al. 1989, Hazlerigg et al. 1991, McNulty et al. 1994, Godson und Reppert 1997).

Der nicht-selektive kompetitive Melatonin-Rezeptoragonist Luzindol und der MT2-selektive Antagonist 4P-PDOT heben den Melatonin-inhibierenden Effekt auf die CREB-Phosphorylierung während einer Forskolin- oder IBMX-Behandlung wieder auf (Bazwinsky-Wutschke et al. 2012). Der durch Melatonin verursachte inhibierende Effekt auf pCREB wird sowohl MT1- und als auch MT2-Rezeptor-mediiert vermittelt. In Melatoninrezeptor-Doppel-*knockout*-Mäusen finden sich in SCN-Neuronen keine pCREB-Veränderungen unter verschiedenen Melatonin-Konzentrationen (Jin et al. 2003).

Mit Hilfe einer gentechnisch veränderten INS-1 Zelle, die den humanen MT2-Rezeptor überexprimierte, konnte eine deutlich stärkere Reduktion von pCREB durch Melatonin (30 min Einwirkzeit) während einer IBMX-Behandlung gezeigt werden (Mühlbauer et al. 2011, Bazwinsky-Wutschke et al. 2012).

Der verstärkte inhibierende Effekt war auch cGMP-abhängig (Mühlbauer et al. 2011). Untersuchungen an Neuronen der lateralen Amygdala weisen auf eine Beteiligung von cGMP über die cGMP-abhängige Proteinkinase an der Phosphorylierung von CREB hin (Paul et al. 2010). In Betracht gezogen werden kann ebenso eine Verknüpfung des cGMP- mit dem cAMP-Signalweg, die über eine Aktivierung der PKA durch cGMP (Lucas et al. 2000) oder durch Bindung von cGMP an die PDE3 gegeben ist (Bender und Beavo 2006).

Eine veränderte Expression des MT1- und MT2-Rezeptors ist bedeutsam hinsichtlich einer diabetischen Stoffwechsellage. Das Pankreasgewebe von Typ-2-diabetischen

GK-Ratten zeigte sowohl für den MT1-Rezeptor (Peschke et al. 2006b) als auch für den MT2-Rezeptor ein deutlich erhöhtes Rezeptorniveau (Peschke et al. 2010) im Vergleich zur Wistar-Ratte. Ebenso wurde eine erhöhte Expression beider Melatoninrezeptoren im Pankreas (Operationsmaterial) von Typ-2-Diabetikern im Vergleich zu Stoffwechsel-unauffälligen Patienten festgestellt (Peschke et al. 2007, Peschke 2008). Jüngste Ergebnisse einer genomweiten Assoziationsstudie postulieren einen Zusammenhang zwischen MT2-Rezeptor-Genvarianten und einer erhöhten Nüchtern-Blutglukose sowie einer verminderten β -Zellfunktion (Prokopenko et al. 2009). In diesem Zusammenhang berichten Lyssenko und Mitarbeiter (2009) von einer erhöhten Expression des MT2-Rezeptor-Transkripts in humanen pankreatischen Inseln des Typ-2-Diabetes-Risikotyps. Sie gehen davon aus, dass die sog. SNPs (*Single Nucleotide Polymorphisms*) des *MTNR1b*-Genlokus als prognostischer Marker für ein erhöhtes Diabetes-Risiko verwendet werden können.

Der inhibierende Effekt auf die Phosphorylierung von CREB durch Melatonin, mediiert über beide Melatoninrezeptor-Isoformen, hätte damit weitreichende Konsequenzen auf alle durch CREB beeinflusste Gene wie die *Camk2d* und *CamkIV* (Zhang et al. 2005). Dazu gehören beispielsweise aber auch Glukosetransporter, die unter Melatonineinfluss oder einer fehlenden Melatoninrezeptorisoform veränderte Transkriptmengen aufweisen (Bazwinsky-Wutschke et al. 2014).

Eine veränderte Melatonin-Rezeptordichte bei einer diabetischen Stoffwechsellage könnte eine veränderte Phosphorylierung von CREB induzieren, infolge dessen die durch CREB regulierten Gene in ihrer Expression verändert werden. Das Pankreasgewebe von GK-Ratten zeigt in der Tat erhöhte *Camk2d*-Transkriptmengen gegenüber dem von Wistar-Ratten (unveröffentlichte eigene Ergebnisse). Der von Lyssenko und Mitarbeitern (2009) vorgeschlagene therapeutische Ansatz für eine Diabetes-Therapie über Melatoninrezeptor-Antagonisten einen Einfluss auf die cAMP und konsekutiv die Insulinsekretion zu erlangen, bleibt aufgrund der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit, die Melatonin-Effekte bis auf Genebene nachweist, zu überdenken.

Die erhobenen Daten verstärken die Vorstellung, dass Melatonin über die Phosphorylierung von CREB Einfluss auf die Transkripte von Calcium-abhängigen Signalproteinen nimmt und so auf direkter oder indirekter Art die Insulinsekretion beeinflusst.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Die steigende Anzahl von Menschen unterschiedlicher Altersklassen, im Besonderen die der Kinder und Jugendlichen, die an Diabetes mellitus erkranken, erfordern in zunehmendem Maße gezielte Präventionsmaßnahmen und Behandlungsstrategien. Voraussetzung hierfür ist eine detaillierte Kenntnis über die Regulationsmechanismen des Glukosemetabolismus und der Signalverarbeitungswege, vor allem innerhalb der pankreatischen β -Zelle, die über ihre Insulinsekretion in erheblichem Umfang an der Regulation des Glukosehaushaltes beteiligt ist.

Mit der vorliegenden Arbeit wurde zunächst das Vorkommen von Calciumsignalproteinen als wichtige Mediatoren innerhalb der Signalkaskaden für die pankreatische β -Zelle untersucht.

Die immunhistochemischen Nachweise am Pankreasgewebe verschiedener Säuger verdeutlichten, dass in der pankreatischen Insel Calciumsignalkomponenten wie Calcium-bindende Proteine (Calbindin-D28k, Secretagogen, Calmodulin, Calreticulin) aber auch deren Effektorenzyme wie die CAMKs verstärkt vorkommen. Das exokrine Pankreasgewebe zeigte eine stark verminderte Immunreaktivität. Von den in der Insel vorkommenden Zelltypen zeichnete sich im Besonderen die pankreatische β -Zelle durch die Lokalisation der CaBPs und CAMKs aus, was sich insbesondere durch den immunhistochemischen und molekularbiologischen Nachweis in den Ratteninsulinomazellen (INS-1 Zellen), einem anerkannten β -Zellmodell, reproduzieren ließ. Die pankreatischen Inseln des Typ-2-diabetischen Tiermodells der GK-Ratte waren im Vergleich zur normoglykämischen Wistar-Ratte sowohl durch erhöhte Transkriptmengen als auch durch veränderte immunhistochemische Verteilungsmuster der CaBPs gekennzeichnet.

Ein für die Signalwegsbeziehungen der Insel besonders bedeutsames CaBP ist das Calmodulin durch seine bekannten Interaktionen mit CAMKs. Das epiphysäre Neurohormon Melatonin übt über die membranständigen Rezeptorisoformen MT1 und MT2 einen hemmenden Einfluss auf die Insulinsekretion aus. Dieser Einfluss erfolgt überwiegend MT1-Rezeptor-vermittelt unter Nutzung des AC/cAMP/PKA-Signalweges. Interessanterweise sind weitere Melatonineffekte *downstream* der PKA nachweisbar. So konnte in INS-1 Zellen unter Stimulation mit cAMP- und Insulin-steigernden Substanzen und einer gleichzeitigen Melatoninapplikation eine Verminderung der zuvor erhöhten Transkriptmengen von Camk2d und CamkIV erreicht werden, die sich durch Gabe von Melatoninrezeptor-Antagonisten wieder auf das Ausgangsniveau zurückführen ließ. Eine signifikante Reduktion der Transkriptmengen durch Melatonin sind unter 1 h, 3 h und 6 h Einwirkzeit feststellbar. Am Beispiel der Camk2d konnte

außerdem gezeigt werden, dass sich der Melatonin-inhibierende Effekt auf das Transkript bis auf Proteinebene auswirkte.

Die Inkubationsversuche mit INS-1 Zellen verdeutlichten, dass Melatonin allein in unstimulierten Zellen eine Verminderung des CamkIV Transkripts nach 48 h, aber zu keiner Zeit eine Verminderung der Camk2d Transkripte bewirkte.

Die Überexpression von MT2-Rezeptoren führte unter IBMX-Behandlung und gleichzeitiger Melatoninapplikation zu einer verstärkten Verminderung der Transkriptmenge von Camk2d, jedoch noch deutlicher von CamkIV, im Vergleich zur IBMX-Behandlung ohne Melatonin.

Die Untersuchung von Melatoninrezeptor-*knockout*-Mausmodellen ergab folgende Ergebnisse. Der Verlust der MT1-Isoform bewirkte ein erhöhtes Transkriptniveau der Camk2d. Das CamkIV-Transkript wurde dagegen durch das Fehlen der MT2-Rezeptorisoform erniedrigt. Beim *Calm1* führte der Wegfall beider Rezeptoren zu einer Steigerung des Transkriptniveaus.

Eine wichtige Schnittstelle für Expressionsänderungen von Transkripten stellen die Transkriptionsfaktoren dar, wobei in den PKA-vermittelten Effekten der Phosphorylierung von CREB eine entscheidende Bedeutung zukommt.

Batch-Versuche mit der INS-1 Zelle belegten während der Applikation von Insulin-stimulierenden und gleichzeitig cAMP-erhöhenden Pharmaka eine signifikante Erhöhung der Phosphorylierung von CREB. Wurden die Substanzen zusammen mit Melatonin appliziert, war eine signifikante Abnahme von pCREB feststellbar.

Die Melatonin-induzierte Abnahme von pCREB wurde von einer Absenkung der Transkripte von CamkIV und Camk2d begleitet. In beiden Genen ist die zur Bindung von pCREB notwendige CRE-Sequenz vorhanden, worüber die Regulation dieser Transkripte zu erklären ist.

Das Ausmaß des Melatonin-inhibierenden Einflusses auf die Phosphorylierung von CREB lässt sich modulieren über eine Erhöhung oder Erniedrigung der Melatoninrezeptoren. Ein erhöhtes Vorkommen der MT2-Rezeptorisoform bedingte eine stärkere Abnahme von pCREB unter Melatonineinwirkung. Eine Verminderung der MT1-Rezeptorisoform führte zur Abschwächung des Melatonin-vermittelten inhibierenden Effektes auf pCREB.

Da die Daten am INS-1 Zellmodell erhoben wurden, kann von einem direkten unmittelbaren Einfluss von Melatonin auf die β -Zelle und das hier vorkommende pCREB und die von diesem Transkriptionsfaktor regulierten Transkripte ausgegangen werden.

