

Funktionelle Beziehungen zwischen Melatonin und Insulin – Untersuchungsergebnisse an stoffwechselgesunden und diabetischen Versuchstieren und Patienten

Einleitung und Rückblick

Im Jahre 2003 konnte eine Übersicht „Zum Einfluss von Melatonin auf Insulinsekretion, Signaltransduktion und Sekretionsrhythmen pankreatischer β -Zellen *in vitro*“ (Peschke, 2003a) in einem ersten Endokrinologieband vorgelegt werden, erschienen als Band 60/1 in der Reihe: „Abhandlungen der Sächsischen Akademie der Wissenschaften zu Leipzig“ (Peschke, 2003b). Dieser Übersichtsartikel führte in die Thematik ein und analysierte die zum Zeitpunkt vorliegende Literatur. Im Zentrum der Übersicht standen die Darstellung eigener Untersuchungsergebnisse und eine kritische Auseinandersetzung mit Befunden aus der umfassend zitierten, auch älteren Literatur. Die systematische Aufarbeitung von fremden und eigenen Befunden zum Einfluss von Melatonin auf die Insulinsekretion, eingeschlossen die Beschreibung von Signaltransduktionsmechanismen und Sekretionsrhythmik, war aus zweierlei Gründen zwingend. Zum einen waren die zurückliegenden Ergebnisse äußerst widersprüchlich und inkonsistent, zum anderen waren durch die Etablierung und Nutzung neuer Techniken, wie beispielsweise molekularbiologischer Untersuchungen und der Superfusionstechnik, *in vitro*-Untersuchungen möglich. Zusammengefasst wurden bereits in der zurückliegenden Übersichtsarbeit und einer zusätzlichen Darstellung in den Sitzungsberichten der Sächsischen Akademie der Wissenschaften (Peschke, 2003c) Ergebnisse und Einsichten, die in hohem Maße zu einem Verständnis des Einflusses von Melatonin auf die Insulinsekretion beitragen. Dennoch muss einschränkend angemerkt werden, dass die zurückliegenden Aussagen vorwiegend auf *in vitro*-Befunden beruhten. Im Rahmen des eigenen Akademie-Langzeitprojektes „Zeitstrukturen endokriner Systeme“ (Peschke, 2001) war das ganz bewusst gewollt. Zunächst sollten morphologische, zellphysiologische und molekularbiologische Einzelbefunde an immortalisierten Ratten-Insulinomazellen (INS1) und pankreatischen Inseln im *in vitro*-Experiment mit dem Ziel untersucht werden, die gewonnenen Befunde in einem zweiten Schritt hinsichtlich ihrer Relevanz für das Versuchstier und schließlich den Menschen zu überprüfen. Diesem Anliegen soll die hier vorliegende 2. Übersichtsdarstellung dienen. In ihr soll im Rückgriff auf bereits dargestellte Befunde deren Übertragbarkeit auf klinische Fragestellungen überprüft werden. Von besonderer Bedeutung ist

dabei die Erweiterung des Themas insofern, als die Epiphysis cerebri mit ihrer Melatoninsynthese unter Berücksichtigung diabetischer Stoffwechsellage mit einbezogen wird. Damit wird das Ziel verfolgt, dem Verständnis der gegenseitigen Beeinflussung von Insulin und Melatonin gerecht zu werden und entsprechende Interaktionen besser zu charakterisieren. Dass sich in diesem Zusammenhang teilweise auch neue Gesichtspunkte ergeben haben, die für die Untersuchungen zusätzliche Aspekte boten und Erweiterungen von Fragestellungen nötig machten, ist ganz natürlich und nachvollziehbar. Zusammengefasst sollen in der vorliegenden zweiten Übersicht Fragen der Rezeptorausstattung von pankreatischer Insel und Epiphyse, der umfassenderen Charakterisierung von Signaltransduktionswegen, der Interaktionen zwischen Insulin- und Melatoninsekretion sowie – besonders wichtig – der Übertragbarkeit von Befunden auf den Menschen unter Einbeziehung menschlichen Operationsmaterials behandelt werden. Es ist nachvollziehbar, dass nur nach Beantragung und Genehmigung entsprechender Ethikanträge diese Untersuchungen möglich wurden.

Keine Berücksichtigung finden in der vorliegenden Zusammenfassung die bereits im ersten Band erschöpfend zitierte Literatur sowie Fragen zur circadianen Insulinsekretion *in vitro*, die auf umfangreichen superfusionstechnischen Analysen beruhten. Das gilt ebenso für weiterführende molekularbiologische Untersuchungen zur möglichen Generierung und Steuerung von Rhythmen der Insulinsekretion in der pankreatischen β -Zelle durch Uhrgene, die ebenfalls publiziert (Mühlbauer et al., 2004) und im II. Endokrinologieband (Peschke, 2005) behandelt wurden (Mühlbauer und Peschke, 2005: „Uhrgene und ihre Bedeutung für die pankreatische Insel“). Ferner wird der Themenkomplex zur Radikalfangenden und antioxidativen Bedeutung des Melatonins (Reiter et al., 2002; Poeggeler, 2005) ausgeblendet, weil er im ersten Endokrinologieband (Brömme und Peschke, 2003: „Molekulare Mechanismen der Alloxan-Toxizität sowie die radikalfangende und antidiabetogene Bedeutung von Melatonin“ und Reiter, 2003: „*Melatonin: its role in limiting macromolecular toxicity due to partially reduced oxygen metabolites*“) sowie ferner im II. Endokrinologieband (Hardeland, 2005: „Melatonin, eine ubiquitäre Substanz. Vorkommen, Wirkungen und Metabolismus außerhalb seiner klassischen Rolle“) umfassend dargestellt wurde.

