

## ERG-Kalium-Kanäle in ihrer Rolle als Vermittler circadianer Prozesse der pankreatischen $\beta$ -Zelle

### Einleitung

Unter ernährungsphysiologischem Aspekt sind circadiane Prozesse der Glukoseverwertung bisher nur marginal behandelt worden. Es lässt sich aber möglicherweise nicht von der Hand weisen, dass ein Teil des Ursachenkomplexes Diabetes Typ2 (*non-insulin-dependent diabetes mellitus*, NIDDM, auch „Altersdiabetes“ genannt) aus Störungen der endogenen Rhythmik und deren Fehlsteuerung resultieren kann (Boden et al., 1996b, 1999). Die Erkrankung am Typ2-Diabetes schreitet rapid fort und betrifft zunehmend auch jüngere Menschen. Nach Schätzung des Deutschen Diabetikerbundes (Angaben vom 17. 09. 2004) wird die Anzahl der Diabetiker in Deutschland von derzeit acht Millionen bis 2010 auf ca. zehn Millionen ansteigen. Die veränderte Lebensführung in der Industriegesellschaft bietet Erklärungen an: Fehlernährung, Bewegungsmangel und resultierende Obesitas betrifft häufig schon Kinder. Auch den Störungen circadianer Rhythmen muss aus ernährungsphysiologischer Sicht breitere Aufmerksamkeit geschenkt werden. Circadiane Rhythmen der LANGERHANSschen Insel mit ihren Hormonen Insulin, Glukagon sowie Somatostatin und der von ihnen wesentlich gesteuerten Glukose-Homöostase treten damit in den Mittelpunkt.

### Uhrengene als Komponenten der zeitlichen Steuerung der $\beta$ -Zelle

Die Arbeitsgruppe um Boden (Boden et al., 1996a,b; Boden et al., 1999) hat im Zuge von Untersuchungen zur Insulinsekretion beim Menschen eine circadiane Rhythmik nachgewiesen. Die Kenntnis circadianer Regulationsmechanismen des Metabolismus ist vor allem auf molekularer Ebene in jüngerer Zeit vertieft worden (Zhang et al., 2006). Damiola und Mitarb. (2000) hatten gefunden, dass die Fütterungsperiodik bei Ratten ein wesentlicher Zeitgeber für die Expressionsdynamik von Uhrengenen in der Leber ist. Es wird seit längerem postuliert, dass neben einer zentralen Uhr im hypothalamischen *Nucleus suprachiasmaticus* (SCN) periphere Oszillatoren existieren, mit denen Organe selbst ihre internen Funktionen circadian-rhythmisch steuern. Der Rhythmus einer peripheren Uhr in der Leber ließ sich im Rattenmodell durch Verschiebung des Lichtregimes und zeitliche Beschrän-

kung des Futterzuganges steuern (Damiola et al., 2000). Andere Studien an Ratten unter Futterrestriktion konnten diesen Befund bestätigen und einen Zusammenhang mit einem circadian-rhythmischen antizipatorischen Nahrungsverlangen nachweisen (Diaz-Munoz et al., 2000). Darüber hinaus ist bekannt, dass auch der Blutglukosespiegel circadian-rhythmisch reguliert wird (Gagliardino et al., 1984). Peschke und Peschke (1998) konnten erstmalig am endokrinen Modell der Ratteninsel nachweisen, dass unter *in vitro*-Bedingungen ein peripherer Oszillator die tagesrhythmische Sekretionsleistung der  $\beta$ -Zelle steuert. Diese Befunde ließen ferner erkennen, dass das Hormon des Pinealorgans Melatonin eine Zeitgeberfunktion auf die Insulinsekretion ausübt. Inzwischen sind diese Ergebnisse von anderer Seite bestätigt worden (Delattre et al., 1999; Picinato et al., 2002). Es ist deutlich geworden, dass von einem Oszillator auszugehen ist, der als Taktgeber für circadian-rhythmische endokrine Prozesse in der Insel fungiert (Mühlbauer et al., 2004). Die kausale Erklärung für die beobachteten circadian-rhythmischen Sekretionsprozesse steht bislang aus. Eine diskutierte Möglichkeit ist der direkte Einfluss von Uhrengenen. Die als Transkriptionsfaktoren fungierenden Uhrengeneprodukte – wie die transkriptionell verstärkenden CLOCK und BMAL1 sowie die hemmenden PER und CRY oder solcher von „output“-Genen wie *dbp* – wirken auf das Insulingen. Als „output“-Gene werden solche Gene bezeichnet, die vom Heterodimer BMAL1/CLOCK transkriptionell aktiviert werden können, um die circadian-rhythmische Information weiterzutragen (Jin et al., 1999). Bekannte Beispiele für Rezipienten circadianer Transmission sind das Gen des Vasopressins (Jin et al., 1999; Munoz et al., 2002) und der AANAT, des Schlüsselenzyms der Melatoninbiosynthese (Chong et al., 2000). Dass Uhrengene eng mit dem Stoffwechsel verknüpft sind, zeigt sich am Beispiel des „*Peroxisome-proliferator-activated receptor  $\alpha$* “ (PPAR $\alpha$ ), einem wesentlichen nukleären Rezeptor des Fettstoffwechsels (Oishi et al., 2005) und an den Untersuchungen von Panda und Mitarb. (2002) an circadian-rhythmisch exprimierten Genen der Leber, die metabolische Prozesse steuern. Ueda und Mitarb. (2005) definierten 3 Schnittstellen circadian-rhythmisch agierender Transkriptions-Faktoren. Sie haben potentielle Zielgene: 1. E/E'-box-, 2. DBP/E4BP4-box- und 3. RevErb $\alpha$ /ROR-box-Elemente. E/E'-box-Elemente finden sich auch im Promotorbereich des Insulingens sowie

SUR1 (Sulfonylurea Rezeptor 1), der regulativen Unter-einheit des  $K_{ATP}$ -Kanals der  $\beta$ -Zelle (Ashcroft und Ashcroft, 1998; Hernandez-Sanchez et al., 1999). Ob diese genannten Gene tatsächlich durch BMAL1/CLOCK angesteuert werden, ist bislang nicht untersucht worden. Dass das bloße Vorhandensein eines E-box-Elementes im Promotorbereich eines Genes kein Garant für circadian-rhythmische Transmission ist, hat sich am Beispiel des Vasoaktiven Intestinalen Peptids (VIP) gezeigt (Munoz und Baler, 2003). Am Modell der mittels Serumschock synchronisierten  $\beta$ -Zellen einer Insulinoma-Zelllinie der Maus ( $\beta$ -TC3) fanden Allaman-Pillet und Mitarb. (2004) Hinweise auf eine circadiane Rhythmik der Insulin-*(Ins)*-Expression in Form transkriptioneller circadianer Oszillationen. Sie sind als Beleg für eine mögliche Steuerung dieses Gens direkt auf Promotorebene anzusehen. Eigene Untersuchungen am Pankreas der Ratte konnten circadiane Veränderungen des *Ins*-Transkriptes nicht belegen, obwohl Uhrengenenkomponenten circadian fluktuieren (Abb. 1).

#### **Einfluss von Kalium-Kanälen auf die circadian-rhythmische Insulinsekretion**

Eine wesentliche Komponente der circadian-rhythmischen Insulinsekretion sind die genannten Uhrengene. Neben möglichen, hier nicht diskutierten parakrinen Einflüssen innerhalb der Insel stellen spannungsabhängige Kaliumkanäle der Zellmembran weitere, den Sekretionsmechanismus steuernde Faktoren dar. Nach neueren Untersuchungen (Yan et al., 2004) wurden bis zu 17 verschiedene Kaliumkanäle von den Zellen einer Ratteninsel exprimiert. Wesentlich für die Funktion der  $\beta$ -Zelle ist der ATP-abhängige Kaliumkanal  $K_{ATP}$ , der ein Hetero-Okta-mer aus der porenbildenden Einheit (KIR6.2) und einer regulativen, Sulfonylharnstoff-sensitiven Einheit (SUR1) darstellt. Über diesen Kanal werden die Vorgänge der postprandialen Stimulus-Sekretions-Kopplung (Ashcroft et al., 1984) geregelt. Sie leiten konsekutiv Insulinexozytose und Glukoseverwertung ein.

