

Sitzungsberichte der Sächsischen Akademie der Wissenschaften zu Leipzig · Mathematisch-naturwissenschaftliche Klasse · Band 129 · Heft 3

Elmar Peschke

**Über den phylogenetischen Funktionswandel
des Pinealorgans und seine Bedeutung für
die Insulinsekretion bei Mammalia**



Verlag der Sächsischen Akademie der Wissenschaften zu Leipzig · In Kommission bei S. Hirzel Stuttgart/Leipzig

Gedruckt mit Unterstützung des Freistaates Sachsen
(Sächsisches Staatsministerium für Wissenschaft und Kunst)

Autor:
Prof. Dr. Elmar Peschke
Martin-Luther-Universität Halle–Wittenberg, Institut für Anatomie
und Zellbiologie, D-06097 Halle/S.

Vortrag gehalten in der Plenarsitzung am 14. Juni 2002
Manuskript eingereicht am 20. Juni 2003
Druckfertig erklärt am 6. Februar 2004

Mit 22 Abbildungen

Bibliographische Information der Deutschen Bibliothek

Die Deutsche Bibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliographie; detaillierte bibliographische Daten sind im Internet über <http://dnb.ddb.de> abrufbar.

ISBN 3-7776-1306-1

Jede Verwertung dieses Werkes außerhalb der Grenzen des Urheberrechtsgesetzes ist unzulässig und strafbar. Dies gilt insbesondere für Übersetzung, Nachdruck, Mikroverfilmung oder vergleichbare Verfahren sowie für die Speicherung in Datenverarbeitungsanlagen. © 2004 Sächsische Akademie der Wissenschaften zu Leipzig.

Druckvorstufe: Media & Office Services Leipzig
Druck und Binden: druckhaus köthen GmbH

Printed in Germany

Inhalt

Einleitung	5
Das dritte Auge – Mythos oder Realität?	5
Descartes und die Epiphysis cerebri	6
Über den Funktionswandel des Pinealorgans in der aufsteigenden Wirbeltierreihe	9
Pinealorgan und Rhythmogenese	11
Zum Funktionsspektrum der Epiphyse und ihrer Bedeutung als Keuschheitsdrüse	14
Zum Einfluss von Indolaminen (Melatonin und Serotonin) auf die Insulinsekretion isolierter LANGERHANSscher Inseln sowie von Melatonineffekten auf die Insulin-produzierende Ratten-Insulinomazelle INS-1	15
Untersuchungen zum Nachweis von Melatoninrezeptoren (MT1) in der pankreatischen Insel neonater Wistar-Ratten sowie bei der Insulinproduzierenden Ratten-Insulinomazelle INS-1	17
Befunde zur Melatoninrezeptor-medierten Signaltransduktion in INS-1-Insulinomazellen	21
Befunde zum molekulargenetischen Hintergrund circadian-rhythmischer Insulinfreisetzung isolierter pankreatischer Ratteninseln unter perfusions-technischen <i>in vitro</i> -Bedingungen	24
Einfluss von Melatonin auf Radikal-induzierte Veränderungen pankreatischer B-Zellen neonater Wistar-Ratten <i>in vitro</i>	28
Zusammenfassung und Ausblick	32
Literatur	33

Einleitung

Die Abbildung der Umwelt durch Sinnesorgane befähigt uns zu einer gewinnbringenden Einnischung in Raum und Zeit. Wenn wir auch einen „Zeitsinn“ oder ein Organ der „Zeitmessung“ im engeren Sinne nicht kennen, ermöglichen unsere Sinnesorgane dennoch die Kontaktaufnahme nicht nur mit dem Raum, sondern auch mit Zeitvermittelnden Ereignissen und sind damit von unverzichtbarer Bedeutung für Interaktionen mit der Umwelt sowie sinnvolle Integration in sie. Bei dieser Integration in unsere Umwelt kommt dem optischen System, unserem „vornehmsten Sinn“, nicht nur bei der gnostischen, sondern auch bei der räumlichen und der zeitlichen Orientierung eine ganz entscheidende Bedeutung zu. Der hoch entwickelte und leistungsfähige „Sehsinn“ der Primaten stellte in der Evolution einen entscheidenden Selektionsvorteil dar, wobei sich die Bedeutung des Lichtes nicht allein auf Erkennungsmechanismen reduziert. Vielmehr synchronisiert Licht als stärkster Zeitgeber ständig unsere endogen generierten Rhythmen und nimmt dadurch koordinierenden und modifizierenden sowie letztlich disziplinierenden Einfluss auf biologische Funktionen sowie physiologische Abläufe und Aktivitätsmuster im Tages- und Jahresgang.

Das dritte Auge – Mythos oder Realität?

Mit der Etablierung der Chronobiologie als medizinisch-biologische Teildisziplin wurden jahrtausendealte Beobachtungen und Erkenntnisse in den vergangenen Jahrzehnten einer wissenschaftlichen Analytik zugeführt, wobei die Frage nach dem Rhythmusgenerator sowie einem möglichen „Zeitsinn“ oftmals in engem Zusammenhang mit der Bedeutung eines überzähligen „dritten Auges“ diskutiert wurde. Gegenstandslos sind in diesem Zusammenhang überzählige Medianaugen, die uns in den Mythen unterschiedlichster Kulturkreise begegnen und sich auf eine Fehlbildung, also auf ein Malheur der ontogenetischen Entwicklung, zurückführen lassen und keinerlei Bedeutung für die hier zu analysierenden Fragen und Probleme haben. Die Abbildungen 1 und 2 zeigen beispielhaft Missbildungen (Terata, Monster) mit Medianäugigkeit (Cyclopenbildungen) aus der MECKEL-Sammlung des Institutes für Anatomie und Zellbiologie der Martin-Luther-Universität Halle – Wittenberg. Entsprechende Terata haben mit Sicherheit Pate gestanden für den wohl bekanntesten Cyclophen, der uns in der Odyssee als Polyphem begegnet [nähere Angaben siehe PESCHKE, 2001 a].



Abb. 1: Präparat einer Missbildung aus der MECKEL-Sammlung des Institutes für Anatomie und Zellbiologie der Martin-Luther-Universität Halle–Wittenberg (Inv.-Nr. 55, Standort 116/2/7) mit medianer Stirn-Missbildung: zusätzliches „Stirnauge“, hier „drittes Auge“



Abb. 2: Präparat einer Missbildung aus der MECKEL-Sammlung des Institutes für Anatomie und Zellbiologie der Martin-Luther-Universität Halle–Wittenberg (Inv.-Nr. 322, Standort 83/3/2) mit Verschmelzung der beiden Orbitae zu einer gemeinsamen medianen Orbita; „singuläres medianes Cycloopenauge“

DESCARTES und die Epiphysis cerebri

Von besonderer Bedeutung für die Frage nach einem möglichen „dritten Auge“ sind jedoch die Abhandlungen zur Philosophie des Lebendigen („Les Traitez de l’Homme et de la Formation du Foetus“ 1632 und „La Description du Corps Humain“ 1648) von RENÉ DESCARTES (1596–1650), die „als Beginn konsequent kausalanalytischen Den-

kens in Biologie und Physiologie“ [ROTSCHUH, 1969] verstanden werden können (siehe Abb. 3 mit dem Titelblatt von „Les Traitez de l’Homme et de la Formation du Foetus“). In diesen Schriften ordnete der geniale französische Aufklärer in anticipierender Weise dem optischen System eine epithalamische Hirnanhangsstruktur, die Epiphysis cerebri, zu, die von ihm als „Sitz des erkennenden Teiles der Seele“, der *res cogitantes*, verstanden wurde. Unsere „Lateralaugen“ projizieren nach DESCARTES Sinneseindrücke direkt zur median liegenden Epiphyse, „wo sich der Sitz des Vorstellungsvermögens und des *sensus communis* befindet“. Die Epiphyse repräsentiert so

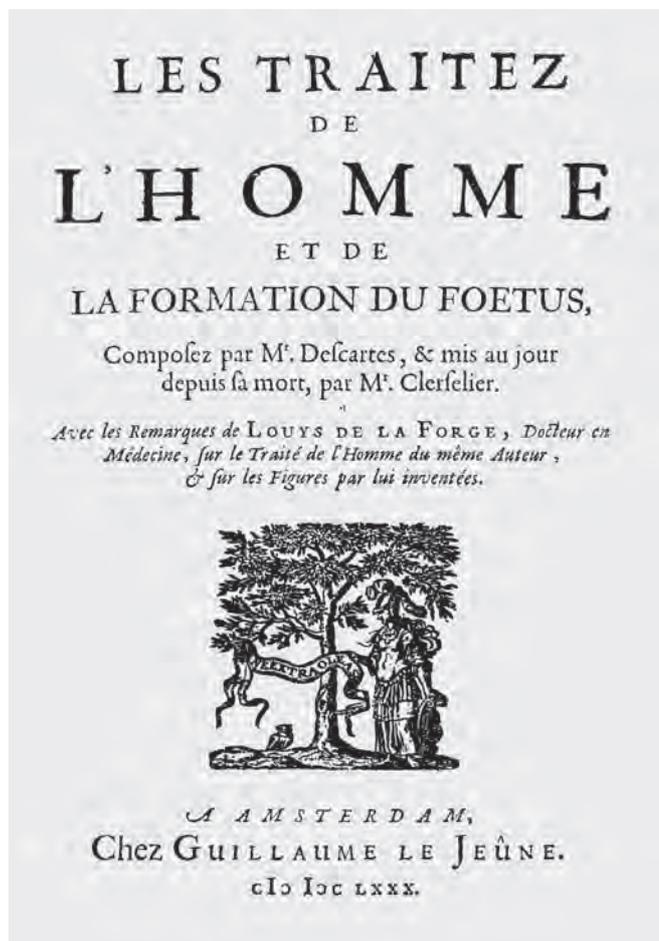


Abb. 3: RENÉ DESCARTES: „Les Traitez de l’Homme et de la Formation du Foetus“, Titelblatt einer Ausgabe von 1680

tatsächlich, wie oftmals treffend bezeichnet, das „Tor zur Seele“ (siehe Abb. 4 und 5, entnommen aus „Les Traitez de l’Homme et de la Formation du Foetus“). Wegen ihrer Ähnlichkeit mit einem Pinienzapfen wird die Epiphyse als Zirbeldrüse oder Pinealorgan bezeichnet. Von DESCARTES wird sie als „Quellort der *spiritus* in der Mitte des Gehirns liegend und als Zentrum der Sinneswahrnehmung, des *sensorium commune*“, verstanden [ROTSCHUH, 1969]. In den folgenden Abschnitten wird deutlich werden, dass die Begriffe „drittes Auge“ und Epiphysis cerebri in engstem Zusammenhang stehen und unter phylogenetischen Gesichtspunkten Synonyma darstellen.

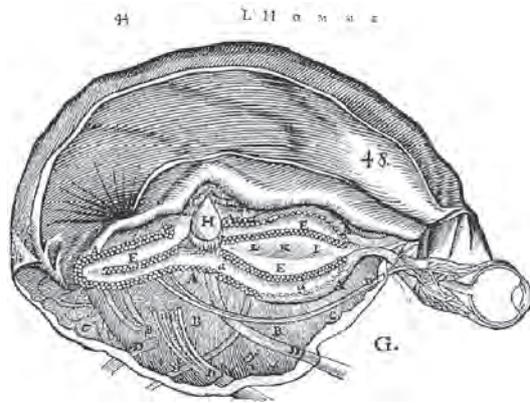


Abb. 4: Abbildung aus „Les Traitez de l’Homme et de la Formation du Foetus“ einer Ausgabe von 1680. Das Pinealorgan, das als „Quellort der *spiritus* in der Mitte des Gehirn liegend und als Zentrum der Sinneswahrnehmung, des *sensorium commune*“, von RENÉ DESCARTES verstanden wird, ist in zentraler Lage in Form eines Pinienzapfens dargestellt und mit „H“ bezeichnet.

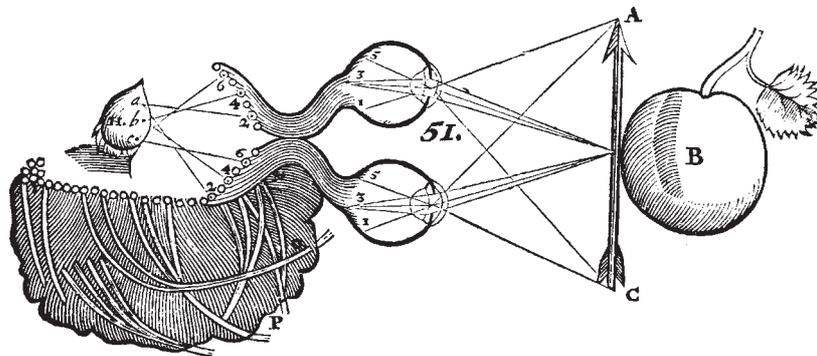


Abb. 5: Abbildung aus „Les Traitez de l’Homme et de la Formation du Foetus“ einer Ausgabe von 1680. In der bekannt gewordenen Abbildung projizieren nach DESCARTES die „Lateraläugen“ direkt zur median liegenden Epiphysis cerebri, „wo sich der Sitz des Vorstellungsvermögens und des *sensorium commune* befindet“.

