

## Rezeptor vermittelte Einflüsse von Melatonin auf die second messenger cAMP, cGMP und IP3 pankreatischer $\beta$ -Zellen sowie Insulin-Melatonin-Interaktionen

### Einleitung und Rückblick

Im Jahre 2003 erschien in einem ersten Endokrinologie-Band in den Abhandlungen der Sächsischen Akademie der Wissenschaften zu Leipzig der Übersichtsartikel: „Zum Einfluss von Melatonin auf Insulinsekretion, Signaltransduktion und Sekretionsrhythmik pankreatischer  $\beta$ -Zellen *in vitro*“ (Peschke, 2003a). Vier Jahre später, im Jahre 2007, konnte im dritten Endokrinologie-Band ein weiterer Übersichtsartikel „Funktionelle Beziehungen zwischen Melatonin und Insulin – Untersuchungsergebnisse an stoffwechselgesunden und diabetischen Versuchstieren und Patienten“ publiziert werden (Peschke und Mühlbauer, 2007). Im vorliegenden Beitrag des vierten Bandes werden einleitend zurückliegende Darstellungen kurz referiert soweit sie für das Verständnis der hier mitgeteilten neuen Befunde unverzichtbar sind. Dabei wird (1.) zunächst noch einmal auf die Melatonin-Rezeptorausstattung der pankreatischen  $\beta$ -Zelle eingegangen, weil dieser Themenkreis gegenwärtig – von hoher Aktualität – im Focus internationalen Interesses steht, wobei die von uns in den zurückliegenden Jahren publizierten Ergebnisse zum Nachweis von Melatonin-Rezeptoren der pankreatischen  $\beta$ -Zelle unter Akzeptanz unserer Erstbeschreibung bestätigt werden.

Ferner soll (2.) in der vorliegenden Übersicht auf Signalkaskaden der  $\beta$ -Zelle eingegangen werden, über die Melatonin Rezeptor-mediert seinen Einfluss auf die Insulinsekretion ausübt. Zurückliegend wurden die *second messenger*-Systeme cAMP (cyclisches Adenosinmonophosphat) und IP3 (Inositoltriphosphat) in ihrer Bedeutung für die Vermittlung von Melatonineinflüssen auf die Insulinsekretion charakterisiert und beschrieben. Aus diesem Grunde werden diese beiden Systeme hier nur exemplarisch berücksichtigt. In der Zwischenzeit konnte von uns zusätzlich der cGMP(cyclisches Guanosinmonophosphat)-Signalweg in seiner Bedeutung für die Insulinsekretion nach Melatonin-Applikation (Stumpf et al., 2008, 2009) analysiert werden, so dass dieser Teil in der vorliegenden Übersicht intensiver abgehandelt wird.

Schließlich soll (3.) in der vorliegenden Übersicht auf die Bedeutung funktioneller Zusammenhänge zwischen Melatonin und Insulin eingegangen werden, wobei die Betrachtung des Zusammenhanges durch Untersuchungen erweitert wird, die an Typ1- und Typ2-diabetischen Tiermodellen sowie humanem Operationsmaterial und Blutplasma von Typ2-Diabetikern durchgeführt wurden.

### 1. Melatoninrezeptor-Ausstattung der pankreatischen $\beta$ -Zelle

Die Charakterisierung und Klonierung der Melatonin-Rezeptoren erfolgte durch Reppert und Mitarbeiter (Reppert et al., 1994, 1995a,b). Durch eigene Untersuchungen (Peschke et al., 2000, 2002; Peschke, 2003a,b, 2004) sowie Publikationen anderer Autoren (Kemp et al., 2002) konnte nachgewiesen werden, dass die pankreatische  $\beta$ -Zelle Melatonin-Rezeptoren vom Typ MT1 aufweist und dass Melatonin-Applikation zu einer Senkung der Insulinsekretion führt (Picinato et al., 2002a). Der beschriebene Mechanismus der Senkung der Insulinsekretion beruht auf einer Bindung der membranständigen MT1-Rezeptoren an hochaffine Pertussistoxin-sensitive inhibitorische GTP-bindende (Gi)-Proteine. Anhaltspunkte für die Existenz von MT2-Rezeptoren auf der  $\beta$ -Zelle konnten erst jüngst erbracht werden (Mühlbauer und Peschke, 2007; Peschke et al., 2007; Peschke 2008). Diesen Befunden lagen zahlreiche Einzeluntersuchungen zugrunde, vor allem aber ein Primer-Design, das sich von derzeit favorisierten Vorgehensweisen unterschied. Seitdem sind in verschiedenen Publikationen die eigenen Befunde bestätigt und erweitert worden sowie Versuche unternommen worden, Rezeptor-medierte Einflüsse des Melatonins in den Kontext klinischer Betrachtungen zu stellen, bis hin zu Spekulationen, ob Melatonin eine Bedeutung für die Diabetogenese haben könnte.

Folgend wird kurz referiert, wodurch der Nachweis von MT2-Rezeptoren auf der  $\beta$ -Zelle gelang. Entscheidend war die *real-time*-Detektion naszierender DNA im Zuge der Polymerase-Kettenreaktion (PCR)-Nutzung unter gleichzeitigem Einbau des sehr stabilen, sensitiven, interkalierenden Fluoreszenzfarbstoffes „Eva Green“, wodurch sich die Sensitivität um ein Vielfaches erhöht. Die Laser-angeregte Fluoreszenz-Emission wurde durch einen Photomultiplier in Echtzeit aufgezeichnet und quantitativ bestimmt. Unter Verwendung der *real-time* RT-PCR-Technik und mit speziell angepassten Primern gelang es nun, MT2-spezifische Transkripte in der pankreatischen Insel sowie einer Insulinomazelllinie (INS1) der Ratte nachzuweisen. Die genutzten Basen-Sequenzen für den Primer zum MT1-Nachweis waren: CAACCTGCAAACCGGAACTC vorwärts und GGAAAACCAC-CAGGGCAAT rückwärts.

Für den Primer zum MT2-Rezeptor-Nachweis wurden folgende Basen-Sequenzen genutzt: CATCCACT-

TCCTCCTTCCAA vorwärts und TATGGCGAAAAC-CACAAACA rückwärts. Beide Primersets führten zur Amplifizierung von Transkriptanteilen des Exon 2. Im Ergebnis gelang es, sowohl MT1- als auch MT2-mRNA entstammende PCR-Produkte zu amplifizieren. Gelelektrophorese-Separation der DNA ergab spezifische Banden: 101 bp für das MT1- und 169 bp für das MT2-Amplikon. Durch Spaltung mit zwei Amplikon-spezifischen Restriktionsenzymen an bekannten Schnittstellen konnte nachfolgend die Spezifität des MT2-PCR-Produktes bestätigt werden. Nach Behandlung mit dem Restriktionsenzym Eco 31I ließen sich im analytischen Agarosegel Fragmente mit den spezifischen Molekülgrößen von 103 bp und 66 bp nachweisen, darüber hinaus auch die erwarteten Fragmentgrößen nach Behandlung mit einem weiteren Restriktionsenzym BfiI (108 bp und 61 bp). Die quantitative Auswertung der PCR-Experimente zeigte allerdings, dass die Expression für den MT2-Rezeptor sehr viel geringer ist, als die des MT1-Rezeptors. Diesem Umstand ist möglicherweise geschuldet, warum ältere Untersuchungen mit konventioneller PCR-Technik zu keinem Ergebnis geführt hatten (Mühlbauer und Peschke, 2007).

Nachdem an Pankreas, isolierten pankreatischen Inseln und Insulinomazellen INS1 von Ratten der Nachweis des MT2-Rezeptors gelungen war, stellte sich die wichtige Frage der Übertragbarkeit des Ergebnisses auf humanes Material. Im Ergebnis konnte mittels *real-time* RT-PCR sowie immunhistochemischer Untersuchungen zweifelsfrei der Nachweis des MT2-Rezeptors auch an menschlichem Pankreasgewebe (Operationsmaterial) erbracht und somit die Übertragbarkeit der Rattenbefunde auf den Menschen belegt werden. Jedoch wird auch beim Menschen die mRNA des MT2-Rezeptor sehr viel schwächer exprimiert. Die Einbeziehung von Pankreasgewebe Typ2-diabetischer Patienten hatte zum Ergebnis, dass die Expressionshöhe sowohl der MT1- als auch MT2-RezeptormRNA bei Diabetikern gegenüber stoffwechselgesunden Patienten stark erhöht ist (Peschke et al., 2007). Bislang nicht geklärt ist die Frage, ob sich den unterschiedlichen Melatonin-Rezeptoren spezielle Funktionszusammenhänge zuordnen lassen wie beispielsweise *phase shifting* (Peschke und Peschke, 1998; Picinato et al., 2002b), das über MT2-Rezeptorsignale vermittelt werden soll (Liu et al., 1997; Jin et al., 2003).

In einer Reihe von Publikationen wurden kürzlich die von uns gefundenen Melatoninrezeptor-Befunde der pankreatischen  $\beta$ -Zelle bestätigt und darüber hinaus ein Zusammenhang zwischen dem Risiko, an Typ2-Diabetes zu erkranken, und dem Auftreten bestimmter Genvarianten des MT2-Rezeptors (*MTNR1b*) im Rahmen einer Genom-weiten Assoziationsstudie untersuchter Populationskohorten erhärtet. Sowohl Untersuchungen von Prokopenko und Mitarb. (2009) als auch Lyssenko und Mitarb. (2009) belegten übereinstimmend, dass das Auftreten

eines bestimmten „single nucleotide polymorphism“ (SNP, rs 10830963), also einer einzigen Basenveränderung gegenüber einer neutralen Sequenz, das Risiko, später an Typ2-Diabetes zu erkranken, signifikant erhöht. Dieser SNP konnte im Intronbereich des *MTNR1b* gefunden werden. Ähnlich wie das Gen des MT1-Rezeptors ist auch das des MT2-Rezeptors durch ein großes Intron mit nichtcodierender Sequenz unterbrochen. Der hier diskutierte SNP fällt in den Intronbereich des *MTNR1b*, berührt also nicht die codierenden, translatierten Abschnitte. Die Interpretation dieses Befundes ist daher bislang offen, zumal kein Überlappen des SNPs mit bekannten Konsensussequenzen für Transkriptionsfaktoren oder Splice-Konsensussequenzen vorliegt (Prokopenko et al., 2009). Belegt ist jedoch ein Zusammenhang zwischen dem höherfrequenten Auftreten dieses SNP in den untersuchten Populationen und größerer Nachweiswahrscheinlichkeit erhöhter Nüchtern-glukosespiegel. Außerdem wurden pathologisch verändertes Insulinsekretionsverhalten (first-phase insulin response) im oralen Glukosetoleranztest (OGGT) sowie im intravenösen Glukosetoleranztest (IVGTT) festgestellt.

In einer weiteren Assoziationsstudie (Bouatia-Naji et al., 2009) wird ein neuer SNP mit modulatorischer Wirkung auf den Glukosestoffwechsel in einer europäischen Population beschrieben. Dieser SNP (rs 1387153) zeigt ebenfalls einen statistisch signifikanten Zusammenhang mit erhöhten Nüchtern-glukosespiegeln, jedoch in Übereinstimmung mit den vorgenannten Studien, keinen wesentlichen Einfluss auf die typischen Risikofaktoren des Typ2-Diabetes wie Obesitas bzw. erhöhten *body mass index* (BMI). Zudem wird ein kumulativer Effekt dieser *MTNR1b*-Genvariante zusammen mit bestimmten Varianten der Gene für Glucokinase (GCK), *glucokinase regulatory protein* (GCKR) und für das  $\beta$ -Zell-spezifische *glucose-6-phosphatase-catalytic-subunit-related-protein* (G6PC2) für die Wahrscheinlichkeit der Entstehung eines Typ2-Diabetes beschrieben (Bouatia-Naji et al., 2008). Interessanterweise befindet sich dieser zweite SNP des *MTNR1b* weit entfernt von dem zuvor genannten, nämlich im 5'-Promotorbereich des Gens, woraus sich ein möglicher Einfluss auf die transkriptionelle Aktivierung erklären könnte.

Die Arbeit von Lyssenko und Mitarb. (2009) deutet auf eine erhöhte Expression des MT2-Rezeptor-Transkripts in humanen pankreatischen Inseln des Diabetes-Risikotyps hin. Dieser Befund würde sich damit in einen Zusammenhang mit erhöhten Expressionswerten für den MT2-Rezeptor im humanen Gesamtpankreas einordnen (Peschke et al., 2007). Insgesamt wird davon ausgegangen, dass die hier diskutierten SNP des *MTNR1b*-Genlokus als mögliche prognostische Marker für ein erhöhtes Diabetes-Risiko genutzt werden könnten. Rönn et al. (2009) konnten darüber hinaus nachweisen, dass der von Lyssenko et al. (2009) und Prokopenko et al. (2009) beschriebene

SNP rs10830963 in Populationen chinesischer Herkunft (Han) 1,5fach häufiger vertreten ist als in Populationen kaukasischer Herkunft, verbunden mit entsprechend höherem Erkrankungsrisiko. Im übrigen bestätigt die Veröffentlichung von Lyssenko et al. (2009) die zuvor von der Arbeitsgruppe um E. Peschke (Mühlbauer und Peschke, 2007; Peschke et al., 2007) publizierten Ergebnisse zur Expression des MT2-Rezeptors im humanen Pankreas mittels PCR-technischer und immunhistochemischer Verfahren. Es wird ferner bestätigt, dass die Melatoninrezeptoren – vermittelt über inhibitorische G-Proteine – an die cAMP-Signalkaskade gekoppelt sind.

Im Unterschied zu den eigenen Befunden sprechen die von Lyssenko et al. (2009) aufgeführten Ergebnisse für ein hohes Expressionsniveau des MT2-Rezeptors in humanen Inseln (Verhältnis MT1:MT2 = 1:1) und bestätigen generell die Expression sowohl des MT1- als auch des MT2-Rezeptors in der Insel. Der Nachweis des MT1 Rezeptors war zuvor von Ramracheya und Mitarb. (2008) auf Grund von „single-cell“ RT-PCR-Befunden an humanen  $\beta$ -Zellen, nicht aber an solchen von Rodentien, erbracht worden.

Schließlich kann festgestellt werden, dass Lyssenko et al. (2009) zusammenfassend zu der Überzeugung gelangen, dass die genannten genetischen Zusammenhänge einen therapeutischen Ansatz bieten könnten, durch Einsatz von Melatoninrezeptor-Antagonisten einen Einfluss auf cAMP und konsekutiv die Insulinsekretion zu erlangen, wobei Stimulation durch GLP-1 oder deren therapeutisch eingesetzte Analoga im Vordergrund stehen. Ob entsprechende Strategien der Diabetes-Therapie perspektivisch bedeutungsvoll sein werden, bleibt abzuwarten.