Untersuchungen von Itri und Mitarb. (2005) an neuronalen Zellen des SCN, dem zentralen „circadian pacemaker“, zeigten, dass  $K^+$ -Kanäle (hier die spannungsabhängigen  $K_v3.1$  und  $K_v3.2$ ) die wahrscheinlichen Kandidaten sind, um Uhrengenenexpression an Membranerregungsprozesse zu koppeln. Dieser Aussage lagen Beobachtungen über eine tageszeitliche Expressionsfluktuation von  $K_v3.1$  und  $K_v3.2$  sowie über circadiane elektrische Aktivitätsänderungen von Neuronen des SCN zugrunde. Diese Erkenntnis legt die Funktion spannungsabhängiger Kaliumkanäle für die Steuerung circadian-rhythmischer Insulinsekretion ebenfalls nahe. Hinzu kommt, dass inzwischen weitere, circadian-rhythmisch gesteuerte Kaliumkanäle bekannt geworden sind, wie beispielsweise  $K_v1.5$  und  $K_v4.2$  in Herzmuskelzellen (Yamashita et al., 2003) und *Erg1* (*Kcnh2*) ebenfalls im

Herzen (Storch et al., 2002). Dass ERG-Kanäle (*Ether-a-go-go-related-gene*) der *Erg*-Genfamilie an der Regulation der Insulinsekretion beteiligt sind, wurde mittels molekulargenetischer und elektrophysiologischer Methoden an isolierten humanen  $\beta$ -Zellen nachgewiesen (Rosati et al., 2000). Dieser Befund war insofern überraschend, als man bislang dieser Gruppe von  $K^+$ -Kanälen ausschließlich eine Funktion im Gehirn oder am Herzen beigemessen hatte. Im Herzen verursachen Mutationen der ERG1-Isoform (HERG beim Menschen genannt) Arrhythmie mit letalem Ausgang, die als Long-QT-Syndrom bekannt geworden ist (Sanguinetti et al., 1995, 1996; Mitcheson et al., 2000). Am Myocyten tragen ERG-Kanäle zur Repolarisation der Zellen am Ende des Aktionspotentials bei (Jurkiewicz und Sanguinetti, 1993). In laktotropen Zellen beeinflusst der ERG-Kanal offenbar den Sekretionsprozess. Das erklärt sich aus der Tatsache, dass pharmakologische Blockierung dieser Kanäle zur Steigerung der Prolaktinsekretion führt (Bauer et al., 2003; Schwarz und Bauer, 2004). Auch bei somatotropen Zellen konnten ERG-Kanäle transkriptionell nachgewiesen werden (Wulfsen et al., 2000), so dass sich eine Verallgemeinerung über Einflüsse von ERG-Kanälen auf endokrine, elektrisch erregbare Zelltypen anbietet. In Analogie zu den Befunden an lactotropen Neuronen des Hypothalamus konnten Rosati und Mitarb. (2000) an isolierten pankreatischen  $\beta$ -Zellen des Menschen belegen, dass Blockierung der ERG-Kanäle mittels Methansulfonanilid (Way 123,398) zur Steigerung der Insulinsekretion führt. Damit war zum ersten Mal eine funktionelle Kopplung zwischen ERG-Kanal und Sekretionsleistung der  $\beta$ -Zelle erwiesen, ohne dass allerdings der Versuch unternommen wurde, zwischen den verschiedenen Isoformen zu differenzieren und deren Expressionsmuster zu analysieren. Eine enge Kopplung an diabetogene Mechanismen ist zudem durch kürzlich publizierte Befunde gegeben, dass der HERG-Kalium-Kanal durch Hyperglykämie in seiner Funktion gestört wird (Zhang et al., 2003). Damit ist diese Gruppe der spannungsabhängigen Kalium-Kanäle ins Zentrum pathophysiologischer Mechanismen der Diabetogenese gerückt worden.

#### **Isoformen des ERG-Kalium-Kanals und ihre möglichen Funktionen in der circadianen Organisation der $\beta$ -Zelle**

Die Genfamilie der spannungsabhängigen *Erg*-Kanäle enthält drei Isoformen, nämlich *Erg1*, *Erg2* und *Erg3* mit den genetischen Bezeichnungen *Kcnh2* für *Erg1*, *Kcnh5* für *Erg2* und *Kcnh6* für *Erg3*. Alle drei Vertreter dieser Familie codieren für Proteine mit einem Molekulargewicht von etwa 127 KD und weisen eine 6-fache Transmembranstruktur auf. *In vivo* bilden 4 Homo-Monomere die tetramere Funktionseinheit (Schwarz und Bauer, 2004). Verschiedene Studien machen es wahrscheinlich, dass auch Hetero-Tetramere mit ERG-Isoformen einen

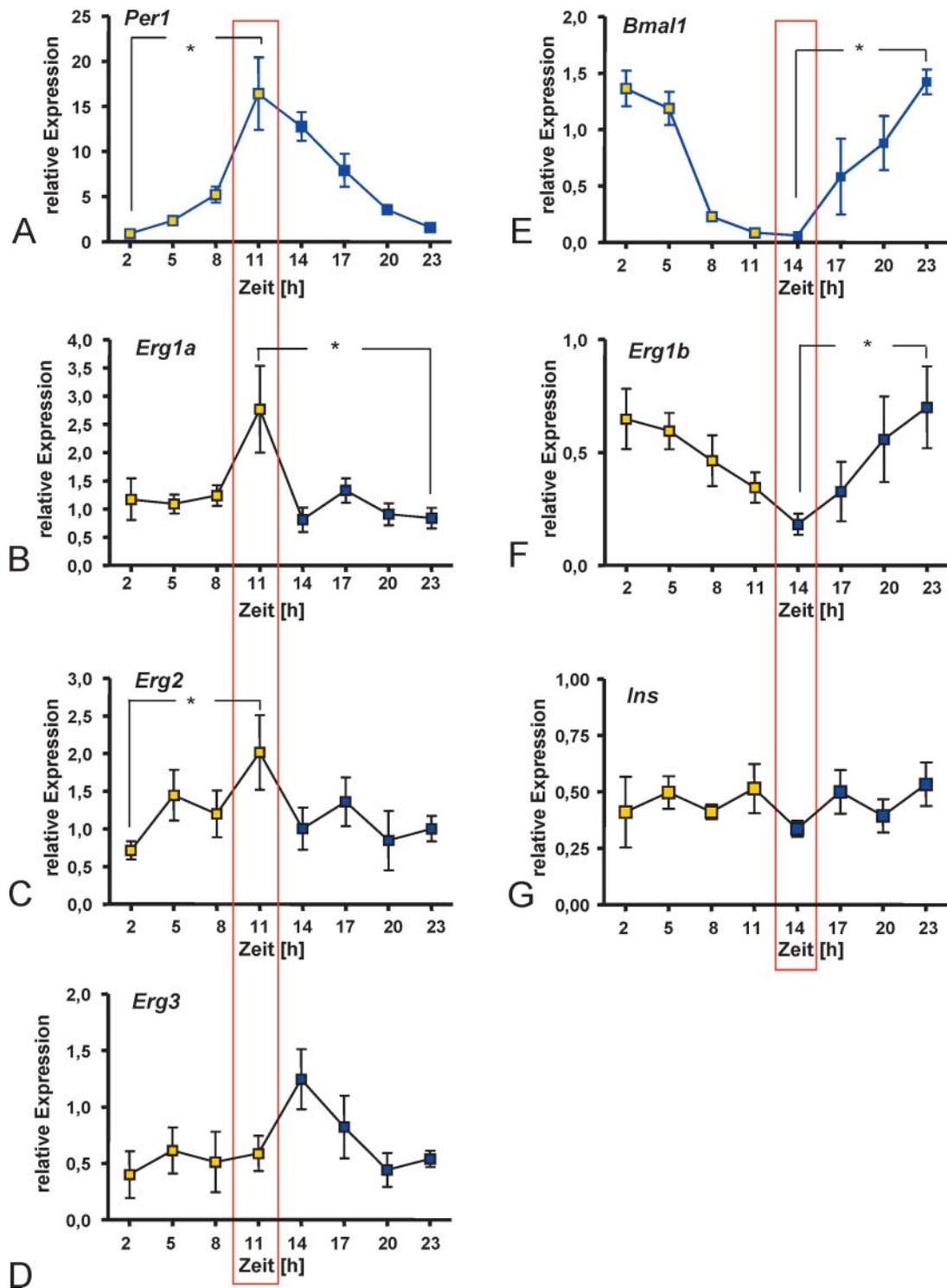


Abb. 1: Circadiane Expressionsmuster von *Erg*-Kaliumkanälen im Vergleich zu denen der Uhrgene *Per1* und *Bmal1* im Rattenpankreas. (A) Die Expressionskinetik der Transkripte von *Per1* weist ein Maximum zur Zeitgeberzeit 11.00 Uhr auf. (B, C, D) Synchron treten Maxima der Transkripte der Isoformen *Erg1a* und *Erg2* auf. Das Maximum von *Erg3* folgt 3 Stunden später. (E) Das Uhrgen *Bmal1* ist gegenläufig zu *Per1* exprimiert. (F) Dazu synchron verhält sich das Transkript der *Erg1b*-Splice-Variante. Ihr Verlauf ist gegenläufig zu allen anderen Isoformen und der *Splice*-Variante *Erg1a*. (G) Das Insulingen-Transkript zeigt dagegen keine signifikanten Veränderungen im Tagesverlauf. Signifikante Unterschiede zwischen Expressions-Maxima und -Minima sind durch einen Stern (\*) gekennzeichnet ( $p < 0,05$ ;  $n = 4 - 6$ ; Mann-Whitney-Test). L : D = 12 : 12 (Zeit in Stunden nach Licht an).