Über den Funktionswandel des Pinealorgans in der aufsteigenden Wirbeltierreihe

Beziehen wir die Stammesentwicklung der Wirbeltiere, die Phylogenese, in unsere Betrachtungen ein, so wird bald deutlich, dass sich das Pinealorgan tatsächlich auf eine unpaare mediane Augenanlage, ausgestattet mit spezifischen Photorezeptoren und damit den Lichtsinneszellen unserer Lateralaugen vergleichbar, zurückführen lässt. Die höchste Ausprägung erlangt das so genannte Scheitelauge bei den gegen Ende des Karbon auftretenden Reptilien, also vor 300 bis 400 Jahrmillionen. Bemerkenswert ist, dass das Scheitelauge der Reptilien, vergleichbar den Lateralaugen, auf einer Ausstülpung des Zwischenhirns (Diencephalon) beruht. Seine höchste Entwicklung ist in der Ausstattung mit Linse, lichtperzipierenden Sinneszellen, vergleichbar unserer Retina, sowie davon ausgehenden Nervenfasern zu sehen. Im Vergleich zu den Reptilien zeigen die epithalamisch-epiphysären Ausstülpungen der 100 Jahrmillionen früher auftretenden Amphibien eher regressive Züge. In eindrucksvoller Weise kann beispielsweise bei Reptilien eine Öffnung (Abb. 6) und – zumindest während der juvenilen Entwicklung – ein deutlich sichtbarer, pigmentarmer Scheitelfleck zwischen den Lateralaugen auf dem Schädeldach (Abb. 7) erkennbar sein, der dem einfallenden



Abb. 6: *Varanus niloticus* (L. 1756). Präparat des Zoologischen Institutes der Martin-Luther-Universität Halle–Wittenberg (Inv.-Nr. IZH-R-818). Unverkennbar ist die Öffnung des parietalen Knochenkanals, in dem das Pinealorgan relativ weit bis unter die Haut reicht.



Abb. 7: *Iguana tuberculata* (Laur.). Präparat des Zoologischen Institutes der Martin-Luther-Universität Halle–Wittenberg (Inv.-Nr. IZH-R-33). Der pigmentarme Scheitelfleck (direkt über dem in Abb. 6 gezeigten Knochenkanal) ermöglicht dem Licht relativ ungehinderten Zutritt zum lichtperzipierenden Pinealorgan der Reptilien.

Licht den Zugang zu den tiefergelegenen lichtempfindlichen Strukturen erleichtert. Die große Ähnlichkeit zur Retina unserer Lateralaugen ist ferner im lamellierten Aufbau der Außenglieder der Sinneszellen zu sehen. Schließlich soll an dieser Stelle unter Weglassung einer Vielzahl von Erscheinungsformen nur noch auf einen Tatbestand hingewiesen werden: Bei Anuren ist ein in der äußeren Haut gelegenes Stirnorgan durch einen Nervus pinealis mit der intrakraniell liegenden Epiphysis cerebri verbunden, eine Grundsituation, die sich wiederum in stark abgewandelter Form als oberflächlicher und tiefer Teil der Epiphyse in der weiteren Entwicklung erhält [DODT, 1966].

Nachdem die Phylogenese Beweise für das reguläre Auftreten eines dritten (medianen) Auges in der aufsteigenden Wirbeltierreihe bis hin zu den Reptilien geliefert hat, ist von Interesse, wie die Entwicklung bei den Vögeln, vor allem aber bei den Säugetieren, *homo sapiens* eingeschlossen, vonstatten ging. Hier begegnet uns im Zuge der Phylogenese ein beispielloses Phänomen. Die zur Lichtperzeption befähigten, mit lichtperzipierenden zapfenähnlichen Außengliedern ausgestatteten Zellen des Pinealkomplexes der rezenten Fische und Amphibien bzw. des Parietalauges der Reptilien fehlen bei den Säugetieren. Unabhängig vom Auftreten zunehmend reduzierter, aber dennoch zur Lichtperzeption befähigter Pinealozyten der Reptilien und Vögel wurde in den Epiphysen aller bisher untersuchten Wirbeltiere die Synthese des Hormons Melatonin nachgewiesen. Das bedeutet, dass die oftmals simplifizierte Darstellung der Umwandlung einer Sinneszelle in eine Drüsenzelle zu korrigieren ist. Der photoneuroendokrine Pinealozyt, ausgestattet mit Sinnes- und endokriner Funktion, wird während der Phylogenese vielmehr dergestalt spezialisiert, dass die Sinnesfunktion bei den niederen Vertebraten zunehmend reduziert und die sekretorische Funktion bei den hochentwickelten Säugetieren beherrschend in den Vordergrund tritt. Aus einem ambivalenten photoneuroendokrinen Pinealozyten bei *Lampetra* entwickelt sich auf der einen Seite die sensorische Zelle des Parietalauges der Reptilien und auf der anderen Seite die sekretorische Zelle der Säugetierepiphyse [UECK, 1982]. Das wichtigste Hormon der Epiphyse ist Melatonin (N-Acetyl-5-methoxytryptamin), das sich von der essentiellen Aminosäure Tryptophan ableitet. Es entsteht über die Zwischenstufen 5-Hydroxytryptophan, 5-Hydroxytryptamin (Serotonin) und N-Acetylserotonin, wobei die Enzyme N-Acetyltransferase (NAT) und 5-Hydroxyindol-O-methyltransferase (HIOMT) bei der Melatoninsynthese von entscheidender Bedeutung sind. Dass Melatonin nicht nur in der Epiphyse, sondern beispielsweise auch in der Retina und einer bei Nagetieren vorkommenden retrobulbären Orbitaldrüse, der HARDERSchen Drüse, synthetisiert wird, sei der Vollständigkeit wegen am Rande genannt. Jedoch, welche Funktion erfüllt das Melatonin bei den Säugetieren? Gibt es den Zusammenhang zum optischen System überhaupt noch? Waren die Anticipationen des genialen und seiner Zeit weit vorausseilenden DESCARTES Irrtümer oder ein Glücksfall des Tüchtigen?

Es steht außer Frage, dass der funktionelle Zusammenhang zwischen Epiphyse und optischem System in eindrucksvoller Weise erhalten geblieben ist. Melatonin ist wie

kaum ein anderes Hormon einer circadianen Sekretionsrhythmik unterworfen, die darin besteht, dass es ausnahmslos in der Dunkelzeit stark erhöht gebildet und freigesetzt wird. Verkürzt könnte man vom „Hormon der Dunkelzeit“ sprechen oder auch von dem Hormon, das unserem Organismus die umgebende Beleuchtungssituation in ein hormonelles Signal umsetzt, einen gegenüber der Lichtzeit exzessiv erhöhten Melatoninspiegel. Eine erstaunliche Besonderheit im Sekretionsmuster des Melatonins ist ferner darin zu sehen, dass sowohl tag- als auch nachtaktive Tiere während der Dunkelzeit – also unabhängig von ihrem Aktivitätszustand und damit unabhängig von Sympathico- oder Parasympathicotonus – einen hohen Melatoninspiegel aufweisen, der schon in Beantwortung kürzester Lichtblitze extrem stark abfällt.

Pinealorgan und Rhythmogenese

Bevor unsere Betrachtungen zur Bedeutung der Epiphyse unter phylogenetischem Aspekt in Fokussierung auf den optischen Sinn fortgesetzt werden, muss zunächst noch ein weiterer Gesichtspunkt berücksichtigt und vorgestellt werden, der von Wichtigkeit für die Zeitstrukturierung biologischer Abläufe ist. Gemeint sind biologische Rhythmen, ihre Definition und der Ort ihrer Generierung in tierischen und pflanzlichen Systemen. Alle physiologischen Abläufe unterliegen biologischen Rhythmen, wobei wir *circadiane* (circa 24 h, zwischen 20 und 28 h), *ultradiane* (weniger als 20 h), *infradiane* (mehr als 28 h), *circaseptane* (circa eine Woche), *circamensuelle* (circa ein Monat) und *circannuale* Rhythmen mit einer Periodenlänge von ungefähr einem Jahr unterscheiden.

Doch nun zurück zu unserem eigentlichen Anliegen. Dass sich mit dem morphologischen Strukturwandel der Epiphyse funktionelle Änderungen verbinden, ist zu erwarten. Problematischer gestaltet sich dagegen die Frage nach dem Erhalt einer funktionellen Bedeutung im optischen System oder, wie eingangs formuliert wurde, nach dem „dritten Auge“. Bei den Vögeln, die hier nur am Rande und der Vollständigkeit wegen berücksichtigt werden können, übernimmt die Epiphyse die Generierung biologischer Rhythmen. Diese endogen generierten Rhythmen unterliegen exogenen Einflüssen wie zum Beispiel dem Licht, das als anerkannt stärkster Zeitgeber die endogen generierten Rhythmen synchronisiert. Durch Exstirpation der Epiphyse werden nicht nur endokrine Regelkreise und damit Funktionsabläufe, sondern auch die oben charakterisierten Rhythmen beeinflusst, was zu funktionellen Entgleisungen führt. Damit bleibt die Epiphyse der Vögel dem optischen Sinn funktionell verbunden und ist essentieller Bestandteil des morphologischen Substrates, das zur „inneren Uhr“ zählt.

Bei den Säugetieren, auf die hier näher eingegangen werden soll, fungiert das Pinealorgan ebenfalls als endokrine Drüse, jedoch nicht als Generator circadianer Rhythmen. Damit stellt sich die Frage, wo bei den Mammalia Rhythmen generiert werden. Ist das Pinealorgan der Säugetiere im Hinblick auf seine ursprüngliche

Bedeutung im optischen System als ein atavistisches Relikt der Phylogenese zu betrachten oder ist ihm noch eine Bedeutung im optischen System und darüber hinaus für die Rhythmogenese verblieben? Die Antwort konnte auf Grund intensiver Untersuchungen der vergangenen Jahrzehnte gegeben werden. Die Säugerepiphyse bleibt dem optischen System funktionell verbunden, photisch gesteuerter neuraler *input* (insbesondere der Einfluss von Katecholaminen) wird in einen hormonellen *output* (Melatonin) umgesetzt. Die Epiphyse fungiert als photoneuroendokriner *transducer* und informiert über das Verhältnis von Licht- und Dunkelzeit im Tagesverlauf (Uhrenfunktion) sowie dessen Veränderungen im Jahresverlauf (Kalenderfunktion). Durch diese Feststellungen ist zwar der uns interessierende enge Zusammenhang zwischen dem optischen Sinn und der Epiphyse hergestellt, jedoch noch nicht der Ort der Rhythmogenese bei den Säugetieren genannt.

Die Generierung circadianer Rhythmen erfolgt bei den Säugetieren in einem hypothalamischen Kerngebiet, dem Nucleus suprachiasmaticus (NSC), der sich morphologisch und auf Grund immunhistochemischer Nachweise in Subkerne (*pars ventrolateralis* und *pars dorsomedialis*) strukturieren lässt. Dieser Kern wurde bereits zu Beginn unseres Jahrhunderts beschrieben, aber erst seit etwa 30 Jahren wird er als primärer *circadian pacemaker* anerkannt. Von besonderer Bedeutung für das Verständnis funktioneller Interaktionen zwischen diesem hypothalamischen Kern und der Epiphyse war der Nachweis von Melatoninrezeptoren im NSC, die auf eine funktionelle Wechselwirkung der beiden Strukturen hinweisen. Dass die Dichte der Melatoninrezeptoren im NSC neben einer Vielzahl anderer Funktionsmerkmale am Tage erhöht ist, während im Gegensatz dazu physiologische, biochemische und morphologische Untersuchungen eine Aktivitätserhöhung der Epiphyse während der Nacht belegen, ist mit einem inhibitorischen Melatonineinfluss auf den NSC als zeitbezogenes feinregulatorisches Instrumentarium vereinbar.

Unser heutiger Kenntnisstand über Strukturen, die im Dienste der Rhythmogenese stehen, lässt sich wie folgt zusammenfassen: Die rhythmusgenerierende Bedeutung des Nucleus suprachiasmaticus, sein photischer Input von der Retina über den retinohypothalamischen Trakt, Afferenzen vom *intergeniculate leaflet* des Corpus geniculatum laterale über den geniculohypothalamischen Trakt, Efferenzen zum Nucleus paraventricularis und weiterführende Verbindungen über das Centrum ciliospinale und Ganglion cervicale superius bis hin zum photoneuroendokrinen *transducer* Epiphysis cerebri stellen im Großen und Ganzen das heute anerkannte morphologische Substrat und Kernstück dessen dar, was sich unter dem Begriff „innere Uhr“ subsumieren lässt (Abb. 8) [Übersicht siehe REUSS, 1996].