## 2. Melatoninrezeptor vermittelte Signalwege in der pankreatischen $\beta$ -Zelle

### 2.1. Der Gi-Adenylatcyclase-cAMP-Signalweg

Melatonin entfaltet – wie bereits referiert – seine bislang bekannten Rezeptor-medierte Effekte auf dem Weg über Pertussistoxin-sensitive inhibitorische GTP-bindende Proteine (Gi), die an die MT1- und MT2-Membranrezeptoren gekoppelt sind. Die wichtigsten und bekanntesten zellulären Effekte des Melatonins werden über eine Herabregulation der intrazellulären cAMP-Konzentration vermittelt (Übersicht siehe: Vanecek, 1998).

Zurückliegende eigene Untersuchungen haben unter Nutzung von molekularbiologischen, autoradiographischen und funktionellen Untersuchungen, Superfusionsexperimenten sowie Bindungsstudien belegen können, dass die Melatonineffekte an der Insulin-produzierenden pankreatischen  $\beta$ -Zelle ebenfalls über trimere inhibitorische Proteine (Gi), die Adenylatcyclase (CA), das

cAMP und die Proteinkinase A vermittelt werden. Die Ergebnisse wurden an pankreatischen Inseln neonater Ratten (Peschke et al., 1997, 2000; Csernus et al., 1998) als auch Ratten-Insulinomazellen INS1 (Peschke et al., 2002, 2006a,b; Peschke, 2003a, 2004) erhoben. Sie haben feststellen lassen, dass Melatonin auf diesem Weg die Glukose-, KCl- und Forskolin-stimulierte Insulinsekretion senkt (siehe auch: Kemp et al., 2002; Picinato et al., 2002a,b).

Bedeutungsvoll waren in diesem Zusammenhang die Anpassung und Nutzung eines cAMP-RIA an eigene superfusionstechnische Versuchsbedingungen. Es zeigte sich, dass cAMP im Perifusat, also extrazellulär, gemessen werden konnte. Für den aktiven Transport in den extrazellulären Raum (Rosenberg et al., 1994; Brundage et al., 1997; Finnegan und Caray, 1998; Kondrashin et al., 1999; Orlov und Maksimova, 1999; Steffgen et al., 1999) werden amphipathische Anionen, sogenannte *multidrug resistance proteins* (MRP) wie MRP4 und MRP5 verantwortlich gemacht (Jedlitschky et al., 2000; Chen et al., 2001). Der Efflux soll energieabhängig und unidirektional erfolgen und durch Substanzen, die die cytoskeletale Mikrotubulus-Assemblierung verhindern, hemmbar sein (Rindler et al., 1978; Brunton und Mayer, 1979; Brunton und Buss, 1980). Eigene Superfusionsexperimente mit INS1-Zellen sollten nun klären, ob der transmembranöse cAMP-Transporter durch Probenecid hemmbar ist. Die publizierten Ergebnisse (Peschke et al., 2002; Peschke 2003a, 2004) machten deutlich, dass Probenecid die Forskolin-stimulierte, extrazellulär gemessene cAMP-Konzentration durch Blockierung des Exportes von cAMP in den Extrazellulärraum senkt, was zu einer Akkumulation von intrazellulärem cAMP mit konsekutiver Erhöhung der Insulinsekretion führt (siehe auch: Finnegan und Carey, 1998; Orlov und Maksimova, 1999; Steffgen et al., 1999; Jedlitschky et al., 2000). Diese Befunde belegen, dass cAMP nicht nur für die gut bekannten intrazellulären Signalfunktionen bedeutungsvoll ist, sondern auch interzellulär Funktionen erfüllt (Chen et al., 2001). Durch Erweiterung des experimentellen Ansatzes und zusätzlichen Einsatz des Phosphodiesterase-Hemmers IBMX (3-Isobutyl-1-methylxanthin) wurden erwartungsgemäß sowohl die cAMP- als auch die Insulinkonzentration erhöht (Peschke et al., 2002; Peschke 2003a, 2004). Zusätzlich wurden Ko-Stimulationen von INS1-Zellen mit Clonidin und Forskolin durchgeführt. Clonidin ist ein  $G_{i\alpha}$ -Protein-Stimulator, während Forskolin die Adenylatcyclase stimuliert. Experimentell wurde folgendermaßen vorgegangen: Nach Applikation von Forskolin allein wurden eine Aktivierung der Adenylatcyclase, konsekutive Erhöhung des intrazellulären cAMP-Gehaltes und schließlich erhöhte Insulinsekretion erzielt. Wurde zusätzlich Clonidin appliziert, das das inhibitorische G-Protein  $G_{i\alpha}$  aktiviert, wurden die Forskolin-Effekte gehemmt und der cAMP-



musste geklärt werden, wie die Einzeleffekte getrennt werden könnten. Dazu musste der Gi-AC-cAMP-Weg gehemmt werden, was durch Blockierung des inhibitorischen G-Proteins (Gi) mittels PTX ermöglicht wird. Nur nach Hemmung der cAMP-Kaskade gelang es, den Rezeptor-medierten Einfluss von Melatonin auf das Gq-PLC-IP<sub>3</sub>-System zu erfassen.

Zusammenfassend erhebt sich die Frage, warum Melatonin in der  $\beta$ -Zelle einander widersprechende Funktionskaskaden zu aktivieren vermag, nämlich auf dem Gi-AC-cAMP-Weg eine Hemmung der Insulinsekretion und dem Gq-PLC-IP<sub>3</sub>-Weg eine Steigerung der Insulinsekretion? Bisher wissen wir nur, dass der IP<sub>3</sub>-Weg sehr schnell, der cAMP-Weg erst nach mehrstündiger Prä-Applikation von Melatonin funktionell bedeutungsvoll wird (Zusammenfassung des Gq-Phospholipase C-IP<sub>3</sub>-Signalweges unter dem Einfluss von Melatonin siehe Zellschema Abb. 2).

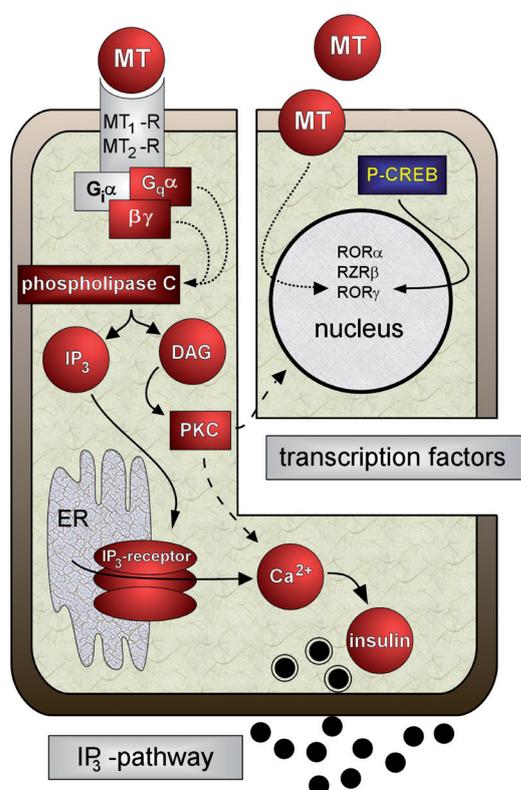


Abb. 2: Schema des Rezeptor-medierten Einflusses von Melatonin auf den Phospholipase C-IP<sub>3</sub>-Signalweg der pankreatischen  $\beta$ -Zelle vermittelt über Gq-Proteine. Auf diesem Weg stimuliert Melatonin die Insulinsekretion (Nebenweg).

CREB, cAMP-regulated element-binding protein; DAG, Diacylglycerol; ER, Endoplasmatisches Retikulum (hier glattes); G<sub>i</sub> $\alpha$ , $\beta$ , $\gamma$ , inhibitorisches G-Protein mit Untereinheiten; G<sub>q</sub> $\alpha$ , $\beta$ , $\gamma$ , G<sub>q</sub>-Protein mit Untereinheiten; IP<sub>3</sub>, Inositol-1,4,5-triphosphat; MT, Melatonin; MT<sub>1</sub>-R und MT<sub>2</sub>-R, Melatonin MT<sub>1</sub>- und MT<sub>2</sub>-Rezeptor; PKC, Proteinkinase C; PLC, Phospholipase C; ROR $\alpha$ , ROR $\beta$ , ROR $\gamma$ , Isoformen der retinoic acid receptor related orphan receptors. Mit freundlicher Genehmigung durch den Blackwell-Verlag aus: Peschke, 2008.

### 2.3. Der Gi-Guanylatcyclase-cGMP-Signalweg

Schließlich wurde in jüngster Zeit der Einfluss von Melatonin auf eine dritte Signalkaskade, den Guanylatcyclase-cGMP-Signalweg, in der pankreatischen  $\beta$ -Zelle untersucht. Cyclisches 3'-5'-Guanosinmonophosphat spielt als *second messenger* neben cAMP (cyclisches 3'-5'-Adenosinmonophosphat) eine zentrale Rolle in der Regulation des Zellstoffwechsels. Neben der Beteiligung der Übertragung von Lichtreizen in der Retina ist cGMP an der Relaxation der Gefäßmuskulatur, Hemmung der Thrombozytenaggregation, Wachstum und Differenzierung von Epithelzellen sowie an der Natrium- und Wasserresorption in Niere und Dünndarm beteiligt. Katalysiert durch Guanylatcyclasen, wird cGMP aus Guanosin-5'-triphosphat (GTP) unter Abspaltung von Pyrophosphat generiert.

Guanylatcyclasen (GC) können als membranständige und zytosolische Enzyme vorliegen. Von der membranständigen Form (mGC) wurden bisher sieben verschiedene Isoformen beschrieben (mGC A bis G). Liganden der Guanylatcyclase A sind ANP (*atrial natriuretic peptide*) und BNP (*brain natriuretic peptide*), welche über die mGC A endokrine Effekte auf den Flüssigkeitshaushalt vermitteln. Die Guanylatcyclase B wird von CNP (*c-type natriuretic peptide*) aktiviert und beeinflusst die vasculäre Regeneration sowie die enchondrale Ossifikation. Die Guanylatcyclase C stellt einen Rezeptor dar, welcher vor allem im Magen-Darm-Trakt von Bedeutung ist. Die ligandenbindende Stelle ist spezifisch für die Peptide Guanylin und Uroguanylin sowie für hitzestabile Enterotoxine, die von Enterobakterien sezerniert werden. Für die Guanylatcyclasen D, E, F und G sind bisher keine endogenen Liganden bekannt; sie gelten deshalb als klassische Orphan-Rezeptoren (Kuhn, 2003). Die Aktivierung der cytosolischen, löslichen Guanylatcyclase-Form (sGC) wird vor allem durch das membrangängige Stickstoffmonoxid (NO) getriggert, welches durch NO-Synthasen (NOS) bei der Umwandlung von L-Arginin in L-Citrullin freigesetzt wird. Die sGC besteht aus einem Heterodimer mit einer  $\alpha$ - und einer  $\beta$ -Untereinheit und ist nur bei Ko-Expression beider Untereinheiten funktionell aktiv (Harteneck et al., 1990).

Der Abbau des cGMP wird durch Phosphodiesterasen (PDE) katalysiert, welche die Phosphodiesterbindung zwischen der 3'-OH-Gruppe der Ribose und der Phosphatgruppe hydrolysieren; es entsteht das biologisch inaktive Guanosinmonophosphat (GMP). Bisher sind 11 Familien ihrer Phosphodiesterasen bekannt, die sich hinsichtlich ihrer Substrat- und Inhibitorspezifität, Regulation, zellulären Lokalisation und Gewebeverteilung unterscheiden. Die Familien PDE 5, 6 und 9 weisen eine hohe Spezifität für cGMP gegenüber cyclischem Adenosinmonophosphat (cAMP) auf. Hingegen bauen die PDE 4, 7 und 8 cAMP mit relativ hoher Spezifität gegenüber cGMP ab. Die PDE

1, 2, 3, 10 und 11 weisen eine ähnliche Affinität für cAMP und cGMP an der katalytischen Domäne auf (Maurice et al., 2003). Des Weiteren ist bekannt, dass durch Bindung von cGMP an die PDE 3 der Abbau von cAMP gehemmt wird, wodurch eine Verknüpfung des cAMP-Signalweges mit der cGMP-Transduktionskaskade entsteht (Bender und Beavo, 2006). Neben der Spaltung durch Phosphodiesterasen wird die cGMP-Wirkung auch durch seine Elimination aus der Zelle über spezifische Transportsysteme begrenzt. Für einige Mitglieder der MRP-Familie als Transporter für amphiphile Anionen konnte gezeigt werden, dass sie zyklische Nukleotide aus der Zelle transportieren können. Die MRP 4, 5 und 8 transportieren sowohl cAMP als auch cGMP (Jedlitschky et al., 2000; Chen et al., 2001; 2005), wobei MRP 5 aber eine deutlich höhere Affinität zu cGMP aufweist (Jedlitschky et al., 2000). Es ist somit davon auszugehen, dass die intrazelluläre cGMP-Konzentration sowohl von der Guanylatcyclase- und Phosphodiesterase-Aktivität als auch von der Elimination durch MRP abhängig ist.

Die zellulären und physiologischen Auswirkungen veränderter cGMP-Konzentrationen werden durch verschiedene Effektorproteine vermittelt. Neben der bereits erwähnten Wirkung auf die cAMP-Signalkaskade durch Hemmung der PDE 3 moduliert cGMP die Aktivität der cGMP-spezifischen Proteinkinase G (PKG) sowie cGMP-abhängige Ionenkanäle. Die cGMP-abhängigen Protein-kinasen gehören zur Familie der Serin-Threonin-Kinasen und werden durch die Bindung von cGMP aktiviert. Ebenso kann die Proteinkinase A (PKA) durch cGMP aktiviert werden – ein weiterer Hinweis für die enge Verknüpfung des cAMP- und cGMP-Signalweges (Lucas et al., 2000). Durch Proteinphosphorylierung der PKA wird dementsprechend die Aktivität von Enzymen, Kanälen oder Transkriptionsfaktoren reguliert. Weiterhin können durch das zyklische Nukleotid nichtselektive, ligandengesteuerte Kationenkanäle, sogenannte CNG (*cyclic nucleotide-gated*)-Kanäle, aktiviert werden. CNG-Kanäle sind sowohl für monovalente als auch für divalente Kationen permeabel, wobei divalente gegenüber monovalenten Ionen bevorzugt werden (Wells und Tanaka, 1997). So können intrazelluläre Natrium- und Kalzium-Konzentrationen in Abhängigkeit von der aktuellen cGMP-Konzentration in der Zelle moduliert werden (Biel et al., 1998; Craven und Zagotta, 2006).