Die Beeinflussung der Insulinsekretion durch Melatonin scheint sehr viel differentieller und modulierender abzulaufen als bisher angekommen. Melatonin greift damit über die PKA nicht nur direkt, sondern indirekt über pCREB in weitere Signalwegsysteme ein, die ihrerseits Einfluss auf die Insulinsekretion und Synthese nehmen (Abb. 11).

Melatonin beeinflusst indirekt über die Phosphorylierung von CREB die Calcium/Calmodulin-abhängige Signalkaskade und hat damit über diesen Weg eine weitere Möglichkeit, die Insulinsekretion zu modulieren. Diese Steuerung scheint von äußeren Einflüssen/Stimuli abhängig zu sein, da sich beispielsweise unter gleichen Bedingungen Melatonineffekte nicht an beiden Camks gleichermaßen nachweisen lassen. Melatonin könnte damit, vermittelt über die Camks, eine Anpassung der Insulinsekretion an die jeweilige metabolische Stoffwechsellage vornehmen. Die Abb. 11 gibt einen zusammenfassenden Überblick, wie Melatonin Rezeptor-vermittelt die AC blockt, welche das eigentliche Enzym darstellt, über das Inkretine wie GLP-1 oder GIP das intrazelluläre cAMP erhöhen. Die über den Melatoninrezeptor vermittelten Effekte werden bis zur Insulinsekretion verfolgt.

AUSBLICK

Das Verständnis der Steuerung von Sekretionsmechanismen in der pankreatischen β -Zelle ist von immenser Bedeutung hinsichtlich der Entwicklung einer diabetischen Stoffwechsellage und bei der Etablierung von therapeutischen Maßnahmen zur Diabetesprävention. Die vorliegende Arbeit konnte zeigen, dass Melatonin Rezeptor-mediiert unter Nutzung des cAMP/PKA/CREB-Signalweges mit dem Calcium/Calmodulin-Signalweg interagiert, indem Calciumsignalkomponenten dieses Signalweges sowohl auf Transkript- als auch auf Proteinebene unter bestimmten Bedingungen durch eine Melatoninbehandlung beeinflusst werden, was in einer veränderten Insulinsekretion resultiert.

Es stellt sich daher die Frage, ob der, in der β -Zelle gut etablierte cAMP/PKA/CREB-Signalweg, auch über weitere externe Faktoren (Neurotransmitter, Hormone, Stoffwechselprodukte) angesteuert werden kann. Der Einfluss bestimmter externer Faktoren auf die Insulinsekretion der β -Zelle ist bisher nur marginal untersucht worden. Es liegen jedoch erste Hinweise für eine Mitbeteiligung an der Entstehung einer diabetischen Stoffwechsellage vor.

Die Aufklärung weiterer Interaktionsprinzipien im Signalnetzwerk der pankreatischen β -Zelle bietet die Möglichkeit, langfristig neue Ansätze zur Behandlung des Diabetes mellitus zu entwickeln.

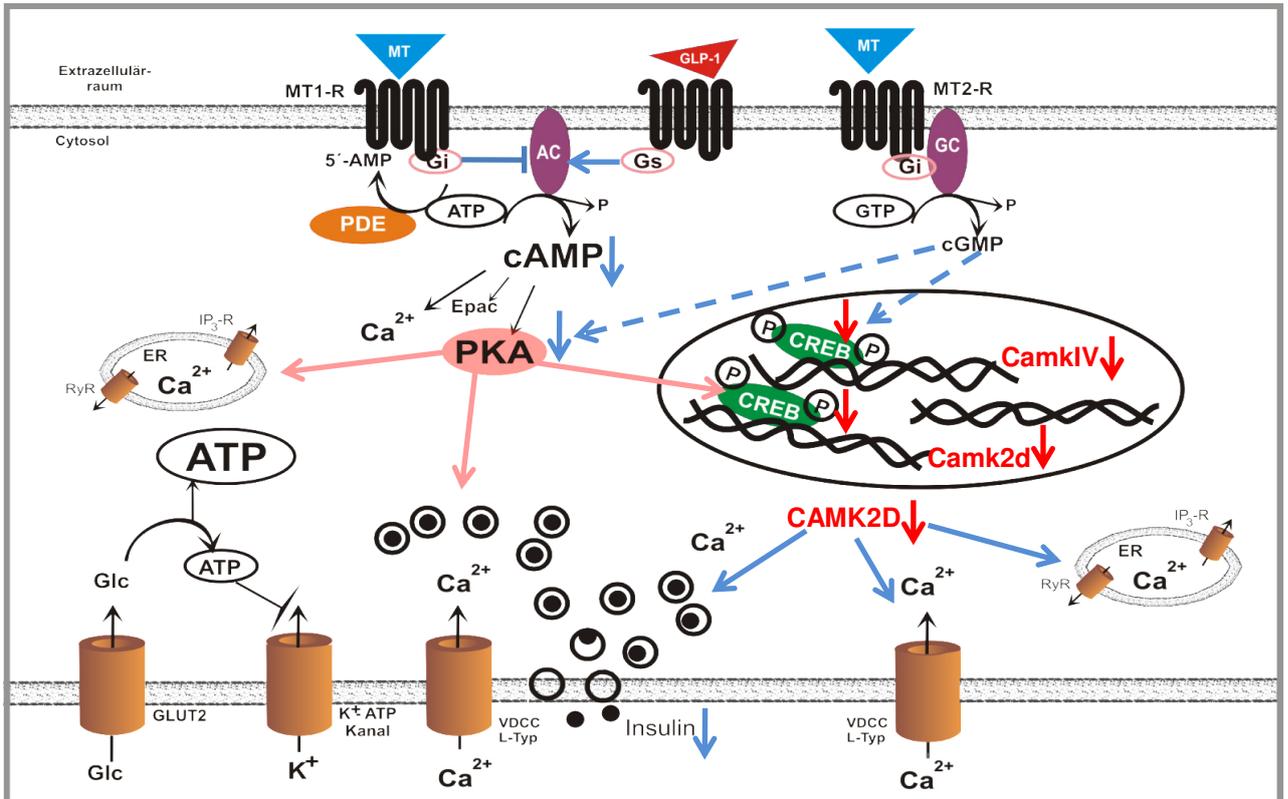


Abb. 11 Stimulierte Insulinsekretion unter Melatonineinfluss. Die blauen Pfeile verdeutlichen bekannte Fakten für die pankreatische β -Zelle, die gestrichelten Pfeile bekannte Fakten aus anderen Zellverbänden. Die roten Pfeile kennzeichnen die Ergebnisse der vorliegenden Studie. **Abkürzungen:** AC – Adenylatzyklase, cAMP – zyklisches 3'-5'-Adenosinmonophosphat, 5'-AMP – Adenosin-5'-monophosphat, ATP – Adenosintriphosphat, CAMK – Calcium-/Calmodulin-abhängige Proteinkinase (CAMKIV, CAMK2D), pCREB – phosphoryliertes cAMP-response element-binding protein, ER – Endoplasmatisches Retikulum, Epac – *exchange protein directly activated by cAMP*, Gi – inhibitorisches GTP-bindendes Protein, Glc – Glucose, GLUT2 – Glucose-2-Transporter, GC – Guanylatzyklase, GTP – Guanosintriphosphat, cGMP – zyklisches 3'-5'-Guanosinmonophosphat, MT – Melatonin, MT-R – Melatoninrezeptor, PDE – Phosphodiesterase, PKA – Proteinkinase A, VDCC – spannungsabhängige Calciumkanäle, RyR- Ryanodinrezeptor, IP₃-R – IP₃-Rezeptor.

6 LITERATURVERZEICHNIS

- Ahmed M, Forsberg J, Bergsten P. Protein profiling of human pancreatic islets by two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry. *J Proteome Res* 2005; 4:931-940.
- Ahren B. Autonomic regulation of islet hormone secretion – implications for health and disease. *Diabetologia* 2000; 43: 393-410.
- Andressen C, Blümcke I, Celio MR. Calcium-binding proteins: selective markers of nerve cells. *Cell Tissue Res* 1993; 271:181-208.
- Asfari M, Janjic D, Meda P, Li G, Halban PA, Wollheim CB. Establishment of 2-mercaptoethanol-dependent differentiated insulin-secreting cell lines. *Endocrinology* 1992; 130:167-78.
- Bach A, Wolgast S, Mühlbauer E, Peschke E. Melatonin stimulates inositol-1,4,5-triphosphate and Ca²⁺ release from INS1 insulinoma cells. *J Pineal Res* 2005; 39:316-323.
- Barg S. Mechanisms of exocytosis in insulin-secreting B-cells and glucagon-secreting A-cells. *Pharmacol Toxicol* 2003; 92:3-13.
- Bazwinsky I**, Hilbig H, Bidmon H-J, Rübsamen R. Characterization of the human superior olivary complex by calcium binding proteins and neurofilament H (SMI-32). *J Comp Neurol* 2003; 456:292-303.
- Bazwinsky I**, Bidmon H-J, Zilles K, Hilbig H. Characterization of the rhesus monkey superior olivary complex by calcium binding proteins and synaptophysin. *J Anat* 2005; 207:745-761.
- Bazwinsky I**, Mühlbauer E, Peschke E. Calcium binding proteins in pancreatic islets. *Verh Anat Ges* 2007; DOI 10.3337/anatges.2007.0004.
- Bazwinsky I**, Härtig W, Rübsamen R. Characterization of cochlear nucleus principal cells of *Meriones unguiculatus* and *Monodelphis domestica* by use of calcium-binding protein immunolabeling. *J Chem Neuroanat* 2008; 35:158-174.
- Bazwinsky-Wutschke I**, Mühlbauer E, Wolgast S, Peschke E. Transcripts of calcium/calmodulin-dependent kinases are changed after forskolin- or IBMX-induced insulin secretion due to melatonin treatment of rat insulinoma β -cells (INS-1). *Horm Metab Res* 2009; 41:805-813.
- Bazwinsky-Wutschke I**, Litvak L, Mühlbauer E, Peschke E. Distribution patterns of calcium-binding proteins in pancreatic tissue of non-diabetic as well as type 2 diabetic rats and in rat insulinoma β -cells (INS-1). *Histochem Cell Biol* 2010; 134:115-127.
- Bazwinsky-Wutschke I**, Mühlbauer E, Litvak L, Peschke E. Calciumsignal-komponenten der pankreatischen Insel unter dem Einfluss von Melatonin. *Nova Acta Leopold NF* 114 2011; 389:207-213.
- Bazwinsky-Wutschke I**, Wolgast S, Mühlbauer E, Albrecht E, Peschke E. Phosphorylation of cyclic AMP-response element-binding protein (CREB) is influenced by melatonin treatment in pancreatic rat insulinoma β -cells (INS-1). *J Pineal Res* 2012; 53:344-357.
- Bazwinsky-Wutschke I**, Bieseke L, Peschke E. Influence of melatonin receptor signalling on parameters involved in blood glucose regulation. *J Pineal Res* 2014; 56:82-96.