Die bisher vorgestellten Befunde haben Gültigkeit für Untersuchungen am „Ganztier“, also für *in vivo*-Untersuchungen, womit nicht gesagt sein soll, dass nicht auch dezentralisierte, isolierte Organe bzw. Zellen oder Zellverbände Rhythmen aufweisen können. Neben hochfrequenten Oscillationen im Sekunden- und Minutenbereich wurden circadiane Rhythmen unter *in vitro*-Bedingungen beispielsweise an isolierten

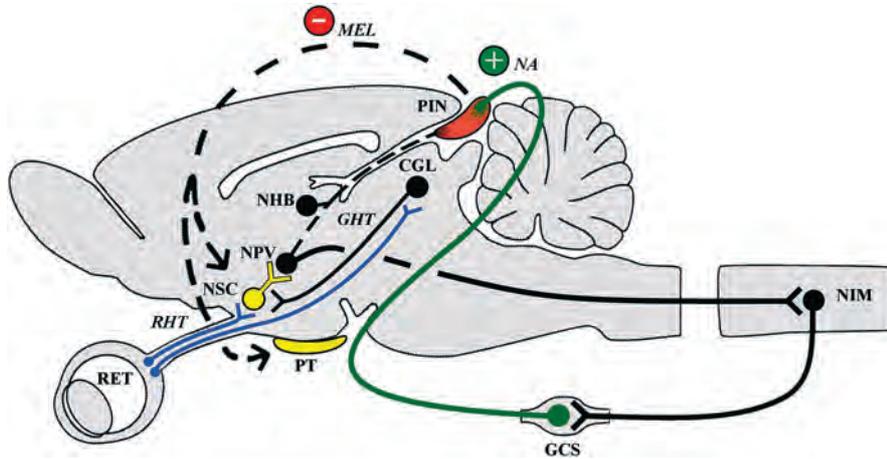


Abb. 8: Vereinfachte Darstellung des photoneuroendokrinen Systems der Ratte in Anlehnung an Stehle und Korf (1996). Der primäre *circadian pacemaker* der Säugetiere, der Nucleus suprachiasmaticus (NSC), empfängt synchronisierende Impulse von der Retina (RET) über den retinohypothalamischen Trakt (RHT). Nach Umschaltungen im Nucleus paraventricularis (NPV), Nucleus intermediolateralis (NIM) des Centrum ciliospinale und Ganglion cervicale superius (GCS) erreichen die Informationen über postganglionäre sympathische Fasern, die Nervi conarii, das Pinealorgan (PIN). Die nachts erhöhte Freisetzung von Noradrenalin (NA) aktiviert die Synthese von Melatonin (MEL), das rückwirkend über Melatoninrezeptoren die Aktivität des NSC hemmt und Einfluss auf die Pars tuberalis nimmt. Zusätzliche Verbindungen des NPV mit den Habenularkernen (NHB, zentrale Innervation der Epiphyse) sowie dem *intergeniculate leaflet* des Corpus geniculatum laterale (CGL) über den giculohypothalamischen Trakt (GHT) werden diskutiert und gehören zum circadianen System, dem morphologischen Substrat der „inneren Uhr“.

Vogel-Epiphysen, Insekten-Nervengewebe, Nebennierenrinden-Zellkulturen, Herzzellverbänden sowie Leberzellen von Säugetieren beobachtet.

Die Kenntnis über biologische Rhythmen hat sich in zunehmendem Maße als praxisrelevant erwiesen. Funktionelle Schäden durch häufig wechselnde Schichtarbeit, Leistungsabfall durch *jet lag*, mangelnde Effizienz durch nicht zeitgerechte Applikation von Zytostatika im Tagesgang und zahlreiche weitere Beispiele unterstreichen die Bedeutung von Chronobiologie und Chronopharmakologie als unverzichtbaren Bestandteil medizinischer Wissenschaft. Die Zielstellung allen medizinischen Handelns wird seit altersher darin gesehen, zur „rechten Zeit“ das „Richtige“ zu tun. In Kenntnis chronobiologischer Gesetzmäßigkeiten wird diese Überzeugung des strengen Zeitbezuges erneut aktuell, was beispielsweise heißen könnte: zu Zeiten höchster Rezeptordichte oder -sensibilität die geringsten, aber noch voll wirksamen Dosen von Medikamenten zwecks Vermeidung von oft schweren Nebeneffekten zu verabreichen.

Kehren wir jedoch noch einmal zu der eingangs gestellten Frage nach der Existenz eines „dritten Auges“ zurück, nachdem wir die Mythologie und ihre Wurzeln in der Teratologie, den Aufklärer DESCARTES, die Phylogenese und die Ontogenese zu Wort kommen ließen. Wir konnten feststellen, dass in der aufsteigenden Wirbeltierreihe durchaus ein „drittes Auge“, ausgestattet mit nahezu allen morphologischen und physiologischen Merkmalen unserer Lateralaugen, zu finden ist und dass ein solches zusätzliches Medianauge in besonders perfekter Ausstattung bei rezenten Reptilien entwickelt ist. Wir konnten weiter feststellen, dass dieses Lichtsinnesorgan bei den Vögeln und Säugetieren einen Funktionswandel erfahren hat. Aus dem „dritten Auge“ wurde eine Melatonin synthetisierende endokrine Drüse, die bei den Vögeln endogene Rhythmen generiert und bei den Säugetieren als photoneuroendokriner *transducer* fungiert. In beiden Fällen bleibt der enge funktionelle Zusammenhang zum optischen System erhalten, wobei die besondere Bedeutung der Epiphyse als Bestandteil der „inneren Uhr“ im Vordergrund steht.

Zum Funktionsspektrum der Epiphyse und ihrer Bedeutung als Keuschheitsdrüse

Wenn auch seit mehr als 2000 Jahren bekannt (HEROPHILOS, GALEN) und oftmals Gegenstand extremer metaphysischer, esoterischer sowie philosophischer Spekulationen (SCHOPENHAUER), gelangte die Zirbeldrüse erst in der ersten Hälfte des 17. Jahrhunderts durch die naturphilosophischen Schriften des Aufklärers RENÉ DESCARTES in den Fokus naturwissenschaftlichen Interesses. Ende des 19. Jahrhunderts [GUTZEIT, 1896] wird aus Königsberg die wichtige Beobachtung mitgeteilt, dass Epiphysenzerstörende Tumoren bei Kindern zur *Pubertas praecox*, einer extrem vorverlagerten sexuellen Reife führen können, was ihr (augenzwinkernd) die Bezeichnung „Keuschheitsdrüse“ eingetragen und eine Flut von Folgeuntersuchungen initiiert hat [PESCHKE, 2003 a]. Über diese Drüse verfügen fast alle Wirbeltiere, der Mensch eingeschlossen (auch wenn es zuweilen schwer fällt, das zu glauben). Inzwischen sind zahlreiche Befunde zusammengetragen worden, die die Ausschließlichkeit eines hemmenden Einflusses auf die Gonadenfunktion nicht mehr rechtfertigen würden, hier aber nicht näher diskutiert werden können.

Eine weitere Besonderheit dieses schon bei Einzellern nachgewiesenen, also phylogenetisch sehr alten Hormons Melatonin ist in seiner rhythmisierenden Bedeutung zu sehen. Das rechtfertigt die Melatonineinnahme durch Personen mit Problemen im Zusammenhang mit *jet lag* oder *shift working*. Therapeutische Ansätze bieten sich weiterhin auf Grund eindeutig antikonvulsiver und sedativer Eigenschaften des Melatonins. Einen erheblichen Raum nehmen ferner Untersuchungen ein, die eine antiproliferative und davon abgeleitet antitumoröse Bedeutung des Melatonins in den Vorder-

grund rücken. Auch Einflüsse auf das Immunsystem werden diskutiert. Hinzu kommt eine in jüngerer Zeit, bisher jedoch nur in pharmakologischen Dosen, nachgewiesene protektive Fähigkeit, Sauerstoffradikale, insbesondere Hydroxylradikale, zu neutralisieren, was die schon seit längerem diskutierte Tumor-protektive Bedeutung von Melatonin ebenfalls erklären könnte.

Im zweiten Teil dieser Abhandlung soll einem ganz anderen Sachverhalt nachgegangen werden, nämlich der Bedeutung des 1958 von LERNER und Mitarbeitern isolierten epiphysären Indolamins Melatonin auf die Insulinsekretion. Befunde der vergangenen Jahrzehnte waren von bemerkenswerter Widersprüchlichkeit, erst in jüngster Zeit wurden auf diesem Gebiet, auch auf Grund eigener Ergebnisse, mehr Sicherheiten erlangt, die hier als Übersicht vorgestellt werden sollen.

Zum Einfluss von Indolaminen (Melatonin und Serotonin) auf die Insulinsekretion isolierter LANGERHANSscher Inseln sowie von Melatonineffekten auf die Insulin-produzierende Ratten-Insulinomazelle INS-1

Bislang wurde die Diskussion über einen möglichen Einfluss des Zeithormons Melatonin auf den Kohlenhydratstoffwechsel und seine hormonelle Steuerung durch die LANGERHANSsche Insel kontrovers geführt. Die Ergebnisse zahlreicher *in vivo*- und *in vitro*-Untersuchungen sprechen

1. für fehlende,
2. Insulin-ähnliche, Diabetes-protektive oder
3. Insulin-suppressive Effekte von Melatonin bzw. pinealen Peptiden.

Eigene Untersuchungen, die erst durch die Etablierung einer effizienten Super- bzw. Perifusionsapparatur möglich wurden, machten hingegen deutlich, dass Melatonin die Glukose-, KCl- und Forskolin-stimulierte Insulinsekretion isolierter pankreatischer Inseln neonater Ratten hemmt, das nahe verwandte und chemisch ähnliche Serotonin (5-Hydroxytryptamin) hingegen die Glukose- und KCl-stimulierte Insulinsekretion erhöht. Diese Aussagen stützen sich auf Untersuchungen, in denen die genannten Stimulantien entweder kurzzeitig-repetitiv oder aber alternativ als Langzeitapplikation im Perifusionssystem getestet wurden. Die Überlegenheit der Perifusionsapparatur beruht unter anderem auf der Möglichkeit, die Sekretionskinetik Insulin-produzierender B-Zellen zu erfassen und zusätzlich systemspezifische Qualitätssicherungen wie beispielsweise Vitalitäts-, Synthese-, Freisetzungs- und Kapazitätskriterien versuchsbegleitend zu erfassen. Im Ergebnis kurzzeitig-repetitiver Applikationen wurde die Glukose-stimulierte Insulinsekretion durch 5 µmol/l Melatonin um 42 % und die KCl-stimulierte um 22 % gesenkt, während 5 µmol/l Serotonin die Glukose-stimulierte

Insulinsekretion um 46% und die KCl-stimulierte Insulinsekretion um 52% erhöhte. Geringere Effekte unter Einfluss von 5 nmol/l Melatonin belegten den konzentrationsabhängigen Indolamineinfluss auf das Inselorgan. Besonders deutlich ist die Dosisabhängige Senkung der Forskolin-stimulierten Insulinsekretion (Abb. 9). Das bedeutet, dass mit hoher Wahrscheinlichkeit Melatonin einen hemmenden Einfluss über G_i -Protein-gekoppelte Rezeptoren auf das Adenylatcyclase/cAMP-System haben muss [PESCHKE et al., 1997, 2000 b; CSERNUS et al., 1998].

Die aufgeführten Ergebnisse wurden an isolierten Inseln erhoben und erlaubten deshalb keine Aussagen darüber, ob die Effekte auf einem direkten oder aber mittelbaren Melatonineinfluss auf die B-Zelle beruhen. Aus diesem Grunde wurde nach einer Zelllinie gesucht, an der direkte Melatonineinflüsse auf die B-Zelle untersucht werden

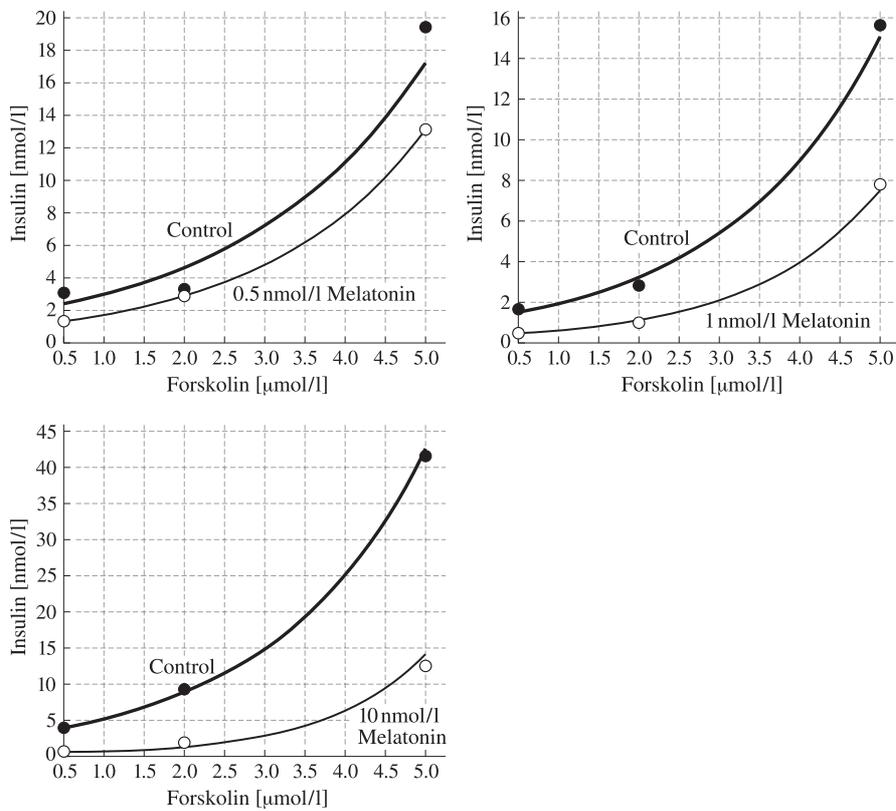


Abb. 9: Einfluss unterschiedlicher Melatonin-Konzentrationen (0,5, 1 und 10nmol/l) auf die Forskolin-stimulierte (0,5, 2 und 5µmol/l) Insulinsekretion isolierter Ratteninseln im Perifusions-system (man beachte die unterschiedliche Ordinaten-Beschriftung). Melatonin in einer Konzentration von 10nmol/l reduzierte die Forskolin-stimulierte Insulinsekretion besonders stark.

konnten. Mit der immortalisierten, Insulin-produzierenden, Glukose-responsiven Ratten-Insulinomazelle INS-1 war ein Modell gefunden, an dem sich alle an der Insel erhobenen und oben vorgestellten Befunde mit dem Gewinn reproduzieren ließen, dass erstmals von einem direkten unmittelbaren Einfluss von Melatonin auf die B-Zelle ausgegangen werden konnte. Diese Feststellung ist insbesondere hinsichtlich der im Folgenden dargestellten Rezeptoruntersuchungen und Signaltransduktionsmechanismen von besonderer Bedeutung. Beispielhaft werden mit der Abbildung 10 radioimmunologische Insulinbefunde nach Applikation unterschiedlicher Forskolinstimulationen allein sowie unter zusätzlicher Melatoningabe (100 nmol/l) an der INS-1-Zelle vorgestellt [PESCHKE et al., 2002].