funktionellen Kanal bilden (Shi et al., 1997; Wimmers et al., 2002). Die drei Isoformen unterscheiden sich vornehmlich in ihren Aktivierungspotentialen (Shi et al., 1997) sowie in ihrer Expression in verschiedenen Organen. Während *Erg1* neben neuronalen Zellen auch im Herzen und endokrinen Zellen exprimiert wird, wurden *Erg2* und *Erg3* im Wesentlichen als spezifische Kanäle in Neuronen betrachtet (Shi et al., 1997). Eigene Untersuchungen am Pankreas deuten allerdings auch auf breiter angelegte Funktionen innerhalb der pankreatischen Insel hin, da sowohl die *Erg1-Splice*-Variante *Erg1a* als auch *Erg2* und *Erg3* in der  $\beta$ -Zelle transkriptionell (Abb. 2) und auch immunologisch (Abb. 3) nachweisbar sind.

Ein völlig neuer Aspekt zur HERG-Funktion war die Annahme (Overholt et al., 2000), dass auf Grund der gemessenen Depolarisationskinetik mit dem pharmakologischen ERG-Blocker Dofetilid ERG als Teil des  $O_2$ -Sensorkomplexes im *Glomus caroticum* fungiert. Da das ERG-Protein zudem über eine PAS (Per-Arnt-Sim)-Domäne verfügt, von der  $O_2$ -Sensitivität bekannt ist (Pelletier et al., 1999), erhält dieser Befund zusätzlich Gewicht.

Was macht ERG-Kanäle zu potentiellen Kandidaten für circadiane Rhythmen? Betrachtet man die Genstruktur für die Isoformen *Erg1*, *Erg2* und *Erg3*, so zeigen sich für das *Erg1*-Gen der Ratte erst etwa 2,5 kb „downstream“ des Transkriptionsstartes – damit also in Intronbereichen des Gens – eine E-box-Sequenz des Typs CACGTG und weitere des E'-Typs AACGTG (Yoo et al., 2005). Es ist allerdings bekannt, dass E-box-Elemente als „enhancer“-Elemente, auch innerhalb eines Gens positioniert, transkriptionelle Prozesse steuern können (Chen und Baler, 2000 für das *AANAT*-Gen; Oishi et al., 2005 für *PPAR $\alpha$* ; Ripperger, 2006 für *RevErb $\alpha$* ). Für den *Erg*-Promotor der Ratte lassen sich innerhalb von 2,2 kb des transkribierten Bereiches sowohl eine perfekte E-box des Typs CACGTG finden sowie ein Element der RevERB $\alpha$ /ROR-box. Imperfekte E-box-Elemente (CANNTG) kommen sowohl im Promotor als auch in Intronbereichen aller drei Gene der *Erg*-Isoformen vor. Zusätzlich zu den bisher betrachteten *Erg*-Isoformen wurde von *Erg1* eine *Splice*-Variante bekannt, die als *Erg1b* bezeichnet wurde (Lees-Miller et al., 1997). Von Pond und Mitarb. (2000) wurde publiziert, dass *Erg1b* im menschlichen Herzen zu keinem funktionellen Translationsprodukt umgeschrieben wird, ein Befund, der jedoch durch Untersuchungen am „knockout“-Modell der Maus überholt zu sein scheint (Lees-Miller et al., 2003). Das Transkript wird nach diesen neueren Befunden, zumindest im Herzen der Maus, in ein funktionelles Protein umgeschrieben, das im Vergleich zur *Splice*-Variante ERG1a einen verkürzten N-Terminus besitzt. Sein Verlust stört im „knockout“-Modell den Kaliumtransport des Myozyten-spezifischen Stromes (und zwar der schnellen Komponente  $I_{Kr}$  mit Repolarisations-Funktion) und führt zur Herzarrhythmie. Interessanterweise weist diese verkürzte Va-

riante des ERG1 keine funktionelle PAS-Domäne mehr auf, die eine Schnittstelle mit anderen Effektorproteinen darstellt. Eine komplette PAS-Domäne ist wahrscheinlich auch für den Prozess des Kanal-Transportes („trafficking“) von Bedeutung. Es ist offensichtlich, dass auch das funktionelle Bedeutungsspektrum des ERG1 noch unklar ist.

Inwiefern sich die von uns festgestellte *Erg1b*-Expression innerhalb der  $\alpha$ -Zellen der LANGERHANSschen Insel auch funktionell erklären lässt, bleibt zu untersuchen (Abb. 3E–G). Hetero-Tetramerbildung (unter Einschluss von ERG1b) mit den, auch in den Glukagon-synthetisierenden Zellen immunologisch nachgewiesenen, Isoformen ERG2 und ERG3, darf zumindest vermutet werden (Abb. 3). Die Bildung solcher Mischformen des Kanals wurde auch auf Grund überlappender immunzytochemischer Nachweise der drei Isoformen in verschiedenen Hirnregionen vermutet (Wimmers et al., 2002). Analog zu diesen Befunden ist Hetero-Tetramerbildung unter Einschluss von ERG1a in den pankreatischen  $\beta$ -Zellen wahrscheinlich, da die eigenen immunocytochemischen Untersuchungen räumliche Überlappungen erkennen lassen (Abb. 3).

#### Befunde zur circadian-rhythmischen Expression von Isoformen des ERG-Kalium-Kanals

Eine Analytik der Expressionsdynamik rhythmischer Veränderungen ergab, dass – neben den spannungsabhängigen Kanälen  $K_{v1.5}$  und  $K_{v4.2}$  – auch *Erg*-Kanäle mit den Isoformen 1, 2 und 3 und den *Erg1-Splice*-Varianten a und b im Pankreas, der Insel und der  $\beta$ -Zelle exprimiert werden (Abb. 2). Eine circadiane Rhythmik mit transkriptionellen Oszillationen konnte für die genannten *Erg*-Isoformen belegt werden (Abb. 1). Dabei zeigte sich zum einen, dass *Erg1a*-, *Erg2*- und – etwa um 3 Stunden abweichend – auch *Erg3*-Transkripte synchron mit dem Uhrengentranskript von *Per1* schwingen (Abb. 1). Auffällig ist hingegen der dazu inverse Verlauf der Expressionskurve der *Splice*-Variante *Erg1b*, die sich gegenläufig zu *Per1* und *Erg1a*, aber synchron zum Uhrengen *Bmal1* verhält.

Für eine circadiane Rhythmik der hier behandelten *Erg*-Isoformen und *Erg1-Splice*-Varianten sprechen auch die durchgeführten Versuche an INS1-Zellen, die mittels Serumschock synchronisiert wurden (Abb. 4). Dass ein Schock mit hohen Serumkonzentrationen (bis zu 50%) als synchronisierendes Signal auf einzelne Zellen einwirkt, konnte erstmalig an Rat-1 Fibroblastzellen gezeigt werden (Balsalobre et al., 1998). Die Befunde dieser und anderer Arbeitsgruppen sprechen dafür, dass die „endogene Uhr“ auf zellulärer Ebene organisiert ist. Die in Abb. 4 dargestellten, präliminären Befunde deuten teilweise (*Erg1a*, *Erg1b* sowie *Erg2*) auf circadiane Veränderungen der INS1-Zellen nach Serumschock hin. Endgültige Aus-