### 2.3.1. Einfluss von Melatonin auf die cGMP-Signalkaskade

Es ist bekannt, dass Melatonin neben der Modulation der cAMP- und IP3-Kaskade in verschiedenen Zellen und Geweben auch Einfluss auf den cGMP-Signaltransduktionsweg nimmt. Allerdings wurden zurückliegende Be-

funde zur Bedeutung von Melatonin auf intrazelluläre cGMP-Konzentrationen kontrovers diskutiert. Versuchsergebnisse von Lopez-Gonzalez und Mitarb. (1992) sowie Faillace und Mitarb. (1996) wiesen eine cGMP-Erhöhung nach Inkubation mit Melatonin nach. Demgegenüber belegen andere Studien eine dosisabhängige Verringerung der cGMP-Konzentration nach Applikation von Melatonin in physiologischen Konzentrationen (Vanecek und Vollrath, 1989; Gilad et al., 1997; Bubis und Zisapel, 1999; Petit et al., 1999; Tamura et al., 2006). Dieser Effekt ist spezifisch für den MT2-Rezeptor, über den die cGMP- als auch cAMP-Signaltransduktionskaskade gehemmt werden können (Petit et al., 1999). Untersuchungen zur Wirkung von Melatonin auf weitere Merkmale der cGMP-Signalkaskade, untersucht an verschiedenen Geweben und Zellen, unterstreichen den Einfluss des Hormons auf den cGMP-Transduktionsweg: Melatonin moduliert die NO-Konzentration (Gitto et al., 2004; Silva et al., 2007), senkt die Aktivität der NOS (Bettahi et al., 1996; Pozo et al., 1997; Storr et al., 2002), erhöht die Aktivität der Guanylatcyclase (Vesely et al., 1981; Faillace et al., 1996) und inhibiert die Aktivität cGMP-abhängiger Phosphodiesterasen (Satake et al., 1991; Bubis and Zisapel, 1999). Faillace und Mitarb. (1996) konnten weiterhin nachweisen, dass die Aktivität der Guanylatcyclase einem 24-Stunden-Rhythmus mit hohen cGMP-Werten in der Nacht unterliegt, was für eine circadian-rhythmische Regulation der Enzymaktivität spricht. Zusammenfassend deutet – wenn auch nicht unwidersprochen – die Mehrzahl der Untersuchungen auf einen hemmenden Effekt von Melatonin auf die cGMP-Signalkaskade hin; eindeutige Aussagen konnten jedoch bislang nicht getroffen werden.

Zum Verständnis der durch Melatonin beeinflussten Signaltransduktionsmechanismen in der pankreatischen  $\beta$ -Zelle sind Untersuchungen zur Bedeutung des MT2-Rezeptors sowie zum Einfluss von Melatonin auf die cGMP-Signalkaskade unverzichtbar. Sie tragen entscheidend zur Ergänzung und Erweiterung der Kenntnisse zurückliegender Studien zum MT1-Rezeptor und der Wirkung von Melatonin auf die cAMP- und IP3-Transduktionswege bei (Peschke et al., 2000, 2002, 2006a,b, 2007; Bach et al., 2005; Peschke, 2008).

### 2.3.2. Aktuelle Ergebnisse zur Bedeutung des MT2-Rezeptors für die Insulinsekretion

Mit der Entdeckung und Erstbeschreibung des MT2-Rezeptors in der pankreatischen  $\beta$ -Zelle erhob sich die Frage, welche physiologische Bedeutung dieser Rezeptortyp für die Vermittlung des Melatoninsignals hat und ob über den MT2-Rezeptor die cGMP-Signalkaskade in Insulinproduzierenden  $\beta$ -Zellen beeinflusst wird. Zur Klärung dieses Sachverhaltes wurden zellphysiologische und molekular-

biologische Untersuchungen an INS1-Zellen und Langerhansschen Inseln der Ratte durchgeführt.

Zunächst bestand das Ziel darin herauszufinden, ob der MT<sub>2</sub>-Rezeptor an der Melatonin vermittelten Senkung der Insulinfreisetzung pankreatischer  $\beta$ -Zellen beteiligt ist. Die Ergebnisse von Zellinkubationsversuchen bestätigten den bereits bekannten Effekt aus Perifusionsexperimenten (Peschke et al., 1997, 2002): Melatonin senkte die Forskolin-stimulierte Insulinsekretion bei INS1-Zellen signifikant. Die Vorinkubation mit dem unspezifischen Melatoninrezeptor-Antagonisten Luzindol bewirkte eine teilweise Verhinderung des Melatonineffektes, wohingegen die Präinkubation mit dem spezifischen MT<sub>2</sub>-Rezeptor-Antagonisten 4-Phenyl-2-propionamidotetralin (4P-PDOT) die Insulin-senkende Melatoninwirkung nahezu vollständig aufhob (Abb. 3; Stumpf et al., 2008). Daraus

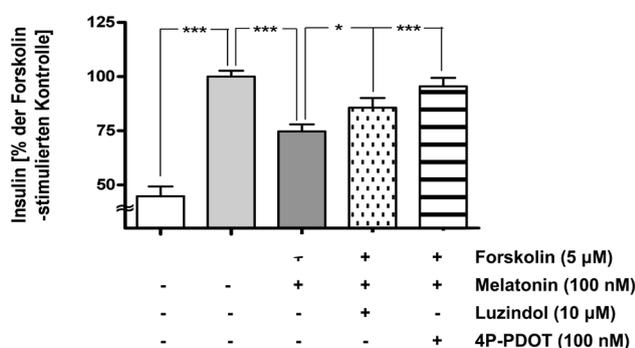


Abb. 3: Untersuchungen zur Wirkung von Melatonin und Melatonin-Rezeptor-Antagonisten auf die Insulinsekretion in pankreatischen  $\beta$ -Zellen. Die Behandlung von Ratten-Insulinoma-Zellen (INS1) mit Melatonin (100 nM) für 6 Stunden reduzierte die Forskolin-stimulierte (5  $\mu$ M) Insulinsekretion signifikant. Die Vorinkubation mit dem unspezifischen Melatoninrezeptor-Antagonist Luzindol (10  $\mu$ M) oder dem spezifischen MT<sub>2</sub>-Rezeptor-Antagonist 4-Phenyl-2-propionamidotetralin (4P-PDOT, 100 nM) für 30 Minuten hob diesen Effekt auf. Das Inkubationsmedium enthielt 11,6 mM Glukose. Die Daten repräsentieren den Mittelwert  $\pm$  SEM aus 3 unabhängigen Versuchen mit je n = 8 (\*P < 0,05; \*\*\*P < 0,001). Mit freundlicher Genehmigung durch den Blackwell-Verlag aus: Stumpf et al., 2008.

kann geschlossen werden, dass die Insulin-senkende Wirkung von Melatonin in pankreatischen  $\beta$ -Zellen nicht, wie bisher angenommen, ausschließlich MT<sub>1</sub>-Rezeptor-mediert ist, sondern auch über den MT<sub>2</sub>-Rezeptor vermittelt wird. In Kenntnis, dass Melatonin über den MT<sub>2</sub>-Rezeptor andernorts neben dem cAMP- auch den cGMP-Signalweg beeinflusst, wurden Untersuchungen zur cGMP vermittelten Transduktionskaskade in der pankreatischen  $\beta$ -Zelle und zur Wirkung von Melatonin auf diesen Signalweg durchgeführt.

### 2.3.3. Expression von Komponenten der cGMP vermittelten Signalkaskade in $\beta$ -Zellen

Eine Melatonin-vermittelte Wirkung auf die intrazelluläre cGMP-Konzentration und mögliche damit verbundene Veränderungen in der Insulinsekretion setzen die Existenz der an der cGMP-Signalkaskade beteiligten Proteine in der pankreatischen  $\beta$ -Zelle voraus.

Die Stickstoffmonoxidsynthase (NOS) ist in der Langerhansschen Insel und der  $\beta$ -Zelle bereits hinlänglich untersucht und nachgewiesen. Die konstitutive, neuronale NOS und die Zytokin-induzierbare, Kalzium-unabhängige NOS wurden zweifelsfrei in der Langerhansschen Insel und auch in der INS1-Zelle nachgewiesen (Carpenter et al., 2001; Lajoix et al., 2001). Ebenso konnte die konstitutiv gebildete endotheliale NOS im endokrinen Pankreas, insbesondere in den  $\beta$ -Zellen, bestimmt werden (Nakada et al., 2000). Untersuchungen an der INS1-Zelllinie sind jedoch nicht bekannt. Über das Vorkommen verschiedener Isoformen der Guanylatcyclasen (GC) im Pankreasgewebe gibt es bisher ebenfalls keine Untersuchungen; die Funktion des Enzyms wurde zurückliegend hauptsächlich indirekt durch den Einsatz von Hemmstoffen, Aktivatoren oder Enzymaktivitätsmessungen analysiert. Lediglich in der  $\beta$ -Zelle der Maus konnte die Existenz von GC nachgewiesen werden (Arava et al., 1999), wobei unklar blieb, um welche der bekannten Isoformen es sich handelt. Demgegenüber wurde der Nachweis der Proteinkinase G (PKG) in den  $\beta$ -Zell-Linien BRIN-BD11 (Kaminski et al., 2004) und MIN6 (Wang et al., 2004) zurückliegend erbracht. Durch Untersuchungen von Ehses und Mitarb. (2002) konnte das Protein in der  $\beta$ -TC-3-Zelllinie der Maus nachgewiesen werden, während der Nachweis in der INS1-Zelle der Ratte scheiterte. Über die Existenz verschiedener Isoformen cGMP-spezifischer Phosphodiesterasen (PDE), *cyclic nucleotide-gated*(CNG)-Kanäle oder (MRP)-Transportproteine gab es, speziell die pankreatische  $\beta$ -Zelle betreffend, bisher keine Untersuchungen.

Um Aussagen darüber treffen zu können, ob und gegebenenfalls wie Melatonin zu Veränderungen von cGMP in pankreatischen  $\beta$ -Zellen führen könnte, wurden INS1-Zellen zunächst mittels RT-PCR, DNA-Gelelektrophorese und Restriktionsanalyse hinsichtlich des Vorkommens von an der cGMP-Signalkaskade beteiligten Proteinen charakterisiert. Dabei wurden sowohl Pankreasgesamtgewebe als auch speziell exokrine Gewebeanteile, die Langerhansschen Inseln und INS1-Zellen untersucht (Stumpf et al., 2008).

Bei Untersuchungen zur Expression der löslichen Form der Guanylatcyclase (sGC) konnten sowohl die mRNA der  $\alpha$ 2- als auch der  $\beta$ 1-Untereinheit nachgewiesen werden, was darauf hindeutet, dass in pankreatischen  $\beta$ -Zellen eine funktionelle Isoform der sGC existiert. Von

den sieben bekannten Formen der membranständigen Guanylatcyclasen (mGC) wurde der Nachweis der mRNA der Isoformen mGC A, B und C in der INS1-Zelle erbracht.

Weiterhin konnten in der INS1-Zelle die Transkripte von Isoformen der cGMP-abbauenden Phosphodiesterasen PDE 1, 2, 5, 9, 10 und 11 nachgewiesen werden. Auf Untersuchungen der Expression genannter Photorezeptor-PDE 6 wurde verzichtet, da diese ausschließlich in den Außensegmenten der Photorezeptoren vorkommt (Bender und Beavo, 2006). Weiterhin konnte die mRNA beider Isoformen von cAMP-spezifischen PDE 3, PDE 3A und PDE 3B in INS1-Zellen detektiert werden.

Bei CNG-Kanälen, die in die Untersuchungen mit einbezogen wurden, handelt es sich um Tetramere, die aus den Untereinheiten CNG A1, CNG A2, CNG A3, CNG A4, CNG B1 und CNG B3 in verschiedenen Kombinationsmöglichkeiten zusammengesetzt sein können. Einige bilden Homomere, die meisten nativen Kanäle sind jedoch aus verschiedenen Untereinheiten zusammengesetzt (Craven und Zagotta, 2006). Bisher gab es keine Untersuchungen zum Vorkommen von CNG-Kanälen in pankreatischem Gewebe oder zur möglichen Beteiligung an Signaltransduktionsprozessen zur Insulinfreisetzung. Molekularbiologische Untersuchungen an INS1-Zellen führten nun erstmals zum Nachweis der mRNA der Untereinheiten CNG A1, CNG A2, CNG B1 und CNG B3 in pankreatischen  $\beta$ -Zellen.

Mit dem Nachweis der Transkripte von MRP 4, 5 und 8 in der INS1-Zelle kann die Möglichkeit der Regulation intrazellulärer cGMP-Konzentrationen durch den Auswärtstransport über MRP-Transporter in der pankreatischen  $\beta$ -Zelle in Betracht gezogen werden. Für den *second messenger* cAMP konnte dieser Effekt nach unspezifischer Hemmung von MRP-Transportern durch Probenecid in eigens dazu durchgeführten Perifusionsexperimenten bereits nachgewiesen werden (Peschke et al., 2002).

### 2.3.4. Melatonin beeinflusst die cGMP-Konzentration in INS1-Zellen

Nach der Charakterisierung der pankreatischen Insel und INS1-Zelle hinsichtlich des Vorkommens von an der cGMP-Signalkaskade beteiligten Proteinen und Versuchen zur funktionellen Bedeutung des MT2-Rezeptors für die Insulinsekretion folgten Untersuchungen zur Beantwortung der zentralen Fragestellung: Hat Melatonin einen Einfluss auf die cGMP-Konzentration der pankreatischen  $\beta$ -Zelle?