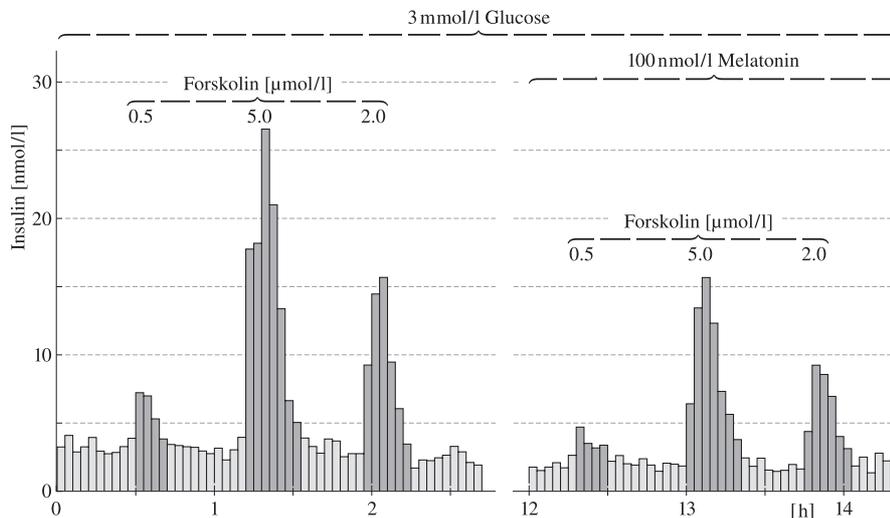


Abb. 10: Insulin-Gehalt im Superfusat nach Behandlung von Ratten-Insulinomazellen INS-1 nach jeweils 3-minütiger Applikation von 0,5, 2 oder 5 µmol/l Forskolin allein sowie unter permanenter zusätzlicher Gabe von 100 nmol/l Melatonin. Melatonin hemmt die Forskolin-stimulierte Insulinsekretion.

Untersuchungen zum Nachweis von Melatoninrezeptoren (MT₁) in der pankreatischen Insel neonater Wistar-Ratten sowie bei der Insulin-produzierenden Ratten-Insulinomazelle INS-1

Da auf Grund von Voruntersuchungen festgestellt worden war, dass Melatoningeffekte in der Insel mit dem nicht hydrolysierbaren Guanosin-5'-[γ-thio]triphosphat [GTPγS, 30 µmol/l] oder dem kompetitiven Melatoninrezeptor-Antagonisten Luzindol [10 µmol/l] blockiert werden konnten, ist davon auszugehen, dass Melatonin seinen

Einfluss auf die pankreatische B-Zelle über spezifische Pertussistoxin-sensitive trimere G_i -Protein-gekoppelte Rezeptoren realisiert. Im Ergebnis der genannten Maßnahmen wurde der Melatonin-Effekt gelöscht. Die Reaktionen waren reproduzierbar und Dosis-abhängig und sowohl an der pankreatischen Insel als auch an der INS-1-Zelle auslösbar (Abb. 11). Zusätzliche autoradiographische Untersuchungen mit 2-[125 J]Jodmelatonin als auch Bindungsstudien bestätigten, dass die pankreatische Insel über hochaffine Melatoninrezeptoren verfügt, Befunde, die im Einklang mit den funktionellen Ergebnissen stehen. Schließlich wurde die Expression von mRNS für MT_1 - und MT_2 -Rezeptoren im Pankreasgewebe der Ratte mit Hilfe der *reverse transcriptase*-PCR (RT-PCR)-Technik untersucht. Der Einsatz von MT_1 -spezifischen Oligonukleotid-Primern führt zu einem Amplifikationsprodukt, das der erwarteten Länge von 329 bp entspricht. Die Spezifität dieser amplifizierten Sequenz wurde durch zwei Kontrolluntersuchungen gesichert.

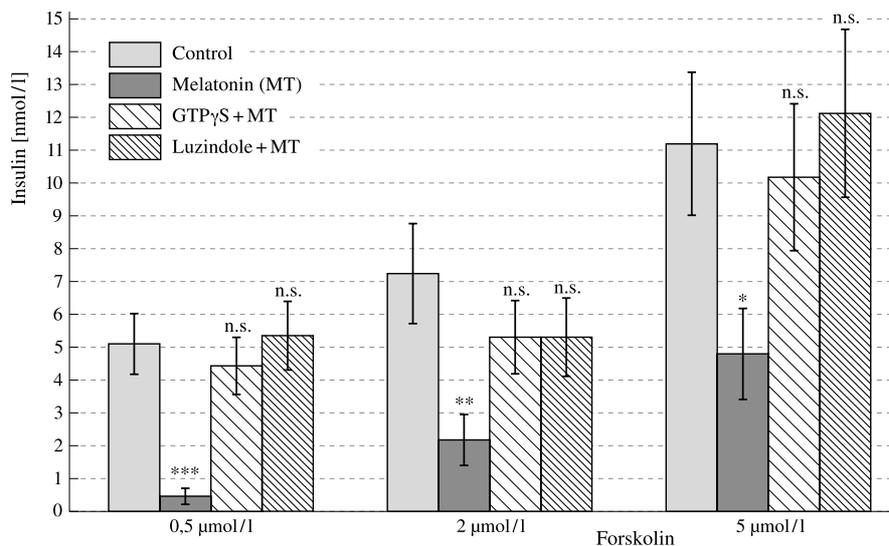


Abb. 11: Zusammenfassung von Ergebnissen an isolierten Ratteninseln nach 3-minütigen Stimulationen mit 0,5, 2 und 5 μ mol/l Forskolin. Die Säulen zeigen Mittelwerte und Standardabweichungen der Mittelwerte ($n=12$), die Berechnungen basieren auf der Erfassung des Netto-Integrals radioimmunologisch bestimmter Insulinfreisetzung [nähere Angaben siehe Csernus et al., 1998]. Melatonin (10 nmol/l) reduziert die durch Forskolin in allen drei Konzentrationen stimulierte Insulinsekretion statistisch signifikant ($n=12$). Zusätzliche Applikation von 30 μ mol/l GTP γ S (nach vorheriger Gabe von 0,4 U/ml Streptolysin O zur Membranperforation) oder des kompetitiven Melatoninrezeptor-Antagonisten Luzindol (10 μ mol/l) heben den Melatonineffekt auf und normalisieren die Insulinsekretion. Abbildung und nähere Angaben zum Versuchsablauf siehe: E. PESCHKE et al. (2000 b).

1. Restriktionsanalyse: Das Enzym MseI führte zu einer vollständigen Spaltung des PCR-Produktes in die zu erwartenden Fragmente (233 + 96 bp);
2. Verschachtelte „nested“ PCR: Reamplifikation des gereinigten PCR-Produktes mit einem intern gelegenen Primer ergibt das zu erwartende PCR-Produkt von 269 bp.

Im Gegensatz dazu führt der Einsatz von MT₂-spezifischen Oligonukleotid-Primern zu keinem Amplifikationsprodukt, was die Existenz von MT₂-Rezeptoren in der pankreatischen Insel unwahrscheinlich macht [PESCHKE et al., 2002].

Diese an der Insel erhobenen Befunde wurden an der Zelllinie INS-1 mit der Zielstellung überprüft, ob die geschilderten direkten Effekte von Melatonin auf die B-Zelle Rezeptor-mediiert sind und ob, ebenso wie bei der Insel beschrieben, die INS-1-Zelle ausschließlich über MT₁- und nicht zusätzlich über MT₂-Rezeptoren verfügt. Die Ergebnisse waren eindeutig. Der Insulin-senkende Effekt des Melatonins wird bei der Insel ebenso wie bei der INS-1-Zelle durch den MT₁-Rezeptor vermittelt (Abb. 12).

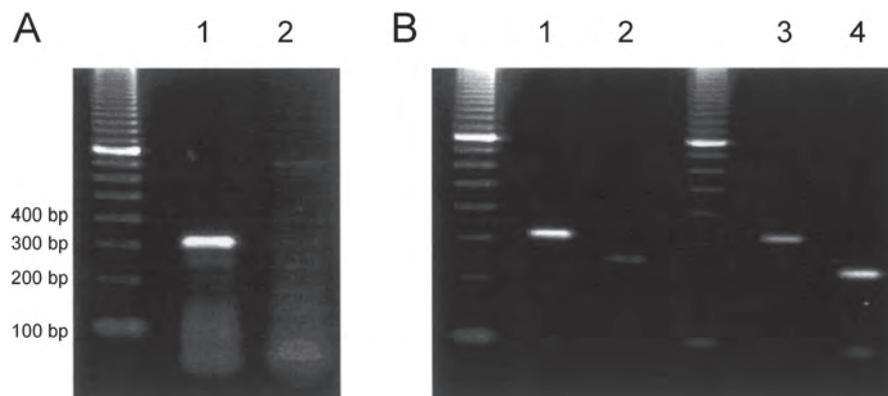


Abb. 12: RT-PCR-Befunde, erhoben an der Ratten-Insulinomazelle INS-1. Die Befunde machen wahrscheinlich, dass die pankreatische B-Zelle über MT₁-, nicht aber MT₂-Rezeptoren verfügt. A1: PCR-Produkt mit Primer für MT₁: positiv (329 bp), A2: PCR-Produkt für MT₂: negativ (292 bp), B1 + B3: PCR-Produkt mit Primer für MT₁: positiv (329 bp), B2: *nested* PCR: positiv (269 bp), B4: Restriktionskontrolle: positiv (233 bp + 96 bp).

Vergleichbar den Inseln führt auch bei der INS-1-Zelle der Einsatz von MT₂-spezifischen Oligonukleotid-Primern zu keinem Amplifikationsprodukt [PESCHKE et al., 2002]. Zur weiteren Absicherung der getroffenen Aussagen wurden Bindungsstudien durchgeführt. Das Ergebnis spricht für eine spezifische Bindung wahrscheinlich nur an eine Bindungsstelle, was gegen die zusätzliche Erfassung von MT₂-Rezeptoren in der INS-1-Zelle spricht. Wenn auch die aus der Sättigungskurve abgeleiteten typischen Kenngrößen B_{max} (1,003 ± 0,047 fmol [¹²⁵J]Jodmelatonin/mg Protein) und KD (108,3 ± 14,9 pmol/l [¹²⁵J]Jodmelatonin) Ausdruck einer geringen Bindungskapazität sind.

zität des getesteten Liganden an der Zellmembran von INS-1-Zellen sind, ist dennoch die Existenz eines Melatonin-spezifischen Rezeptors auf der INS-1-Zelle wahrscheinlich (Abb. 13) [Publikation in Vorbereitung].