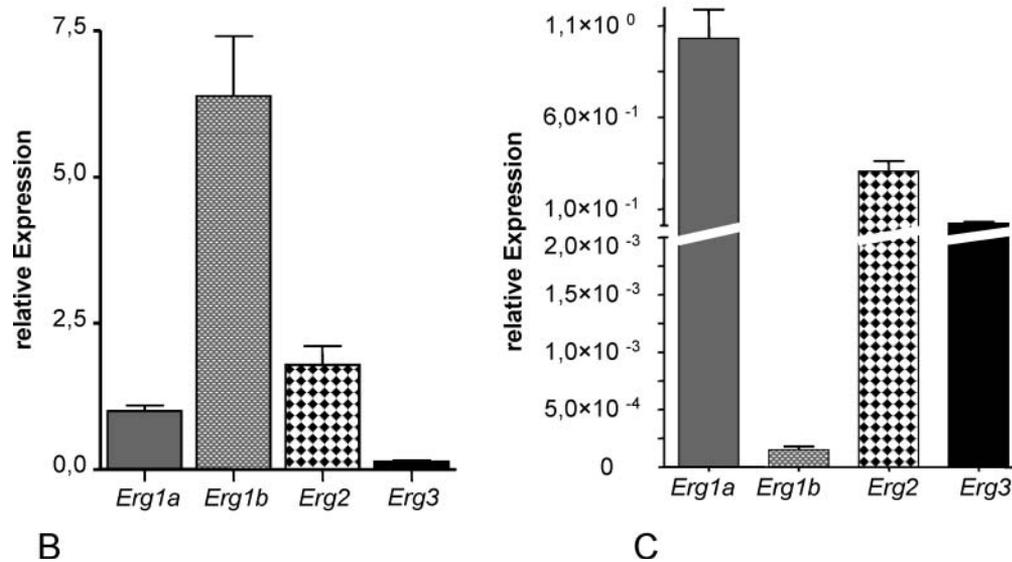
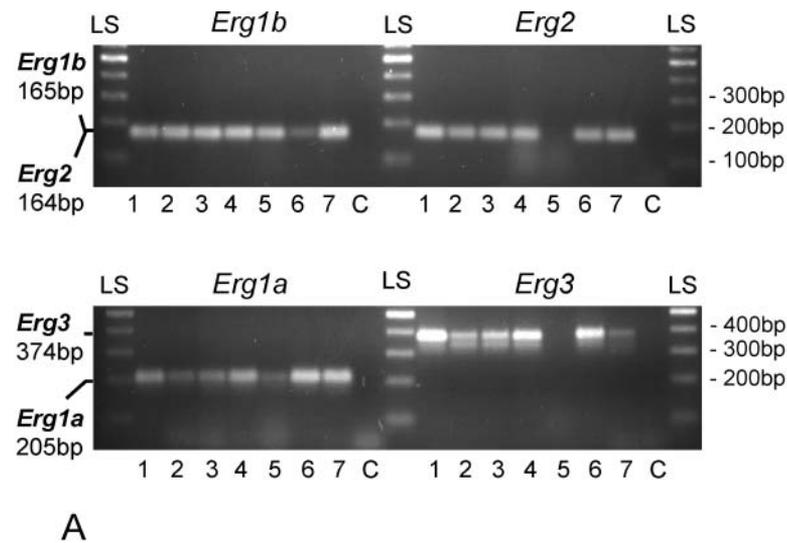


Abb. 2: Expression von Kaliumkanälen der *Ether-a-go-go-related-gene* (*Erg*)-Genfamilie in pankreatischem Gewebe der Ratte und in Kontrollgeweben. Mittels reverser Transkriptions-PCR (RT-PCR) wurden Transkripte aller drei Isoformen sowie die *Splice*-Varianten von *Erg1a* und *Erg1b* nachgewiesen. (A) Dargestellt sind Banden der jeweiligen Amplikons nach gelelektrophoretischer Trennung in 3%igem Agarosegel und Ethidiumbromidfärbung der DNA. Zuordnung der Banden 1: Hypothalamus, 2: Gesamtpankreas (Lichtzeit), 3: Gesamtpankreas (Dunkelzeit), 4: LANGERHANSSche Insel, 5: Exokrines pankreatisches Gewebe, 6: INS1-Zellen, 7: Pinealorgan, C: H<sub>2</sub>O -Negativkontrolle. (B) Quantitative Auswertung des Expressionsniveaus der *Erg*-Isoformen mittels *real-time* RT-PCR an isolierten pankreatischen Inseln der Ratte zeigt, dass das Transkript der *Erg1b-Splice*-Variante am stärksten exprimiert ist. Die Expression der *Erg2*- und *Erg3*- sowie der *Erg1a*-Transkripte ist im Vergleich zu *Erg1b* deutlich geringer. (C) Die Expressionsniveau der INS1-Zelle ist am höchsten für die *Erg1a*- und am niedrigsten für die *Erg1b-Splice*-Variante. *Erg2* und *Erg3* liegen dazwischen. Verfahren für quantitative Erfassungen:  $\Delta\Delta$ -CT-Bestimmung mit  $\beta$ -Aktin als Referenzgen.

sagen bedürfen jedoch weiterer Überprüfung und Bestätigung. Die Mechanismen dieser peripheren zellulären Oszillatoren im Vergleich zur zentralen biologischen Uhr des SCN ist kürzlich an Organen von *Per2*-Luziferase-

„*knockin*“-Mäusen bearbeitet worden (Yoo et al., 2004). Das experimentelle Design dieser Arbeitsgruppe erlaubte die kontinuierliche Erfassung circadianer Rhythmen peripherer Organe an SCN-läsionierten Tieren über mehr als