- Bazwinsky-Wutschke** I, Mühlbauer E, Albrecht E, Peschke E. Calcium-signaling components in rat insulinoma β -cells (INS-1) and pancreatic islets are differentially influenced by melatonin. (eingereicht)
- Bender AT, Beavo JA. Cyclic nucleotide phosphodiesterases: molecular regulation und clinical use. *Pharmacol Rev* 2006; 58:488-520.
- Benitez-King G, Huerto-Delgadillo L, Anton-Tay F. Melatonin modifies calmodulin cell levels in MDCK and N1E-115 cell lines and inhibits phosphodiesterase activity in vivo. *Brain Res* 1991; 557:289-292.
- Benítez-King G, Ríos A, Martínez A, Antón-Tay F. In vitro inhibition of Ca^{2+} /calmodulin-dependent kinase II activity by melatonin. *Biochim Biophys Acta* 1996; 1290:191-196.
- Bhatt HS, Conner BP, Prasanna G, Yorio T, Easom RA. Dependence of insulin secretion from permeabilized pancreatic beta-cells on the activation of $Ca^{(2+)}$ /calmodulin-dependent protein kinase II. A re-evaluation of inhibitor studies. *Biochem Pharmacol* 2000; 60:1655-1663.
- Blanpied TA, Augustine GJ. Protein kinase A takes center stage in ATP-dependent insulin secretion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96:329-231.
- Buffa R, Mare P, Salvatore M, Solcia E, Furness JB, Lawson DE. Calbindin 28 kDA in endocrine cells of known or putative calcium-regulating function. Thyroparathyroid C cells, gastric ECL cells, intestinal secretin and enteroglucagon-cells, pancreatic glucagons, insulin and PP cells, adrenal medullary NA cells and some pituitary (TSH?) cells. *Histochemistry* 1989; 91:107-113.
- Burry RW. Controls for immunocytochemistry: an update. *J Histochem Cytochem* 2011; 59:6-12.
- Carlberg C. Gene regulation by melatonin. *Ann N Y Acad Sci* 2000; 917:387-396.
- Carlezon WA Jr, Duman RS, Nestler EJ. The many faces of CREB. *Trends Neurosci* 2005; 28:436-445.
- Celio MR, Pauls TL, Schwaller B. Guidebook to the calcium-binding proteins. A Sambrook & Tooze Publication at Oxford University Press 1996.
- Chin D, Means AR. Calmodulin: a prototypical calcium sensor. *Trends Cell Biol* 2000; 10:322-328. Erratum in: *Trends Cell Biol* 2000; 10:428.
- Cnop M, Welsh N, Jonas JC, Jörns A, Lenzen S, Eizirik DL. Mechanisms of pancreatic beta-cell death in type 1 and type 2 diabetes: many differences, few similarities. *Diabetes* 2005; 54:97-107.
- Costa EJ, Lopes RH, Lamy-Freund MT. Permeability of pure lipid bilayers to melatonin. *J Pineal Res* 1995; 19:123-126.
- Csernus VJ, Hammer T, Peschke D, Peschke E. Dynamic insulin secretion from perfused rat pancreatic islets. *Cell Mol Life Sci* 1998; 54:733-743.
- Dai J, Inscho EW, Yuan L, Hill SM. Modulation of intracellular calcium and calmodulin by melatonin in MCF-7 human breast cancer cells. *J Pineal Res* 2002; 32:112-119.
- Dalle S, Quoyer J, Varin E, Costes S. Roles and regulation of the transcription factor CREB in pancreatic β -cells. *Curr Mol Pharmacol* 2011; 4:187-195.
- De Almeida-Paula LD, Costa-Lotufo LV, Silva Ferreira Z, Monteiro AE, Isoldi MC, Godinho RO, Markus RP. Melatonin modulates rat myotube-acetylcholine receptors by inhibiting calmodulin. *Eur J Pharmacol* 2005; 525:24-31.

- Del Río B, García Pedrero JM, Martínez-Campa C, Zuazua P, Lazo PS, Ramos S. Melatonin, an endogenous specific inhibitor of estrogen receptor alpha via calmodulin. *J Biol Chem* 2004; 279:38294-38302.
- Dinet V, Korf HW. Impact of melatonin receptors on pCREB and clock-gene protein levels in the murine retina. *Cell Tissue Res* 2007; 330:29-34.
- Dixit SS, Wang T, Manzano EJ, Yoo S, Lee J, Chiang DY, Ryan N, Respress JL, Yechoor VK, Wehrens XH. Effects of CaMKII-mediated phosphorylation of ryanodine receptor type 2 on islet calcium handling, insulin secretion, and glucose tolerance. *PLoS One* 2013; 8:e58655.
- Dubocovich ML, Markowska M. Functional MT1 and MT2 melatonin receptors in mammals. *Endocrine* 2005; 27:101-110.
- Dyachok O, Isakov Y, Sägetorp J, Tengholm A. Oscillations of cyclic AMP in hormone-stimulated insulin secreting beta-cells. *Nature* 2006; 439:349-352.
- Easom RA, Filler NR, Ings EM, Tarpley J, Landt M. Correlation of the activation of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II with the initiation of insulin secretion from perfused pancreatic islets. *Endocrinology* 1997; 138:2359-2364.
- Easom RA. CaM kinase II: a protein kinase with extraordinary talents germane to insulin exocytosis. *Diabetes* 1999; 48:675-684.
- Epstein PN, Overbeek PA, Means AR. Calmodulin-induced early-onset diabetes in transgenic mice. *Cell* 1989; 58:1067-1073.
- Epstein PN, Ribar TJ, Decker GL, Yaney G, Means AR. Elevated beta-cell calmodulin produces a unique insulin secretory defect in transgenic mice. *Endocrinology* 1992; 130:1387-1393.
- Fukunaga K, Horikawa K, Shibata S, Takeuchi Y, Miyamoto E. Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II-dependent long-term potentiation in the rat suprachiasmatic nucleus and its inhibition by melatonin. *J Neurosci Res* 2002; 70:799-807.
- Furman B, Ong WK, Pyne NJ. Cyclic AMP signaling in pancreatic islets. *Adv Exp Med Biol* 2010; 654:281-304.
- Gembal M, Gilon P, Henquin JC. Evidence that glucose can control insulin release independently from its action on ATP-sensitive K⁺-channels in mouse β -cells. *J Clin Invest* 1992; 89:1288-1295.
- Godson C, Reppert SM. The Mel1a melatonin receptor is coupled to parallel signal transduction pathways. *Endocrinology* 1997; 138:397-404.
- Gonzalez GA, Montminy MR. Cyclic AMP stimulates somatostatin gene transcription by phosphorylation of CREB at serine 133. *Cell* 1989; 59:675-680.
- Goto Y, Kakizaki M. The spontaneous diabetes rat: a model of non insulin dependent diabetes mellitus. *Proc Japan Acad* 1981; 57:381-384.
- Goto Y, Suzuki K, Ono T, Sasaki M, Toyota T. Development of diabetes in the non-obese NIDDM rat (GK rat). *Adv Exp Med Biol* 1988; 246:29-31.
- Gribble FM, Reimann F. Pharmacological modulation of K_{ATP}-channels. *Biochem Soc Trans* 2002; 30:333-339.
- Hamilton K, Tein M, Glazier J, Mawer EB, Berry JL, Balment RJ, Boyd RD, Garland HO, Sibley CP. Altered calbindin mRNA expression and calcium regulating hormones in rat diabetic pregnancy. *J Endocrinol* 2000; 164:67-76.
- Hanoune J, Defer N. Regulation and role of adenylyl cyclase isoforms. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2001; 41:145-174.

- Hardeland R. Melatonin, hormone of darkness and more: occurrence, control mechanisms, actions and bioactive metabolites. *Cell Mol Life Sci* 2008; 65:2001-2018.
- Hazlerigg DG, Morgan PJ, Lawson W, Hastings MH. Melatonin inhibits the activation of cyclic AMP-dependent protein kinase in cultured pars tuberalis cells from ovine pituitary. *J Neuroendocrinol* 1991; 3:597-603.
- Hevia D, Sainz RM, Blanco D, Quirós I, Tan DX, Rodríguez C, Mayo JC. Melatonin uptake in prostate cancer cells: intracellular transport versus simple passive diffusion. *J Pineal Res* 2008; 45:247-257.
- Hirling H, Scheller RH. Phosphorylation of synaptic vesicle proteins: modulation of the alpha SNAP interaction with the core complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; 93:11945-11949.
- Hisatomi M, Hidaka H, Niki I. Ca^{2+} /calmodulin and cyclic 3,5' adenosine monophosphate control movement of secretory granules through protein phosphorylation/dephosphorylation in the pancreatic beta-cell. *Endocrinology* 1996; 137:4644-4649.
- Jin X, von Gall C, Pieschl RL, Gribkoff VK, Stehle JH, Reppert SM, Weaver DR. Targeted disruption of the mouse Mel(1b) melatonin receptor. *Mol Cell Biol* 2003; 23:1054-1060.
- Jockers R, Maurice P, Boutin JA, Delagrèze P. Melatonin receptors, heterodimerization, signal transduction and binding sites: what's new? *Br J Pharmacol* 2008; 154:1182-1192.
- Johnson JA, Grande JP, Roche PC, Kumar R. Immunohistochemical localization of the 1,25(OH)₂D₃ receptor and calbindin D28k in human and rat pancreas. *Am J Physiol* 1994; 267:E356-360.
- Kato S, Ishida H, Tsuura Y, Tsuji K, Nishimura M, Horie M, Taminato T, Ikehara S, Odaka H, Ikeda I, Okada Y, Seino Y. Alterations in basal and glucose-stimulated voltage-dependent Ca^{2+} channel activities in pancreatic beta cells of non-insulin-dependent diabetes mellitus GK rats. *J Clin Invest* 1996; 97:2417-2425.
- Kelley GG, Zawulich KC, Zawulich WS. Calcium and mitochondrial signal interact to stimulate phosphoinositide hydrolysis and insulin secretion in rat islets. *Endocrinol* 1994; 134:1648-1654.
- Kemp DM, Ubeda M, Habener JF. 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* 2002; 191:157-166.
- Kline CF, Wright PJ, Koval OM, Zmuda EJ, Johnson BL, Anderson ME, Hai T, Hund TJ, Mohler PJ. β IV-Spectrin and CaMKII facilitate Kir6.2 regulation in pancreatic beta cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013; 110:17576-17581.
- Korf HW, Schomerus C, Stehle JH. The pineal organ, its hormone melatonin, and the photoneuroendocrine system. *Adv Anat Embryol Cell Biol* 1998; 146:1-100.
- Korf HW, Von Gall C, Stehle J. The circadian system and melatonin: lessons from rats and mice. *Chronobiol Int* 2003; 20:697-710.
- Krueger KA, Bhatt H, Landt M, Easom RA. Calcium-stimulated phosphorylation of MAP-2 in pancreatic betaTC3-cells is mediated by Ca^{2+} /calmodulin-dependent kinase II. *J Biol Chem* 1997; 272:27464-27469.
- Lalli E, Sassone-Corsi P. Signal transduction and gene regulation: the nuclear response to cAMP. *J Biol Chem* 1994; 269:17359-17362.