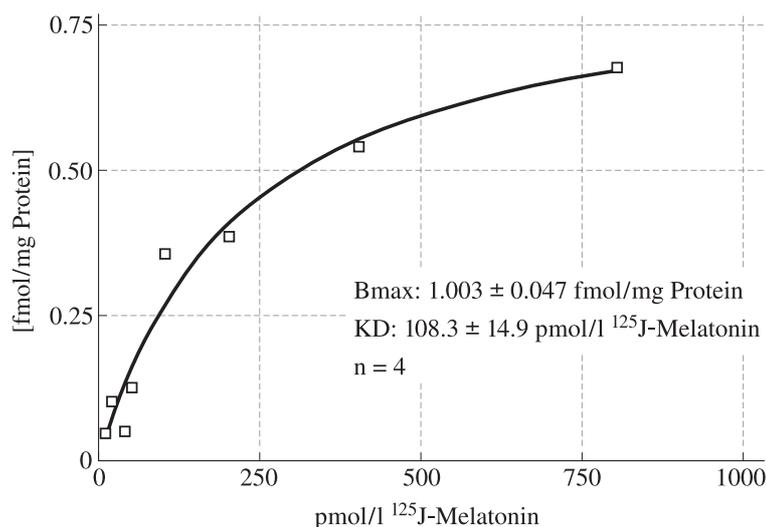


Abb. 13: Sättigungskurve zur Beschreibung der Bindungscharakteristik von [¹²⁵J]Jodmelatonin an Rezeptoren von INS-1-Zellmembranen. Aufgetragen wurde die Menge gebundenen [¹²⁵J]Jodmelatonins bezogen auf mg Protein gegen die Menge des freien ungebundenen [¹²⁵J]Jodmelatonins im Reaktionsvolumen. Die ermittelten Werte von $1,003 \pm 0,047$ fmol/mg Protein für Bmax und $108,3 \pm 14,9$ pmol/l [¹²⁵J]Jodmelatonin für KD sprechen für das Vorhandensein eines Melatonin-spezifischen Rezeptors (Versuchsbedingungen: Inkubation bei 30 °C für 60 min, Displacerkonzentration 5 µmol/l Melatonin, 80 µg Protein/Ansatz; n=4).

Zusätzlich konnte mittels funktioneller Melatoninrezeptor-Untersuchungen nachgewiesen werden, dass durch Applikation des kompetitiven Melatoninrezeptor-Antagonisten Luzindol (30 µmol/l) der Insulin-senkende Melatonineffekt an der INS-1-Zelle nahezu aufgehoben wird. Diese Ergebnisse waren für die weiteren Untersuchungen in zweifacher Weise bedeutungsvoll. Zum einen wurde überzeugend nachgewiesen, dass die Melatonineffekte durch einen MT₁-Rezeptor-medierte direkten Einfluss von Melatonin auf die B-Zelle zustande kommen. Zum anderen empfiehlt sich die INS-1-Zelle durch diese Befunde als ein taugliches Modell für repräsentative, auf die Insel übertragbare Ergebnisse bezüglich des Einflusses von Melatonin auf die B-Zelle sowie der im nächsten Teil beschriebenen Untersuchungen zur Charakterisierung intrazellulärer Signaltransduktionsprozesse unter Melatonineinfluss. Ganz offensichtlich hat die INS-1-Zelle den MT₁-Rezeptor einschließlich Melatonin-beeinflussbarer Signaltransduktionswege und Funktionsspektren konserviert.

Befunde zur Melatoninrezeptor-medierten Signaltransduktion in INS-1-Insulinomazellen

In Kenntnis, dass andernorts Melatonin seine Effekte über Pertussistoxin-sensitive G_i -Protein gekoppelte Rezeptoren, die Adenylatcyclase (AC) und konsekutiv über das cyclische Adenosinmonophosphat (cAMP) entfaltet, wurden zahlreiche Stimulationsversuche mit Forskolin, das bekanntlich die AC stimuliert, sowohl an Inseln als auch an INS-1-Zellen durchgeführt. In jedem Fall steigert Forskolin dosisabhängig sowohl die Insulinsekretion als auch den cAMP-Gehalt im Superfusat, und Melatonin erniedrigte in allen Fällen den Forskolin-stimulierten Insulin- und cAMP-Gehalt im Superfusat. Ausdruck des Rezeptor-medierten Effektes von Melatonin sind Befunde, die belegen, dass der kompetitive Melatoninrezeptor-Antagonist Luzindol den durch Melatonin gesenkten cAMP-Spiegel normalisieren kann (Abb. 14). Damit wird am

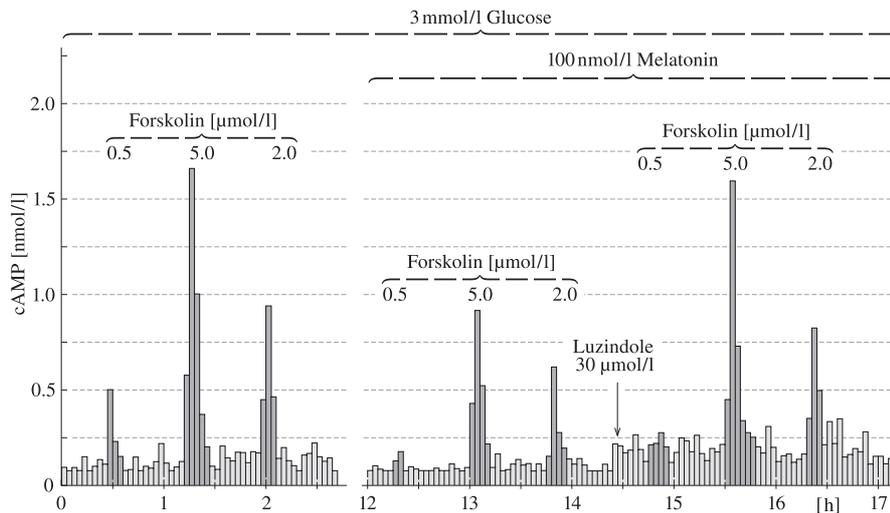


Abb. 14: cAMP-Spiegel nach Applikation von 0,5, 2 oder 5 $\mu\text{mol/l}$ Forskolin für jeweils 3 min allein, nach zusätzlicher Melatoningabe sowie zusätzlicher Melatonin-plus Luzindol-Applikation (30 $\mu\text{mol/l}$). Durch Einsatz des kompetitiven Melatoninrezeptor-Antagonisten Luzindol wird der Melatoneffekt minimiert bzw. nahezu aufgehoben.

second messenger cAMP, wie bereits zuvor auf Insulin-Ebene nachgewiesen, der funktionelle Nachweis erbracht, dass der Melatoneffekt durch Melatoninrezeptor-Blockade minimier- oder aufhebbar ist. Aus der Literatur ist bekannt, dass cAMP einem unidirektionalen, Energie-abhängigen, transmembranösen Transport unterliegt, der durch definierte *multidrug resistance proteins*, insbesondere MRP4 und MRP5, bestimmt wird und dass diese MRP's als Exportpumpen für amphiphile Anionen zu

verstehen sind [PESCHKE et al., 2002]. Die eigenen Untersuchungen belegen, dass diese transmembranösen Pumpen durch Probenecid gehemmt oder blockiert werden. Probenecid (2 mmol/l) erhöht den Forskolin-stimulierten cAMP-Gehalt in der Zelle, gefolgt von einer erhöhten Insulinsekretion, und erniedrigte den Forskolin-stimulierten cAMP-Gehalt im Superfusat. Die bislang geschilderten funktionellen Befunde werden in Form eines synoptischen Zellfunktionsbildes zusammengefasst (Abb. 15),

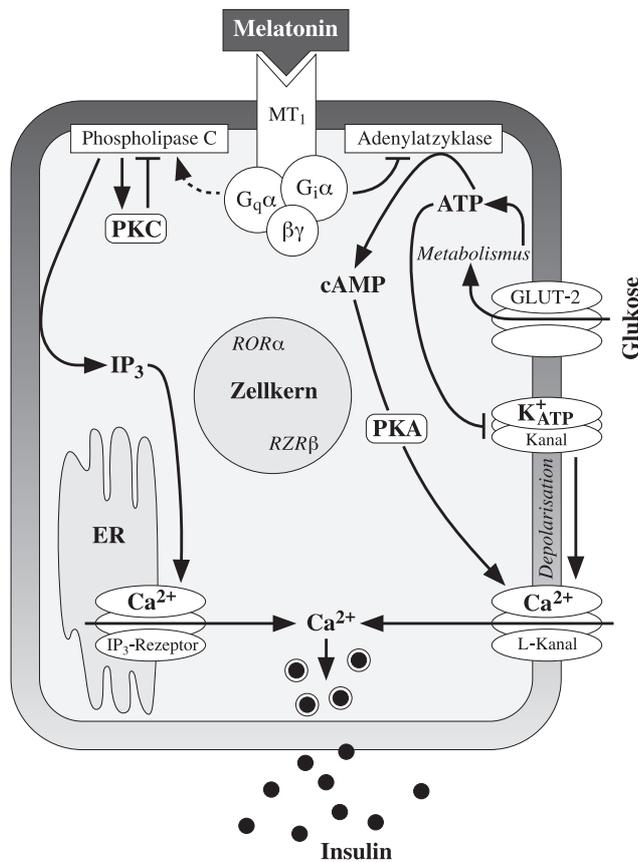


Abb. 15: Synoptische Darstellung intrazellulärer Signaltransduktionsmechanismen der pankreatischen B-Zelle unter dem Einfluss von Melatonin. Melatonin hemmt, über membranständige MT₁-Rezeptoren und G_i-Proteine mediiert, die Adenylatzyklase, konsekutiv den cAMP-Gehalt und schließlich die Insulinsekretion. Es ist nicht auszuschließen, dass Melatonin zusätzlich, über membranständige MT₁-Rezeptoren und G_q-Protein mediiert, die Phospholipase C stimuliert und konsekutiv über IP₃-Stimulation und Freisetzung intrazellulären Kalziums die Insulinsekretion steigert. Welcher Weg unter welchen Bedingungen im Vordergrund steht, ist zur Zeit nicht geklärt.

wobei die zur Insulinsekretion führenden letzten Schritte der Signaltransduktionskaskade noch ausgesprochen hypothetisch sind und weitere Einflusswege, zum Beispiel die Beteiligung der IP_3 -Kaskade, nicht ausschließen. Ermutigende erste Untersuchungen zum Einfluss von Melatonin auf die Carbachol-stimulierte Insulinsekretion machen deutlich, dass G_q -medierte Einflüsse von Melatonin auf das IP_3 -System wahrscheinlich sind.

Mit den letztgenannten Feststellungen soll ein Problem angeschnitten werden, das einerseits unverständlich anmutet und andererseits von großer Tragweite für das auf komplexen Systemen beruhende Wechselspiel zwischen Indolaminen und Insulinsekretion sein könnte. Das Problem besteht in der vordergründig unvereinbar erscheinenden und dennoch möglichen ambivalenten Einflussnahme von Melatonin auf die B-Zelle. Zum einen steht es außer Zweifel, dass Melatonin mit hochaffinen membranständigen Melatonin(MT_1)-Rezeptoren eine Liganden-Rezeptor-Bindung eingeht, die über trimere G_i -Proteine und nach Dissoziation der G-Protein-Untereinheiten, speziell der $G_i\alpha$ -Untereinheit, zu einer Hemmung der Adenylatcyclase und konsekutiv des cAMP-Spiegels führt. Es ist davon auszugehen, dass diese Funktionskaskade über die Proteinkinase A (PKA) und einer nachfolgenden Erhöhung des intrazellulären Ca^{2+} -Gehaltes (möglicherweise über Öffnung spannungsabhängiger Ca^{2+} -Kanäle) zu der von uns nachgewiesenen und inzwischen von anderen Autoren bestätigten Melatoninbedingten Insulinsekretionshemmung führt. Auf der anderen Seite ist nicht auszuschließen (und erste Untersuchungsergebnisse sprechen dafür), dass Melatonin zusätzlich Einfluss auf G_q -Proteine nimmt und konsekutiv über Aktivierung der Phospholipase C (PLC) und des Inositoltriphosphates (IP_3) auf dem Weg der Freisetzung von Ca^{2+} aus dem glatten endoplasmatischen Retikulum die Insulinsekretion erhöhet. Schließlich ist auf Grund von Vergleichsuntersuchungen an anderen Zellen nicht auszuschließen, dass die β/γ -Untereinheit der G_i -Proteine (nach Dissoziation) bei gleichzeitiger Erhöhung intrazellulären Calciums zu einer Aktivierung der PLC, der Proteinkinase C (PKC) und zu einem konsekutiven Insulinanstieg beitragen könnte. Diese Reaktion ist durch Pertussistoxin hemmbar, erklärlich, weil dadurch die Dissoziation der G_i -Untereinheiten gehemmt wird [GODSON und REPERT, 1997]. Letztgenannte Befunde könnten auch das Signaltransduktionsgeschehen der B-Zelle betreffen und komplizieren, sind jedoch noch nicht überprüft worden. Dennoch wird es von entscheidender Bedeutung sein nachzuweisen, unter welchen Bedingungen Melatonin über G_i -Proteine wirkt und damit zur Senkung des Insulinspiegels beiträgt bzw. ob und unter welchen Voraussetzungen Melatonin über G_q -Proteine zu einer Erhöhung der Insulinsekretion führt (Abb. 15). Es steht außer Zweifel, dass die Klärung dieses Problems von großer klinischer Bedeutung sein könnte. Andererseits begegnet uns diese Janusköpfigkeit des Melatonins nicht erstmalig, wir kennen sie auch von der Gonaden-Achse, wo Melatonin eine antigonadotrope, aber auch progonadotrope Bedeutung entwickeln kann [PESCHKE 2001 b, 2003 b, c, d].