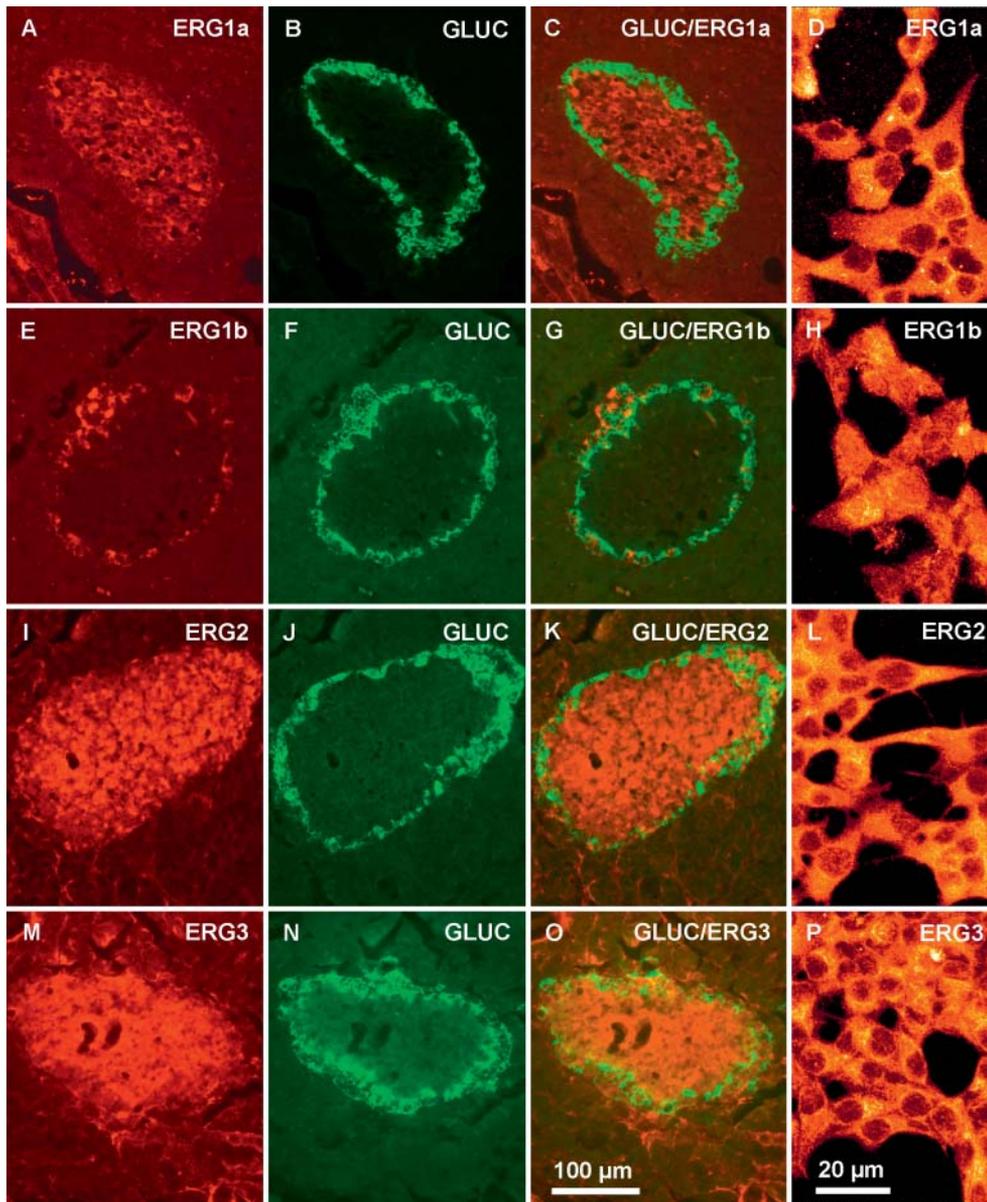


Abb. 3: Immunhistochemische Darstellungen von ERG-Isoformen und ERG1-*Splice*-Varianten mit Fluoreszenzfarbstoff-markierten Sekundär-Antikörpern. (A) Nachweis der Expression von ERG1a in der LANGERHANSschen Insel des Rattenpankreas; (B) Glukagonnachweis (GLUC) von  $\alpha$ -Zellen derselben Insel; (C) Doppelmarkierung mit ERG1a- und GLUC-Antikörpern: Die  $\beta$ -Zellen reagieren mit dem ERG1a-Antikörper (nicht aber mit dem ERG1b-Antikörper), die  $\alpha$ -Zellen erwartungsgemäß mit dem GLUC-Antikörper, aber nicht oder nur gering mit dem ERG1a-Antikörper. (D) Die Immunreaktion zeigt, dass ERG1a in INS1-Zellen exprimiert ist. (E) Nachweis der Expression von ERG1b in der LANGERHANSschen Insel des Rattenpankreas; (F) Glukagonnachweis von  $\alpha$ -Zellen an derselben Insel; (G) Doppelmarkierung mit ERG1b- und GLUC-Antikörpern zeigt eine periphere,  $\alpha$ -Zell-spezifische Immunmarkierung. (H) ERG1b ist schwach in INS1-Zellen nachweisbar. (I) Nachweis von ERG2 in der LANGERHANSschen Insel des Rattenpankreas; (J) Glukagonnachweis in  $\alpha$ -Zellen an derselben Insel; (K) Doppelmarkierung mit ERG2- und GLUC-Antikörpern zeigt Immunmarkierung bevorzugt in  $\beta$ -Zell-Bereichen und nur disseminiert im  $\alpha$ -Zell-Bereich. (L) ERG2 ist in INS1-Zellen nachweisbar. (M) Nachweis von ERG3 in der LANGERHANSschen Insel des Rattenpankreas; (N) Glukagonnachweis in  $\alpha$ -Zellen derselben Insel; (O) Doppelmarkierung mit ERG3- und GLUC-Antikörpern zeigt eine gleichmäßige Verteilung der Immunmarkierung im  $\alpha$ - und  $\beta$ -Zell-Bereich. (P) ERG3 Immunreaktion in INS1-Zellen.

sieben Tage. Die vorgestellten Befunde sind ein Beleg für die Existenz peripherer Oszillatoren, die in der eigenen Arbeitsgruppe auch für isolierte Inseln der Ratte publiziert werden konnten (Peschke und Peschke, 1998).

Die Frage nach synchronisierenden Faktoren für periphere Zellen und Organsysteme wäre allerdings neu zu stellen. Die Untersuchungen von Peschke und Mitarb. zur Rolle und Funktion von Melatoninrezeptoren der pan-

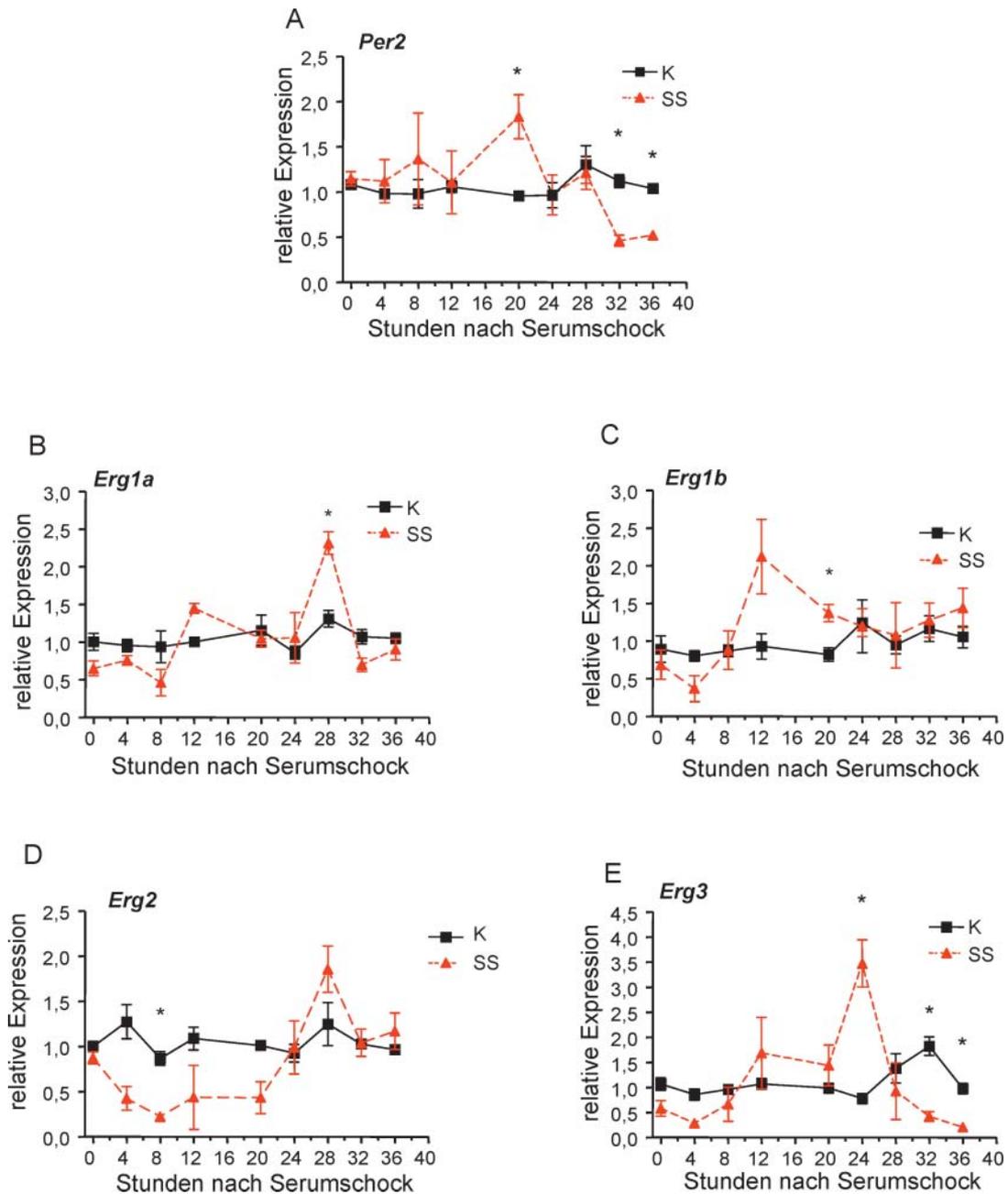


Abb. 4: Reaktionsmuster von INS1-Zellen nach Serumschockbehandlung. Kinetik der Transkriptveränderungen von Serumschock-behandelten INS1-Zellen (SS) im Vergleich zur Kontrolle (K). (A) *Per2*, (B) *Erg1a*, (C) *Erg1b*, (D) *Erg2*, (E) *Erg3*. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen Kontrolle und Serumschock-behandelten Zellen sind durch einen Stern (\*) gekennzeichnet (Mann-Whitney Test,  $p < 0,05$ ,  $n = 4$ ).

kreatischen  $\beta$ -Zelle (Peschke et al., 2000, 2002, 2006, 2007; Bach et al., 2006; Mühlbauer und Peschke, 2007) werden durch die zitierten Arbeiten gestützt und gewinnen damit erneut an Bedeutung. Die Melatoninrezeptoren stehen möglicherweise im Dienst der Synchronisation Melatonin-abhängiger Prozesse der pankreatischen  $\beta$ -Zelle. Als Fazit für die in Abb. 4 beschriebenen Effekte der Serumbehandlung von INS1-Zellen auf die Expression der *Erg*-Isoformen lässt sich festhalten, dass die in Abb. 1

beschriebene Rhythmik der Transkript-Akkumulation sich auch in den Serumschockversuchen bei den oben genannten Genen andeutet.

Die immunocytochemischen Befunde (Abb. 3) mittels spezifischer Antikörper für alle 3 bisher behandelten Isoformen bzw. *ERG1-Splice*-Varianten, lassen auf spezifische Funktionen von *ERG1a* für die  $\beta$ -Zelle und von *ERG1b* für die Glukagon-synthetisierende  $\alpha$ -Zelle schließen. Den Isoformen *ERG2* und *ERG3*, die sowohl im

Zentrum als auch in der Peripherie der Insel immunocytochemisch nachgewiesen wurden, lässt sich auf Grund ihrer Lokalisation keine Zelltyp-spezifische, wohl aber eine inselnspezifische Funktion zumessen (Abb. 3).