In den Versuchen zur Regulation von cGMP durch Melatonin wurden INS1-Zellen zwecks Hemmung des cGMP-Abbaus mit dem unspezifischen Phosphodiesterase-Hemmer IBMX vorinkubiert. Die Inkubation mit Melatonin führte zu einer signifikanten Senkung der IBMX-stimulierten cGMP-Konzentration in Abhängigkeit von Dosis (Abb. 4A) und Inkubationszeit (Abb. 4B). Zur Untersuchung der Rezeptorspezifität des Melatonineffektes wurden wiederum der unspezifische Melatoninrezeptor-Antagonist Luzindol sowie der spezifische MT2-Rezeptor-Antagonist 4P-PDOT eingesetzt (Dubocovich et al., 1997; Nonno et al., 1999). Die Vorinkubation sowohl mit Luzindol als auch mit 4P-PDOT hob in eindrucksvoller Weise den cGMP-senkenden Melatonineffekt nahezu vollständig auf (Abb. 5). Daraus kann geschlossen werden, dass die cGMP-senkende Wirkung von Melatonin in pankreatischen  $\beta$ -Zellen Rezeptor-mediiert ist. Luzindol ist ein unspezifischer, kompetitiver Melatoninrezeptor-Antagonist mit einer 15- bis 25-fach höheren Affinität für den MT2-Rezeptor gegenüber dem MT1-Rezeptor (Dubocovich et al., 1997; Nonno et al., 1999). Dagegen weist 4P-PDOT mit einer 300- bis 22000-fach höheren Affinität zum MT2-Rezeptor eine sehr hohe Selektivität für diesen Rezeptortyp auf (Dubocovich et al., 1997; Nonno et al., 1999). Die Tatsache, dass der Einsatz beider Rezep-

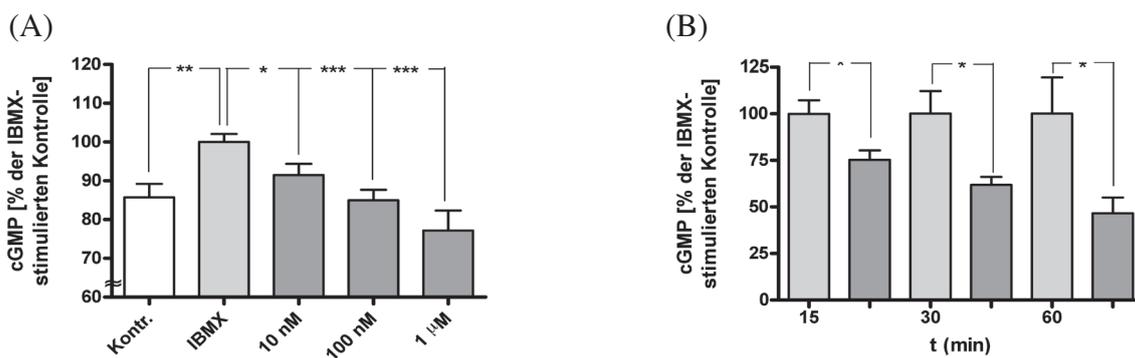


Abb. 4: Bestimmung der cGMP-Konzentration in Ratten-Insulinoma-Zellen (INS1) nach dosis- und zeitabhängiger Melatoninstimulation unter Hemmung der Phosphodiesterasen mit 3-Isobutyl-1-methylxanthin (IBMX, 1 mM). (A) Melatonin (10 nM, 100 nM, 1  $\mu$ M) senkt den IBMX-stimulierten cGMP-Gehalt dosisabhängig und signifikant nach 1-stündiger Inkubationszeit. Die Daten repräsentieren den Mittelwert  $\pm$  SEM aus 3 unabhängigen Versuchen mit je  $n = 4$ . (B) Der cGMP-senkende Effekt von 100 nM Melatonin erhöht sich mit steigender Inkubationsdauer (15 bis 60 Minuten). Schon nach 15-minütiger Melatoninapplikation wird die cGMP-Konzentration signifikant gesenkt. Im Diagramm sind Mittelwerte und Standardabweichungen mit  $n = 4$  dargestellt (\* $P < 0,05$ ; \*\* $P < 0,01$ ; \*\*\* $P < 0,001$ ). Mit freundlicher Genehmigung durch den Blackwell-Verlag aus: Stumpf et al., 2008.

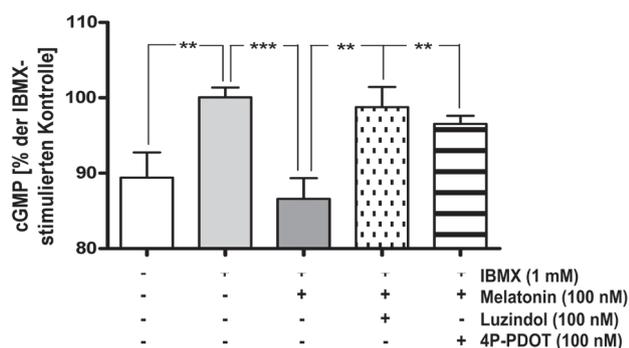


Abb. 5: Untersuchung der Wirkung von Melatoninrezeptor-Antagonisten auf die Melatonin vermittelte Senkung der cGMP-Konzentration in Ratten-Insulinoma-Zellen (INS1). Die unspezifische Hemmung der Phosphodiesterasen mit 3-Isobutyl-1-methylxanthin (IBMX, 1 mM) führt zur Erhöhung von cGMP. Melatonin senkt den IBMX-stimulierten cGMP-Gehalt bei Einsatz einer Konzentration von 100 nM nach 1-stündiger Inkubationszeit signifikant. Durch Vorinkubation mit dem MT<sub>2</sub>-spezifischen Rezeptorblocker 4-Phenyl-2-propionamidotetralin (4P-PDOT, 100 nM) und dem unspezifischen Melatonin-Rezeptorblocker Luzindol (100 nM) wird dieser Melatoneffekt aufgehoben. Die Daten repräsentieren den Mittelwert  $\pm$  SEM aus 3 unabhängigen Versuchen mit je  $n = 4$  (\*\*P < 0,01; \*\*\*P < 0,001). Mit freundlicher Genehmigung durch den Blackwell-Verlag aus: Stumpf et al., 2008).

torblocker die cGMP-senkende Wirkung von Melatonin fast vollkommen aufhob, rechtfertigt die Annahme, dass Melatonin diesen Effekt über den MT<sub>2</sub>-Rezeptor vermittelt. Bedauerlicherweise ist kein gut etablierter, selektiver MT<sub>1</sub>-Rezeptor-Antagonist kommerziell verfügbar, um MT<sub>1</sub>-Rezeptor-spezifische Effekte blockieren zu können.

### 2.3.5. Bedeutung von Guanylatcyclase und Stickstoffmonoxid für Melatonin vermittelte Effekte auf die cGMP-Konzentration

Nachdem nachgewiesen war, dass Melatonin Rezeptor-mediiert die cGMP-Konzentration in pankreatischen  $\beta$ -Zellen senkt, bestand das Ziel weiterführender Untersuchungen darin, herauszufinden, über welchen Mechanismus der Effekt vermittelt wird und welche Komponenten der cGMP-Signalkaskade daran beteiligt sind. Eine Modulation der Aktivität der GC war naheliegend. Dementsprechend sollten Quantifizierungen der GC-mRNA nach Melatoninbehandlung und Inkubationsversuche mit einem NO-Donator sowie Einsatz spezifischer Inhibitoren des Enzyms Aufschluss über die Wirkung von Melatonin auf die GC geben. Die Ergebnisse von *real-time* RT-PCR-Untersuchungen an INS1-Zellen zeigten, dass die Expression der löslichen Guanylatcyclase (sGC) nach Langzeit-Melatonininkubation dosisabhängig gesenkt wird (Abb. 6; Stumpf et al., 2009). Unterstützend zu den molekularbiologischen Analysen wurden Inkuba-

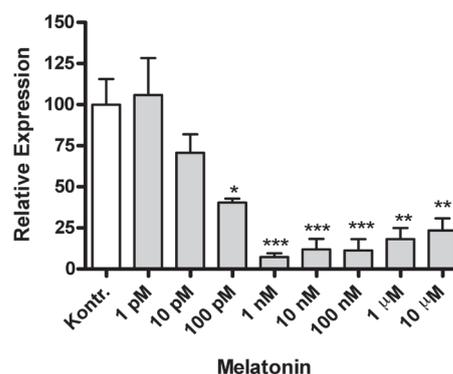


Abb. 6: Expressionsanalyse der löslichen Guanylatcyclase (sGC) in Ratten-Insulinoma-Zellen (INS1) nach Melatoneinwirkung. Die Zellen wurden für 24 Stunden mit Melatonin (1 pM bis 10  $\mu$ M) inkubiert; anschließend konnten mittels *real-time* RT-PCR Unterschiede der mRNA-Expression der sGC ermittelt werden. Zur Quantifizierung wurden Primer zur spezifischen Amplifikation der Untereinheit des Enzyms sGC  $\alpha$ 2 verwendet. Melatonin führte zur dosisabhängigen Senkung der sGC  $\alpha$ 2-mRNA mit signifikanten Ergebnissen bei Einsatz der Konzentrationen von 100 pM bis 10  $\mu$ M. Die niedrigsten Werte traten in Proben auf, die mit Melatoneinkonzentrationen im nanomolaren Bereich behandelt wurden. Die Daten repräsentieren den Mittelwert  $\pm$  SEM aus 3 unabhängigen Versuchen mit je  $n = 3$  (\*P < 0,05; \*\*P < 0,01; \*\*\*P < 0,001). Mit freundlicher Genehmigung durch den Blackwell-Verlag aus: Stumpf et al., 2009.

tionsversuche unter Einsatz des NO-Donators S-Nitroso-N-acetyl-DL-penicillamin (SNAP) und der spezifischen sGC-Inhibitoren 1H-(1,2,4)oxadiazolo(4,3- $\alpha$ )quinoxalin-1-on (ODQ) und 4H-8-bromo-1,2,4oxadiazolo(3,4d)benz(b)(1,4)oxazin-1-on (NS2028) durchgeführt: Zum einen bewirkte SNAP über die Freisetzung von NO eine Steigerung der Aktivität der sGC und folglich eine deutliche Erhöhung von cGMP. Gleichzeitige Melatoningabe führte zur signifikanten Senkung des SNAP-induzierten Anstiegs der cGMP-Konzentration (Stumpf et al., 2009). Zum anderen konnte der cGMP-senkende Effekt von Melatonin durch die Vorinkubation mit ODQ und NS2028 aufgehoben werden. Bei Betrachtung der Isoformen membranständiger Guanylatcyclasen mGC A, mGC B und mGC C konnten keine Veränderungen der mRNA-Expression durch Melatonin festgestellt werden. Ebenso kam es nach Blockierung der sGC nicht mehr zu der oben beschriebenen Senkung der cGMP-Konzentration unter Melatoneinfluss (Abb. 7). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass Melatonin seine Wirkung über die sGC-Isoform vermittelt (Stumpf et al., 2009). Übereinstimmend mit diesen Resultaten hatte die Inkubation mit *atrial natriuretic peptide* (ANP), einem Aktivator der mGC, keinen Effekt auf zelluläre cGMP-Konzentrationen in humanen embryonalen Nierenzellen (Petit et al., 1999). Bis heute gibt es keinerlei Hinweise auf die Beteiligung membranständiger Guanylatcyclase-Formen in der Modulation der NO- oder cGMP-Konzentrationen durch Melatonin.

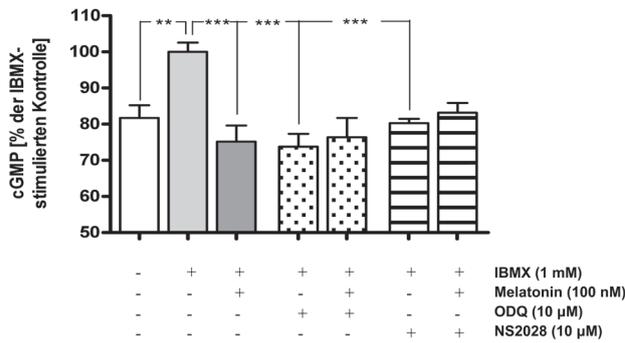


Abb. 7: Einfluss von Melatonin und den spezifischen Inhibitoren der löslichen Guanylatcyclase 1H-(1,2,4)oxadiazolo(4,3- $\alpha$ )quinoxalin-1-on (ODQ) und 4H-8-bromo-1,2,4oxadiazolo(3,4d)benz(b)(1,4)oxazin-1-on (NS2028) auf die cGMP-Konzentration in Ratten-Insulinoma-Zellen (INS1). Die Zellen wurden mit dem unspezifischen Phosphodiesterase-Hemmer 3-Isobutyl-1-methylxanthin (IBMX, 1 mM) vorinkubiert, um den cGMP-Abbau zu verhindern. Die Behandlung mit Melatonin (100 nM) senkte die IBMX-induzierte Erhöhung der cGMP-Konzentration nach 1-stündiger Inkubationszeit. Die Präinkubation mit ODQ (10 µM) oder NS2028 (10 µM) für 20 Minuten resultierte in einer signifikanten Senkung der cGMP-Gehalte in INS1-Zellen. Dieser Effekt wurde durch Melatoninbehandlung (100 nM) nicht beeinflusst, was darauf hindeutet, dass Melatonin seine cGMP-senkende Wirkung über die lösliche Guanylatcyclase vermittelt. Die Daten repräsentieren den Mittelwert  $\pm$  SEM aus 3 unabhängigen Versuchen mit je  $n = 4$  (\*\* $P < 0,01$ ; \*\*\* $P < 0,001$ ). Mit freundlicher Genehmigung durch den Blackwell-Verlag aus: Stumpf et al., 2009.

Die Aktivierung der sGC wird vor allem durch das membrangängige NO ausgelöst, welches durch die NOS bei der Umwandlung von L-Arginin in L-Citrullin freigesetzt wird. Melatonin nimmt bekanntlich Einfluss auf NO (Saenz et al., 2002; Silva et al., 2007) und die Aktivität und Expression der NOS (Crespo et al., 1999; Storr et al., 2002; Valero et al., 2006; Liang et al., 2009). So erhob sich die Frage, ob der Einfluss von Melatonin auf die sGC sich möglicherweise aus veränderten NO-Konzentrationen erklärt. Die Inkubation von INS1-Zellen mit Melatonin und anschließende Bestimmung von NO (Griess-Methode) führte zu keiner signifikanten Veränderung nach Kurzzeit-Stimulation (1 h), wohingegen Melatonin nach Langzeitstimulation (4 bis 24 h) die NO-Konzentration signifikant senkte. Zusätzlich wurde cGMP nach Melatoningabe und Präinkubation mit dem unspezifischen NOS-Inhibitor N<sup>G</sup>-monomethyl-L-arginin (L-NMMA) bestimmt. Es konnte nachgewiesen werden, dass der cGMP-senkende Effekt von Melatonin nicht durch den Einfluss der NOS vermittelt wird (Stumpf 2009). Die Resultate der Messung von NO-Gehalten und Inkubation von L-NMMA lassen zusammenfassend erkennen, dass Melatonin in Kurzzeit-Inkubationsexperimenten die cGMP-Konzentration nicht durch Modulation von NO oder der NOS-Aktivität vermittelt. Möglicherweise spielt dieser Effekt jedoch eine Rolle bei längerfristiger Melatonineinwirkung.

Neben der Bindung von NO an die prosthetische Gruppe der GC als bedeutendstem Mechanismus zur Regulierung der Enzymaktivität werden weitere Möglichkeiten zur Steuerung der GC-Aktivität diskutiert: Die Genexpression des Enzyms kann durch transkriptionale und post-transkriptionale Faktoren beeinflusst werden, wie etwa durch Zytokine, Wachstumsfaktoren und *second messenger*-Systeme (Andreopoulos und Papapetropoulos, 2000). Die Phosphorylierung der GC durch die PKC, PKA oder PKG, Protein-Protein-Interaktionen sowie der Einfluss verschiedener Substrate oder Reaktionsprodukte, wie Ca<sup>2+</sup>, ATP, GTP, cGMP oder Mg<sup>2+</sup>, stellen Möglichkeiten der post-translationalen Regulierung des Enzyms in unterschiedlichen Zell-Linien oder Geweben dar (Pyriochou und Papapetropoulos, 2005). Zu alternativen Regulationsmechanismen neben der Bindung von NO an die sGC im Pankreas gibt es bisher keine Studien. Die vorliegend beschriebenen Untersuchungen an der INS1-Zelle weisen bei Kurzzeitinkubation von 1 h den Einfluss der sGC, jedoch nicht der NO-Konzentration oder NOS-Aktivität, in der Melatonin-mediierten Senkung von cGMP nach. Aus diesem Grund muss in Betracht gezogen werden, dass andere, NO-unabhängige Prozesse, für diesen Effekt verantwortlich sind, wie z. B. eine Phosphorylierung der sGC durch die PKA, die zur gesteigerten Enzymaktivität führt (Zwiller et al., 1981). Somit könnte die Hemmung der cAMP-Signalkaskade einschließlich der PKA durch Melatonin auch für eine reduzierte Aktivität der sGC verantwortlich sein.