Befunde zum molekulargenetischen Hintergrund circadian-rhythmischer Insulinfreisetzung isolierter pankreatischer Ratteninseln unter perfusionstechnischen *in vitro*-Bedingungen

Die circadian-rhythmische Insulinfreisetzung isolierter pankreatischer Inseln *in vitro* war bislang unbekannt. Sie konnte erstmals durch eigene, die Sekretionskinetik erfassende Langzeit-Perfusionsexperimente an pankreatischen Inseln neonater Ratten nachgewiesen werden. Das Superfusionssystem wurde dabei so an die Funktionsbedingungen pankreatischer Inseln angepasst, dass die Inseln bis zu 8 Tage am Leben erhalten und ihre Vitalitäts-, Synthese-, Freisetzungs- und Kapazitätskriterien erfasst wurden. Erste Ergebnisse belegten neben ultradianen Oscillationen die Existenz circadianer Rhythmen der Insulin-Ausschüttung mit Periodenlängen zwischen 21,8 und 26,2 h unter *in vitro*-Bedingungen. In Zusatzuntersuchungen wurde Melatonin als potentieller Zeitgeber (Äquivalent der Dunkelzeit) eingesetzt (Abb. 16). Vorläufige Ergebnisse legten in Einheit mit ersten Versuchen zur Erstellung von *phase-response*-

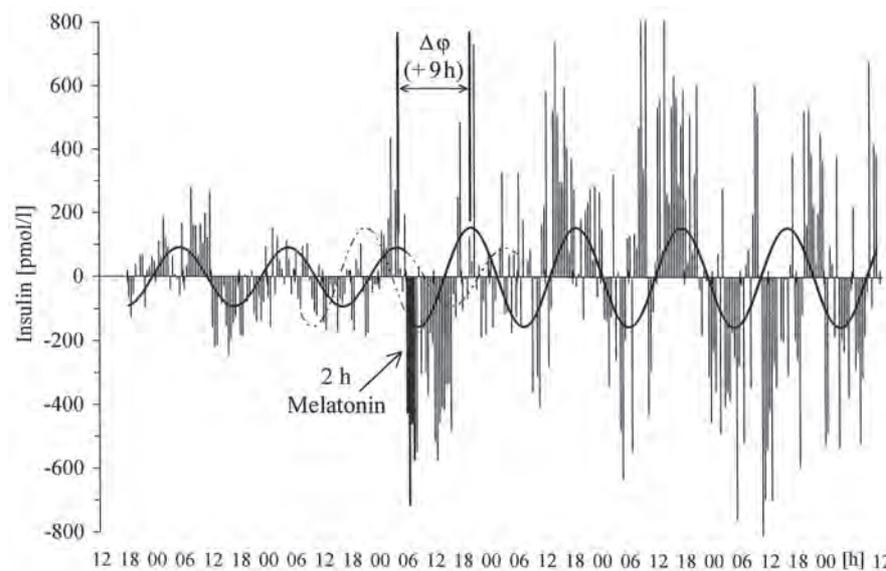


Abb. 16: Beispiel für *phase-response*-Untersuchungen Glukose-stimulierter Inseln (8,6 mmol/l Glukose) *in vitro* nach Trendbereinigung und Abtragung der positiven und negativen Abweichungen vom Mesor, der hier gleich „0“ gesetzt wurde. Der Versuchszeitraum betrug ca. 7 Tage (d), die Probenauswertung erfolgte aller 30 min. Nach 2,5 d wurden für 2 h 10 nmol/l Melatonin als hormoneller Zeitgeber verabreicht. Es zeigt sich, dass nach Melatoningabe die Periodenlänge (τ) von 22,9 h nahezu beibehalten, die Phase jedoch um ca. 9 h vorverlagert wurde. Nähere methodologische Angaben siehe: E. PESCHKE und D. PESCHKE (1998).

curves (PRC) die Vermutung nahe, dass der circadiane Rhythmus durch ein peripheres Oscillator-System in der pankreatischen Insel selbst generiert wird [PESCHKE und PESCHKE, 1998]. Diese Befunde sollen durch den Einsatz weiterer potentieller Zeitgeber ergänzt werden.

Aus den Befunden, die einen peripheren intrainsulären Oscillator wahrscheinlich machen, leitete sich zwangsläufig die Frage nach der Expression von Zeitgenen in der pankreatischen Insel ab. Deshalb wurden Untersuchungen angeschlossen, die dem Nachweis von Zeitgenen auf mRNA-Ebene in der pankreatischen Ratteninsel sowie der INS-1-Zelle mit dem Ziel dienen, die oben geschilderten Phänomene circadian-rhythmischer Insulinsekretion einer molekulargenetischen Analyse zu unterziehen. Konkret wurden aus der Gruppe von Zeit- oder Uhrengenen (clock genes) *Per-1*, *Per-2* und *Cry-1* ausgewählt, die für Transkriptionsfaktoren mit negativer regulatorischer Wirkung codieren. Das Translationsprodukt dieser 3 Gene supprimiert als Homo- oder Heterodimer die Transkription von *Bmal-1* (Gen-Produkt: ARNT-like Protein-1 oder MOP-3), einem Mitglied der Gruppe von Zeitgenen mit positiver Wirkung, welches überwiegend im Zusammenspiel mit dem *Clock*-Gen agiert. Die Abbildung 17 fasst die Expressionsspektren von mRNA genannter Gene beispielhaft in unterschiedlichen Geweben zusammen. Im Einzelnen wurde *Per-1*-mRNA als 402 bp-Amplikon der cDNA von Rattenpankreas, Rattengehirn, INS-1-Zelle, Rattenniere sowie Pankreas der NMRI-Maus nachgewiesen (Abb. 17 a). *Cry-1*-mRNA ließ sich als Amplikon der cDNA von Gehirn, Pankreas, Niere, INS-1-Zelle und Pinealorgan der Ratte sowie Pankreas und Gehirn unterschiedlicher Mauslinien nachweisen. Die Größe des Amplikons von 101 bp stimmte mit dem 100 bp-Fragment des Längenstandards (LS, siehe Abb. 17 b, rechts) nach elektrophoretischer Trennung (berechneter Wert aus dem Gel 113 ± 1 bp) überein. *Per-2*-mRNA lässt sich als 780 bp-Amplikon der cDNA von Pankreas, Gehirn, Niere und Pinealorgan sowie INS-1-Zellen nachweisen (Abb. 17 c). Die Expression von *Bmal-1*-mRNA schließlich ist als Amplikon der cDNA von Pankreas, Gehirn und Niere der Ratte sowie INS-1-Zellen nachweisbar. Außerdem lässt sich das Transkript im Pankreas der Maus detektieren. Die aus der Maus-Sequenz abgeleitete Amplikongröße beträgt 382 bp, diese Molekülgröße lässt sich im Vergleich mit dem LS (siehe Abb. 17 d, rechts) bei einem Wert von 386 ± 3 bp festlegen.

Schließlich wurde die mRNA des *Dbp* (Genprodukt des *Dbp*: D-site albuminpromotor binding-protein), ein sogenanntes „CLOCK controlled output gene“, nachgewiesen, das selbst als Transkriptionsfaktor die Expression weiterer Gene beeinflusst und, unter der Kontrolle von Zeitgenen stehend, im Pankreas sowie anderen peripheren Organen circadian-rhythmisch oszilliert. Seine Detektion dient hier als Kontrollgen der Erfassung von zeitabhängigen Expressionsschwankungen auf mRNA-Ebene im Pankreas. Bisher konnte nachgewiesen werden, dass *Dbp*-mRNA als Amplikon der cDNA von Pankreas, Gehirn, Niere und Pinealorgan sowie INS-1-Zellen eine deutliche Bande bei 113 ± 3 bp zeigt, die im Vergleich mit dem Molekülgrößen-Standard dem theoretischen Wert für das Amplikon von 105 bp nahe kommt.

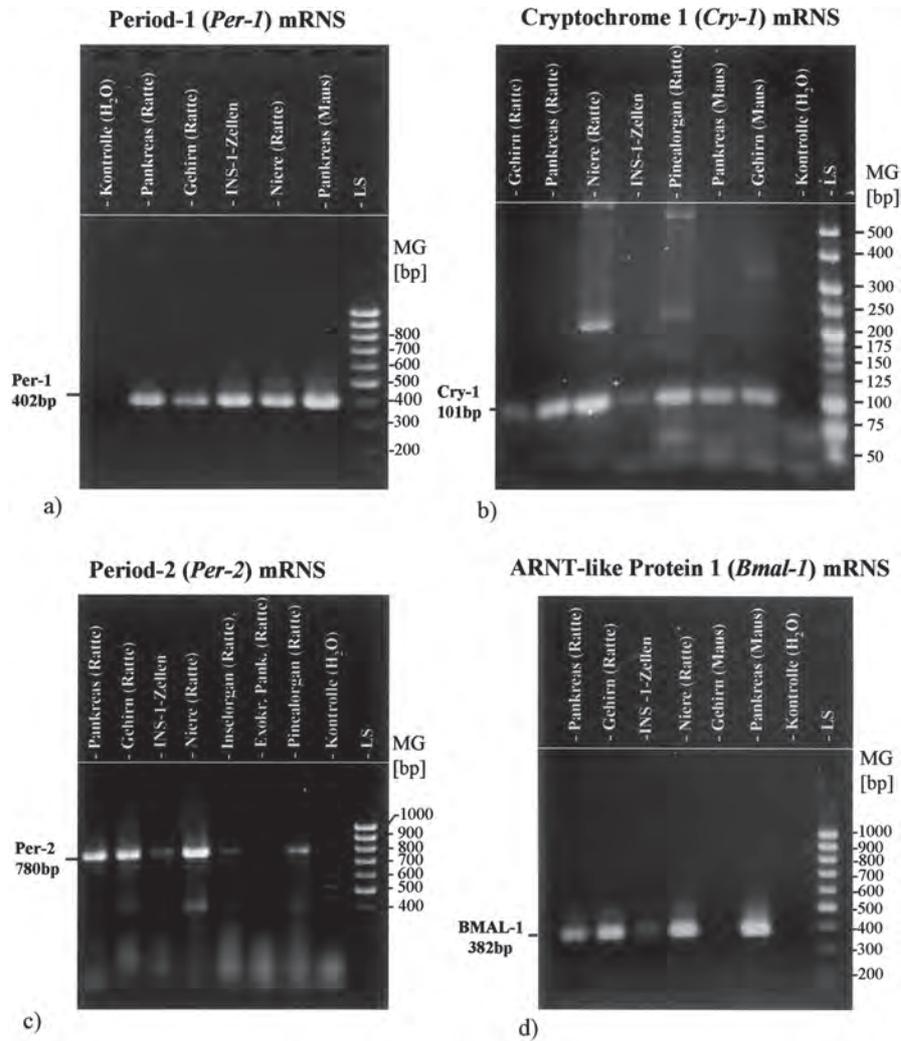


Abb. 17: Nachweis der mRNS von Zeit- oder Uhren-Genen (*clock genes*) im Pankreas und in INS-1-Insulinomazellen sowie einigen ausgewählten Kontrollorganen von Maus und Ratte. Ausgewählt wurden die Zeitgene *Per-1*, *Per-2* sowie *Cry-1*, die für Transkriptionsfaktoren mit negativer regulatorischer Wirkung codieren. Zusätzlich wurde *Bmal-1*, ein Zeit-Gen mit positiver regulatorischer Wirkung, hinsichtlich seiner Expression analysiert. Die Transkripte aller 4 Zeit-Gene wurden im Pankreas sowie in der INS-1-Zelle nachgewiesen.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die Transkripte genannter Zeit- oder Uhren-Gene, wenn auch in unterschiedlicher Expressionshöhe, im Pankreas sowie der INS-1-Zelle nachweisbar sind. Weiterführende Untersuchungen an pankreatischen Inseln im Tagesgang, bei unterschiedlichen Spezies sowie stoffwechselgesunden und diabetischen Individuen in Einheit mit Proteinnachweisen (western-blot) sollen klären, wie die oben geschilderten circadianen Muster der Insulinsekretion bei isolierten Inseln im *in vitro*-Versuch organisiert werden. Beispielhaft wird in Abbildung 18 das circadiane Expressionsmuster der Zeitgene *Per-1* und *Bmal-1* vorgestellt [MÜHLBAUER et al., 2004].

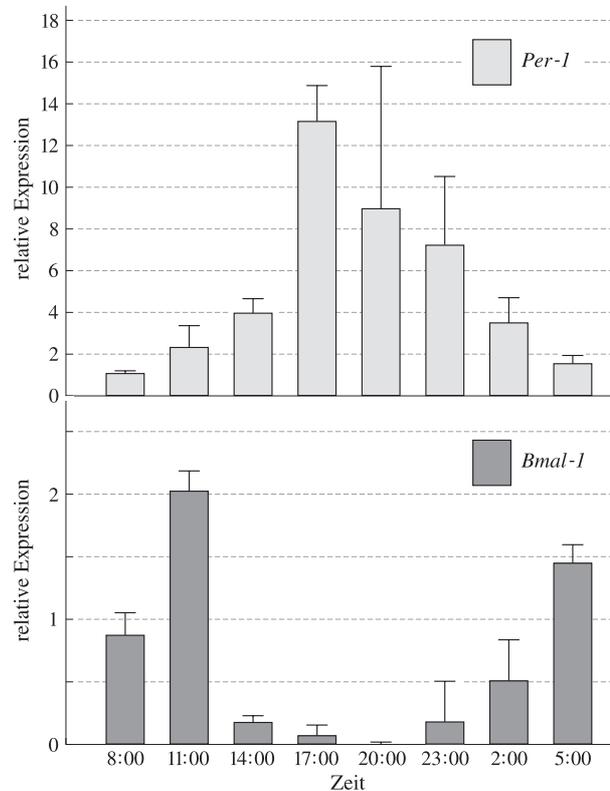


Abb. 18: Circadiane Expression der Zeitgene *Per-1* und *Bmal-1* im Rattenpankreas. Ergebnisse quantitativer *real-time* RT-PCR. Die Signalstärken der Sybr-Green vermittelten Fluoreszenz der Amplifikationsprodukte sind als relative Expression der berücksichtigten Zeitpunkte im Tagesgang aufgetragen.