Rückblickend wurde erstmalig im Jahre 2000 von Rosati und Mitarb. die funktionelle Bedeutung von HERG (humanes ERG1) für die Insulinsekretion erkannt. Die eigenen Kalzium-Imaging-Befunde an INS1-Zellen mit Konfokaler Laser *Scanning* Mikroskopie zeigen, dass nach Blockierung der ERG-Kanäle mit E-4031 ein Kalzium-Einstrom messbar wird, der nicht aus intrazellulären

Quellen stammt (Abb. 5A–C). Der gemessene Kalzium-Einstrom wird mit großer Wahrscheinlichkeit durch spannungsgesteuerte Kalziumkanäle vom L-Typ vermittelt. Er ist als Sekundärantwort auf Blockierung der ERG-Kanäle und anschließende Membrandepolarisation zu verstehen. Kalzium ist für die Insulin-Liberation unverzichtbar. Daraus folgt eine enge Kopplung der ERG-Kanalfunktion an die Insulinsekretion, die von Veränderungen des Membranpotentials mitbestimmt wird. Elektrophysiologische Untersuchungen (*voltage clamp*) bei Klemmspannungen zwischen  $-80$  und  $0$  mV (Abb. 5D, oben) zeigen eine Ver-

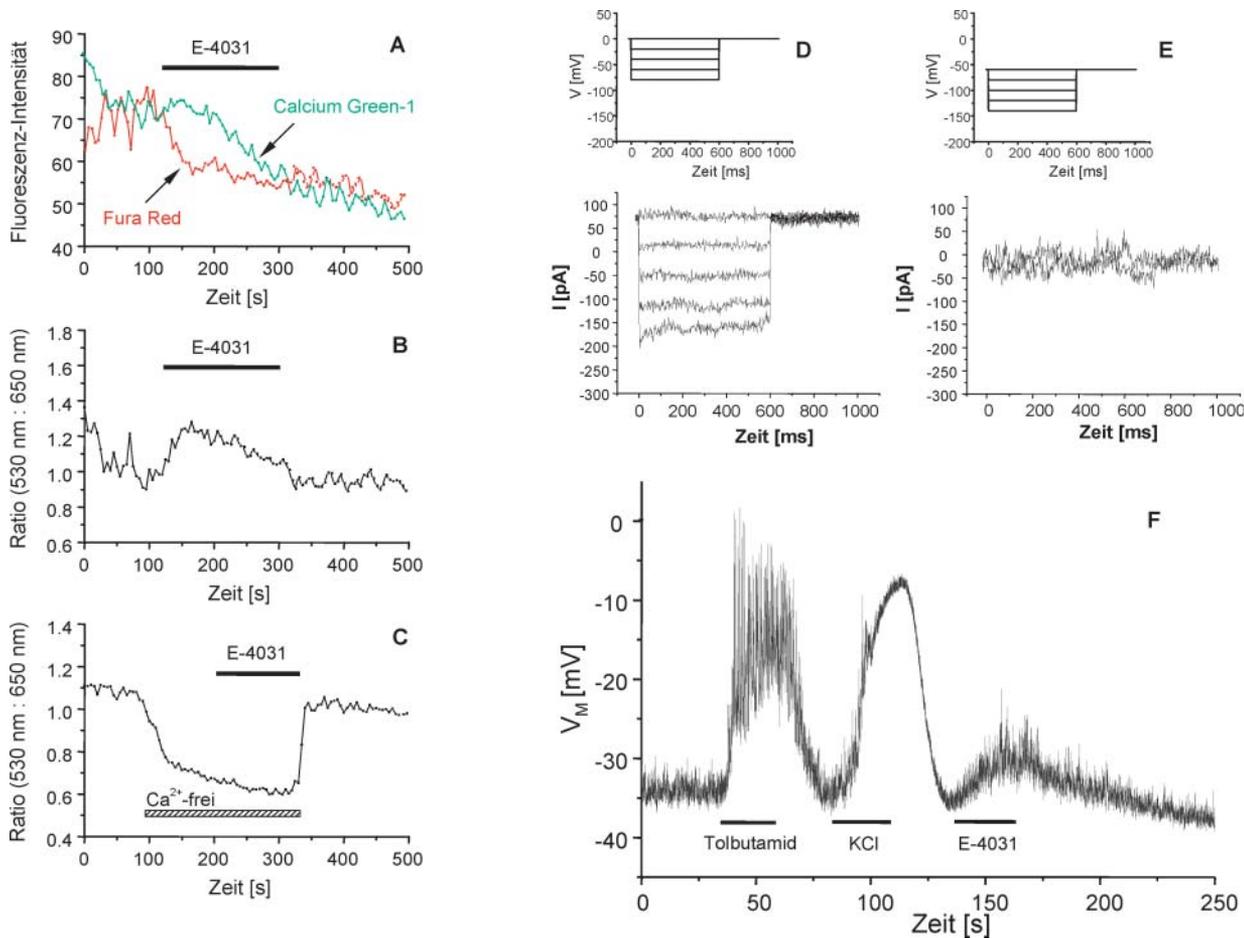


Abb. 5: Versuche zum Nachweis der Funktion vom ERG-Kalium-Kanal durch Kalzium-*Imaging* und elektrophysiologische Untersuchungen nach Kanalblockierung mit E-4031 an INS1-Zellen. (A) Darstellung des Kalzium-*Imaging*-Verfahrens unter Einbeziehung der Fluoreszenzfarbstoffe Fura Red und Calcium Green-1. Das Verhältnis der Fluoreszenzen beider Farbstoffe definiert Kurven, die die zellinterne Kalziumkonzentration bzw. deren Veränderungen beschreiben. (B) Perfusion mit E-4031 ( $1 \mu\text{M}$ ) zur Blockierung von ERG-Kalium-Kanälen führt sekundär zu einer Erhöhung der gemessenen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration in der Zelle. (C) Bei Entzug des extrazellulären Kalziums in der Perifusionslösung tritt kein vergleichbarer Effekt auf. Das bedeutet, dass die in (B) gezeigte, unter E-4031 gemessene Erhöhung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration durch Einstrom aus dem extrazellulären Raum zustande kommt. *Voltage clamp*-Versuche zum Nachweis der ERG-Kanalfunktion in der INS1-Zelle zeigen, dass bei Klemmspannungen zwischen  $-80$  und  $0$  mV (D, oben) Membranströme gemessen werden, die mit E-4031 ( $1 \mu\text{M}$ ) blockierbar sind (D, unten). In diesem Spannungsbereich öffnen ERG-Kanäle. Bei Spannungen zwischen  $-60$  und  $-140$  mV hingegen (E, oben), bei denen die ERG-Kanäle inaktiviert sind, zeigt sich kein Einfluss des Blockers E-4031 (E, unten). Dargestellt werden Differenzwerte zwischen Messungen mit und ohne (Kontrolle) E-4031. (F) Die Messung des Membran-Potentialverlaufs (*current clamp*) zeigt, dass die INS1-Zelle über Tolbutamid-sensitive ( $\text{K}_{\text{ATP}}$ ) Kanäle verfügt ( $10 \mu\text{M}$ ) und auch durch KCl ( $40 \text{ mM}$ ) depolarisierbar ist. Sie lässt sich zudem durch den ERG-Kanalblocker E-4031 ( $1 \mu\text{M}$ ) schwach depolarisieren, was auf das Vorhandensein funktionell aktiver ERG-Kanäle in der INS1-Zelle hinweist.

ringerung des Membranstromes bei Perfusion mit dem ERG-Kanalblocker E-4031 (Abb. 5D, unten). Bei Klemmspannungen außerhalb des aktiven Bereiches der ERG-Kanäle (Abb. 5E, oben) treten keine durch E-4031 beeinflussbaren Membranströme auf (Abb. 5E, unten). *Current clamp* Messungen des Membranpotentials von INS1-Zellen belegen sowohl Einflüsse des ERG-Kanalblockers E-4031 als auch von Tolbutamid und KCl (Abb. 5F). Eigene perfusionstechnische Untersuchungen an INS1-Zellen zeigen, dass nach Blockierung des ERG-Kanals mit dem Methan-Sulfonanilid E-4031 oder dem Proteintoxin-Blocker rBeKm-1 erhöhte Insulinsekretion gemessen werden konnte. Die kombinierte Gabe von E-4031 und Arginin ließ in vergleichbarer Weise zu den Ergebnissen von Rosati und Mitarb. (2000) summative Effekte erkennen (Abb. 6).

Zusammenfassend bestätigen die Expressions-Untersuchungen (Abb. 1, 2 und 4) sowie die immunhistochemischen (Abb. 3) und elektrophysiologischen (Abb. 5)

Befunde in Einheit mit Ergebnissen funktioneller, perfusionstechnischer Untersuchungen (nähere Angaben siehe Abb. 6A–D) mittels spezifischer pharmakologischer Blocker (E-4031 bzw. rBeKm-1) an stimulierten (KCl, Glukose oder Arginin) INS1-Zellen die funktionelle Bedeutung der ERG-Kalium-Kanal-Familie für die LANGERHANSsche Insel. Die Ergebnisse belegen, dass die berücksichtigten Kaliumkanäle Teil eines Komplexes sein könnten, der für die circadian-rhythmische Steuerung der Insulinsekretion verantwortlich ist. Es ist vorstellbar, dass ERG-Kanäle als „output“-Faktoren des peripheren Oszillators in der Insel zu verstehen sind, die über circadiane Veränderungen des zellulären Kanalbesatzes sowohl qualitativ (durch temporäre Hetero-Tetramerbildung) als auch quantitativ (durch ihre Besetzung der Zell-Membran) die Insulinsekretion steuern.