Aktuelle Befunde zur Melatoninrezeptor-Ausstattung der pankreatischen β -Zelle

Die Klonierung und Charakterisierung der Melatonin-Rezeptoren erfolgte durch Reppert und Mitarbeiter (Reppert et al., 1994, 1995a,b). Zurückliegende eigene Arbeiten (Peschke et al., 2000, 2002; Peschke, 2003a,c, 2004) sowie Publikationen anderer Autoren (Kemp et al., 2002) machten deutlich, dass die pankreatische β -Zelle Melatonin-Rezeptoren vom Typ MT1 (früher MT1a) aufweist und dass Melatonin-Applikation zu einer Senkung der Insulinsekretion führt (Peschke et al., 2002; Picinato et al., 2002b). Anhaltspunkte für die Existenz von MT2(MT1b)-Rezeptoren auf der β -Zelle konnten unter Nutzung molekularbiologischer *reverse transcription polymerase chain reaction*(RT-PCR)-Untersuchungen nicht gefunden werden. Der beschriebene Mechanismus der Senkung der Insulinsekretion beruht auf einer Bindung der membranständigen MT1-Rezeptoren an – auch andernorts beschriebene – hochaffine Pertussistoxin-sensitive inhibitorische GTP-bindende (Gi)-Proteine. Die weitere Signaltransduktion erfolgt über das Adenylatcyclase-cAMP-System. Im Ergebnis konnte zusammenfassend festgestellt werden, dass die Insulinsekretion nach Melatonin-Applikation sowohl in pharmakologischen als auch physiologischen Dosierungen gesenkt wurde. Dosis-Wirkungs-Beziehungen sprachen für die Spezifik der Reaktion. Diesen Befunden lagen zahlreiche Einzeluntersuchungen zugrunde, vor allem aber ein *Primer*-Design, das sich von derzeitig favorisierten Vorgehensweisen unterschied.

Im Folgenden werden nun Befunde vorgestellt, die unsere Kenntnisse erweitern und auch den Nachweis von MT2(MT1b)-Rezeptoren ermöglichen. Die Entwicklungen der jüngeren Zeit ermöglichen die „Echtzeit (*real-time*)“-Detektion naszierender DNA im Zuge der Nutzung der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) unter gleichzeitigem Einbau des sehr sensitiven interkalierenden Fluoreszenzfarbstoffes „Eva Green“. Die Laser-angeregte Fluoreszenz-Emission kann durch einen Photomultiplier in Echtzeit aufgezeichnet und quantitativ bestimmt werden. Damit erhöht sich die Sensitivität des Systems um ein Vielfaches. Unter Verwendung dieser Technik (*real-time* RT-PCR) und mit speziell angepassten *Primern* gelang es, Melatonin-Rezeptor 2(MT2)-spezifische Transkripte sowohl in der pankreatischen Insel der Ratte als auch in einer immortalisierten β -Zelllinie der Ratte (INS1) nachzuweisen.

Die genutzten Basen-Sequenzen für den *Primer* zum MT1-Nachweis waren: CAACCTGCAAACCGGAACCT vorwärts und GGAAAACCACCAGGGCAAT rückwärts.

Für den *Primer* zum MT2-Rezeptor-Nachweis wurden die Basen-Sequenzen: CATCCACTTCCTCCTTCCAA vorwärts und TATGGCGAAAACCACAAACA rückwärts genutzt. Die Basen-Sequenzen der β -Actin-*Primer* wurden zurückliegend publiziert (Mühlbauer et al., 2004;

Mühlbauer und Peschke, 2005). Beide *MT-Primer*-Sets amplifizierten den, dem Exon 2 entstammenden, Anteil der beiden Transkripte. Im Ergebnis gelang es, sowohl MT1- als auch MT2-mRNA entstammende PCR-Produkte zu amplifizieren (Abb. 1A). Gelelektrophorese-Separation der DNA ergab spezifische Banden: 101 bp für das MT1- und 169 bp für das MT2-Amplikon. Durch Spaltung mit zwei Amplikon-spezifischen Restriktionsenzymen an bekannten Schnittstellen konnte nachfolgend die Spezifität des MT2-PCR-Produktes bestätigt werden. Nach Behandlung mit dem Restriktionsenzym Eco 311 ließen sich im analytischen Agarose-Gel Fragmente mit den vorhergesagten Molekülgrößen von 109 bp und 66 bp nachweisen (Abb. 1B); darüber hinaus auch die nach Behandlung mit dem Restriktionsenzym BfiI erwarteten Fragmentgrößen (Nachweis eines 113 bp Produktes). Die quantitative Auswertung dieser PCR-Experimente zeigte allerdings, dass die Expressionshöhe auf mRNA-Ebene für den MT2-Rezeptor stark hinter derjenigen der Melatoninrezeptor-Isoform 1 (MT1-Rezeptor) zurückbleibt, nämlich um ein 86faches (Abb. 1C+D). Dieser Umstand erklärt, warum ältere Untersuchungen der eigenen und auch anderer Arbeitsgruppen mit konventioneller PCR-Technik zu keinem Ergebnis geführt hatten (Mühlbauer und Peschke, 2007).