Einfluss von Melatonin auf Radikal-induzierte Veränderungen pankreatischer B-Zellen neonater Wistar-Ratten *in vitro*

Zurückliegende Untersuchungen machten deutlich, dass reaktive Sauerstoffspezies (ROS) sowohl bei der experimentellen B-Zell-Zerstörung durch Gabe von Alloxan (ALX) als auch bei der Entstehung des Typ1-Diabetes maßgeblich beteiligt sind. Die Applikation von ALX führt bei isolierten Inseln nach anfänglich temporärer Steigerung der Insulinfreisetzung nachfolgend zu deren Senkung. Ursache der zunächst erhöhten Hormonfreisetzung waren Membranschäden der B-Zellen. Die nachfolgende Senkung der Insulinfreisetzung beruht auf Zelluntergängen. Die durch ALX hervorgerufenen B-Zell-Nekrosen wurden durch 1 mmol/l Melatonin nahezu vollständig verhindert. Da Melatonin konzentrationsabhängig einen Teil der gebildeten Hydroxylradikale neutralisiert – die halbmaximal wirksame Melatoninkonzentration (IC_{50}) beträgt 23 $\mu\text{mol/l}$ – ist eine antidiabetogene Bedeutung von Melatonin in Betracht zu ziehen (Abb. 19). Mittels chemiluminometrischer und photometrischer Methoden konnte ferner nachgewiesen werden, dass ALX bei Interaktion mit physiologischen Konzentrationen intrazellulärer Reduktionsmittel, hauptsächlich mit Glutathion (GSH), ein Redoxpaar bildet, das molekularen Sauerstoff durch sequentielle Elektronenübertragungen primär zum Superoxidradikal und sekundär zu Wasserstoffperoxid

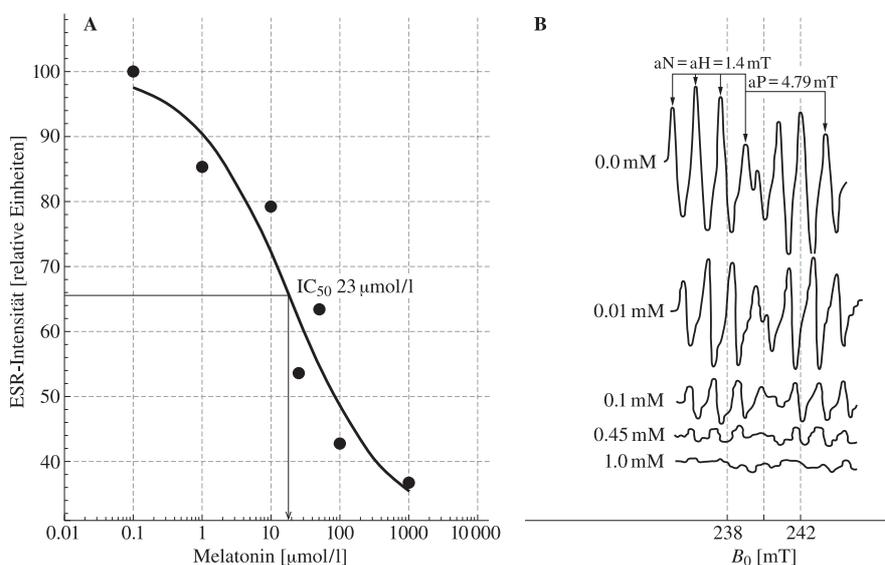
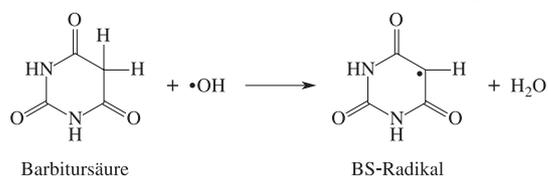


Abb. 19: Elektronen-Spin-Resonanz-Spektrum (ESR): Einfluss unterschiedlicher Melatoninkonzentrationen auf die Signalintensität des OH-DEPMPO-Adduktes. Die IC_{50} für Melatonin beträgt 23 $\mu\text{mol/l}$.

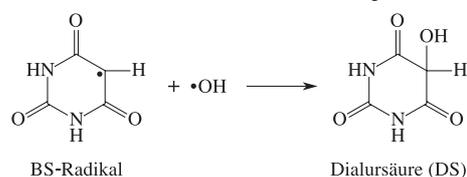
reduziert. Die Anwesenheit geeigneter Eisenkomplexatoren (z. B. NTA-Fe²⁺) führt im nächsten Schritt zur Bildung der äußerst reaktiven und toxisch-wirksamen Hydroxylradikale (Schema 1). Der Nachweis dieser Radikale erfolgte direkt, durch Adduktierung an eine spezifische *spin-trap* (DEPMPO) mittels Elektronen-Spin-Resonanz-Spektroskopie. Die Befunde belegen, dass Melatonin ein effizienter Hydroxylradikalfänger (*radical scavenger*) ist. Es schützt die pankreatische B-Zelle vor den Folgen von oxidativem Stress [BRÖMME et al., 1999; EBELT et al., 2000; PESCHKE et al., 2000a].

Weiterführende Untersuchungen hatten sich einerseits zum Ziel gesetzt festzustellen, welche funktionell-physiologische Bedeutung dem Melatonin im Konzert unterschiedlicher *radical scavenger* zukommt und andererseits, ob das experimentell häufig eingesetzte ALX möglicherweise im Intermediärstoffwechsel entstehen kann und

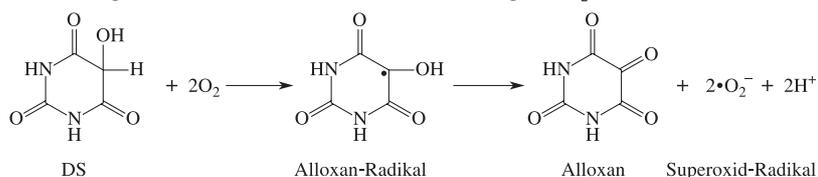
Schritt 1: Wasserstoffabstraktion von Barbitursäure (BS) und Bildung des BS-Radikals



Schritt 2: Addition von •OH an das BS-Radikal (Bildung von Dialursäure)



Schritt 3: Autoxidierung von DS via Alloxan-Radikal zu Alloxan (Bildung von •O₂⁻)



Schritt 4: Regenerierung des Eisen-Katalysators



Schema 1: Angenommener Reaktionsmechanismus der Hydroxylradikal-vermittelten Umwandlung von Barbitursäure zu Alloxan

damit bedeutungsvoll für die Genese des Typ1-Diabetes sein könnte. Dazu ist in Fortsetzung und Erweiterung der oben vorgestellten Befunde festzustellen, dass ALX ein chemisches Diabetogen ist, das hauptsächlich durch Bildung von Sauerstoffradikalen (ROS) die B-Zellen der LANGERHANSschen Inseln bei Labornagern durch Nekrose zerstört. Barbitursäure (BS) zählt ebenso wie das ALX zu den Derivaten der Pyrimidinbase Uracil. Hier soll nun der Frage nachgegangen werden, ob BS durch Hydroxylradikale ($\bullet\text{OH}$) zu ALX umgesetzt und ob dieser Umsatz durch Melatonin, dem nachgewiesenermaßen potenten Fänger von $\bullet\text{OH}$, verhindert werden kann. Zudem sollte die Radikal-fangende Wirkung von Melatonin mit anderen $\bullet\text{OH}$ -Radikal-Scavengern verglichen werden. Der Nachweis als auch die Quantifizierung der mittels FENTON-Reaktion gebildeten $\bullet\text{OH}$ erfolgte mittels *spin-trap*-Technik und ESR-Spektroskopie. Der Nachweis des Umsatzes von BS sowie die Bildung von ALX erfolgte mittels HPLC-Technik. Im Ergebnis der Untersuchungen wurde festgestellt, dass BS zunächst durch eine $\bullet\text{OH}$ -initiierte H-Abstraktion in das Barbitursäureradikal ($\bullet\text{BS}$) umgewandelt wird, an das sich dann ein zweites $\bullet\text{OH}$ adduktieren kann. Das Produkt der Hydroxylierung des $\bullet\text{BS}$ ist Dialursäure (DS), die in Gegenwart von Sauerstoff (O_2) letzteren zu Superoxid-Radikalen ($\bullet\text{O}_2^-$) reduziert und dabei selbst zu ALX autoxydiert. Die gebildeten $\bullet\text{O}_2^-$ reduzieren die bei der FENTON-Reaktion entstehenden Fe^{3+} zu katalytisch wirksamen Fe^{2+} (Schema 2). Melatonin ist in der Lage, mit den $\bullet\text{OH}$ zu interagieren und verhindert damit die Bildung von ALX (Abb. 20). Andere

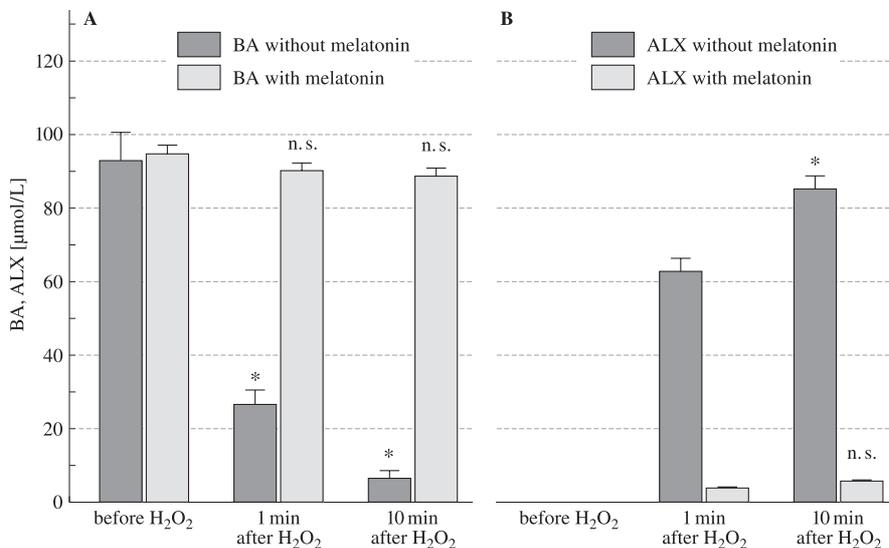
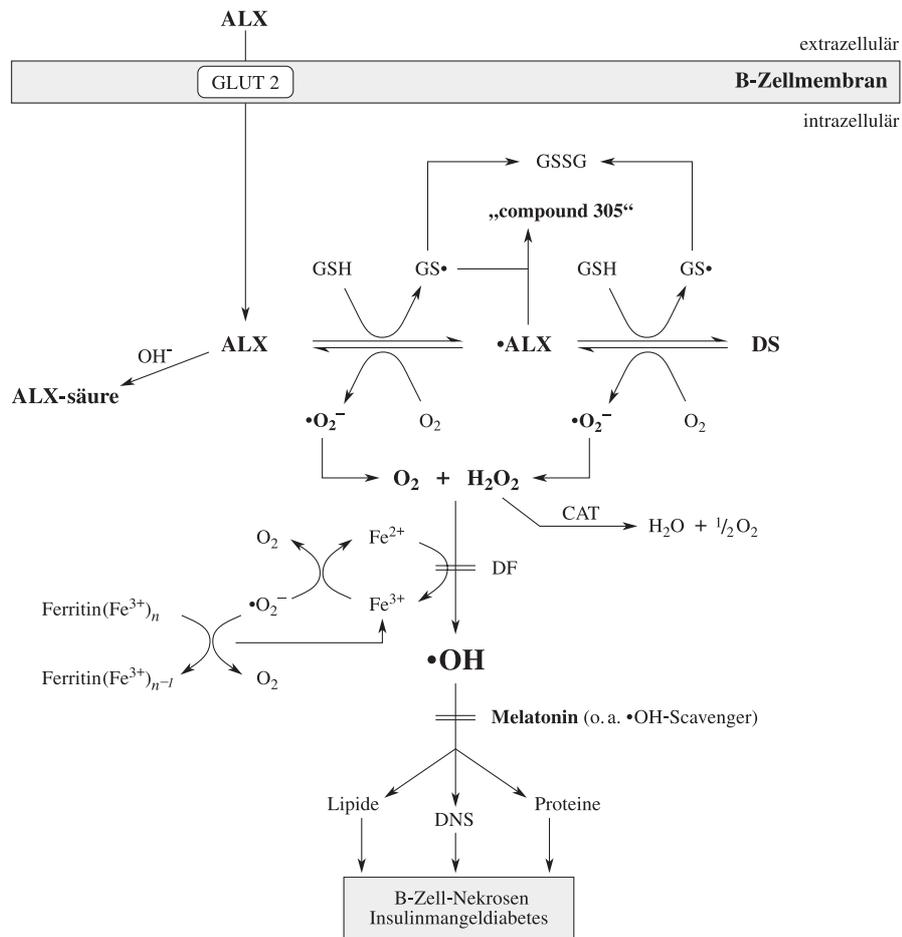


Abb. 20: Einfluss unterschiedlicher Expositionszeiten auf die Abnahme von Barbitursäure bzw. Zunahme der Alloxan-Konzentration infolge der Hydroxylradikal-verursachten Hydroxylierungsreaktion mit und ohne Melatonin.