- Landt M, Easom RA, Colca JR, Wolf BA, Turk J, Mills LA, McDaniel ML. Parallel effects of arachidonic acid on insulin secretion, calmodulin-dependent protein kinase activity and protein kinase C activity in pancreatic islets. *Cell Calcium* 1992; 13:163-172.
- Lenzen S. The beta cell in diabetes. *Dtsch Med Wochenschr* 2011; 136:1123-1127.
- Lewit-Bentley A, Reity S. EF-hand calcium-binding proteins. *Curr Opin Struct Biol* 2000; 10:637-643.
- Liu C, Weaver DR, Jin X, Shearman LP, Pieschl RL, Gribkoff VK, Reppert SM. Molecular dissection of two distinct actions of melatonin on the suprachiasmatic circadian clock. *Neuron* 1997; 19:91-102.
- Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{(-Delta Delta C(T))}. *Methods* 2001; 25:402-408.
- Lucas KA, Pitari GM, Kazerounian S, Ruiz-Stewart I, Park J, Schulz S, Chepenik KP, Waldman SA. Guanylyl cyclases and signaling by cyclic GMP. *Pharmacol Rev* 2000, 53:375-414.
- Lyssenko V, Nagorny CL, Erdos MR, Wierup N, Jonsson A, Spégel P, Bugliani M, Saxena R, Fex M, Pulizzi N, Isomaa B, Tuomi T, Nilsson P, Kuusisto J, Tuomilehto J, Boehnke M, Altshuler D, Sundler F, Eriksson JG, Jackson AU, Laakso M, Marchetti P, Watanabe RM, Mulder H, Groop L. Common variant in MTNR1B associated with increased risk of type 2 diabetes and impaired early insulin secretion. *Nat Genet* 2009; 41:82-88.
- MacDonald MJ. Glucose-stimulated expressed sequence tags from rat pancreatic islets. *Mol Cell Endocrinol* 1996; 123:199-204.
- Macías M, Escames G, Leon J, Coto A, Sbihi Y, Osuna A, Acuña-Castroviejo D. Calreticulin-melatonin. An unexpected relationship. *Eur J Biochem* 2003; 270:832-840.
- Matsumoto K, Ebihara K, Yamamoto H, Tabuchi H, Fukunaga K, Yasunami M, Ohkubo H, Shichiri M, Miyamoto E. Cloning from insulinoma cells of synapsin I associated with insulin secretory granules. *J Biol Chem* 1999; 274:2053-2059.
- Mayr B, Montminy M. Transcriptional regulation by the phosphorylation-dependent factor CREB. *Nat Rev Mol Cell* 2001; 2:599-609.
- McClenaghan NH, Flatt PR. Physiological and pharmacological regulation of insulin release: insights offered through exploitation of insulin-secreting cell lines. *Diabetes Obes Metab* 1999; 1:137-150.
- McNulty S, Ross AW, Barrett P. Melatonin regulates the phosphorylation of CREB in ovine pars tuberalis. *J Neuroendocrinol* 1994; 6:523-532.
- McNulty S, Ross AW, Shiu KY, Morgan PJ, Hastings MH. Phosphorylation of CREB in ovine pars tuberalis is regulated both by cyclic AMP-dependent and cyclic AMP-independent mechanisms. *J Neuroendocrinol* 1996; 8:635-645.
- McNulty S, Schurov IL, Sloper PJ, Hastings MH. Stimuli which entrain the circadian clock of the neonatal Syrian hamster in vivo regulate the phosphorylation of the transcription factor CREB in the suprachiasmatic nucleus in vitro. *Eur J Neurosci* 1998; 10:1063-1072.
- Miralles F, Portha B. Early development of beta-cells is impaired in the GK rat model of type 2 diabetes. *Diabetes* 2001; 1:S84-8.
- Möhlig M, Wolter S, Mayer P, Lang J, Osterhoff M, Horn PA, Schatz H, Pfeiffer A. Insulinoma cells contain an isoform of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II delta associated with insulin secretion vesicles. *Endocrinology* 1997; 138:2577-2584.

- Montminy MR, Bilezikian LM. Binding of a nuclear protein to the cyclic-AMP response element of the somatostatin gene. *Nature* 1987; 328:175-178.
- Morgan PJ, Lawson W, Davidson G, Howell HE. Guanine nucleotides regulate the affinity of melatonin receptors on the ovine pars tuberalis. *Neuroendocrinology* 1989; 50:359-362.
- Mühlbauer E*, **Bazwinsky-Wutschke I***, Wolgast S, Labucay K, Peschke E. Differential and day-time dependent expression of nuclear receptors ROR α , ROR β , ROR γ and RXR α in the rodent pancreas and islet. *Mol Cell Endocrinol* 2013; 365:129-138. ***Authors equally contributed to the manuscript.**
- Mühlbauer E, Albrecht E, Bazwinsky-Wutschke I, Peschke E. et al. Melatonin influences insulin secretion primarily via MT₁ receptors in rat insulinoma cells (INS-1) and mouse pancreatic islets. *J Pineal Res* 2012; 52:446-459.
- Mühlbauer E, Albrecht E, Hofmann K, Bazwinsky-Wutschke I, Peschke E. et al. Melatonin inhibits insulin secretion in rat insulinoma β -cells (INS-1) heterologously expressing the human melatonin receptor isoform MT₂. *J Pineal Res* 2011; 51:361-372.
- Mühlbauer E, Gross E, Labucay K, Wolgast S, Peschke E. Loss of melatonin signaling and its impact on circadian rhythms in mouse organs regulating blood glucose. *Eur J Pharmacol* 2009; 606:61-71.
- Mühlbauer E, Peschke E. Evidence for the expression of both the MT₁- and in addition, the MT₂ melatonin receptor, in the rat pancreas, islet and beta-cell. *J Pineal Res* 2007; 42:105-106.
- Mühlbauer E, Wolgast S, Finckh U, Peschke D, Peschke E. Indication of circadian oscillations in the rat pancreas. *FEBS Lett* 2004; 564:91-96.
- Nesher R, Anteby E, Yedovizky M, Warwar N, Kaiser N, Cerasi E. Beta-cell protein kinases and the dynamics of the insulin response to glucose. *Diabetes* 2002; 51:S68-73.
- Nielander HB, Onofri F, Valtorta F, Schiavo G, Montecucco C, Greengard P, Benfenati F. Phosphorylation of VAMP/synaptobrevin in synaptic vesicles by endogenous protein kinases. *J Neurochem* 1995; 65:1712-1720.
- Niki I, Hidaka H. Roles of intracellular Ca²⁺ receptors in the pancreatic beta-cell insulin secretion. *Mol Cell Biochem* 1999; 190:119-124.
- Niki I, Yokokura H, Sudo T, Kato M, Hidaka H. Ca²⁺ signaling and intracellular Ca²⁺ binding proteins. *J Biochem* 1996; 120:685-698.
- Novier A, Nicolas D, Krstic R. Colocalization of calretinin and glucagons in rat pancreatic A cells. *Acta Histochem* 1997; 99:217-222.
- Oyadomari S, Takeda K, Takiguchi M, Gotoh T, Matsumoto M, Wada I, Akira S, Araki E, Mori M. Nitric oxide-induced apoptosis in pancreatic beta cells is mediated by the endoplasmic reticulum stress pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001; 98:10845-10850.
- Panten U. Signaltransduktion in der pankreatischen B-Zelle. PESCHKE, E. (Hrsg.): *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 2005, 126 Seiten, 38 Abbildungen, 5 Tabellen. ISBN 3-7776-1368-1, ISSN 0365-6470
- Paul C, Stratil C, Hofmann F, Kleppisch T. cGMP-dependent protein kinase type I promotes CREB/CRE-mediated gene expression in neurons of the lateral amygdala. *Neurosci Lett* 2010; 473:82-86.

- Perry TA, Greig NH. The glucagon-like peptides: a double-edged therapeutic sword? *Trends Pharmacol Sci* 2003; 24:377-383.
- Persaud SJ, Liu B, Sampaio HB, Jones PM, Muller DS. Calcium/calmodulin-dependent kinase IV controls glucose-induced Irs2 expression in mouse beta cells via activation of cAMP response element-binding protein. *Diabetologia* 2011; 54:1109-1120.
- Peschke E, Peschke D, Hammer T, Csernus V. Influence of melatonin and serotonin on glucose-stimulated insulin release from perfused rat pancreatic islets in vitro. *J Pineal Res* 1997; 23:156-163.
- Peschke E, Fauteck JD, Musshoff U, Schmidt F, Beckmann A, Peschke D. Evidence for a melatonin receptor within pancreatic islets of neonate rats: functional, autoradiographic, and molecular investigations. *J Pineal Res* 2000; 28:156-164.
- Peschke E, Mühlbauer E, Musshoff U, Csernus VJ, Chankiewicz E, Peschke D. Receptor (MT(1)) mediated influence of melatonin on cAMP concentration and insulin secretion of rat insulinoma cells INS-1. *J Pineal Res* 2002; 33:63-71.
- Peschke, E.: Über den phylogenetischen Funktionswandel des Pinealorgans und seine Bedeutung für die Insulinsekretion bei Mammalia. *Sitzungsber. Sächs. Akad. Wiss, Math.-nat. Kl., Band 129, Heft 3. S. Hirzel, Stuttgart/Leipzig* 2004. 34 Seiten, 22 Abbildungen.
- Peschke E, Bach AG, Mühlbauer E. Parallel signaling pathways of melatonin in the pancreatic beta-cell. *J Pineal Res* 2006a; 40:184-191.
- Peschke E, Frese T, Chankiewicz E, Peschke D, Preiss U, Schneyer U, Spessert R, Mühlbauer E. Diabetic Goto Kakizaki rats as well as type 2 diabetic patients show a decreased diurnal serum melatonin level and an increased pancreatic melatonin-receptor status. *J Pineal Res* 2006b; 40:135-143.
- Peschke E, Stumpf I, **Bazwinsky I**, Litvak L, Dralle H, Mühlbauer E. Melatonin and type 2 diabetes - a possible link? *J Pineal Res* 2007; 42:350-358.
- Peschke E. Melatonin, endocrine pancreas and diabetes. *J Pineal Res* 2008; 44:26-40.
- Peschke E, Mühlbauer E. New evidence for a role of melatonin in glucose regulation. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2010; 24:829-841.
- Peschke E, Schucht H, Mühlbauer E. 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* 2010; 49:373-381.
- Peschke E, Bähr I, Mühlbauer E. Melatonin and Pancreatic Islets: Interrelationships between Melatonin, Insulin and Glucagon. *Int J Mol Sci* 2013; 14:6981-7015.
- Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 2001; 29:e45.
- Picinato MC, Haber EP, Carpinelli AR, Cipolla-Neto J. Daily rhythm of glucose-induced insulin secretion by isolated islets from intact and pinealectomized rat. *J Pineal Res* 2002a; 33:172-177.
- Picinato MC, Haber EP, Cipolla-Neto J, Curi R, de Oliveira Carvalho CR, Carpinelli AR. Melatonin inhibits insulin secretion and decreases PKA levels without interfering with glucose metabolism in rat pancreatic islets. *J Pineal Res* 2002b; 33:156-160.
- Pochet R, Blachier F, Malaisse W, Parmentier M, Pasteels B, Pohl V, Résibois A, Rogers J, Roman A. Calbindin-D28k in mammalian brain, retina, and endocrine pancreas: immunohistochemical comparison with calretinin. *Adv Exp Med Biol* 1989; 255:435-443.