Nachdem an Pankreas, isolierten pankreatischen Inseln und Insulinomazellen INS1 von Ratten der Nachweis des MT2-Rezeptors erbracht worden war, stellte sich die wichtige Frage der Übertragbarkeit des Ergebnisses auf humanes Material. Im Ergebnis konnte mittels quantitativer *real-time* RT-PCR- und zusätzlicher immunhistochemischer Untersuchungen zweifelsfrei der Nachweis des MT2-Rezeptors auch an menschlichem Pankreasgewebe (Operationsmaterial) erbracht und somit die Übertragbarkeit der Rattenbefunde auf den Menschen belegt werden (Abb. 2A). Die inzwischen publizierten Ergebnisse machen deutlich, dass beide Rezeptortypen auf menschlichem Pankreasgewebe nachweisbar sind, dass jedoch die mRNA des MT2-Rezeptors sehr viel schwächer exprimiert wird (Abb. 2B; Peschke et al., 2007). Da in die Untersuchungen sowohl Pankreasgewebe von stoffwechselgesunden als auch von Typ2-diabetischen Patienten einbezogen wurde, konnte mittels quantitativer RT-PCR zusätzlich festgestellt werden, dass die Expressionshöhe sowohl der MT1- als auch MT2-Rezeptor-mRNA bei Diabetikern gegenüber stoffwechselgesunden Patienten stark erhöht ist (Abb. 2C). Auch die immunhistochemischen Ergebnisse stützen diese Aussage (Abb. 3). Weiterführende Untersuchungen werden zu klären haben, ob sich den unterschiedlichen Melatonin-Rezeptoren spezielle Funktionszusammenhänge zuordnen lassen. Speziell interessiert dabei, ob die Mitteilungen anderer Autoren, dass durch Melatonin hervorgerufenen *phase shifting* (Peschke und Peschke, 1998; Picinato et al., 2002a) ausnahmslos über MT2-Rezeptorsignale vermittelt wird (Liu et al., 1997; Jin et al., 2003), auch für die pankreatische