•OH-Scavenger, wie zum Beispiel Mannitol, GSH und Dimethylthioharnstoff, interagieren ebenfalls mit •OH. Sie sind aber im direkten Vergleich mit Melatonin weniger wirksam. Die Hydroxylierung von BS erwies sich als eine geeignete Nachweisreaktion für die stattgehabte •OH-Bildung. Es zeigte sich zudem, dass Melatonin zu den effektivsten •OH-Fängern gezählt werden kann, dessen Wirksamkeit höher als die von GSH ist [BRÖMME et al., 2001, 2002 a, b; BRÖMME und PESCHKE, 2003].



Schema 2: Synoptische Darstellung möglicher intrazellulärer Mechanismen, die sich unter Einfluss von Alloxan in der pankreatischen B-Zelle abspielen. Melatonin vermag durch Neutralisierung von Hydroxyl-Radikalen (Hydroxylradikal-Scavenger) die Entstehung von B-Zell-Nekrosen aufzuhalten und damit die Schwere des Insulinmangeldiabetes zu minimieren.

Zusammenfassung und Ausblick

Die stammesgeschichtliche Betrachtung des Pinealorgans in der Wirbeltierreihe hat eine interessante Entwicklung und vielfältige Funktionen des Organs deutlich gemacht. Sein Haupthormon, das Melatonin, greift in verschiedenste endokrine und metabolische Abläufe ein. Im Hinblick auf die näher untersuchte Einflussnahme von Melatonin auf die Insulinsekretion der Säugetiere konnten Ergebnisse an Pankreata von Nagetieren sowie an Insulin-produzierenden Insulinomazellen (INS-1) erhoben werden, die Modellfunktion ausüben. Hinzu kommt humanpathologisches Operationsgut. Die Ergebnisse enthalten Ansatzpunkte für die Einbeziehung von Indolaminen, insbesondere Melatonin, in Mechanismen der Diabetogenese-Prophylaxe. Zusammenfassend ist festzustellen, dass die Insulin-produzierende pankreatische B-Zelle über spezifische Pertussistoxin-sensitive G_i -Protein-gekoppelte Melatonin-Rezeptoren (MT_1) verfügt, nicht jedoch über MT_2 -Rezeptoren. Ferner kann festgestellt werden, dass die Insulin-senkenden Melatonin-Effekte hauptsächlich über das Adenylatcyclase/cAMP-System mediiert werden. Weiterhin konnte nachgewiesen werden, dass die Insulinsekretion (auch im *in vitro*-Experiment) einem circadianen Rhythmus unterliegt, der in der pankreatischen Insel selbst generiert wird. Erste Befunde machen wahrscheinlich, dass diese Rhythmusgenerierung in engem Zusammenhang mit der Expression von Zeitgenen in der pankreatischen Insel sowie in der Ratten-Insulinomazelle INS-1 steht. Diese Fragen bedürfen der weiteren Überprüfung. Sie sollen mittels *real-time* Rt-PCR zwecks Erfassung der mRNA-Expression von Zeitgenen im Tagesgang dienen. Zusatzuntersuchungen belegen ferner, dass Melatonin ein äußerst potenter Radikalfänger ist, der sich im Vergleich mit bekannten *scavengern* behauptet. Damit kommt dem Melatonin hinsichtlich seiner Bedeutung für die Insulinsekretion sowie Diabetogenese-Prophylaxe entscheidende Bedeutung zu, die von wesentlicher klinischer Relevanz sein könnte. Perspektivisch wird der intrazellulären Signaltransduktion weiter nachgegangen werden, da nicht davon auszugehen ist, dass die Melatonineffekte allein über den Adenylatcyclase/cAMP-Weg mediiert werden. Erste Untersuchungsergebnisse sprechen vielmehr dafür, dass Melatonineffekte zusätzlich auch über die Phospholipase C und den *second messenger* IP_3 vermittelt werden könnten. Ob zusätzlich zu den membranständigen Melatonin(MT_1)-Rezeptoren gegebenenfalls Kernrezeptoren (Orphan-Rezeptoren, $ROR\alpha$, $RZR\beta$) an der Auslösung von Melatonineffekten beteiligt sind, wird zu untersuchen sein. Angesichts der Lipophilie des Melatonins und seiner daraus resultierenden ungehinderten Membrangängigkeit sollten entsprechende Erwägungen in das Untersuchungsspektrum einbezogen werden. Hinsichtlich der Bedeutung von Zeitgenen für die Rhythmusgenerierung in der pankreatischen Insel sowie der möglichen Charakterisierung eines Oszillators in der B-Zelle, sollen begonnene Untersuchungen fortgesetzt werden. Erste Experimente zur Erfassung von Melatonin-Tagesprofilen bei diabetischen sowie stoffwechselgesunden Mäusen und Ratten sowie Patienten wurden begonnen.

Die Untersuchungen dienen als theoretisch experimentelle Basis für die Übertragung von *in vitro*-Befunden auf den Organismus und stellen auf Grund der Erfassung von Melatonin-Tagesprofilen beim Menschen den Brückenschlag zur Klinik her.

Danksagung: Die der Publikation zugrunde liegenden Untersuchungen wurden unter Mithilfe von Frau Prof. D. Peschke sowie den Herren Priv.-Doz. H.-J. Brömme, Prof. V. Csernus, Dr. H. Ebel, Dr. J.-D. Fauteck, Dr. T. Hammer, Dr. E. Mühlbauer, Prof. U. Musshoff und Andreas Bach durchgeführt.

Literatur

- Brömme, H.-J., H. Ebel, D. Peschke, and E. Peschke: Alloxan acts as a pro-oxidant only under reducing conditions: influence of melatonin. *Cell. Mol. Life Sci. (CMLS)* 55, 487–493 (1999).
- Brömme, H.-J., W. Mörke, and E. Peschke: Transformation of barbituric acid into alloxan by hydroxyl radicals. Interaction with melatonin and with other hydroxyl radical scavengers. *J. Pineal Res.* 33, 239–247 (2002 a).
- Brömme, H.-J., W. Mörke, R. Weinandy, D. Peschke, and E. Peschke: Formation of compound 305 requires the simultaneous generation of both alloxan and GSH radicals. *Horm. Metab. Res.* 34, 62–66 (2002 b).
- Brömme, H.-J. und E. Peschke: Molekulare Mechanismen der Alloxan-Toxizität sowie der radikalfangenden und antidiabetogenen Bedeutung von Melatonin. In: Peschke, E. (Hrsg.): *Endokrinologie. Vorträge im Rahmen des Projektes „Zeitstrukturen endokriner Systeme“*. Abh. Sächs. Akad. Wiss., Math.-naturwiss. Klasse, Verlag Sächs. Akad. Wiss. Leipzig, Hirzel, Stuttgart–Leipzig, 135–160, 2003.
- Brömme, H.-J., R. Weinandy, D. Peschke, and E. Peschke: Simultaneous quantitative determination of alloxan, GSH and GSSG by HPLC. Estimation of the frequency of redox cycling between alloxan and dialuric acid. *Horm. Metab. Res.* 33, 106–109 (2001).
- Csernus, V., T. Hammer, D. Peschke, and E. Peschke: Dynamic insulin secretion from perfused rat pancreatic islets. *Cell. Mol. Life Sci. (CMLS)* 54, 733–743 (1998).
- Doty, E.: Vergleichende Physiologie der lichtempfindlichen Wirbeltier-Epiphyse. *Nova Acta Leopoldina* 31, 219–235 (1966).
- Ebel, H., D. Peschke, H.-J. Brömme, W. Mörke, and E. Peschke: Influence of melatonin on free radical induced changes in rat pancreatic beta-cells in vitro. *J. Pineal Res.* 28, 65–72 (2000).
- Godson, C., and S. Reppert: The Mel_{1a} melatonin receptor is coupled to parallel signal transduction pathways. *Endocrinology* 138, 397–404 (1997).
- Lerner, A. B., J. D. Case, Y. Takahashi, T. H. Lee, and W. Mori: Isolation of Melatonin, the pineal gland factor that lightens melanocytes. *J. Am. Chem. Soc.* 80, 2587 (1958).
- Mühlbauer, E., S. Wolgast, U. Finckh, D. Peschke, and E. Peschke: Indication of circadian oscillations in the rat pancreas. *FEBS Lett.* 2004 (submitted).
- Peschke, E.: Das „dritte Auge“ – Mythos oder Realität? Vorträge aus dem Studium universale 1997/1999. *Leipziger Universitätsreden, Neue Folge* 88, 77–86 (2001 a).

- Peschke, E.: Vorhaben Zeitstrukturen endokriner Systeme. *Jb. Sächs. Akad. Wiss.* 1999/2000, 203–213 (2001 b).
- Peschke, E.: Vorhaben Zeitstrukturen endokriner Systeme. *Jb. Sächs. Akad. Wiss.* 2001/2002, 278–298 (2003 b).
- Peschke, E.: Was hat die Keuschheitsdrüse mit der Insulinsekretion zu tun? *Jb. Sächs. Akad. Wiss. Leipzig*, 2001/2002, 366–368 (2003 a).
- Peschke, E.: Zum Einfluss von Melatonin auf Insulinsekretion, Signaltransduktion und Sekretionsrhythmik pankreatischer B-Zellen in vitro. In: Peschke, E. (Hrsg.): *Endokrinologie. Vorträge im Rahmen des Projektes „Zeitstrukturen endokriner Systeme“*. *Abh. Sächs. Akad. Wiss., Math.-naturwiss. Klasse*, Verlag Sächs. Akad. Wiss. Leipzig, Hirzel, Stuttgart–Leipzig, 87–117, 2003 c.
- Peschke, E. (Hrsg.): *Endokrinologie. Vorträge im Rahmen des Projektes „Zeitstrukturen endokriner Systeme“*. *Abh. Sächs. Akad. Wiss., Math.-naturwiss. Klasse*, Verlag Sächs. Akad. Wiss. Leipzig, Hirzel, Stuttgart–Leipzig, 165 Seiten, 73 Abbildungen, 2003 d.
- Peschke, E., H. Ebel, H.-J. Brömme, and D. Peschke: ‘Classical’ and ‘new’ diabetogens – comparison of their effects on isolated rat pancreatic islets in vitro. *Cell. Mol. Life Sci. (CMLS)* 57, 158–164 (2000 a).
- Peschke, E., J.-D. Fauteck, U. Musshoff, F. Schmidt, A. Beckmann, and D. Peschke: Evidence for a melatonin receptor within pancreatic islets of rats: functional, autoradiographic and molecular investigations. *J. Pineal Res.* 28, 156–164 (2000 b).
- Peschke, E., E. Mühlbauer, U. Musshoff, V. J. Csernus, E. Chankiewicz, and D. Peschke: Receptor (MT₁) mediated influence of melatonin on cAMP content and insulin secretion of rat insulinoma cells INS-1. *J. Pineal Res.* 33, 63–71 (2002).
- Peschke, E., and D. Peschke: Evidence for a circadian rhythm of insulin release from perfused rat pancreatic islets. *Diabetologia* 41, 1085–1092 (1998).
- Peschke, E., D. Peschke, T. Hammer, and V. Csernus: Influence of melatonin and serotonin on glucose-stimulated insulin release from perfused rat pancreatic islets in vitro. *J. Pineal Res.* 23, 156–163 (1997).
- Reuss, S.: Components and connections of the circadian timing system in mammals. *Cell Tiss. Res.* 285, 353–378 (1996).
- Rotschuh, K. E.: René Descartes: „Über den Menschen“ (1632) sowie „Beschreibung des menschlichen Körpers“ (1648). Nach der ersten französischen Ausgabe von 1664 übersetzt und mit einer historischen Einleitung und Anmerkungen versehen von Karl E. Rotschuh, Verlag Lambert Schneider, Heidelberg, 1969.
- Stehle, J. H. und H. W. Korf: Neuroendokrine Signaltransduktion: Das Pinealorgan als Modell für cAMP-modulierte Genexpression. *Neuroforum* 4, 13–22 (1996).
- Ueck, M.: Morphologie und Physiologie des Pinealorgans in der Evolution der Wirbeltiere. *Verh. Dtsch. Zool. Ges.* 1982, 51–80, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1982.