- Polonsky KS, Sturis J, Van Cauter E. Temporal profiles and clinical significance of pulsatile insulin secretion. *Horm Res* 1998; 49:178-184.
- Popoli M. Synaptotagmin is endogenously phosphorylated by Ca^{2+} /calmodulin protein kinase II in synaptic vesicles. *FEBS Lett* 1993; 317:85-88.
- Portha B. Programmed disorders of beta-cell development and function as one cause for type 2 diabetes? The GK rat paradigm. *Diabetes Metab Res Rev* 2005; 21:495-504.
- Pozo D, Reiter RJ, Calvo JR, Guerrero JM. Inhibition of cerebellar nitric oxide synthase and cyclic GMP production by melatonin via complex formation with calmodulin. *J Cell Biochem* 1997; 65:430-442.
- Prokopenko I, Lanzenberg C, Florez JC et al. Variants in MTNR1B influence fasting glucose levels. *Nat Genet* 2009; 41:77-81.
- Reddy D, Pollock AS, Clark SA, Sooy K, Vasavada RC, Stewart AF, Honeyman T, Christakos S. Transfection and overexpression of the calcium binding protein calbindin-D28k results in a stimulatory effect on insulin synthesis in a rat beta cell line (RIN 1046-38). *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; 94:1961-1966.
- Redecker P, Cetin Y. Rodent pancreatic islet cells contain the calcium-binding proteins calcineurin and calretinin. *Histochem Cell Biol* 1997; 108:133-139.
- Reppert SM, Godson C, Mahle CD, Weaver DR, Slaugenhaupt SA, Gusella JF. Molecular characterization of a second melatonin receptor expressed in human retina and brain: the Mel1b melatonin receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995; 92:8734-8738.
- Reppert SM, Weaver DR, Ebisawa T. Cloning and characterization of a mammalian melatonin receptor that mediates reproductive and circadian responses. *Neuron* 1994; 13:1177-1185.
- Ribar TJ, Epstein PN, Overbeek PA, Means AR. Targeted overexpression of an inactive calmodulin that binds Ca^{2+} to the mouse pancreatic beta-cell results in impaired secretion and chronic hyperglycemia. *Endocrinology* 1995; 136:106-115.
- Roe MW, Worley JF 3rd, Tokuyama Y, Philipson LH, Sturis J, Tang J, Dukes ID, Bell GI, Polonsky KS. NIDDM is associated with loss of pancreatic beta-cell L-type Ca^{2+} channel activity. *Am J Physiol* 1996; 270:E133-E140.
- Romero MP, Garcia-Perganeda A, Guerriero JM, Osuna C. Membrane-bound calmodulin in *Xenopus laevis* oocytes as a novel binding site for melatonin. *FASEB J* 1998; 12:1401-1408
- Rorsman P, Eliasson L, Renström E, Gromada J, Barg S, Göpel S. The Cell Physiology of Biphasic Insulin Secretion. *News Physiol Sci* 2000; 15:72-77.
- Saper CB. An open letter to our readers on the use of antibodies. *J Comp Neurol* 2005; 493:477-478.
- Schuster C, Williams LM, Morris A, Morgan PJ, Barrett P. The human MT1 melatonin receptor stimulates cAMP production in the human neuroblastoma cell line SH-SY5Y cells via a calcium-calmodulin signal transduction pathway. *J Neuroendocrinol* 2005;17:170-178.
- Schwaller B. Cytosolic Ca^{2+} buffers. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2010; 2:a004051.
- Seino S, Shibasaki T, Minami K (2013) Dynamics of insulin secretion and the clinical implications for obesity and diabetes. *J Clinical Invest* 2013; 121:2118-2125.
- Sharp GW. Mechanisms of inhibition of insulin release. *Am J Physiol* 1996; 271 C1781-1799.

- Shaywitz AJ, Greenberg ME. CREB: a stimulus-induced transcription factor activated by a diverse array of extracellular signals. *Annu Rev Biochem* 1999; 68:821-861. Review. Erratum in: *Annu Rev Biochem*. 2003;72:vii.
- Sheynzon P, Korf HW. Targeted deletions of Mel1a and Mel1b melatonin receptors affect pCREB levels in lactotroph and pars intermedia cells of mice. *Neurosci Lett* 2006; 407:48-52.
- Skovhus KV, Bergholdt R, Erichsen C, Sparre T, Nerup J, Karlsen AE, Pociot F. Identification and characterization of secretagogin promoter activity. *Scand J Immunol* 2006; 64:639-645.
- Slominski RM, Reiter RJ, Schlabritz-Loutsevitch N, Ostrom RS, Slominski AT. Melatonin membrane receptors in peripheral tissues: distribution and functions. *Mol Cell Endocrinol* 2012; 351:152-166.
- Sooy K, Schermerhorn T, Noda M, Surana M, Rhoten WB, Meyer M, Fleischer N, Sharp GW, Christakos S. Calbindin-D(28k) controls $[Ca^{(2+) }]_i$ and insulin release. Evidence obtained from calbindin-D(28k) knockout mice and beta cell lines. *J Biol Chem* 1999; 274:34343-34349.
- Stumpf I, **Bazwinsky** I, Peschke E. Involvement of the cGMP pathway in mediating the insulin-inhibitory effect of melatonin in pancreatic beta-cells. *J Pineal Res* 2008; 45:318-327.
- Stumpf I, Bazwinsky I, Peschke E. Modulation of the cGMP signaling pathway by melatonin in pancreatic beta-cells. *J Pineal Res* 2009; 46:140-147.
- Suefuji M, Furukawa N, Matsumoto K, Oiso H, Shimoda S, Yoshinaga T, Matsuyama R, Miyagawa K, Kondo T, Kawashima J, Tsuruzoe K, Araki E. The impact of Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase II on insulin gene expression in MIN6 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2012; 421:801-807.
- Sugden MC, Christie MR, Ashcroft SJ. Presence and possible role of calcium-dependent regulator (calmodulin) in rat islets of Langerhans. *FEBS Lett* 1979; 105:95-100.
- Tabuchi H, Yamamoto H, Matsumoto K, Ebihara K, Takeuchi Y, Fukunaga K, Hiraoka H, Sasaki Y, Shichiri M, Miyamoto E. Regulation of insulin secretion by overexpression of Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase II in insulinoma MIN6 cells. *Endocrinology* 2000; 141:2350-2360.
- Takahashi N, Kadowaki T, Yazaki Y, Ellis-Davies GC, Miyashita Y, Kasai H. Post-priming actions of ATP on Ca^{2+} -dependent exocytosis in pancreatic beta cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96:760-765. Erratum in: *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96:3330.
- Taskén K, Aandahl EM. Localized effects of cAMP mediated by distinct routes of protein kinase A. *Physiol Rev* 2004; 84:137-167.
- Thongboonkerd V, Zheng S, McLeish KR, Epstein PN, Klein JB. Proteomic identification and immunolocalization of increased renal calbindin-D28k expression in OVE26 diabetic mice. *Rev Diabet Stud* 2005; 2:19-26.
- Unfried C, Burbach G, Korf HW, von Gall C. Melatonin receptor 1-dependent gene expression in the mouse pars tuberalis as revealed by cDNA microarray analysis and in situ hybridization. *J Pineal Res* 2010; 48:148-156.
- Váradi A, Molnár E, Ostenson CG, Ashcroft SJ. Isoforms of endoplasmic reticulum $Ca^{(2+)}$ -ATPase are differentially expressed in normal and diabetic islets of Langerhans. *Biochem J* 1996; 319:521-527.
- Vest RS, Davies KD, O'Leary H, Port JD, Bayer KU. Dual mechanism of a natural CaMKII inhibitor. *Mol Biol Cell* 2007; 18:5024-5033.

- von Gall C, Weaver DR, Kock M, Korf HW, Stehle JH. Melatonin limits transcriptional impact of phosphoCREB in the mouse SCN via the Mel1a receptor. *Neuroreport* 2000; 11:1803-1807.
- von Gall C, Weaver DR, Moek J, Jilg A, Stehle JH, Korf HW. Melatonin plays a crucial role in the regulation of rhythmic clock gene expression in the mouse pars tuberalis. *Ann N Y Acad Sci* 2005; 1040:508-511.
- Wagner L, Oliyarnyk O, Gartner W, Nowotny P, Groeger M, Kaserer K, Waldhäusl W, Pasternack MS. Cloning and expression of secretagogin, a novel neuroendocrine- and pancreatic islet of Langerhans-specific Ca²⁺ binding protein. *J Biol Chem* 2000; 275:24740-24751.
- Waldhäusl W, Lenzen S. Kapitel 14. Kohlenhydratstoffwechsel, In: Schwarz S, Förster O, Peterlik M, Schauenstein K, Wick G, ed (Hrsg). *Pathophysiologie – Molekulare, zelluläre, systemische Grundlage von Erkrankungen*. Wien, Wilhelm Maudrich Verlag, 2007.
- Wang L, Bhattacharjee A, Fu J, Li M. Abnormally expressed low-voltage-activated calcium channels in beta-cells from NOD mice and a related clonal cell line. *Diabetes* 1996; 45:1678-1683.
- Wayman GA, Tokumitsu H, Davare MA, Soderling TR. Analysis of CaM-kinase signaling in cells. *Cell Calcium* 2011; 50:1-8.
- Welp A, Manz B, Peschke E. Development and validation of a high throughput direct radioimmunoassay for the quantitative determination of serum and plasma melatonin (N-acetyl-5-methoxytryptamine) in mice. *J Immunol Methods* 2010; 358:1-8.
- Wenham RM, Landt M, Easom RA. Glucose activates the multifunctional Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II in isolated rat pancreatic islets. *J Biol Chem* 1994; 269:4947-4952.
- Wenham RM, Landt M, Walters SM, Hidaka H, Easom RA. Inhibition of insulin secretion by KN-62, a specific inhibitor of the multifunctional Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II. *Biochem Biophys Res Commun* 1992; 189:128-133.
- Wicht H, Maronde E, Olcese J, Korf HW. A semiquantitative image-analytical method for the recording of dose-response curves in immunocytochemical preparations. *J Histochem Cytochem* 1999; 47:411-420.
- Wollheim CB, Maechler P. Beta-cell mitochondria and insulin secretion: messenger role of nucleotides and metabolites. *Diabetes* 2002; 51:S37-42.
- Yamamoto H, Matsumoto K, Araki E, Miyamoto E. New aspects of neurotransmitter release and exocytosis: involvement of Ca²⁺/calmodulin-dependent phosphorylation of synapsin I in insulin exocytosis. *J Pharmacol Sci* 2003; 93:30-34.
- Zaitsev S, Efanova I, Ostenson CG, Efendić S, Berggren PO. Delayed Ca²⁺ response to glucose in diabetic GK rat. *Biochem Biophys Res Commun* 1997; 239:129-133.
- Zhang X, Odom DT, Koo SH, Conkright MD, Canettieri G, Best J, Chen H, Jenner R, Herbolsheimer E, Jacobsen E, Kadam S, Ecker JR, Emerson B, Hogenesch JB, Unterman T, Young RA, Montminy M. Genome-wide analysis of cAMP-response element binding protein occupancy, phosphorylation, and target gene activation in human tissues. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102:4459-4464.
- Ziff EB. Transcription factors: a new family gathers at the cAMP response site. *Trends Genet* 1990; 6:69-72.
- Zylka-Menhorn V. Diabetes mellitus: Kinder und Jugendliche bedürfen einer engmaschigen Betreuung. *Dtsch Arztebl* 2012; 109(50): A-2523/B-2065/C-20.