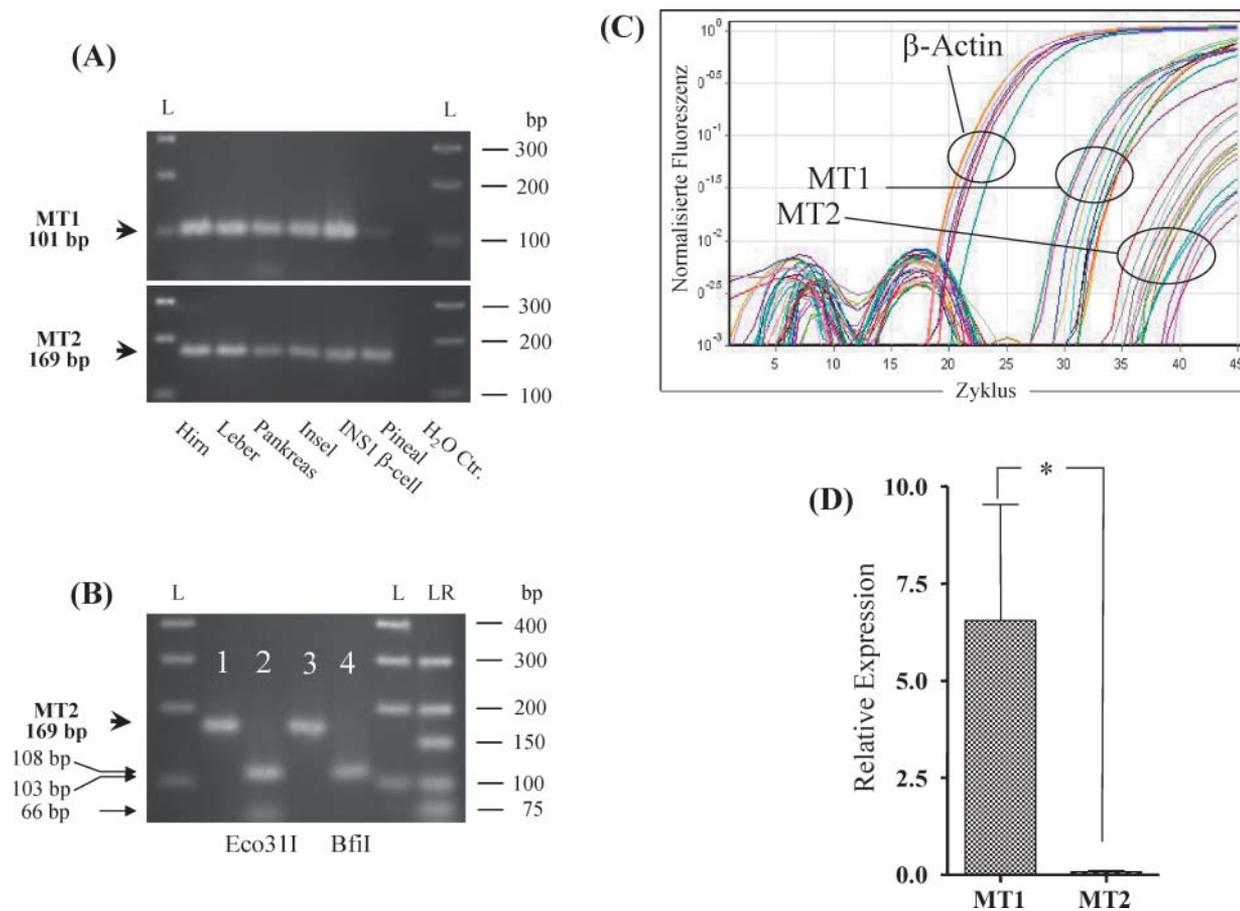


Abb. 1: Reverse Transkriptions-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR-Analyse) der Melatoninrezeptor-Isoformen MT1 und MT2 in pankreatischem Gewebe sowie in Kontrollgeweben. (A) Gelelektrophoretische Trennung der MT1- und MT2-mRNA-abhängigen PCR-Produkte aus verschiedenen Geweben der Ratte. (B) Untersuchung auf MT2-Rezeptor-Produktspezifität durch Restriktionsenzym-Analyse des Amplikons mittels der Enzyme Eco31I und BfiI sowie Vergleich der Produkte mit einem Molekulargrößenstandard (L = 100 bp-Leiter, LR = Leiter im Niedermolekularbereich). (B1) 169 bp = MT2-Amplikon, (B2) Produkte der Eco31I-Spaltung von 103 bp- bzw. 66 bp-Größe, (B3) MT2-Amplikon, (B4) 108 bp-Produkt der BfiI-Spaltung. Ein weiterhin entstehendes kleines 61 bp-Fragment ist nicht dargestellt. (C) Ergebnis eines *real-time* RT-PCR-Laufes, welcher die relative Fluoreszenz-Akkumulation von β -Aktin-, MT1- und MT2-PCR-Produkten, ausgehend von cDNA der Ratteninsel, darstellt. (D) Darstellung eines quantitativen Vergleichs der Expression von MT1- mit MT2-mRNA in der Ratteninsel unter Verwendung der $\Delta\Delta$ -Ct-Methode und der Expressionshöhe von β -Aktin-mRNA. Die vier zur Analyse verwendeten mRNA-Extrakte der pankreatischen Insel belegen, verglichen mit dem MT1-Rezeptor, ein signifikant niedrigeres Expressionsniveau des MT2-Rezeptors (das Balkendiagramm repräsentiert Mittelwerte \pm SEM, $n = 4$, $P < 0,05$, H₂O Ctr. = PCR-Negativkontrolle; Mühlbauer und Peschke, J Pineal Res 2007, 42:105–106).

β -Zelle zutrifft. Entsprechende Aussagen stützen sich unter anderem auf Untersuchungen an neuronalen Zellen des hypothalamischen *Nucleus suprachiasmaticus*, die an MT1- bzw. MT2-Rezeptor *knockout*-Mäusen durchgeführt wurden. Dabei ließen nach Melatonin-Applikation allein MT2-Rezeptor *knockout*-Mäuse ein *phase shifting* vermissen.

Auf Grund seiner Lipophilie vermag Melatonin ungehindert die Zellmembran zu durchdringen (Menéndez-Peláez et al., 1993; Costa et al., 1995). Das hat zurückliegend immer wieder die Frage nach der funktionellen Bedeutung möglicher nucleärer Orphan-Rezeptoren und deren Bedeutung für Melatonin als intrazellulärem Liganden aufgeworfen (Menéndez-Peláez und Reiter, 1993; Rafii-el-

Idrissi et al., 1998; Wang et al., 2003; Gillespie et al., 2004; Jetten, 2004; Kiefer et al., 2005; Kang et al., 2006). Neben den verbreitet nachgewiesenen Kernrezeptoren ROR α , ROR γ und RevErb α wurde der in neuronalem Gewebe vorkommende Kernrezeptor RZR β ausgewählt (Glass, 1994; Carlberg und Wiesenberg, 1995). Ziel war es, die Existenz und gegebenenfalls unterschiedliche Expressionshöhe dieser 4 Kandidaten in menschlichem Pankreasgewebe sowie menschlichen pankreatischen Inseln stoffwechselgesunder und Typ2-diabetischer Patienten zu charakterisieren. Die spezifischen Amplifikationsprodukte konnten mittels Agarose-Gel-Elektrophorese der PCR-Produkte mit 481 bp (ROR α), 305 bp (RZR β), 172 bp (ROR γ) und 101 bp (RevErb α) visualisiert werden