### 2.3.6. Tierexperimentelle und klinische Untersuchungen

Zahlreiche tierexperimentelle Versuche an Streptozotocin(STZ)-behandelten oder Typ2-diabetischen Goto-Kakizaki-Ratten (GK-Ratten), klinische Patientendaten zu Melatonin-, Insulin- und Glukose-Tagesprofilen im Plasma sowie die Charakterisierung der Melatoninrezeptoren stoffwechselunauffälliger und Typ2-diabetischer Patienten konnten zurückliegend Kenntnisse zum engen Zusammenhang zwischen Melatonin und Insulin bei diabetischer Stoffwechsellage liefern (Peschke et al., 2006b, 2007, 2008; Peschke, 2008). Um die Einsicht zum Einfluss von Melatonin auf die cGMP-Kaskade zu erweitern, wurden auch im Rahmen der cGMP-Analytik tierexperimentelle Untersuchungen einbezogen. Ein quantitativer Vergleich der sGC-mRNA in Inseln stoffwechselgesunder Wistar-Ratten (WR-Ratten) und Typ2-diabetischer GK-Ratten, gewonnen zur Tages- oder Nachtzeit, unterstützt und erweitert Kenntnisse zur Bedeutung des Melatonins für die Diabetogenese: Bei WR-Ratten ist die sGC in der Nacht signifikant niedriger exprimiert als am Tag (Abb. 8). Das spricht für eine Regulation der Enzymaktivität in Abhängigkeit von der Tageszeit, wie bereits von der

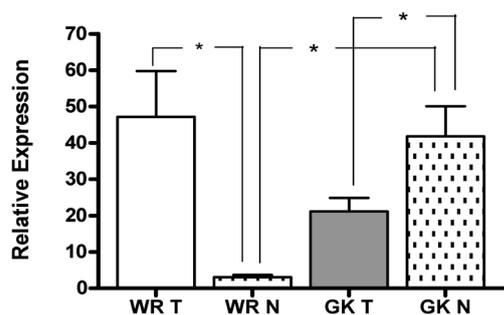


Abb. 8: Vergleich der mRNA-Expression der löslichen Guanylatcyclase in pankreatischen Inseln extrahiert aus stoffwechselgesunden Wistar(WR)- und Typ2-diabetischen Goto-Kakizaki(GK)-Ratten am Tag (T) und in der Nacht (N). Die sGC $\alpha$ 2-mRNA ist in Inseln von WR-Ratten am Tag signifikant stärker exprimiert als in der Nacht, wohingegen die Expression bei GK-Tieren nachts deutlich erhöht ist. Am Tag sind bei WR-Ratten höhere Mengen des Transkripts nachweisbar als bei GK-Ratten, während nachts die sGC $\alpha$ 2-mRNA bei GK-Tieren deutlich stärker exprimiert wird. Die Daten repräsentieren den Mittelwert  $\pm$  SEM mit  $n = 4$  (\* $P < 0,05$ ). Mit freundlicher Genehmigung durch den Blackwell-Verlag aus: Stumpf et al., 2008.

Retina des Goldhamsters bekannt (Faillace et al., 1996). Im Gegensatz zum Transkript in Langerhansschen Inseln stoffwechselgesunder WR-Ratten ist die sGC-mRNA bei Typ2-diabetischen GK-Ratten nachts deutlich hochreguliert. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass bei WR-Ratten am Tag deutlich höhere Mengen des Transkripts nachweisbar sind als bei GK-Ratten; ein Effekt, der nachts in genau umgekehrter Weise beobachtet wird (Abb. 8).

Zusätzlich wurden Untersuchungen an Gesamtpankreata und Langerhansschen Inseln – isoliert aus Melatoninrezeptor-*knockout*-Mäusen – im Tagesgang durchgeführt. Das Ziel bestand darin, herauszufinden, ob Veränderungen in der Expression der sGC zu unterschiedlichen Tageszeiten bzw. nach Melatoninrezeptor-*knockout* vorliegen. Als Voraussetzung für diese Untersuchungen wurde zunächst der Nachweis erbracht, dass die sGC in Übereinstimmung mit den Ergebnissen bei der Ratte auch im Pankreas und den Inseln der Maus exprimiert ist. Die Daten zeigen, dass die sGC  $\alpha$ 2-Expression sowohl direkt in den Langerhansschen Inseln als auch in Pankreata von Tag- und Nachttieren bei Vorliegen eines Rezeptor-*knockouts* erhöht ist. Dieser Effekt ist bei den MT2- und Doppel-*knockout*-Tieren besonders stark ausgeprägt. Anhand der Ergebnisse kann gefolgert und bestätigt werden, dass Melatonin Rezeptor-mediert Einfluss auf die cGMP-Transduktionskaskade nimmt und dass offensichtlich vor allem der MT2-Rezeptor an der cGMP-senkenden Wirkung von Melatonin beteiligt ist. Damit wurden die Resultate aus *batch*-Inkubationsversuchen der  $\beta$ -Zelllinie auch mit Untersuchungen am Tiermodell ergänzt.

### 2.3.7. Regulierung der Insulinsekretion durch cGMP

Im nächsten Schritt folgten Untersuchungen zur Klärung der Frage, ob veränderte cGMP-Konzentrationen in der pankreatischen  $\beta$ -Zelle Einfluss auf die Insulinsekretion nehmen. Frühere Studien zur Beteiligung der NO-cGMP-Signalkaskade in der Regulation der Insulinsekretion kamen zu unterschiedlichen und widersprüchlichen Resultaten. Die meisten Daten deuten auf einen Insulin-senkenden Effekt durch erhöhte cGMP-Konzentrationen hin (Laychock et al., 1991; Matsuura et al., 1999; Kaneko et al., 2003). Dagegen haben andere Studien gezeigt, dass cGMP die Insulinfreisetzung hemmt (Vara et al., 1991) oder nicht beeinflusst (Jones et al., 1992; Sjöholm et al., 1997). Im Ergebnis eigener Inkubationsversuche mit INS1-Zellen unter Verwendung des membrangängigen cGMP-Analogons 8-Br-cGMP wurde deutlich, dass cGMP die Insulinfreisetzung in Abhängigkeit von der Dosis signifikant erhöht (Abb. 9). Daraus kann

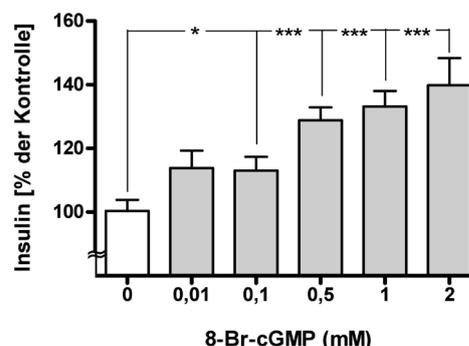


Abb. 9: Untersuchungen zum Einfluss veränderter cGMP-Konzentrationen auf die Insulinsekretion pankreatischer  $\beta$ -Zellen. Ratten-Insulinoma-Zellen (INS1) wurden für 1 Stunde mit dem membrangängigen cGMP-Analogon 8-Br-cGMP (10  $\mu$ M bis 2 mM) bei einem Glukosegehalt von 11,6 mM im Medium stimuliert. 8-Br-cGMP erhöht die Insulinsekretion signifikant und in Abhängigkeit von der Dosis. Im Diagramm sind Mittelwerte und Standardabweichungen von 3 voneinander unabhängig durchgeführten Experimenten mit jeweils  $n = 4$  dargestellt (\* $P < 0,05$ ; \*\*\* $P < 0,001$ ). Mit freundlicher Genehmigung durch den Blackwell-Verlag aus: Stumpf et al., 2008.

gefolgert werden, dass die Senkung der cGMP-Konzentration durch Melatonin mit einer Hemmung der Insulinsekretion verbunden ist. Die Erkenntnisse sprechen dafür, dass Melatonin über die cGMP-Signalkaskade ebenso einen Insulin-senkenden Effekt vermittelt, wie es bei der bekannten Wirkung über den cAMP-Transduktionsweg der Fall ist. Möglicherweise spielt dabei eine Verknüpfung der cAMP- mit der cGMP- Signalkaskade eine Rolle, wie sie über die Aktivierung der PKA oder die Hemmung der cAMP-spezifischen PDE 3 durch cGMP auftreten kann.

Um mögliche Mechanismen der Melatoninwirkung auf die Insulinsekretion durch Senkung des cGMP auf-

zudecken, wurden weiterführend Untersuchungen über die mögliche Beteiligung der Proteinkinase G (PKG) als bedeutendem Bestandteil der cGMP-Signaltransduktionskade durchgeführt. Obwohl die Existenz der PKG im Pankreas und auch speziell in pankreatischen  $\beta$ -Zellen bekannt ist, gab es bislang keine Hinweise auf die Bedeutung des Proteins für die Insulinsekretion. Die Daten zeigen, dass die Blockade der PKG bei gering erhöhten cGMP-Konzentrationen die Insulin-erhöhende cGMP-Wirkung nicht beeinflusst; bei höheren cGMP-Gehalten die Blockade der PKG jedoch zur Hemmung der Insulinsteigerung durch cGMP führt. Es liegt daher die Vermutung nahe, dass die PKG erst bei höheren cGMP-Konzentrationen aktiviert wird und an der Signaltransduktion der cGMP-Kaskade beteiligt ist.

### 2.3.8. Ergebnisse zur Funktion von cyclic nucleotide-gated (CNG)-Kanälen in $\beta$ -Zellen

Neben der Aktivierung der PKG und cGMP-spezifischer Phosphodiesterasen sind CNG-Kanäle Effektorproteine des cGMP zur Regulation verschiedener zellulärer und physiologischer Prozesse. Mit dem Nachweis der mRNA von CNG-Kanal-Untereinheiten in der INS1-Zelle stellte sich die Frage, ob CNG-Kanäle als Komponenten des cGMP-Transduktionsweges auch an der Signalkaskade zur Insulinfreisetzung beteiligt sind. Die Blockade dieser CNG-Kanäle mit dem spezifischen Antagonisten *L-cis*-Diltiazem (LCD) führte zur signifikanten Senkung der Insulinfreisetzung. Nach Hemmung der CNG-Kanäle hatte 8-Br-cGMP keinen steigernden Effekt mehr auf die Insulinsekretion. Daraus kann geschlossen werden, dass CNG-Kanäle an der Insulinsteigernden Wirkung von cGMP beteiligt sind. Interessanterweise zeigten *real-time* RT-PCR-Befunde ferner, dass durch Melatonin nach Langzeitinkubation die mRNA-Expression des CNG-Kanals in Abhängigkeit von der Dosis signifikant gesenkt wird (Stumpf et al., 2009). Es liegt nahe, dass dies ein *downstream*-Effekt verminderter cGMP-Konzentrationen durch Melatonin ist, welcher konsekutiv zu Änderungen in der Insulinfreisetzung führt. Mit diesen Ergebnissen wurden erstmals Aussagen zum Vorkommen von CNG-Kanälen im Pankreas und speziell in der pankreatischen  $\beta$ -Zelle, zu deren Beteiligung an der Insulinsekretionskaskade und zum Einfluss von Melatonin auf diese Kanäle getroffen. CNG-Kanäle werden direkt durch Bindung von cGMP oder cAMP geöffnet. Somit kann der Einfluss auf die mRNA-Expression des CNG-Kanals ebenso aus der Melatonin-medierten Hemmung des cAMP-Signalweges resultieren. Zum Verständnis der Funktion der CNG-Kanäle in der pankreatischen  $\beta$ -Zelle sowie zum Einfluss von Melatonin auf diese Proteine sind weiterführende Untersuchungen notwendig

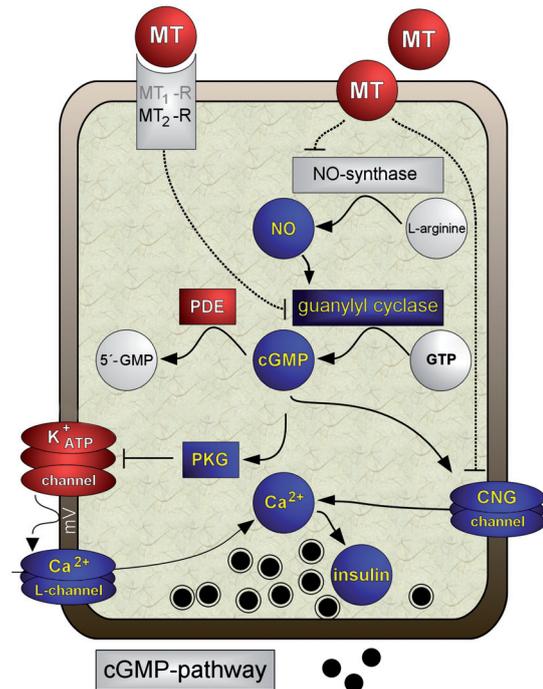


Abb. 10: Schema des Rezeptor-medierte Einflusses von Melatonin auf den Guanylatcyclase-cGMP-Signalweg der pankreatischen  $\beta$ -Zelle vermittelt über inhibitorische Gi-Proteine. Auf diesem Weg hemmt Melatonin die Insulinsekretion.

$\text{Ca}^{2+}$  L-channel, spannungsabhängiger Kalziumkanal; cGMP, cyclisches 3',5'-Guanosinmonophosphat; CNG-channel, cyclic nucleotide-gated channel; GMP, Guanosinmonophosphat; GTP, Guanosintriphosphat;  $\text{K}^{+}_{\text{ATP}}$ -channel, APT-abhängiger  $\text{K}^{+}$ -Kanal; MT, Melatonin;  $\text{MT}_1$ -R und  $\text{MT}_2$ -R, Melatonin  $\text{MT}_1$ - und  $\text{MT}_2$ -Rezeptor; NO, Stickstoffmonoxid; PDE, Phosphodiesterase; PKG, Proteinkinase G. Mit freundlicher Genehmigung durch den Blackwell-Verlag aus: Peschke, 2008.

(Zusammenfassung des Gi-Guanylatcyclase-cGMP-Signalweges unter dem Einfluss von Melatonin siehe Zellschema Abb. 10).