7 THESEN

Die pankreatische β -Zelle der LANGERHANSschen Insel der Bauchspeicheldrüse von Säugetieren verfügt über ein Netzwerk von Calciumsignalwegen, die entscheidend die Insulinausschüttung beeinflussen. Calciumsignalproteine wie Calcium-bindende Proteine (CaBPs) repräsentieren einen integralen Bestandteil dieser Netzwerke.

1) Die CaBPs Calbindin-D28k, Secretagogen, Calreticulin und Calmodulin sind im Pankreasgewebe vom Säugetier (Mensch, Ratte, Maus) vorherrschend in der pankreatischen Insel lokalisiert, wobei die CaBPs durch differentielle Verteilungsmuster in der Immunmarkierung einer pankreatischen Insel gekennzeichnet sind.

2) In den pankreatischen Inseln kommen alle CaBPs nachweislich in der β -Zelle vor. Immunhistochemisch und molekularbiologisch konnte in den Ratteninsulinomazellen INS-1, einem anerkannten β -Zellmodell, das Vorkommen der CaBPs reproduziert werden. Ergänzende Immunogoldmarkierungen am Pankreasgewebe zeigen die Dominanz einzelner CaBPs in bestimmten Zellkompartimenten.

3) Von den im Pankreasgewebe untersuchten CaBPs gehört Calmodulin zu den CaBPs mit hohem Expressionsniveau in isolierten pankreatischen Inseln der Ratte und in den INS-1 Zellen.

4) Der molekularbiologische und immunhistochemische Nachweis der CaBPs in den pankreatischen Inseln von Typ-2-diabetischen Goto-Kakizaki-Ratten im Vergleich zu normoglykämischen Wistar-Ratten belegt eine Alteration in ihrer Expression. Es sind eine erhöhte Expression und veränderte immunhistochemische Verteilungsmuster nachweisbar, die im Zusammenhang mit einer diabetischen Stoffwechsellage bzw. Typ-2-Diabetes assoziierten Änderungen stehen.

Zu den für die Signalwegbeziehungen der pankreatischen Insel bedeutsamen CaBPs gehört das Calmodulin, das über seine Interaktion mit den Calcium/Calmodulin-abhängigen Proteinkinasen (CAMKs) die Insulinsekretion reguliert. Die Insulinsekretion wiederum wird über das epiphysäre Neurohormon Melatonin beeinflusst. Melatonin übt, mediiert über Gi-gekoppelte Melatoninrezeptor-Isoformen (MT1, MT2), einen überwiegend hemmenden Einfluss auf die stimulierte Insulinsekretion aus.

5) Die Analyse von Transkripten verschiedener Isoformen bzw. Typen von Camks ergab differierende Expressionsniveaus in der pankreatischen Ratteninsel und in der INS-1 Zelle. Immunhistochemische Markierungen der CAMK2D und CAMKIV belegen eine vorrangig auf die pankreatische Insel beschränkte Lokalisation.

6) Unter Einsatz von cAMP- und Insulinsekretions-steigernden Substanzen werden die Transkriptmengen von Camk2d und CamkIV in INS-1 Zellen nach 6 h (und auch nach

kürzeren Einwirkungszeiten) signifikant erhöht, während unter gleichzeitiger Applikation von Melatonin eine signifikante Abnahme der Transkriptmengen messbar ist, die mit einer signifikanten Verminderung der Insulinsekretion in denselben Zellen koinzidiert. Die Gabe von Melatoninrezeptor-Antagonisten hebt die Effekte wieder auf.

7) Unter Verwendung eines CAMK2D-ELISAs konnte erstmals für die pankreatische β -Zelle gezeigt werden, dass sich die zuvor durch Melatonin verursachten transkriptionellen Effekte bis auf die Proteinebene von CAMK2D reproduzieren lassen.

8) In gentechnisch veränderten INS-1 Zellen, mit heterologer Expression des humanen MT2-Rezeptors, konnte ein signifikant verstärkter inhibitorischer Einfluss von Melatonin unter Einwirkung von cAMP- und Insulinsekretions-steigernden Substanzen auf die Camk2d- und CamkIV-Transkripte gemessen werden. Dies bestätigt, dass Melatonin Rezeptor-mediiert die Transkriptmengen beeinflusst, jedoch die Einflusskraft von der Expressionshöhe einer Melatoninrezeptor-Isoform (hier MT2) abhängt.

9) In den Pankreata von Melatoninrezeptor-*knockout*-Mäusen führt das Fehlen einer oder beider Melatoninrezeptor-Isoformen zu signifikanten Transkriptmengen-änderungen im Vergleich zur Wildtyp-Maus, z. B. induziert der MT1-Rezeptorverlust eine Erhöhung des Camk2d-Transkripts. Dies deutet auf eine Abhängigkeit der Transkriptexpression von der Präsenz der jeweiligen Melatoninrezeptor-Isoform.

10) Eine alleinige Applikation von Melatonin auf die INS-1 Zellen über verschiedene Zeiträume führt nur zu einer Veränderung der CamkIV-Transkriptmengen während die Camk2d-Transkriptniveaus davon unbeeinflusst bleiben.

Für Änderungen in der Genexpression, wie sie zuvor für Camk2d- und CamkIV-Transkripte dokumentiert werden, sind Transkriptionsfaktoren, wie beispielsweise das *cyclic AMP-response element-binding protein* (CREB), verantwortlich. Der durch Phosphorylierung über die Proteinkinase A (cAMP-Signalweg) aktivierte Transkriptionsfaktor CREB (pCREB) bindet an eine im Gen enthaltene sogenannte CRE-Sequenz.

11) Pharmakologische Substanzen, welche cAMP- und Insulinsekretions-steigernd wirken, induzieren konzentrationsabhängig eine Erhöhung der pCREB-Immunreaktivität in den Zellkernen von INS-1 Zellen. Die gleichzeitige Gabe von Melatonin während einer solchen Stimulation der INS-1 Zellen vermindert signifikant die Phosphorylierung von CREB nach 15 min, 30 min, 1 h und 3 h.

12) Verschiedene Melatoninrezeptor-Antagonisten heben diese senkende Wirkung von Melatonin auf pCREB wieder auf. Dies spricht für einen Rezeptor-vermittelten Effekt von Melatonin auf die Phosphorylierung von CREB.

13) In hMT2-INS-1 Zellen, gentechnisch veränderten INS-1 Zellen mit heterologer Expression des humanen MT2-Rezeptors, ist eine stärkere Abnahme von pCREB unter Melatonineinwirkung feststellbar. Dies ist von funktioneller Bedeutung, da bei einer diabetischen Stoffwechsellaage die Melatoninrezeptoren generell erhöhte Expressionsniveaus aufweisen.

14) Der *knockdown* des MT1-Rezeptors der INS-1 Zelle mittels eines stabil im Genom integrierten *antisense*-RNA codierenden Vektors (rMT1-*knockdown* INS-1 Zellen) vermindert den inhibierenden Einfluss von Melatonin auf pCREB. Der noch verbleibende hemmende Effekt auf pCREB wird über MT2-Rezeptoren vermittelt. Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass die Melatonin-bedingte Hemmung von pCREB über beide Melatoninrezeptor-Isoformen (MT1 und MT2) vermittelt wird.

Zusammengefasst implizieren die Ergebnisse, dass Melatonin über den cAMP/PKA/CREB-Signalweg Calciumsignalkomponenten in der pankreatischen β -Zelle beeinflussen kann, die am Mechanismus der Insulinsynthese und Insulinsekretion beteiligt sind, wie die hier untersuchten Camk2d und CamkIV. Damit hat Melatonin die Möglichkeit, indirekt *via* CREB und konsekutiv über die Calcium/Calmodulin-abhängige Signalkaskade, die Insulinfreisetzung zu steuern.

Die Aufklärung von Interaktionsprinzipien im Signalnetzwerk der pankreatischen β -Zelle, die im Zusammenhang mit der Insulinfreisetzung stehen, und ihre Beeinflussung durch externe Faktoren wie Melatonin ist die Voraussetzung für die langfristige Entwicklung von Ansätzen zur Behandlung des *Diabetes mellitus*, insbesondere des Typ-2-Diabetes.