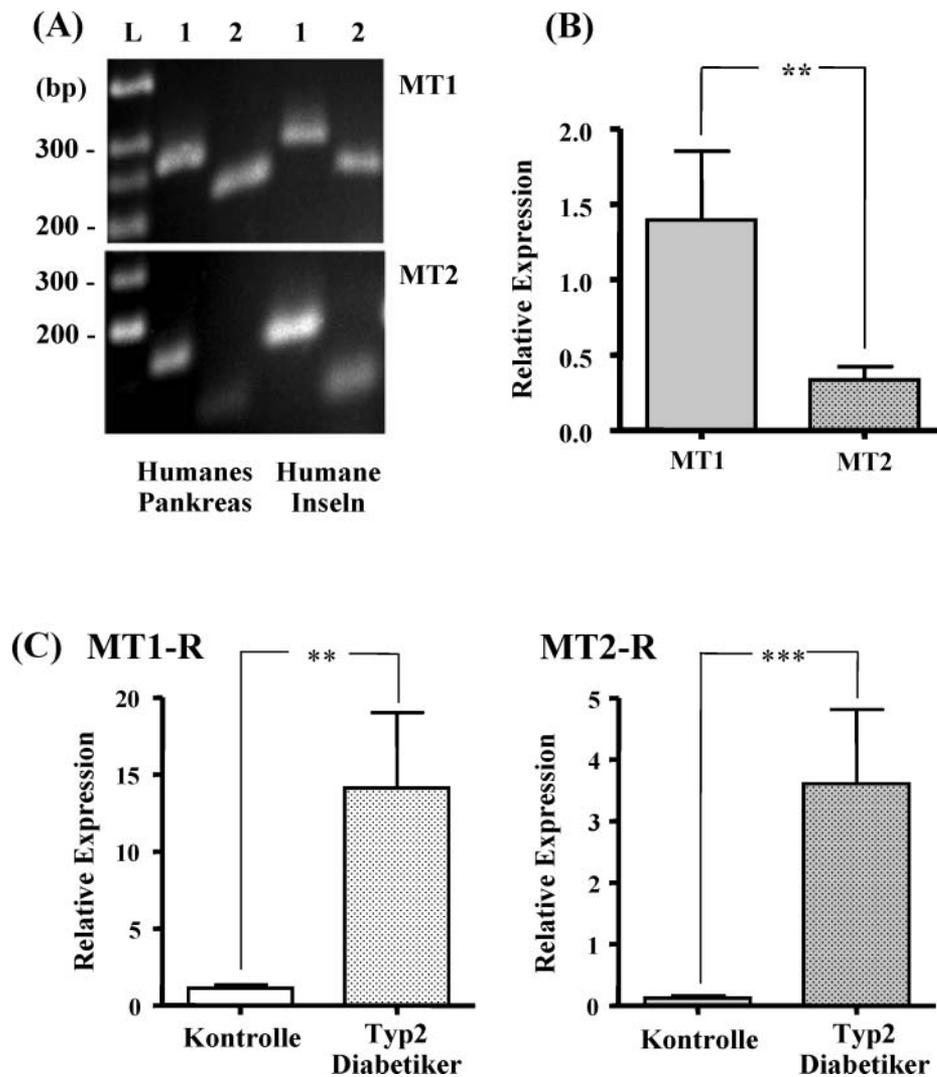


Abb. 2: (A) Gelelektrophoretische Darstellung der Expression von MT1- und MT2-Rezeptor-mRNA in humanem Pankreas sowie humanen LANGERHANSchen Inseln. (A1) Darstellung von MT1- und MT2-PCR-Produkten mittels spezifischer Melatoninrezeptor-Primer. (A2) Visualisierung der erwarteten spezifischen Amplifikationsprodukte und abgeleiteter Restriktionsfragmente nach Inkubation mit den Restriktionsenzymen BclI für den MT1- und AvaII für den MT2-Rezeptor (L: Standard, 100 bp-Leiter). (B) Relative Expression der MT1- und MT2-Rezeptor-mRNA im Pankreas nichtdiabetischer Patienten (n = 8). Die MT1-Rezeptorexpression ist gegenüber der MT2-Expression um den Faktor 4,15 erhöht. Der Expressionsunterschied ist mit einer Wahrscheinlichkeit von $** P < 0,01$ signifikant. (C) Quantitative Erfassung der MT1- und MT2-Melatoninrezeptor-mRNA humanen Pankreasgewebes mittels *real-time* RT-PCR von stoffwechselgesunden (Kontrolle, n = 18) und diabetischen Patienten (Typ2-Diabetiker, n = 7). Die Daten belegen sowohl für den MT1- als auch für den MT2-Rezeptor statistisch signifikante Erhöhungen der mRNA-Expression bei Diabetikern gegenüber stoffwechselgesunden Patienten ($** P < 0,01$, $*** P < 0,001$; Peschke et al., J Pineal Res 2007, 42:350–358).

(Abb. 4A). Im Ergebnis ließen sich Unterschiede in der Expressionshöhe der mRNA zwischen stoffwechselgesunden und Typ2-diabetischen Patienten nachweisen. Dabei zeigten sich – wie bei den Membranrezeptoren – erhöhte Expressionen der mRNA von ROR α und RZR β sowie statistisch signifikante Erhöhungen von ROR γ bei Typ2-diabetischen Patienten. RevErb α wies keine erhöhte Expression bei den diabetischen Patienten auf (Abb. 4B). Es wird nach diesem erstmaligen Nachweis genannter Kernrezeptoren im Pankreas diabetischer und stoffwechselgesunder

Patienten weiteren Untersuchungen vorbehalten bleiben, zur funktionellen Bedeutung dieser Reaktionen Stellung zu beziehen. Aufmerksamkeit verdient insbesondere die Beobachtung, dass die Expression der Melatonin-Membranrezeptoren (MT1 und MT2) ebenso wie die Expression der gegenwärtig noch nicht ausreichend charakterisierten Kernrezeptoren bei Diabetikern in auffälliger Weise erhöht war (Peschke et al., 2007).