Die hier vorgestellten Untersuchungen zur physiologischen Bedeutung des  $\text{MT}_2$ -Rezeptors für die Vermittlung des Melatoninsignals und zum Einfluss von Melatonin auf die pankreatischen  $\beta$ -Zellen unter Einbeziehung der cGMP-Signalkaskade ergänzen bisherige Ergebnisse und erweitern das Verständnis über die Wirkung von Melatonin auf den Glukosestoffwechsel. Es konnte nachgewiesen werden, dass der  $\text{MT}_2$ -Rezeptor an der Insulin-senkenden Wirkung von Melatonin beteiligt ist und dass Melatonin die cGMP-Konzentrationen in INS1-Zellen in Abhängigkeit von Dosis und Inkubationszeit senkt. Dieser Effekt wird über die Regulation der löslichen Guanylatcyclase vermittelt. Genexpressionsanalysen der sGC in Inseln stoffwechselgesunder und Typ2-diabetischer Ratten unter Betrachtung tageszeitlicher Veränderungen ergänzen INS1-Zell-spezifische Untersuchungen. Darüber hinaus konnten Aussagen zu

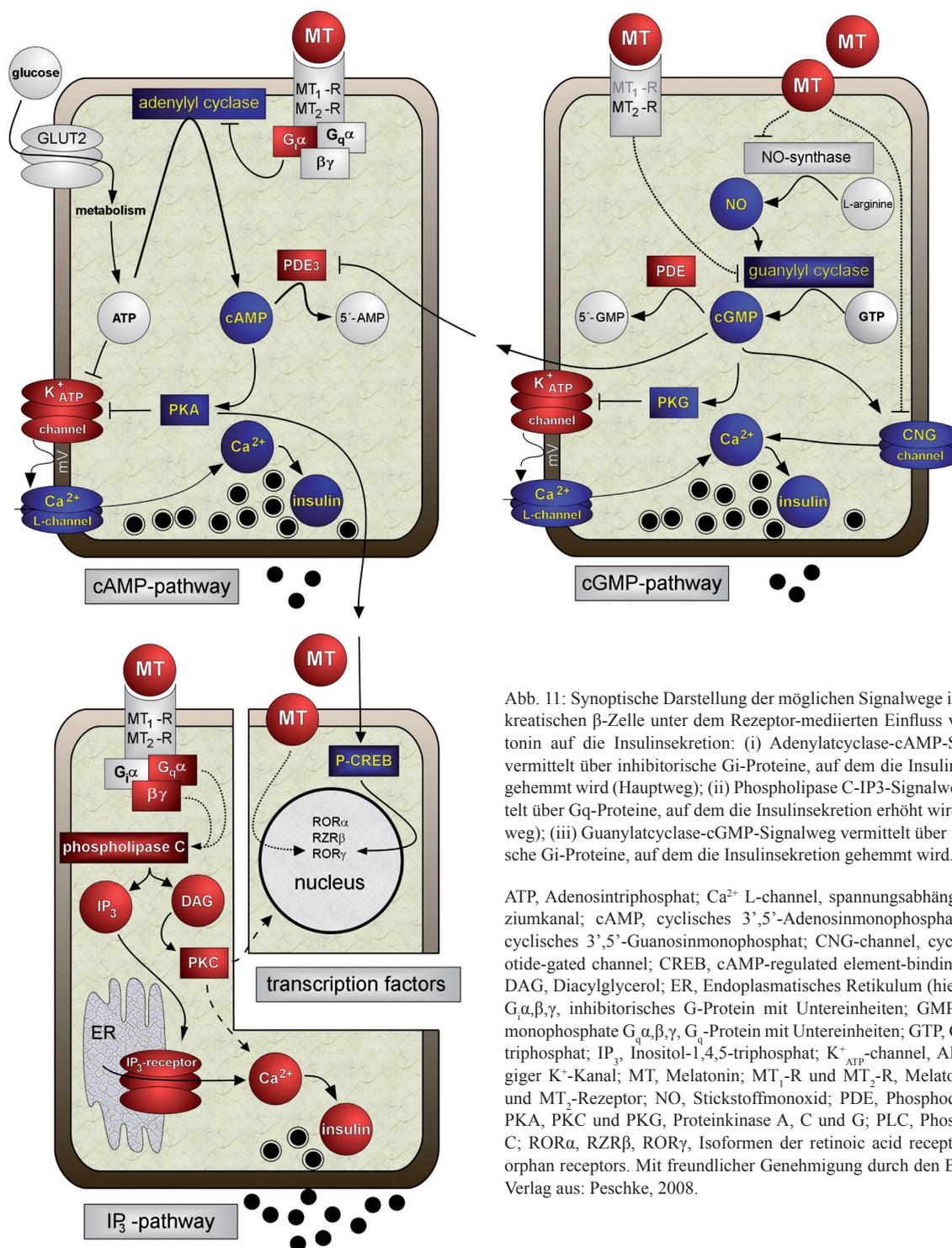


Abb. 11: Synoptische Darstellung der möglichen Signalwege in der pankreatischen  $\beta$ -Zelle unter dem Rezeptor-medierten Einfluss von Melatonin auf die Insulinsekretion: (i) Adenylatcyclase-cAMP-Signalweg vermittelt über inhibitorische  $G_i$ -Proteine, auf dem die Insulinsekretion gehemmt wird (Hauptweg); (ii) Phospholipase C-IP3-Signalweg vermittelt über  $G_q$ -Proteine, auf dem die Insulinsekretion erhöht wird (Nebenweg); (iii) Guanylatcyclase-cGMP-Signalweg vermittelt über inhibitorische  $G_i$ -Proteine, auf dem die Insulinsekretion gehemmt wird.

ATP, Adenosintriphosphat;  $Ca^{2+}$  L-Kanal, spannungsabhängiger Kalziumkanal; cAMP, cyclisches 3',5'-Adenosinmonophosphat; cGMP, cyclisches 3',5'-Guanosinmonophosphat; CNG-channel, cyclic nucleotide-gated channel; CREB, cAMP-regulated element-binding protein; DAG, Diacylglycerol; ER, Endoplasmatisches Retikulum (hier glattes);  $G_{\alpha,\beta,\gamma}$ , inhibitorisches G-Protein mit Untereinheiten;  $GMP$ , guanine monophosphate  $G_{\alpha,\beta,\gamma}$ ,  $G_q$ -Protein mit Untereinheiten;  $GTP$ , Guanosintriphosphat;  $IP_3$ , Inositol-1,4,5-triphosphat;  $K^+_{ATP}$ -channel, APT-abhängiger  $K^+$ -Kanal; MT, Melatonin;  $MT_1$ -R und  $MT_2$ -R, Melatonin  $MT_1$ - und  $MT_2$ -Rezeptor; NO, Stickstoffmonoxid; PDE, Phosphodiesterase; PKA, PKC und PKG, Proteinkinase A, C und G; PLC, Phospholipase C;  $ROR\alpha$ ,  $RZR\beta$ ,  $ROR\gamma$ , Isoformen der retinoic acid receptor related orphan receptors. Mit freundlicher Genehmigung durch den Blackwell-Verlag aus: Peschke, 2008.

Komponenten der cGMP-Signalkaskade in INS1-Zellen und zum Einfluss von cGMP, der PKG und CNG-Kanälen auf die Insulinsekretion getroffen werden. Aus den Ergebnissen lässt sich schließen, dass Melatonin – in Analogie zur Wirkung über den cAMP-Signalweg – durch Senkung der cGMP-Konzentration die Insulinsekretion hemmt.

Mit den Untersuchungen zur Wirkung von Melatonin auf die cAMP-, IP3- und cGMP-Signalkaskaden in der pankreatischen  $\beta$ -Zelle konnten umfassende Kenntnisse zur Modulation der Insulinsekretion durch das Indolamin erlangt werden (Synopsis der 3 Signalwege, cAMP, cGMP und IP3 unter dem Einfluss von Melatonin siehe Abb. 11). Offen bleibt die Frage, warum Melatonin seine

Effekte auf die Insulinfreisetzung der  $\beta$ -Zelle über unterschiedliche Signalkaskaden mediiert und welche funktionelle Bedeutung der Ausprägung beider Melatoninrezeptor-Formen (MT1 und MT2) in der Vermittlung von Melatonineffekten zukommt.

### 3. Melatonin-Insulin-Interaktionen: Untersuchungen an Typ1- und Typ2-diabetischen Tiermodellen sowie Patientenmaterial

Bisher standen die Melatoninrezeptor-Ausstattung sowie die Vermittlung des Melatonineinflusses auf Signalkaskaden der pankreatischen  $\beta$ -Zelle im Zentrum der Betrachtungen. Auf das mögliche Vorkommen von Melatoninrezeptoren auf anderen Inselzellen, wie beispielsweise  $\alpha$ -Zellen, wurde grundsätzlich nicht eingegangen (Ramracheya et al., 2008). Im Ergebnis wurde deutlich, dass Melatonin über die cAMP- und cGMP-Kaskade die Insulinsekretion senkt und nur unter besonderen experimentellen Bedingungen (Hemmung von inhibitorischen Gi-Proteinen mittels Pertussistoxin) die Insulinsekretion unter Nutzung der IP3-Kaskade erhöht (Nebenweg, physiologische Bedeutung bislang unbekannt). Für die Weiterverfolgung und mögliche Erklärung der Ergebnisse ist entscheidend und soll deshalb besonders hervorgehoben werden, dass Melatonin (nur) die stimulierte Insulinsekretion (durch Glukose, KCl oder Forskolin hervorgerufen) zu hemmen in der Lage ist.

Im 3. Teil soll nun kurz analysiert werden, in welcher Weise diabetische Stoffwechsellentgleisungen Einfluss auf die Synthese und Sekretion von Melatonin nehmen. Dazu konnte von uns erstmals 2006 Stellung bezogen werden (Peschke et al., 2006b), nachdem es gelungen war nachzuweisen, dass Typ2-diabetische Goto-Kakizaki(GK)-Ratten einen erniedrigten Melatonin-Plasmagehalt aufweisen, der sich mit einem erhöhten Melatoninrezeptor-Status (*real-time* RT-PCR-Untersuchungen) pankreatischer  $\beta$ -Zellen paarte. In dieser Arbeit konnte zweifelsfrei nachgewiesen werden, dass leicht erhöhte Insulinspiegel der Typ2-diabetischen GK-Ratten mit einer Senkung der Melatoninsynthese und konsekutiven Melatoninsekretion koinzidierten. Parallel konnten Tagesprofile der Melatoninsekretion von Typ2-diabetischen Patienten erfasst und in Übereinstimmung zu den Ergebnissen der GK-Ratten eine deutliche Absenkung von Melatonin im Plasma nachgewiesen werden. Erhärtet wurden die Befunde durch Bestimmungen der Arylalkylamin-N-Acetyl-Transferase(AA-NAT)-Enzymaktivität von Epiphysen (die AA-NAT wird als limitierendes Enzym der Melatoninsynthese angesehen), die bei den GK-Ratten gegenüber stoffwechselgesunden Wistar-Ratten ebenfalls erniedrigt war. Dieser Befund war von erhöhter Expression der AA-NAT-mRNA (kompensatorisch?) begleitet.

Schließlich war bei den GK-Ratten die pineale Insulinrezeptor-Expression erniedrigt, die Melatoninrezeptor-Expression der  $\beta$ -Zellen jedoch erhöht. Hinzu kam, dass periferfusionstechnische *ex vivo*-Untersuchungen von Epiphysen unter dem Einfluss von Insulin eindeutige Erniedrigungen Norepinephrin-stimulierter Melatoninsynthese zeigten (Peschke et al., 2008). Etwa zeitgleich wurde der Einfluss von Insulin auf die Norepinephrin(NE)-stimulierte Melatoninsynthese explantierter Ratteneiphysen durch Garcia und Mitarb. (2008) bestätigt, jedoch wurde im Gegensatz zu den eigenen Befunden festgestellt, dass Insulin die NE-stimulierte Melatoninsynthese ebenso wie die Tryptophanhydroxylase potenziert.

Diese bisher skizzierten eigenen Befunde waren so eindeutig und überzeugend, dass dem Zusammenhang weiter nachgegangen wurde und an vorhandenem menschlichen Pankreasgewebe (Operationsmaterial) von Stoffwechsellunauffälligen sowie Typ2-diabetischen Patienten Rezeptoranalysen durchgeführt wurden. Zunächst konnte in Übereinstimmung mit den an der Ratte erhobenen Befunden die Melatoninrezeptor-Ausstattung auch der menschlichen  $\beta$ -Zelle nachgewiesen werden. Zusätzlich wurde festgestellt, dass das menschliche Pankreas – im Vergleich zum MT2-Rezeptor – eine höhere Expression des MT1-Rezeptors aufweist und dass – wie oben bereits bei der GK-Ratte festgestellt – die Expression beider Melatoninrezeptoren im Pankreas von Typ2-Diabetikern erhöht ist (Peschke et al., 2007; Peschke, 2008).

*Eine erste Zusammenfassung erlaubt festzustellen, dass bei Typ2-diabetischen GK-Ratten als auch bei Typ2-diabetischen Patienten erhöhtes Plasmainsulin mit erniedrigter AA-NAT-Enzymaktivität sowie Melatoninsynthese und -sekretion koinzidieren und dass erniedrigter Plasma-Melatoningehalt von erhöhter Melatoninrezeptor-mRNA-Expression der pankreatischen  $\beta$ -Zellen begleitet ist. Bislang wurde jedoch noch nicht geklärt, ob es wirklich der erhöhte Insulinspiegel ist, der die Melatoninsenkung zur Folge hat, da nicht ausgeschlossen werden konnte, dass gegebenenfalls auch der erhöhte Glukosespiegel im Plasma die Ursache für die beschriebenen Effekte sein könnte.*

Um sich der Klärung dieser Frage zu nähern, wurden sowohl 6 als auch 45 Wochen alte Wistar-Ratten mit dem klassischen Diabetogen Streptozotocin (STZ, 60 mg/kg Körpergewicht) zur Entwicklung eines Typ1-Diabetes intraperitoneal gespritzt und nach 6 Wochen im Tagesgang (aller 3 h je 5 Tiere) getötet. Im Ergebnis des aufwendigen tierexperimentellen Vorgehens wurden Tagesprofile von jeweils jungen (12 Wochen) als auch älteren (51 Wochen) Kontroll- als auch STZ-Ratten gewonnen, wobei die STZ-Tiere erwartungsgemäß extrem erhöhte Glukosewerte im Plasma, in überraschender Weise aber auch erhöhten Melatonin-Plasmagehalt aufwiesen. Die Melatoninerhöhungen der STZ-Tiere waren verbunden

mit erhöhter Expression pinealer AA-NAT und erhöhter Expression pinealer Insulinrezeptor-mRNA. Dieses Ergebnis war nicht erwartet worden und die Veröffentlichung der Ergebnisse der 12 Wochen alten Tiere wurde zunächst solange zurückgehalten, bis die Ergebnisse der 2. Experimentalserie (ältere Tiere, 51 Wochen) ebenfalls vorlag. Auf Grund der Übereinstimmung der Ergebnisse bei jungen als auch älteren Tieren – nämlich erniedrigtes bis fehlendes Insulin koninziert mit erhöhtem Plasmamelatonin – konnte davon ausgegangen werden, dass nicht die Glukose, sondern das niedrige (fast fehlende) Insulin (als Ergebnis der  $\beta$ -Zell-Zerstörung durch STZ) die Ursache der Melatonin-Erhöhung sein müsste (Peschke et al., 2008). Dennoch blieb eine Unsicherheit, die darin bestand, dass STZ zwar relativ spezifisch die pankreatische  $\beta$ -Zelle zerstört, zusätzliche (unbekannte) Lateral-effekte aber nicht ausgeschlossen werden konnten. Um auch diese Frage eindeutig beantworten zu können, wurden mit dankenswerter Unterstützung der Medizinischen Hochschule Hannover Typ1-diabetische iddm-Ratten sowie deren Hintergrundstamm LEW1AR1 in die Untersuchungen einbezogen und nach anfänglichen Problemen mit der Zucht begonnen. Die Tiere entwickeln um den 60. Lebensstag einen Typ1-Diabetes, der nach wenigen Tagen auf Grund totalen Insulinmangels zum Tode führt. Die bisherigen Untersuchungsergebnisse, die im Tagesgang (aller 3 h unter L:D = 12:12) erhoben wurden, bestätigen die zuvor beschriebenen STZ-Befunde, nämlich, dass Insulinmangel erhöhte Melatonin-Plasmakonzentrationen hervorruft. Gestützt werden die Aussagen durch perifusionstechnische *ex vivo*-Untersuchungen explantierter Epiphysen von iddm- sowie LEW1AR1-Ratten als Kontrollen. Im Vergleich zu den LEW1AR1-Ratten reagieren die Epiphysen der Typ1-diabetischen iddm-Ratten mit verstärkter Melatoninsynthese und -sekretion auf NE-Stimulation. Die Perifusionsergebnisse explantierter Epiphysen machen deutlich, dass die gesteigerte Melatoninausschüttung allein auf „intra“-epiphysärer Aktivierung der Synthese-Maschinerie beruht (an dieser Stelle wird auf die graphische Dokumentation der Ergebnisse verzichtet, weil die Ergebnisse noch präliminären Charakters sind).