ANLAGEN

CURRICULUM VITAE Dr. rer. nat. Ivonne Bazwinsky-Wutschke, geb. Bazwinsky
geboren am 21.11.1974 in Weißenfels
verheiratet mit Torsten Wutschke

Schulbildung und Studium

1981 - 1990	Zehnklassige Allgemeinbildende Oberschule in Lützen
1990 - 1991	Wechsel in die Leistungsklasse der Erweiterten Oberschule Johann Wolfgang von Goethe in Weißenfels
1991 - 1993	Ausbildung am Gustav-Adolf-Gymnasium in Lützen und Erwerb der allgemeinen Hochschulreife im Juni 1993
Okt. 1993 - Dez. 1998	Diplomstudiengang Biologie an der Universität Leipzig, Fakultät für Biowissenschaften, Pharmazie und Psychologie
Juli - Aug. 1997	Diplomprüfung in den Schwerpunktfächern Neurobiologie, Immunbiologie, Tierphysiologie sowie im Nebenfach Biochemie
ab Okt. 1997	Mitarbeiterin der Arbeitsgruppe Neurobiologie unter Leitung von Herrn Prof. Rübsamen am Institut für Biowissenschaften, Pharmazie und Psychologie der Universität Leipzig
Jan. 1998 - Dez. 1998	Anfertigung der Diplomarbeit in der Arbeitsgruppe Neurobiologie unter Anleitung von Herrn Prof. Rübsamen
Jan. 1999 - April 2003	Dissertation in der Arbeitsgruppe Neurobiologie unter Leitung von Herrn Prof. Rübsamen
September 2003	Promotionsverteidigung

Berufstätigkeit

Juni 2003 - März 2004	wissenschaftliche Mitarbeiterin der Arbeitsgruppe Chronoendokrinologie unter Leitung von Herrn Prof. E. Peschke am Institut für Anatomie und Zellbiologie der MLU Halle-Wittenberg
April 2004 - März 2010	wissenschaftliche Assistentin (C1) am Institut für Anatomie und Zellbiologie der MLU Halle-Wittenberg (Arbeitsgruppe: Prof. Peschke)
ab April 2010	wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Anatomie und Zellbiologie der MLU Halle-Wittenberg (Arbeitsgruppe Prof. Peschke und seit 2012 Arbeitsgruppe Prof. Dehghani)
September 2011	Qualifikation und Abschlussprüfung zur Fachanatomin

Selbständigkeitserklärung und Erklärung über frühere Habilitationsversuche

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Quellen und Hilfsmittel angefertigt habe. Ein Habilitationsverfahren wurde bislang an einer anderen Fakultät oder Universität weder eröffnet noch beantragt. Frühere Habilitationsverfahren an der Martin-Luther-Universität sind meinerseits nicht unternommen worden.

Halle, den 14.04.2014

.....

Dr. rer. nat Ivonne Bazwinsky-Wutschke

DANKSAGUNG

Sehr herzlich danke ich Herrn Prof. Elmar Peschke für die uneingeschränkte Unterstützung und intensive Förderung meiner wissenschaftlichen Projekte. Besonders sei ihm und Frau Prof. Dorothee Peschke gedankt für die intensive Betreuung während meiner Anatomieausbildung. Beide sind in ihrem persönlichem Engagement, ihrer exzellenten Fachkompetenz und ihrem Enthusiasmus in Forschung und Lehre für mich immer ein Vorbild und Maßstab. Insbesondere Frau Prof. Peschke möchte ich an dieser Stelle nochmals für Ihre persönliche und intensive Betreuung während meiner ersten „Gehversuche“ im Präparierkurs Danke sagen.

Zu den Personen, die mir stets mit Rat und Tat zur Seite standen, ist besonders Dr. Eckhard Mühlbauer hervorzuheben. Seine Hilfsbereitschaft und die konstruktive Kritik bei allen auftretenden Problemen, aber auch seine menschliche Seite haben zum Gelingen vieler Publikationen ganz wesentlich beigetragen.

Mein ganz besonderer Dank geht an Dr. Liudmila Litvak für Ihre Unterstützung bei den Immunogoldmarkierungen und an Dr. Sabine Wolgast für Ihre Hilfe bei der Westernblottechnik. Ein Riesendankeschön auch den medizinisch-technischen Assistentinnen, Candy Rothgänger, Diana Rarisch, Annika Jordan und Beate Heydel. Sie alle haben mich über die Jahre eng begleitet und immer stark unterstützt.

Herrn Professor Dr. Dr. Bernd Fischer, Direktor am Institut für Anatomie und Zellbiologie, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, danke ich herzlich für die freundliche Unterstützung meines Habilitationsvorhaben.

Ein sehr herzlicher Dank geht an Herrn Prof. Faramarz Dehghani, der mein weiteres Qualifikationsvorhaben im Endstadium uneingeschränkt unterstützt hat und immer wieder motivierend auf mich einwirkte. Ich bin ihm dankbar für viele wertvolle Hinweise, aber auch konstruktive Kritik.

Herrn Prof. Wollheim (Faculty of Medicine, Lund University, Geneva, Schweiz) danke ich für die freundliche Überlassung der INS-1 Zellen.

Ich möchte an dieser Stelle die Möglichkeit nutzen, mich bei all jenen zu bedanken, die mich in den letzten Jahren unterstützt haben:

Frau Prof. Heike Kielstein danke ich ganz herzlich für Ihr Vertrauen und für die Möglichkeit eigenverantwortlich die Studierenden der Zahnmedizin ausbilden zu dürfen.

Herrn Prof. Rüdiger Schultka danke ich für die vielen anatomisch-fachlichen Hilfestellungen und sein Interesse am Fortgang meiner Arbeit.

Herrn Prof. Rübsamen (Universität Leipzig, Fakultät für Biowissenschaften, Pharmazie und Psychologie, Institut für Biologie) danke ich, dass er mir die Welt der Calcium-bindenden Proteine frühzeitig eröffnet und mich für wissenschaftliche Fragen begeistert hat.

Danke an Frau PD Dr. Göbbel, der ich in tiefer Freundschaft sehr verbunden bin. Sie ist für mich ein Vorbild als Mensch, aber auch in der akribischen Art ihrer akademischen Wissensvermittlung und ihrer Forschung.

An dieser Stelle möchte ich auch den Präparator(inn)en, insbesondere Achim Heine und Jana Gräfenhain danken, die jederzeit meine Wünsche im Präparierkurs berücksichtigt haben und auf deren Unterstützung ich jederzeit zählen konnte.

Für finanzielle Unterstützung danke ich der Sächsischen Akademie der Wissenschaften zu Leipzig, da zahlreiche Untersuchungen im Rahmen des Akademieprojektes „Zeitstrukturen endokriner Systeme“ durchgeführt wurden. Der Medizinischen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle danke ich für die finanzielle Unterstützung im Rahmen einer Roux-Anschubförderung des Wilhelm-Roux-Programms.

Mein ganz besonderer und tiefverbundener Dank geht an dieser Stelle an meinen Mann Torsten und meine Eltern (Bernhard und Ilona Bazwinsky), die mir immer zur Seite gestanden haben, wenn ich das Gefühl hatte, die sich vor mir auftürmenden Hürden nicht überwinden zu können.

THEMATISCH RELEVANTE EIGENE PUBLIKATIONEN

- Bazwinsky I**, Hilbig H, Bidmon H-J, Rübsamen R. Characterization of the human superior olivary complex by calcium binding proteins and neurofilament H (SMI-32). *J Comp Neurol* 2003; 456:292-303. *IF 2003: 3,672*
- Bazwinsky I**, Bidmon H-J, Zilles K, Hilbig H. Characterization of the rhesus monkey superior olivary complex by calcium binding proteins and synaptophysin. *J Anat* 2005; 207:745-761. *IF 2005: 2,010*
- Chankiewitz E, Peschke D, Herberg L, **Bazwinsky I**, Mühlbauer E, Brömme HJ, Peschke E. Did the gradual loss of GLUT2 cause a shift to diabetic disorders in the New Zealand obese mouse (NZO/HI)? *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 2006; 114:262-269. *IF 2006: 1,36*
- Frese T, **Bazwinsky I**, Mühlbauer E, Peschke E. Circadian and age-dependent expression patterns of GLUT2 and glucokinase in the pancreatic β -cell of diabetic and nondiabetic rats. *Horm Metab Res* 2007; 39:567-574. *IF 2007: 2,254*
- Mühlbauer E, **Bazwinsky I**, Wolgast S, Klemenz A, Peschke E. Circadian changes of ether-a-go-go-related-gene (Erg) potassium channel transcripts in the rat pancreas and β -cell. *Cell Mol Life Sci* 2007; 64:768-780. *IF 2007: 5,239*
- Peschke E, Stumpf I, **Bazwinsky I**, Litvak L, Dralle H, Mühlbauer E. Melatonin and type 2 diabetes – a possible link? *J Pineal Res* 2007; 42:350-358. *IF 2007: 4,098*
- Bazwinsky I**, Härtig W, Rübsamen R. Characterization of cochlear nucleus principal cells of *Meriones unguiculatus* and *Monodelphis domestica* by use of calcium-binding protein immunolabeling. *J Chem Neuroanat* 2008; 35:158-174. *IF 2008: 2,58*
- Peschke E, Wolgast S, **Bazwinsky I**, Pönicke S, Mühlbauer E. Increased melatonin synthesis in pineal glands of rats in streptozotocin induced type 1 diabetes. *J Pineal Res* 2008; 45:439-448. *IF 2008: 5,056*
- Bazwinsky-Wutschke I**, Mühlbauer E, Wolgast S, Peschke E. Transcripts of calcium/calmodulin-dependent kinases are changed after forskolin- or IBMX-induced insulin secretion due to melatonin treatment of rat insulinoma β -cells (INS-1). *Horm Metab Res* 2009; 41:805-813. *IF 2009: 2,686*
- Stumpf I, **Bazwinsky I**, Peschke E. Modulation of the cGMP signaling pathway by melatonin in pancreatic β -cells. *J Pineal Res* 2009; 46:140-147. *IF 2009: 5,209*
- Bazwinsky-Wutschke I**, Wolgast S, Mühlbauer E, Peschke E. Distribution patterns of calcium-binding proteins in pancreatic tissue of non-diabetic as well as type 2 diabetic rats and in rat insulinoma β -cells (INS-1). *Histochem Cell Biol* 2010; 134:115-127. *IF 2010: 4,727*
- Bazwinsky-Wutschke I**, Paulsen F, Stövesandt D, Holzhausen H-J, Heine H-J, Peschke E. Anatomical changes after pneumonectomy. *Ann Anat* 2011; 193:168-172. *IF 2011: 1,861*
- Mühlbauer E, Albrecht E, Hofmann K, **Bazwinsky-Wutschke I**, Peschke E. Melatonin inhibits insulin secretion in rat insulinoma β -cells (INS-1) heterologously expressing the human melatonin receptor isoform MT2. *J Pineal Res* 2011; 51:361-372. *IF 2011: 5,794*