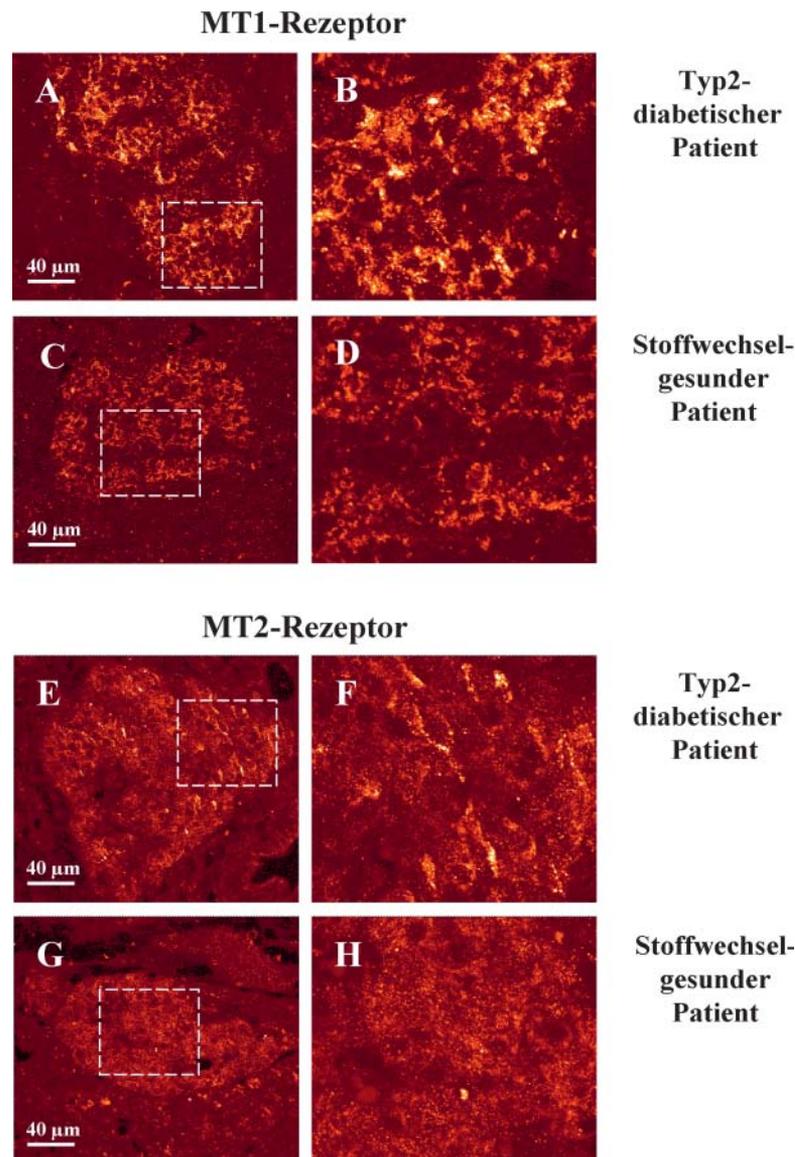


Abb. 3: Immunhistochemische Darstellung des MT1- (A–D) und MT2-Rezeptors (E–H) in humanem Pankreasgewebe. Die mittels konfokaler Laser-Scanning Mikroskopie (CLSM) gewonnenen Mikrophotogramme zeigen deutliche Farbintensitätsunterschiede zwischen den einzelnen Vergleichen. Erstens sind die Signale bei den Pankreata diabetischer Patienten (MT1: A,B und MT2: E,F) stärker. Zweitens bestehen zwischen den MT1- und MT2-Rezeptor-Darstellungen nochmals auffällige Unterschiede. Generell weisen die Pankreata Typ2-diabetischer Patienten mehr MT1-Rezeptor-spezifisches Reaktionsprodukt auf, was besonders in den Ausschnittsvergrößerungen (B,F) deutlich wird. Die Befunde sprechen für eine stärkere Melatoninrezeptor-Ausprägung bei Typ2-diabetischen Patienten. Die Ergebnisse stützen die quantitativen PCR-Befunde (Abb. 2C), die stärkere Melatonin-Rezeptor-Expressionen bei Diabetikern nachweisen (Peschke et al., J Pineal Res 2007, 42:350–358).

Melatonin entfaltet seine Rezeptor-medierte Effekte in der pankreatischen β -Zelle auf zwei unterschiedlichen Signaltransduktionswegen

Melatonin-Effekte, mediiert auf dem Gi-Adenylatcyclase-cAMP-Weg

Das Epiphysenhormon Melatonin entfaltet seine bislang bekannten Rezeptor-medierte Effekte auf dem Weg über Pertussistoxin sensitive inhibitorische GTP-bindende

Proteine (G_i), die an die MT1- und MT2-Membranrezeptoren gekoppelt sind. Die wichtigsten und bekanntesten zellulären Effekte des Melatonins werden über eine Herabregulation der intrazellulären cAMP-Konzentration vermittelt (Übersicht siehe: Vanecek, 1998).

Zurückliegende eigene Untersuchungen haben unter Nutzung molekularbiologischer, autoradiographischer und funktioneller Superfusionsexperimente sowie Bindungsstudien belegen können, dass die Rezeptor(MT1)-medierte Melatonineffekte an der Insulin-produzierenden