*Eine zweite Zusammenfassung erlaubt festzustellen, dass bei Typ1-diabetischen STZ-Ratten, ebenso wie bei Typ1-diabetischen iddm-Ratten erniedrigtes bzw. fehlendes Plasmainsulin mit erhöhter Melatoninsynthese und -sekretion koinzidieren.*

Derzeit werden umfängliche HPLC-, molekularbiologische *real-time* RT-PCR sowie weiterführende perifusionstechnische Untersuchungen an explantierten (*ex vivo*) Epiphysen durchgeführt, um die Ursachen und die Sinnhaftigkeit des eindeutigen Antagonismus zwischen Insulin und Melatonin zu verstehen.

Ein Erklärungsansatz könnte darin bestehen, dass in der Insulin-senkenden Funktion des Melatonins ein

Schutz der pankreatischen  $\beta$ -Zelle vor exzessiver Insulinsekretion und damit Überforderung der  $\beta$ -Zelle zu sehen ist. Dafür spricht – wie oben bereits hervorgehoben – dass Melatonin in unseren Experimenten allein die stimulierte Insulinsekretion hemmt. Dieses bislang spekulative Konzept orientiert sich an der Tatsache, dass beim Menschen des nachts der Melatonin-Plasmagehalt hoch ist, zu einer Zeit, in der – in aller Regel – wenig Insulin auf Grund fehlender Nahrungsaufnahme gebraucht wird. Inwieweit dieses Konzept auch auf die nachtaktive Ratte übertragbar ist, bleibt abzuwarten. Nicht unwesentlich könnte auch die Tatsache sein, dass mit zunehmendem Alter der Melatoningehalt im Plasma stetig abnimmt und die Typ2-Diabetesinzidenz steigt. Dieser Zusammenhang trifft jedoch nur für den Typ2-Diabetes zu, der auf einer  $\beta$ -Zell-Überforderung mit zunächst relativem und schließlich absolutem Insulinmangel beruht. Erst wenn die  $\beta$ -Zelle infolge einer totalen Überforderung „ausgebrannt“ ist (vor der Melatonin möglicherweise schützt), ist die Senkung der stimulierten Insulinsekretion durch Melatonin funktionell nicht mehr sinnvoll.

*Im Ergebnis der hier vorgestellten Ergebnisse und Deutungsversuche wird in einer dritten Zusammenfassung festgestellt, dass die Autoren dem Melatonin eine Schutzfunktion vor langfristig ungezügelter Insulinsekretion zuerkennen (Melatonin hemmt die stimulierte (!) Insulinsekretion). Die Autoren möchten sich von kurzgreifender Euphorie jüngster Mitteilungen abgrenzen (z. B. Diabetes Deutschland News vom 13. Februar 2009), dass das „Schlafhormon Melatonin das Diabetes-Risiko fördert“ und „man nur noch Medikamente zu entwickeln braucht, die das nächtliche Melatonin-Signal an den Insulin-produzierenden Zellen des Pankreas blockieren und so zu einer Normalisierung des Nüchtern-Blutzuckers beim Typ 2 Diabetes führen“. Daran ändern auch die oben beschriebenen und erst jüngst erkannten Genpolymorphismen (SNP's), die in unmittelbarer Nähe der codierenden Sequenz des MT2-Rezeptors lokalisiert sind, nichts (Stai-ger et al., 2008; Bouatia-Naji et al., 2009; Lyssenko et al., 2009; Prokopenko et al., 2009; Sparso et al., 2009), da sich bisher keine überzeugenden funktionellen Aussagen oder Zusammenhänge über die Bedeutung des MT2-Rezeptors für die Genese des Typ2-Diabetes ableiten lassen.*

## Literatur

- Andreopoulos S, Papapetropoulos A (2000). Molecular aspects of soluble guanylyl cyclase regulation. *Gen Pharmacol* 34:147–157.
- Arava Y, Adamsky K, Ezerzer C, Ablamunits V, Walker MD (1999). Specific gene expression in pancreatic  $\beta$ -cells: cloning and characterization of differentially expressed genes. *Diabetes* 48:552–556.
- Bach AG, Wolgast S, Mühlbauer E, Peschke E (2005). Melatonin stimulates inositol-1,4,5-trisphosphate and  $\text{Ca}^{2+}$  release from INS1 insulinoma cells. *J Pineal Res* 39:316–323.