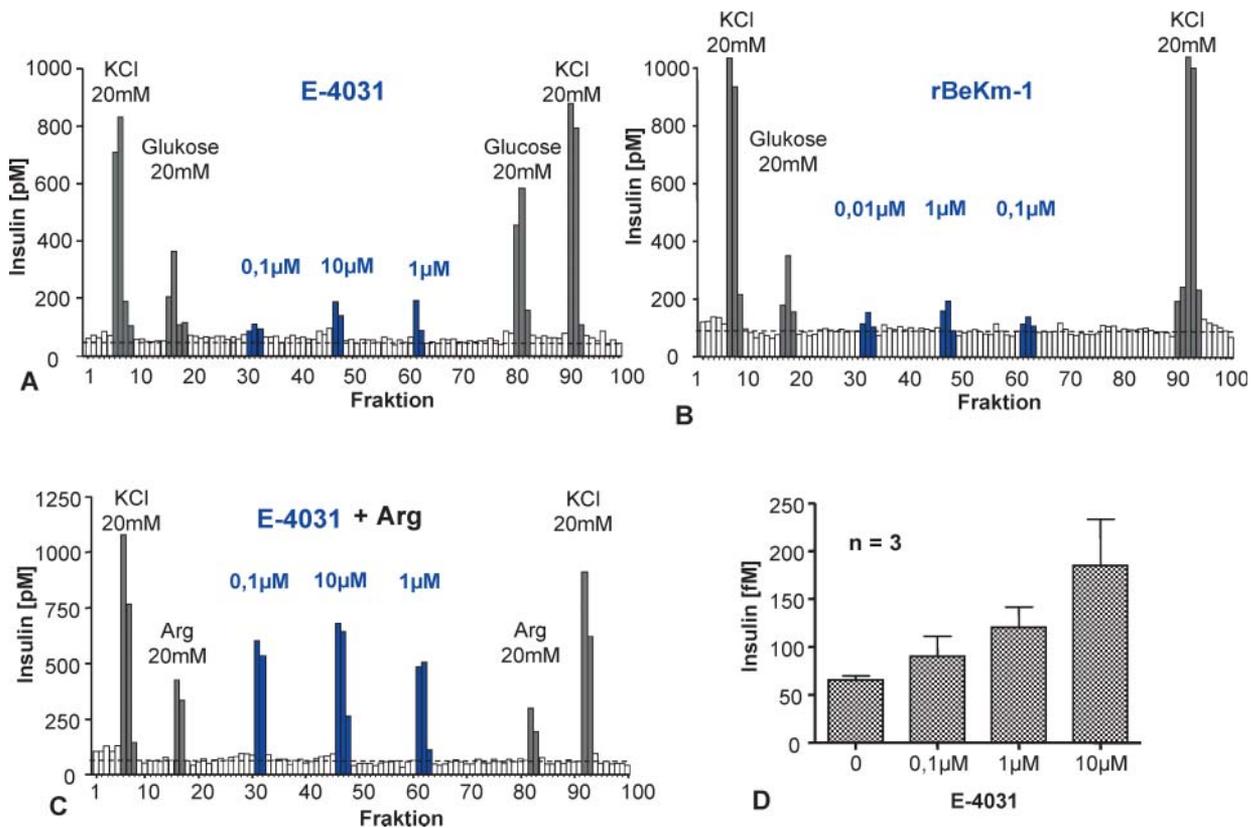


Abb. 6: Perfusionsexperimente zum Nachweis von ERG-Kanal-Funktionen für die Insulinsekretion in INS1-Zellen. Dargestellt sind Insulinkonzentrationen der Superfusate nach unterschiedlichen Stimulationen. (A) Stimulationen mit 20 mM KCl oder mit 20 mM Glukose führen zu starker Erhöhung der basalen Insulinsekretion. Der Einsatz des ERG-spezifischen Kanalblockers E-4031 in unterschiedlichen Konzentrationen (0,1, 1 sowie 10 μM) steigert die Insulinsekretion vergleichsweise geringer. Erneute KCl- und Glukose-Stimulation der Zellen am Ende desselben Experimentes übertrifft die Insulinsekretion zu Versuchsbeginn und bestätigt die Vitalität der Zellen über den gesamten Versuchsablauf. (B) Auch Blockierung mittels rBeKm-1 führt zu einer schwachen, aber messbaren Erhöhung der Sekretionsleistung der INS1-Zellen. (C) Ko-Stimulation von INS1-Zellen mit Arginin und E-4031 zeigt stärkere Insulinsekretion als Stimulation mit Arginin allein. (D) Die Spezifik der E-4031-Effekte wird durch Dosis-Wirkungsbeziehungen zwischen 0,1 μM und 10 μM unterstrichen.

### Danksagung

Die hier vorgestellten Ergebnisse sind unter Mitarbeit von Dr. Ivonne Bazwinsky (Immunhistochemie), Dr. Albrecht Klemenz (Elektrophysiologie), Dr. Sabine Wolgast (konfokalmikroskopische Kalzium-Bestimmungen) sowie Candy Rothgänger (technische Assistenz) zustande gekommen. Finanziell wurden die Untersuchungen durch den Bund und das Land Sachsen-Anhalt im Rahmen des Projektes „Zeitstrukturen endokriner Systeme“ der Sächsischen Akademie der Wissenschaften zu Leipzig unterstützt.

Die Abbildungen werden mit freundlicher Erlaubnis des Verlagshauses Birkhäuser AG (Basel) wiedergegeben und sind, zum Teil in veränderter Form, der Publikation: Mühlbauer et al. (2007) *Cell Mol Life Sci* 64:768–780 entnommen.