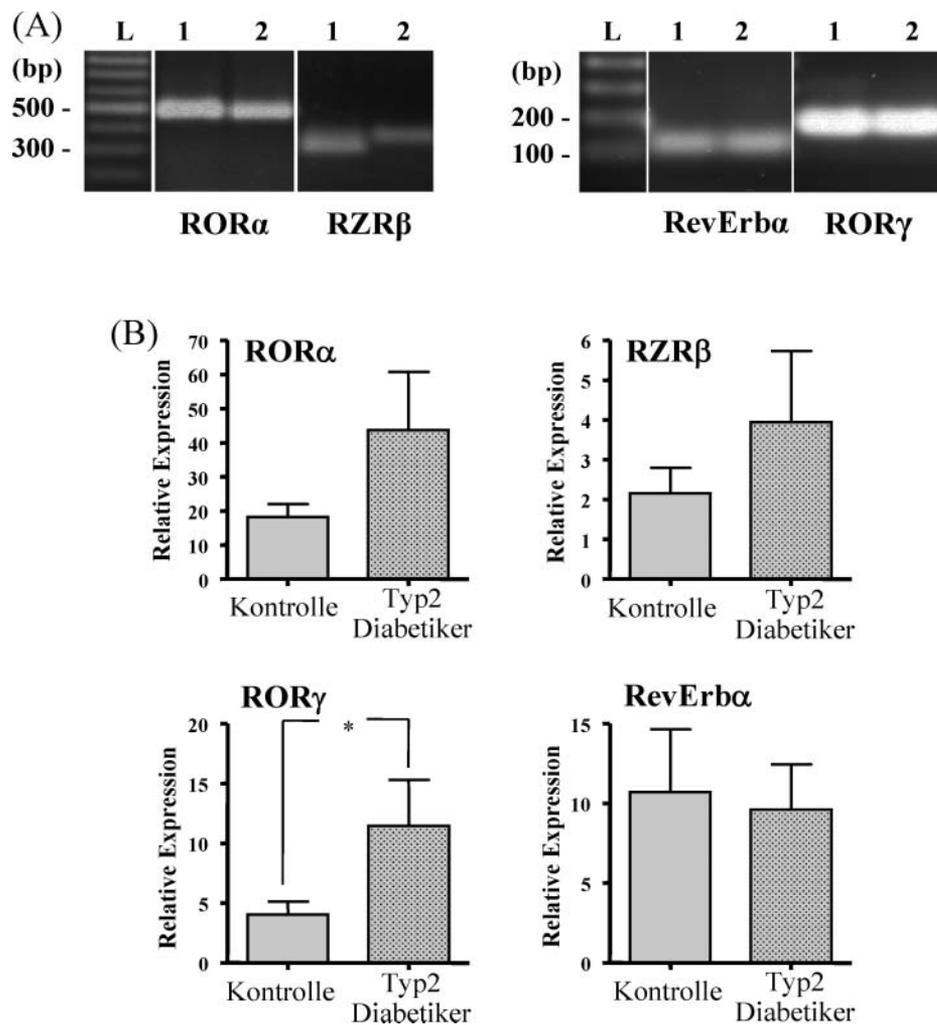


Abb. 4: (A) Quantitative RT-PCR-Analyse der Gen-Expression nucleärer Orphan-Rezeptoren ROR α , RZR β , ROR γ und RevErba in humanem Pankreasgewebe (1) und humanen pankreatischen Inseln (2). (B) Relative Expression der nucleären Rezeptoren ROR α , RZR β , ROR γ und RevErba in humanem Pankreasgewebe stoffwechselgesunder (Kontrolle, n = 18) und diabetischer Patienten (Typ2-Diabetiker, n = 7). Die Ergebnisse belegen, ebenso wie die der Melatonin-Membranrezeptoren MT1 und MT2 der Typ2-diabetischen Patienten (Abb. 2), eine erhöhte Expression der nucleären Orphan-Rezeptoren ROR α , RZR β , ROR γ . Allein beim ROR γ -Vergleich treten statistisch signifikante Unterschiede auf (* P < 0,05; Peschke et al., J Pineal Res 2007, 42:350–358).

den β -Zelle ebenfalls über trimere Gi-Proteine, die Adenylatcyclase, das cAMP und die Proteinkinase A vermittelt werden. Die dazu durchgeführten und vielfach reproduzierten Befunde wurden nach Testung (Csernus et al., 1998) und Anpassung einer Superfusionsanlage sowohl an pankreatische Inseln neonater Ratten (Peschke et al., 1997, 2000) als auch Ratten-Insulinomazellen INS1 (Peschke et al., 2002, 2006a,b; Peschke, 2003a,c, 2004) erhoben. Sie haben feststellen lassen, dass Melatonin auf diesem Weg die Glukose-, KCl- und Forskolin-stimulierte Insulinsekretion senkt (siehe auch: Kemp et al., 2002). Vergleichbare Ergebnisse, nämlich inhibitorischen Melatonineinfluss auf die Adenylatcyclase und konsekutiv den cAMP-Gehalt, wurden an retinalen Pigmentzellen von Mensch und Ratte (Nash und Osborne, 1995), Schaf- (Morgan et al., 1995) und Ratten-Hypophysen (Vanecek

und Klein, 1995), Nieren von Hühnchen (Song et al., 1996), Nebenhoden von Ratten (Shiu et al., 2000) sowie peritonealen Makrophagen von Mäusen (Garcia-Pergandada et al., 1999) erhoben.

Die eigenen Befunde ließen sich sowohl durch kurzzeitig-repetitive als auch Langzeitstimulationen superfusionstechnisch nachweisen und konnten durch Einsatz unterschiedlicher Techniken und Experimente validiert werden. Von besonderer Bedeutung war in diesem Zusammenhang die Nutzung eines cAMP-RIA und dessen Anpassung an die zu untersuchenden Superfusionsmedien. Es zeigte sich, dass cAMP im Superfusat – also extrazellulär – gemessen werden konnte, wofür amphipatische Anionen, sogenannte *multidrug resistance proteins* wie MRP4 und MRP5 verantwortlich gemacht wurden (Jedlitschky et al., 2000; Chen et al., 2001). Es

handelt sich hierbei um einen aktiven Zelltransport vom intrazellulären in den extrazellulären Raum (Rosenberg et al., 1994; Brundege et al., 1997; Finnegan und Caray, 1998; Kondrashin et al., 1999; Orlov und Maksimova, 1999; Steffgen et al., 1999). Dieser Transport erklärt, dass cAMP nicht nur wie bekannt intrazellulär, sondern mit großer Wahrscheinlichkeit auch extrazellulär eine *messenger*-Bedeutung zukommt (Fehr et al., 1990). Der Efflux soll energieabhängig und unidirektional erfolgen und durch Substanzen, die die cytoskeletale Mikrotubulus-Assemblierung verhindern, hemmbar sein (Rindler et al., 1978; Brunton und Mayer, 1979; Brunton und Buss, 1980). Bei unseren Superfusionsexperimenten mit INS1-Zellen stellte sich die Frage, ob sich der transmembranöse cAMP-Transporter durch Probenecid (p-[Dipropylsulfamoyl]Benzoessäure) hemmen lässt. Die publizierten Ergebnisse (Peschke et al., 2002; Peschke 2003a,c, 2004) machten zwingend deutlich, dass Probenecid die Forskolin-stimulierte, extrazellulär gemessene cAMP-Konzentration durch Blockierung des Exportes von cAMP in den Extrazellulärraum senkt, was zu einer Akkumulation von intrazellulärem cAMP mit konsekutiver Erhöhung der Insulinsekretion führt (siehe auch: Finnegan und Carey, 1998; Orlov und Maksimova, 1999; Steffgen et al., 1999; Jedlitschky et al., 2000). Diese Befunde suggerieren, dass cAMP nicht nur für die gut bekannten intrazellulären Signalfunktionen bedeutungsvoll ist, sondern auch interzellulär Funktionen erfüllt (Chen et al., 2001). Durch Erweiterung des experimentellen Ansatzes und zusätzlichen Einsatz des Phosphodiesterase-Hem-

mers IBMX (3-Isobutyl-1-methylxanthin) wurden erwartungsgemäß sowohl die cAMP- als auch die Insulin-Konzentration erhöht (weitere Angaben einschließlich Abbildungen siehe: Peschke et al., 2002; Peschke 2003a, 2004).