- Bähr I, **Bazwinsky-Wutschke** I, Wolgast S, Hofmann K, Streck S, Mühlbauer E, Wedekind D, Peschke E. Glut4 in the endocrine pancreas – indicating an impact in pancreatic islet cell physiology? *Horm Metab Res* 2012; 44:442-450.
IF 2012: 2,145
- Bazwinsky-Wutschke** I, Wolgast S, Mühlbauer E, Albrecht E, Peschke E. Phosphorylation of cyclic AMP-response element-binding protein (CREB) is influenced by melatonin treatment in pancreatic rat insulinoma β -cells (INS-1). *J Pineal Res* 2012; 53:344-357.
IF 2012: 7,304
- Mühlbauer E*, **Bazwinsky-Wutschke** I*, Wolgast S, Labucay K, Peschke E. Differential and day-time dependent expression of nuclear receptors ROR α , ROR β , ROR γ and RXR α in the rodent pancreas and islet. *Mol Cell Endocrinol* 2013; 365:129-138. ***Authors equally contributed to the manuscript.**
IF 2012: 4,039
- Mühlbauer E, Albrecht E, **Bazwinsky-Wutschke** I, Peschke E. Melatonin influences insulin secretion primarily via MT(1) receptors in rat insulinoma cells (INS-1) and mouse pancreatic islets. *J Pineal Res* 2012; 52:446-459.
IF 2012: 7,304
- Bazwinsky-Wutschke** I, Bieseke L, Mühlbauer E, Peschke E. Influence of melatonin receptor signalling on parameters involved in blood glucose regulation. *J Pineal Res* 2014; 56:82-96.
IF 2012: 7,304
- Bazwinsky-Wutschke** I, Mühlbauer E, Albrecht E, Peschke E. Calcium-signaling components in rat insulinoma β -cells (INS-1) and pancreatic islets are differentially influenced by melatonin. (eingereicht)

Transcripts of calcium/calmodulin-dependent kinases are changed after forskolin- or IBMX-induced insulin secretion due to melatonin treatment of rat insulinoma β -cells (INS-1)

I. Bazwinsky-Wutschke, E. Mühlbauer, S. Wolgast and E. Peschke

ABSTRACT

The objective of the present study was to examine the effects of melatonin on transcripts of isoforms of calcium/calmodulin-dependent protein kinases in rat insulinoma β -cells INS-1. Investigations show that calcium/calmodulin-dependent kinase IV and calcium/calmodulin-dependent kinase 2d are expressed in human and rat pancreatic islets and INS-1 cells. By application of either forskolin or 3-isobutyl-1-methylxanthine for 6 hours, calcium spiking was evoked and the release of insulin was increased. The expression of the calcium/calmodulin-dependent kinase IV and calcium/calmodulin-dependent kinase 2d transcripts was significantly increased due to forskolin or 3-isobutyl-1-methylxanthine. Acute melatonin treatment (6 h) in the presence of either forskolin or 3-isobutyl-1-methylxanthine caused a significant decrease in insulin release and induced significant downregulation of calcium/calmodulin-dependent kinase IV and calcium/calmodulin-dependent kinase 2d transcripts in INS-1 batch cultures. The attenuating effect of melatonin on transcripts could be almost completely reversed by preincubation with the melatonin receptor antagonist luzindole. Thus, the insulin-inhibiting effect of melatonin in INS-1 cells is associated with significant changes in transcripts of calcium-signaling components suggesting that melatonin influences gene expression of components, which are known to be involved in insulin secretion or insulin gene expression.

Bazwinsky-Wutschke I, Mühlbauer E, Wolgast S, Peschke E. Transcripts of calcium/calmodulin-dependent kinases are changed after forskolin- or IBMX-induced insulin secretion due to melatonin treatment of rat insulinoma β -cells (INS-1). *Horm Metab Res* 2009; 41:805-813. doi: 10.1055/s-0029-1225631.

Distribution patterns of calcium-binding proteins in pancreatic tissue of non-diabetic as well as type 2 diabetic rats and in rat insulinoma *beta*-cells (INS-1)

I. Bazwinsky-Wutschke, S. Wolgast, E. Mühlbauer and E. Peschke

ABSTRACT

The present study dealt with the localization of different calcium-binding proteins (CaBPs) in the pancreatic tissue of non-diabetic and diabetic rats and in rat insulinoma-cells (INS-1). Transcripts of CaBPs displayed different expression levels in rat pancreatic tissue and INS-1 cells. Immunohistochemistry demonstrated that three of these proteins, calmodulin, calreticulin and calbindin-D28k, were located predominantly in the pancreatic islets (in both α - and β -cells) of rats, showing weaker labeling of exocrine tissue. Secretagogin was exclusively found within islets. All CaBPs were also immunohistochemically detected in INS-1 cells. Immunohistochemical analysis demonstrates differences in CaBP distributions when comparing the pancreatic tissues of diabetic Goto-Kakizaki rats and non-diabetic Wistar rats. Pancreatic tissue in type 2 diabetic Goto-Kakizaki rats showed significantly higher transcript levels of all CaBPs compared to those in Wistar rats. These results indicate that alterations of CaBPs in pancreatic islets are associated with metabolic disturbances related to type 2 diabetes.

Bazwinsky-Wutschke I, Wolgast S, Mühlbauer E, Peschke E. Distribution patterns of calcium-binding proteins in pancreatic tissue of non-diabetic as well as type 2 diabetic rats and in rat insulinoma β -cells (INS-1). *Histochem Cell Biol* 2010; 134:115-127. doi: 10.1007/s00418-010-0721-y.

Calciumsignalkomponenten der pankreatischen Insel unter dem Einfluss von Melatonin

I. Bazwinsky-Wutschke, E. Mühlbauer, L. Litvak and E. Peschke

ABSTRACT

Die pankreatische β -Zelle der LANGERHANSschen Insel verfügt über ein Netzwerk von Calciumsignalwegen, die entscheidend für die Insulinausschüttung und Insulinbiosynthese sind. Die Signaltransduktion und Wirksamkeit von intrazellulären Calciumsignalen hängt maßgeblich von Calciumsignalkomponenten wie den folgenden Calcium-bindenden Proteinen (CaBPs) ab: Calbindin-D28k (CALB), Secretagogin (SCGN), Calmodulin (CALM) und Calreticulin (CALR). CALM im Besonderen vermittelt seine Effekte auf die Insulinsekretion und Insulinbiosynthese über die Bindung an Calcium/Calmodulin-abhängige Kinasen (CAMKs). CaBPs und CAMKs im pankreatischen Gewebe und in Insulinoma- β -Zellen (INS1) der Ratte nachzuweisen, war das erste Ziel der vorliegenden Studie. Untersuchungen aus der eigenen Arbeitsgruppe dokumentierten erstmalig einen Melatonin-vermittelten Einfluss auf die Insulinausschüttung. Rezeptor-mediert führt Melatonin in Abhängigkeit des genutzten Signalwegs vor allem zu einer Absenkung der Insulinausschüttung. Die Klärung der Frage, ob Calciumsignalkomponenten – mit Fokussierung auf Isoformen der CAMKs (CamkIV, Camk2d) – an der Vermittlung dieses Effektes beteiligt sind, beinhaltete den zweiten Teil der Studie.

Bazwinsky-Wutschke I, Mühlbauer E, Litvak L, Peschke E. Calciumsignalkomponenten der pankreatischen Insel unter dem Einfluss von Melatonin. Nova Acta Leopold NF 114 2011; 389:207-213.

Phosphorylation of cyclic AMP-response element-binding protein (CREB) is influenced by melatonin treatment in pancreatic rat insulinoma β -cells (INS-1)

I. Bazwinsky-Wutschke, S. Wolgast, E. Mühlbauer, E. Albrecht and E. Peschke

ABSTRACT

The pineal hormone melatonin exerts its influence on the insulin secretion of pancreatic islets by a variety of signalling pathways. The purpose of the present study was to analyse the impact of melatonin on the phosphorylated transcription factor cAMP-response element-binding protein (pCREB). In pancreatic rat insulinoma β -cells (INS-1), pCREB immunofluorescence intensities in cell nuclei using digitised confocal image analysis were measured to semi-quantify differences in the pCREB immunoreactivity (pCREB-ir) caused by different treatments. Increasing concentrations of forskolin or 3-isobutyl-1-methylxanthine (IBMX) resulted in a dose-dependent rise of the mean fluorescence intensity in pCREB-ir nuclear staining. Concomitant melatonin application significantly decreased pCREB-ir in INS-1 cells after 30-min, 1-hr and 3-hr treatment. The melatonin receptor antagonists luzindole and 4-phenyl-2-propionamidotetraline (4P-PDOT) completely abolished the pCREB phosphorylation-decreasing effect of melatonin, indicating that both melatonin receptor isoforms (MT1 and MT2) are involved. In a transfected INS-1 cell line expressing the human MT2 receptor, melatonin caused the greatest reduction in pCREB after IBMX treatment compared with nontransfected INS-1 cells, indicating a crucial influence of melatonin receptor density on pCREB regulation. Furthermore, the downregulation of pCREB by melatonin is concomitantly associated with a statistically significant downregulation of Camk2d transcript levels, as measured after 3 hr. In conclusion, the present study provides evidence that the phosphorylation level of CREB is modulated in pancreatic β -cells by melatonin. Mediated via CREB, melatonin regulates the expression of genes that play an important functional role in the regulation of β -cell signalling pathways.

Bazwinsky-Wutschke I, Wolgast S, Mühlbauer E, Albrecht E, Peschke E. Phosphorylation of cyclic AMP-response element-binding protein (CREB) is influenced by melatonin treatment in pancreatic rat insulinoma β -cells (INS-1). *J Pineal Res* 2012; 53:344-357. doi: 10.1111/j.1600-079X.2012.01004.x.

Influence of melatonin receptor signalling on parameters involved in blood glucose regulation

I. Bazwinsky-Wutschke, L. Bieseke, E. Mühlbauer and E. Peschke

ABSTRACT

The pineal hormone melatonin is known to influence insulin secretion via the G-protein-coupled receptor isoforms MT1 and MT2. The present study was aimed to further elucidate the impact of melatonin on blood glucose regulation. To this end, mouse lines were used, in which one of the two or both melatonin receptors were deleted. In comparison with wild-type mice of the same age (8-12 months old), increased plasma insulin and melatonin levels and decreased blood glucose levels and body weights were detected in the MT1- and double-knockout lines. The elimination of melatonin receptor signalling also altered blood glucose concentrations, body weight and melatonin and insulin levels when comparing wild-type and receptor knockout mice of different ages (6 wk and 8-12 months old); such changes, however, were dependent on the type of receptor deleted. Furthermore, reverse transcription polymerase chain reaction results provided evidence that melatonin receptor deficiency has an impact on transcript levels of pancreatic islet hormones as well as on pancreatic and hepatic glucose transporters (Glut1 and 2). Under stimulated insulin secretion in the presence of melatonin in the rat insulinoma β -cells INS-1, the Glut1 transcript level was decreased. In conclusion, the present findings demonstrate that melatonin receptor knockout types affect blood glucose levels, body weight, plasma levels of melatonin and insulin, as well as pancreatic hormone and Glut1 expression in significantly different manners.

Bazwinsky-Wutschke I, Bieseke L, Mühlbauer E, Peschke E. Influence of melatonin receptor signalling on parameters involved in blood glucose regulation. *J Pineal Res* 2014; 56:82-96. doi: 10.1111/jpi.12100