### Literatur

- Allaman-Pillet N, Roduit R, Oberson A, Abdelli S, Ruiz J, Beckmann JS, Schorderet DF, Bonny C. 2004. Circadian regulation of islet genes involved in insulin production and secretion. *Mol Cell Endocrinol* 226:59–66.
- Ashcroft FM, Harrison DE, Ashcroft SJ. 1984. Glucose induces closure of single potassium channels in isolated rat pancreatic beta-cells. *Nature* 312:446–448.
- Ashfield R, Ashcroft SJ. 1998. Cloning of the promoters for the beta-cell ATP-sensitive K-channel subunits Kir6.2 and SUR1. *Diabetes* 47:1274–1280.
- Bach AG, Wolgast S, Mühlbauer E, Peschke E. 2005. Melatonin stimulates inositol-1,4,5-trisphosphate and Ca<sup>2+</sup> release from INS1 insulinoma cells. *J Pineal Res* 39:316–323.
- Balsalobre A, Damiola F, Schibler U. 1998. A serum shock induces circadian gene expression in mammalian tissue culture cells. *Cell* 93:929–937.
- Bauer CK, Wulfen I, Schafer R, Glassmeier G, Wimmers S, Flitsch J, Ludecke DK, Schwarz JR. 2003. HERG K(+) currents in human prolactin-secreting adenoma cells. *Pflugers Arch* 445:589–600.
- Boden G, Chen X, Polansky M. 1999. Disruption of circadian insulin secretion is associated with reduced glucose uptake in first-degree relatives of patients with type 2 diabetes. *Diabetes* 48:2182–2188.
- Boden G, Chen X, Urbain JL. 1996a. Evidence for a circadian rhythm of insulin sensitivity in patients with NIDDM caused by cyclic changes in hepatic glucose production. *Diabetes* 45:1044–1050.
- Boden G, Ruiz J, Urbain JL, Chen X. 1996b. Evidence for a circadian rhythm of insulin secretion. *Am J Physiol* 271:246–252.
- Chen W, Baler R. 2000. The rat arylalkylamine N-acetyltransferase E-box: differential use in a master vs. a slave oscillator. *Brain Res Mol Brain Res* 81:43–50.
- Chong NW, Bernard M, Klein DC. 2000. Characterization of the chicken serotonin N-acetyltransferase gene. Activation via clock gene heterodimer/E box interaction. *J Biol Chem* 275:32991–32998.
- Damiola F, Le Minh N, Preitner N, Kornmann B, Fleury-Olela F, Schibler U. 2000. Restricted feeding uncouples circadian oscillators in peripheral tissues from the central pacemaker in the suprachiasmatic nucleus. *Genes Dev* 14:2950–2961.
- Delattre E, Cipolla-Neto J, Boschero AC. 1999. Diurnal variations in insulin secretion and K<sup>+</sup> permeability in isolated rat islets. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 26:505–510.
- Diaz-Munoz M, Vazquez-Martinez O, Aguilar-Roblero R, Escobar C. 2000. Anticipatory changes in liver metabolism and entrainment of insulin, Glukagon, and corticosterone in food-restricted rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 279:2048–2056.
- Gagliardino JJ, Hernandez RE, Rebolledo OR. 1984. Chronobiological aspects of blood glucose regulation: a new scope for the study of diabetes mellitus. *Chronobiologia*. 11:357–379.
- Hernandez-Sanchez C, Ito Y, Ferrer J, Reitman M, LeRoith D. 1999. Characterization of the mouse sulfonylurea receptor 1 promoter and its regulation. *J Biol Chem* 274:18261–18270.
- Itri JN, Michel S, Vansteensel MJ, Meijer JH, Colwell CS. 2005. Fast delayed rectifier potassium current is required for circadian neural activity. *Nat Neurosci* 8:650–656.
- Jin X, Shearman LP, Weaver DR, Zylka MJ, de Vries GJ, Reppert SM. 1999. A molecular mechanism regulating rhythmic output from the suprachiasmatic circadian clock. *Cell* 96:57–68.
- Jurkiewicz NK, Sanguinetti MC. 1993. Rate-dependent prolongation of cardiac action potentials by a methanesulfonanilide class III antiarrhythmic agent. Specific block of rapidly activating delayed rectifier K<sup>+</sup> current by dofetilide. *Circ Res* 72:75–83.
- Lees-Miller JP, Guo J, Somers JR, Roach DE, Sheldon RS, Rancourt DE, Duff HJ. 2003. Selective knockout of mouse ERG1 B potassium channel eliminates I(Kr) in adult ventricular myocytes and elicits episodes of abrupt sinus bradycardia. *Mol Cell Biol* 23:1856–1862.
- Lees-Miller JP, Kondo C, Wang L, Duff HJ. 1997. Electrophysiological characterization of an alternatively processed ERG K<sup>+</sup> channel in mouse and human hearts. *Circ Res* 81:719–726.
- Mitcheson JS, Chen J, Lin M, Culbertson C, Sanguinetti MC. 2000. A structural basis for drug-induced long QT syndrome. *Proc Natl Acad Sci USA* 97:12329–12333.
- Mühlbauer E, Peschke E. 2007. Evidence for the expression of both the MT1- and in addition, the MT2-melatonin receptor, in the rat pancreas, islet and  $\beta$ -cell. Letter to the editor. *J Pineal Res* 42:105–106.
- Mühlbauer E, Wolgast S, Finckh U, Peschke D, Peschke E. 2004. Indication of circadian oscillations in the rat pancreas. *FEBS Lett* 564:91–96.
- Munoz E, Baler R. 2003. The circadian E-box: when perfect is not good enough. *Chronobiol Int*. 20:371–388.
- Munoz E, Brewer M, Baler R. 2002. Circadian Transcription. Thinking outside the E-Box. *J Biol Chem* 277:36009–36017.
- Oishi K, Shirai H, Ishida N. 2005. CLOCK is involved in the circadian transactivation of peroxisome-proliferator-activated receptor alpha (PPARalpha) in mice. *Biochem J* 386:575–581.
- Overholt JL, Ficker E, Yang T, Shams H, Bright GR, Prabhakar NR. 2000. HERG-Like potassium current regulates the resting membrane potential in glomus cells of the rabbit carotid body. *J Neurophysiol* 83:1150–1157.
- Panda S, Antoch MP, Miller BH, Su AI, Schook AB, Straume M, Schultz PG, Kay SA, Takahashi JS, Hogenesch JB. 2002. Coordinated transcription of key pathways in the mouse by the circadian clock. *Cell* 109:307–320.
- Pellequer JL, Brudler R, Getzoff ED. 1999. Biological sensors: More than one way to sense oxygen. *Curr Biol* 9:416–418.

- Peschke E, Bach AG, Mühlbauer E. 2006. 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, Mühlbauer E, Musshoff U, Csernus VJ, Chankiewicz E, Peschke D. 2002. Receptor (MT1) mediated influence of melatonin on cAMP concentration and insulin secretion of rat insulinoma cells INS-1. *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, 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.
- Picinato MC, Haber EP, Carpinelli AR, Cipolla-Neto J. 2002. Daily rhythm of glucose-induced insulin secretion by isolated islets from intact and pinealectomized rat. *J Pineal Res* 33:172–177.
- Pond AL, Scheve BK, Benedict AT, Petrecca K, Van Wagoner DR, Shrier A, Nerbonne JM. 2000. Expression of distinct ERG proteins in rat, mouse, and human heart. Relation to functional I(Kr) channels. *J Biol Chem* 275:5997–6006.
- Ripperger JA. 2006. Mapping of binding regions for the circadian regulators BMAL1 and CLOCK within the mouse *Rev-erb-alpha* gene. *Chronobiol Int* 23:135–142.
- Rosati B, Marchetti P, Crociani O, Lecchi M, Lupi R, Arcangeli A, Olivotto M, Wanke E. 2000. Glucose- and arginine-induced insulin secretion by human pancreatic beta-cells: the role of HERG K(+) channels in firing and release. *FASEB J* 14:2601–2610.
- Sanguinetti MC, Curran ME, Spector PS, Keating MT. 1996. Spectrum of HERG K+-channel dysfunction in an inherited cardiac arrhythmia. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:2208–2212.
- Sanguinetti MC, Jiang C, Curran ME, Keating MT. 1995. A mechanistic link between an inherited and an acquired cardiac arrhythmia: HERG encodes the IKr potassium channel. *Cell* 81:299–307.
- Schwarz JR., Bauer CK. 2004. Functions of erg K+ channels in excitable cells. *J Cell Mol Med* 8:22–30.
- Shi W, Wymore RS, Wang HS, Pan Z, Cohen IS, McKinnon D, Dixon JE. 1997 Identification of two nervous system-specific members of the erg potassium channel gene family. *J Neurosci* 17:9423–9432.
- Storch KF, Lipan O, Leykin I, Viswanathan N, Davis FC, Wong WH, Weitz CJ. 2002. Extensive and divergent circadian gene expression in liver and heart. *Nature* 417:78–83.
- Ueda HR, Hayashi S, Chen W, Sano M, Machida M, Shigeyoshi Y, Iino M, Hashimoto S. 2005. System-level identification of transcriptional circuits underlying mammalian circadian clocks. *Nat Genet* 37:187–192.
- Wimmers S, Bauer CK, Schwarz JR. 2002. Biophysical properties of heteromultimeric erg K+ channels. *Pflugers Arch* 445:423–430.
- Wulfen I, Hauber HP, Schiemann D, Bauer CK, Schwarz JR. 2000. Expression of mRNA for voltage-dependent and inward-rectifying K channels in GH3/B6 cells and rat pituitary. *J Neuroendocrinol* 12:263–272.
- Yamashita T, Sekiguchi A, Iwasaki YK, Sagara K, Iinuma H, Hatano S, Fu LT, Watanabe H. 2003. Circadian variation of cardiac K+ channel gene expression. *Circulation* 107:1917–1922.
- Yan L, Figueroa DJ, Austin CP, Liu Y, Bugianesi RM, Slaughter RS, Kaczorowski GJ, Kohler MG. 2004. Expression of voltage-gated potassium channels in human and rhesus pancreatic islets. *Diabetes* 53:597–607.
- Yoo SH, Ko CH, Lowrey PL, Buhr ED, Song EJ, Chang S, Yoo OJ, Yamazaki S, Lee C, Takahashi JS. 2005. A noncanonical E-box enhancer drives mouse *Period2* circadian oscillations in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 102:2608–2013.
- Yoo SH, Yamazaki S, Lowrey PL, Shimomura K, Ko CH, Buhr ED, Siepka SM, Hong HK, Oh WJ, Yoo OJ, Menaker M, Takahashi JS. 2004. *PERIOD2::LUCIFERASE* real-time reporting of circadian dynamics reveals persistent circadian oscillations in mouse peripheral tissues. *Proc Natl Acad Sci USA* 101:5339–5346.
- Zhang Y, Han H, Wang J, Wang H, Yang B, Wang Z. 2003. Impairment of human ether-a-go-go-related gene (HERG) K+ channel function by hypoglycemia and hyperglycemia. Similar phenotypes but different mechanisms. *J Biol Chem* 278:10417–10426.
- Zhang J, Kaasik K, Blackburn MR, Lee CC. 2006. Constant darkness is a circadian metabolic signal in mammals. *Nature* 439:340–343.