- Bender AT, Beavo JA (2006). Cyclic nucleotide phosphodiesterases: molecular regulation and clinical use. *Pharmacol Rev* 58:488–520.
- Bettahi I, Pozo D, Osuna C, Reiter RJ, Acuna-Castroviejo D, Guerrero JM (1996). Melatonin reduces nitric oxide synthase activity in rat hypothalamus. *J Pineal Res* 20:205–210.
- Biel M, Sautter A, Ludwig A, Hofmann F, Zong X (1998). Cyclic nucleotide-gated channels—mediators of NO:cGMP-regulated processes. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 358:140–144.
- Bouatia-Naji N, Bonfond A, Cavalcanti-Proença C, Sparsø T, Holmkvist J, Marchand M, Delplanque J, Lobbens S, Rocheleau G, Durand E, De Graeve F, Chèvre JC, Borch-Johnsen K, Hartikainen AL, Ruokonen A, Tichet J, Marre M, Weill J, Heude B, Tauber M, Lemaire K, Schuit F, Elliott P, Jørgensen T, Charpentier G, Hadjadj S, Cauchi S, Vaxillaire M, Sladek R, Visvikis-Siest S, Balkau B, Lévy-Marchal C, Pattou F, Meyre D, Blakemore AI, Jarvelin MR, Walley AJ, Hansen T, Dina C, Pedersen O, Froguel P (2009). A variant near MTNR1B is associated with increased fasting plasma glucose levels and type 2 diabetes risk. *Nat Genet* 41:89–94.
- Brundege JM, Diao L, Proctor WR, Dunwiddie TV (1997). The role of cyclic AMP as a precursor of extracellular adenosine in the rat hippocampus. *Neuropharmacology* 36:1201–1210.
- Brunton LL, Buss JE (1980). Export of cyclic AMP by mammalian reticulocytes. *J Cyclic Nucleotide Res* 6:369–377.
- Brunton LL, Mayer SE (1979). Extrusion of cyclic AMP from pigeon erythrocytes. *J Biol Chem* 254:9714–9720.
- Bubis M, Zisapel N (1999). Involvement of cGMP in cellular melatonin responses. *Biol Cell* 91:45–49.
- Carpenter L, Cordery D, Biden TJ (2001). Protein kinase Cdelta activation by interleukin-1beta stabilizes inducible nitric-oxide synthase mRNA in pancreatic beta-cells. *J Biol Chem* 276:5368–5374.
- Chen ZS, Lee K, Kruh GD (2001). Transport of cyclic nucleotides and estradiol 17-beta-D-glucuronide by multidrug resistance protein 4. Resistance to 6-mercaptopurine and 6-thioguanine. *J Biol Chem* 276:33747–33754.
- Chen ZS, Guo Y, Belinsky MG, Kotova E, Kruh GD (2005). Transport of bile acids, sulfated steroids, estradiol 17-beta-D-glucuronide, and leukotriene C4 by human multidrug resistance protein 8 (ABCC11). *Mol Pharmacol* 67:545–557.
- Craven KB, Zagotta WN (2006). CNG and HCN channels: two peas, one pod. *Annu Rev Physiol* 68:375–401.
- Crespo E, Macias M, Pozo D, Escames G, Martin M, Vives F, Guerrero JM, Acuna-Castroviejo D (1999). Melatonin inhibits expression of the inducible NO synthase II in liver and lung and prevents endotoxemia in lipopolysaccharide-induced multiple organ dysfunction syndrome in rats. *FASEB J* 13:1537–1546.
- Csernus VJ, Hammer T, Peschke D, Peschke E (1998). Dynamic insulin secretion from perfused rat pancreatic islets. *Cell Mol Life Sci* 54:733–743.
- Dubocovich ML, Masana MI, Jacob S (1997). Melatonin receptor antagonists that differentiate between the human Mel1a and Mel1b recombinant subtypes are used to assess the pharmacological profile of the rabbit retina ML1 presynaptic heteroreceptor. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 355:365–375.
- Ehshes JA, Pelech SL, Pederson RA, McIntosh CHS (2002). Glucose-dependent insulinotropic polypeptide activates the Raf-Mek1/2-ERK1/2 module via a cyclic AMP/cAMP-dependant protein kinase/Rap1-mediated pathway. *J Biol Chem* 277:37088–37097.
- Faillace MP, Keller Sarmentino MI, Rosenstein RE (1996). Melatonin effect on the cyclic cGMP system in the golden hamster retina. *Brain Res* 711:112–117.
- Finnegan RB, Carey GB (1998). Characterization of cyclic AMP efflux from swine adipocytes in vitro. *Obes Res* 6:292–298.
- Garcia RAP, Afeche SC, Scialfa JH, Amaral FG, Santos SHJ, Lima FB, Young ME, Cipolla-Neto J (2008). Insulin modulates norepinephrine-mediated melatonin synthesis in cultured rat pineal gland. *Life Sci* 82:108–114.
- Gilad E, Matzkin H, Zisapel N (1997). Inactivation of melatonin receptors by protein kinase C in human prostate epithelial cells. *Endocrinology* 138:4255–4261.
- Gitto E, Reiter RJ, Cordaro SP, La Rosa M, Chiurazzi P, Trimarchi G, Gitto P, Calabro MP, Barberi I (2004). Oxidative and inflammatory parameters in respiratory distress syndrome of preterm newborns: beneficial effects of melatonin. *Am J Perinatol* 21:209–216.
- Harteneck C, Koesling D, Söling A, Schultz G, Böhme E (1990). Expression of soluble guanylyl cyclase. Catalytic activity requires two enzyme subunits. *FEBS Lett* 272:217–222.
- Jedlitschky G, Burchell B, Keppler D (2000). The multidrug resistance protein 5 functions as an ATP-dependent export pump for cyclic nucleotides. *J Biol Chem* 275:30069–30074.
- Jin X, von Gall C, Pieschl RL, Gribkoff VK, Stehle JH, Reppert SM, Weaver DR (2003). Targeted disruption of the mouse Mel(1b) melatonin receptor. *Mol Cell Biol* 23:1054–1060.
- Jones PM, Persaud SJ, Bjaaland T, Pearson JD, Howell SL (1992). Nitric oxide is not involved in the initiation of insulin secretion from rat islets of Langerhans. *Diabetologia* 35:1020–1027.
- Kaminski A, Gao H, Morgan NG (2004). Involvement of the cGMP signaling pathway in the regulation of viability in insulin-secreting BRIN-BD11 cells. *FEBS Lett* 559:118–124.
- Kaneko Y, Ishikawa T, Amano S, Nakayama K (2003). Dual effect of nitric oxide on cytosolic Ca<sup>2+</sup> concentration and insulin secretion in rat pancreatic beta-cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 284:C1215–1222.
- Kemp DM, Ubeda M, Habener JF (2002). Identification and functional characterization of melatonin Mel 1a receptors in pancreatic beta cells: potential role in incretin-mediated cell function by sensitization of cAMP signaling. *Mol Cell Endocrinol* 191:157–166.
- Kondrashin A, Nesterova M, Cho-Chung YS (1999). Cyclic adenosine 3':5'-monophosphate-dependent protein kinase on the external surface of LS-174T human colon carcinoma cells. *Biochemistry* 38:172–179.
- Kuhn, M (2003). Structure, regulation, and function of mammalian membrane guanylyl cyclase receptors, with a focus on guanylyl cyclase-A. *Circ Res* 93:700v709.
- Lajoix AD, Reggio H, Charde T, Peraldi-Roux S, Tribillac F, Roye M, Dietz S, Broca C, Manteghetti M, Ribes G, Wollheim CB, Gross R (2001). A neuronal isoform of nitric oxide synthase expressed in pancreatic beta-cells controls insulin secretion. *Diabetes* 50:1311–1323.
- Laychock SG, Modica ME, Cavanaugh CT (1991). L-arginine stimulates cyclic guanosine 3',5'-monophosphate formation in rat islets of Langerhans and RINm5F insulinoma cells: evidence for L-arginine:nitric oxide synthase. *Endocrinology* 129:3043–3052.
- Liang R, Nickkholgh A, Hoffmann K, Kern M, Schneider H, Sobirey M, Zorn M, Büchler MW, Schemmer P (2009). Melatonin protects from hepatic reperfusion injury through inhibition of IKK and JNK pathways and modification of cell proliferation. *J Pineal Res* 46:8–14.
- Liu C, Weaver DR, Jin X, Shearman LP, Pieschl RL, Gribkoff VK, Reppert SM (1997). Molecular dissection of two distinct actions of melatonin on the suprachiasmatic circadian clock. *Neuron* 19:91–102.
- Lopez-Gonzalez MA, Calvo JR, Osuna C, Guerrero JM (1992). Interaction of melatonin with human lymphocytes: evidence for binding sites coupled to potentiation of cyclic AMP stimulated by vasoactive intestinal peptide and activation of cyclic cGMP. *J Pineal Res* 12:97–104.
- Lucas KA, Pitari GM, Kazerounian S, Ruiz-Stewart I, Park J, Schulz S, Chepenik KP, Waldman SA (2000). Guanylyl cyclases and signaling by cyclic GMP. *Pharmacol Rev* 52:375–414.
- 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 (2009). Common variant in MTNR1B associated with increased risk of type 2 diabetes and impaired early insulin secretion. *Nat Genet* 41:82–88.
- Matsuura N, Ishikawa T, Abe S, Yuyama H, Sugino F, Ishii K, Nakayama K (1999). Nitric oxide-cyclic cGMP system potentiates glucose-induced rise in cytosolic  $Ca^{2+}$  concentration in rat pancreatic beta-cells. *Life Sci* 65:1515–1522.
- Maurice DH, Palmer D, Tilley DG, Dunkerley HA, Netherton SJ, Raymond DR, Elbatary HS, Jimmo SL (2003). Cyclic nucleotide phosphodiesterase activity, expression, and targeting in cells of the cardiovascular system. *Mol Pharmacol* 64:533–546.
- Mühlbauer E, Peschke E (2007). Expression of both the MT1- and MT2-melatonin receptor in the rat pancreas, islet and  $\beta$ -cell. Letter to the editor. *J Pineal Res* 42:105–106.
- Nakada S, Ishikawa T, Yamamoto Y, Kaneko Y, Nakayama K (2000). Constitutive nitric oxide synthases in rat pancreatic islets: direct imaging of glucose-induced nitric oxide production in  $\beta$ -cells. *Eur J Physiol* 447:305–311.
- Nonno R, Pannacci M, Lucini V, Angeloni D, Fraschini F, Stankov BM (1999). Ligand efficacy and potency at recombinant human MT2 melatonin receptors: evidence for agonist activity of some mt1-antagonists. *Br J Pharmacol* 127:1288–1294.
- Orlov SN, Maksimova NV (1999). Efflux of cyclic adenosine monophosphate from cells: mechanisms and physiological implications. *Biochemistry (Mosc.)* 64:127–135.
- Peschke E (2003a). Zum Einfluss von Melatonin auf Insulinsekretion, Signaltransduktion und Sekretionsrhythmik pankreatischer B-Zellen *in vitro*. In: Peschke E (ed.) *Endokrinologie, Vorträge im Rahmen des Projektes „Zeitstrukturen endokriner Systeme“*. Abh Sächs Akad Wiss, Math-nat Kl 60/1. Stuttgart/Leipzig, S. Hirzel, S. 89–119.
- Peschke E (2003b). Vorhaben Zeitstrukturen endokriner Systeme. *Jb Sächs Akad Wiss* 2001/2002, S. 278–298.
- Peschke E (2004). Über den phylogenetischen Funktionswandel des Pinealorgans und seine Bedeutung für die Insulinsekretion bei Mammalia. *Sitzungsber Sächs Akad Wiss, Math-nat Kl* 129/3. Stuttgart/Leipzig: S. Hirzel. 34 Seiten, 22 Abbildungen.
- Peschke E (2008). Melatonin, endocrine pancreas and diabetes. *J Pineal Res* 44:26–40.
- Peschke E, Bach AG, Mühlbauer E (2006a). Parallel signaling pathways of melatonin in the pancreatic  $\beta$ -cell. *J Pineal Res* 40:184–191.
- Peschke E, Fauteck JD, Musshoff U, Schmidt F, Beckmann A, Peschke D (2000). Evidence for a melatonin receptor within pancreatic islets of neonate rats: functional, autoradiographic, and molecular investigations. *J Pineal Res* 28:156–164.
- Peschke E, Frese T, Chankiewicz E, Peschke D, Preiss U, Schneyer U, Spessert R, Mühlbauer E (2006b). Diabetic Goto Kakizaki rats as well as type 2 diabetic patients show a decreased diurnal serum melatonin level and an increased pancreatic melatonin-receptor status. *J Pineal Res* 40:135–143.
- Peschke E, Mühlbauer E (2007). Funktionelle Beziehungen zwischen Melatonin und Insulin – Untersuchungsergebnisse an stoffwechselgesunden und diabetischen Versuchstieren und Patienten. In: Peschke E (ed.) *Endokrinologie III, Vorträge im Rahmen des Projekts „Zeitstrukturen endokriner Systeme“*. Abh Sächs Akad Wiss, Math-nat Kl, Band 64/4. Stuttgart/Leipzig, S. Hirzel, S. 103–118.
- Peschke E, Mühlbauer E, Musshoff U, Csernus VJ, Chankiewicz E, Peschke D (2002). Receptor (MT<sub>1</sub>) mediated influence of melatonin on cAMP content and insulin secretion of rat insulinoma cells INS1. *J Pineal Res* 33:63–71.
- Peschke E, Peschke D (1998). Evidence for a circadian rhythm of insulin release from perfused rat pancreatic islets. *Diabetologia* 41:1085–1092.
- Peschke E, Peschke D, Hammer T, Csernus V (1997). Influence of melatonin and serotonin on glucose-stimulated insulin release from perfused rat pancreatic islets *in vitro*. *J Pineal Res* 23:156–163.
- Peschke E, Stumpf I, Bazwinsky I, Litvak L, Dralle H, Mühlbauer E (2007). Melatonin and type 2 diabetes – a possible link? *J Pineal Res* 42:350–358.
- Peschke E, Wolgast S, Bazwinsky I, Pönicke K, Mühlbauer E (2008). Increased melatonin synthesis in pineal glands of rats in streptozotocin induced type 1 diabetes. *J Pineal Res* 45:439–448.
- Petit L, Lacroix I, De Coppet P, Strosberg AD, Jockers R (1999). Differential signaling of human Mel1a and Mel1b melatonin receptors through the cyclic guanosine 3'-5'-monophosphate pathway. *Biochem Pharmacol* 58:633–639.
- Picinato MC, Haber EP, Cipolla-Neto J, Curi R, de Oliveira Carvalho CR, Carpinelli AR (2002a). Melatonin inhibits insulin secretion and decreases PKA levels without interfering with glucose metabolism in rat pancreatic islets. *J Pineal Res* 33:156–160.
- Picinato MC, Haber EP, Carpinelli AR, Cipolla-Neto J (2002b). Daily rhythm of glucose-induced insulin secretion by isolated islets from intact and pinealectomized rat. *J Pineal Res* 33:172–177.
- Pozo D, Reiter RJ, Calvo RJ (1997). Inhibition of cerebellar nitric oxide synthase and cyclic GMP production by melatonin via complex formation with calmodulin. *J Cell Biochem* 65:430–442.
- Prokopenko I, Langenberg C, Florez JC, Saxena R, Soranzo N, Thorleifsson G, Loos RJ, Manning AK, Jackson AU, Aulchenko Y, Potter SC, Erdos MR, Sanna S, Hottenga JJ, Wheeler E, Kaakinen M, Lysenko V, Chen WM, Ahmadi K, Beckmann JS, Bergman RN, Bochud M, Bonnycastle LL, Buchanan TA, Cao A, Cervino A, Coin L, Collins FS, Crisponi L, de Geus EJ, Dehghan A, Deloukas P, Doney AS, Elliott P, Freimer N, Gateva V, Herder C, Hofman A, Hughes TE, Hunt S, Illig T, Inouye M, Isomaa B, Johnson T, Kong A, Krestyaninova M, Kuusisto J, Laakso M, Lim N, Lindblad U, Lindgren CM, McCann OT, Mohlke KL, Morris AD, Naitza S, Orrù M, Palmer CN, Pouta A, Randall J, Rathmann W, Saramies J, Scheet P, Scott LJ, Scuteri A, Sharp S, Sijbrands E, Smit JH, Song K, Steinthorsdottir V, Stringham HM, Tuomi T, Tuomilehto J, Uitterlinden AG, Voight BF, Waterworth D, Wichmann HE, Willemsen G, Witteman JC, Yuan X, Zhao JH, Zeggini E, Schlessinger D, Sandhu M, Boomsma DI, Uda M, Spector TD, Penninx BW, Altshuler D, Vollenweider P, Jarvelin MR, Lakatta E, Waeber G, Fox CS, Peltonen L, Groop LC, Mooser V, Cupples LA, Thorsteinsdottir U, Boehnke M, Barroso I, Van Duijn C, Dupuis J, Watanabe RM, Stefansson K, McCarthy MI, Wareham NJ, Meigs JB, Abecasis GR (2009). Variants in MTNR1B influence fasting glucose levels. *Nat Genet* 41:77–81.
- Pyrriochou A, Papapetropoulos A (2005). Soluble guanylyl cyclase: more secrets revealed. *Cell Signal* 17:407–413.
- Ramracheya RD, Muller DS, Squires PE, Brereton H, Sugden D, Huang GC, Amiel SA, Jones PM, Persaud SJ (2008). Function and expression of melatonin receptors on human pancreatic islets. *J Pineal Res* 44:273–279.
- Reppert SM, Godson C, Mahle CD, Weaver DR, Slaugenhaupt SA, Gusella JG (1995a). Molecular characterization of a second melatonin receptor expressed in human retina and brain: The Mel<sub>1b</sub> melatonin receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 92:8734–8738.
- Reppert SM, Weaver DR, Cassone VM, Godson C, Kolakowski Jr LF (1995b). Melatonin receptors are for the birds: molecular analysis of two receptor subtypes differentially expressed in chick brain. *Neuron* 15:1003–1015.
- Reppert SM, Weaver DR, Ebisawa T (1994). Cloning and characterization of a mammalian melatonin receptor that mediates reproductive and circadian responses. *Neuron* 13:1177–1185.
- Rindler MJ, Bashor MM, Spitzer N, Saier Jr MH (1978). Regulation of adenosine 3':5'-monophosphate efflux from animal cells. *J Biol Chem* 253:5431–5436.
- Rönn T, Wen J, Yang Z, Lu B, Du Y, Groop L, Hu R, Ling C (2009). A

- common variant in MTNR1B, encoding melatonin receptor 1B, is associated with type 2 diabetes and fasting plasma glucose in Han Chinese individuals. *Diabetologia* 52:830–833.
- Rosenberg PA, Knowles R, Knowles KP, Li Y (1994). Beta-adrenergic receptor-mediated regulation of extracellular adenosine in cerebral cortex in culture. *J Neurosci* 14:2953–2965.
- Saenz DA, Turjanski AG, Sacca GB (2002). Physiological concentrations of melatonin inhibit the nitridergic pathway in the Syrian hamster retina. *J Pineal Res* 33:31–36.
- Satake N, Oe H, Sawada T, Shibata S (1991). The mode of vasorelaxing action of melatonin in rabbit aorta. *Gen Pharmacol* 22:219–221.
- Silva CLM, Tamura EK, Macedo SM, Cecon E, Bueno-Alves L, Farsky SH, Ferreira ZS, Markus RP (2007). Melatonin inhibits nitric oxide production by microvascular endothelial cells in vivo and in vitro. *Br J Pharm* 151:195–205.
- Sjoholm A (1997). Glucose stimulates islet beta-cell mitogenesis through GTP-binding and by protein kinase C-dependent mechanisms. *Diabetes* 46:1141–1147.
- Sparsø T, Bonnefond A, Andersson E, Bouatia-Naji N, Holmkvist J, Wegner L, Grarup N, Gjesing AP, Banasik K, Cavalcanti-Proença C, Marchand M, Vaxillaire M, Charpentier G, Jarvelin MR, Tichet J, Balkau B, Marre M, Lévy-Marcha C, Faerch K, Borch-Johnsen K, Jørgensen T, Madsbad S, Poulsen P, Vaag A, Dina C, Hansen T, Pedersen O, Froguel P (2009). The G-allele of intronic rs10830963 in MTNR1B confers increased risk of impaired fasting glycemia and type 2 diabetes through an impaired glucose-stimulated insulin release: studies involving 19,605 Europeans. *Diabetes Publish Ahead of Print*, published online on Mar 26 asbdb08-1660.
- Staiger H, Machicao F, Schäfer SA, Kirchhoff K, Kantartzis K, Guthoff M, Silbernagel G, Stefan N, Häring HU, Fritsche A (2008). Polymorphisms within the novel type 2 diabetes risk locus MTNR1B determine beta-cell function. *PLoS ONE* 3:e3962.
- Steffgen J, Rohrbach S, Beery E, Ersoy D, Jarry H, Metten M, Bornstein SR, Müller GA, Burckhardt G (1999). Demonstration of a probenecid-inhibitable anion exchanger involved in the release of cortisol and cAMP and in the uptake of p-aminohippurate in bovine adrenocortical cells. *Cell Physiol Biochem* 9:72–80.
- Storr M, Koppitz P, Sibaev A, Saur D, Kurjak M, Franck H, Schusdziarra V, Allescher HD (2002). Melatonin reduces non-adrenergic, non-cholinergic relaxant neurotransmission by inhibition of nitric oxide synthase activity in the gastrointestinal tract of rodents in vitro. *J Pineal Res* 33:101–108.
- Stumpf I, Bazwinsky I, Peschke E (2009). Modulation of the cGMP signaling pathway by melatonin in pancreatic  $\beta$ -cells. *J Pineal Res* 46:140–147.
- Stumpf I, Mühlbauer E, Peschke E (2008). Involvement of the cGMP pathway in mediating the insulin-inhibitory effect of melatonin in pancreatic beta-cells. *J Pineal Res* 45: 318–327.
- Tamura EK, Silva CL, Markus RP (2006). Melatonin inhibits endothelial nitric oxide production in vitro. *J Pineal Res* 41:267–274.
- Valero M, Espine LM, Mosquera J (2006). Melatonin decreases nitric oxide production, inducible nitric oxide synthase expression and lipid peroxidation induced by Venezuelan encephalitis equine virus in neuroblastoma cell cultures. *Neurochem Res* 31:925–932.
- Vanecek J (1998). Cellular mechanisms of melatonin action. *Physiol Rev* 78:687–721.
- Vanecek J, Vollrath L (1989). Melatonin inhibits cyclic AMP and cyclic GMP accumulation in the rat pituitary. *Brain Res* 505:157–159.
- Vara E, Tamarit-Rodriguez J (1991). Does cyclic guanosine monophosphate mediate noradrenaline-induced inhibition of islet insulin secretion stimulated by glucose and palmitate? *Biochem* 278:243–248.
- Vesely DL (1981). Melatonin enhances guanylate cyclase activity in a variety of tissues. *Mol Cell Biochem* 35:55–58.
- Wang X, Li H, De Leo D, Guo W, Koshkin V, Fantus IG, Giacca A, Chan CB, Wheeler MB (2004). Gene and protein kinase expression profiling of reactive oxygen species-associated lipotoxicity in the pancreatic  $\beta$ -cell line MIN6. *Diabetes* 53:129–140.
- Wells GB, Tanaka JC (1997). Ion selectivity predictions from a two-site permeation model for the cyclic nucleotide-gated channel of retinal rod cells. *Biophys J* 72:127–140.
- Zwiler J, Revel MO, Basset P (1981). Evidence for phosphorylation of rat brain guanylate cyclase by cyclic AMP-dependent protein kinase. *Biochem Biophys Res Commun* 104:1381–1387.