Weiterführende Untersuchungen, die den Sachverhalt noch eindeutiger belegen, wurden mit Ko-Stimulationen der INS1-Zelle in *batch*-Versuchen mit Clonidin und Forskolin erreicht. Clonidin ist ein $G_{i\alpha}$ -Protein-Stimulator, während Forskolin die Adenylatcyclase stimuliert. Experimentell wurde folgendermaßen vorgegangen. Nach Applikation von Forskolin allein wurden eine Aktivierung der Adenylatcyclase, konsekutive Erhöhung des intrazellulären cAMP-Gehaltes und schließlich erhöhte Insulinsekretion erzielt. Wurde zusätzlich Clonidin appliziert, das das inhibitorische G-Protein $G_{i\alpha}$ aktiviert, wurden die Forskolin-Effekte gehemmt und der cAMP-Gehalt erniedrigt. 20-stündige Präinkubation der INS1-Zellen mit Pertussistoxin hatte zur Folge, dass $G_{i\alpha}$ blockiert war, Clonidin keine Aktivierung von $G_{i\alpha}$ auslösen konnte und so Forskolin zu einer ungehemmten Aktivierung der Adenylatcyclase, der cAMP-Konzentration und konsekutiv zu einer ungehemmten Insulinsekretion führte. Mit weniger Worten zusammengefasst, die Hemmung (durch PTX) der Hemmung (Aktivierung von $G_{i\alpha}$ durch Clonidin) führte zu einer uneingeschränkten Aktivierung (durch Forskolin) der Insulinsekretion. Zur besseren Überschaubarkeit dient die Abb. 5 (Peschke et al., 2006b).

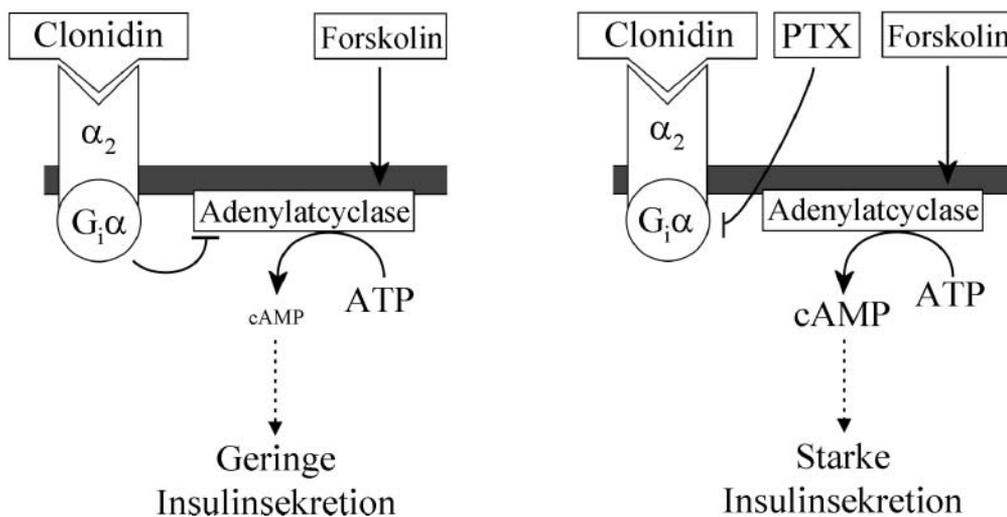


Abb. 5: Modellvorstellungen zum Einfluss von Forskolin, Clonidin und Pertussistoxin (PTX) auf die Insulinsekretion von Ratten-Insulinomazellen INS1. Forskolin stimuliert die Adenylatcyclase und konsekutiv die Bildung von cAMP, was zu einer Erhöhung der Insulinsekretion führt. Durch zusätzliche Gabe von Clonidin wird das inhibitorische $G_{i\alpha}$ -Protein aktiviert. Die Folge ist eine Hemmung der Adenylatcyclase und konsekutiv der Insulinsekretion. Inkubation der INS1-Zelle mit PTX für 20 h vor Stimulationsbeginn blockiert das inhibitorische $G_{i\alpha}$ -Protein, so dass Clonidin auf dem beschriebenen Wege die Adenylatcyclase nicht mehr hemmen kann. Die Folge ist eine unbeeinträchtigte Insulinsekretion, ebenso wie sie nach Forskolin-Stimulation allein erreicht wird. Die referierte Modellvorstellung war für das Verständnis von Ergebnissen wichtig, in denen mittels PTX-Inkubation die inhibitorischen $G_{i\alpha}$ -Proteine blockiert werden sollten, um den Einfluss von Melatonin allein auf dem Gq-Phospholipase C-IP3-Weg erfassen zu können (Peschke et al., J Pineal Res 2006b, 40:184–191).

Melatonin-Effekte, mediert auf dem Gq-Phospholipase C-IP3-Weg

Im Ergebnis der Untersuchungen und Auseinandersetzungen mit der Frage, ob die Rezeptor-medierte Melatoninwirkung in der pankreatischen β -Zelle allein auf dem Adenylatcyclase-cAMP-Weg vermittelt wird und sich alle Befunde auf der Grundlage dieses Weges erklären lassen, wurden Untersuchungen begonnen, die weitere Transduktionswege einbeziehen sollten. Schon bald wurde deutlich, dass sich verschiedene Melatonineffekte über die

Nutzung des Phospholipase C-IP3-Weg erklären ließen und dass dieser Weg eine besondere Bedeutung haben müsse. Das war bereits aus Vergleichsuntersuchungen an Hirnschnitten von Hühnchen (Popova und Dubocovich, 1995) sowie Ovarialzellen des Chinesischen Hamsters (MacKenzie et al., 2002) bekannt. Von besonderer Bedeutung war in diesem Zusammenhang die Anpassung eines kommerziell vertriebenen IP3-RIA an das eigene β -Zell-System, die immortalisierte, Glukose-responsive Ratten-Insulinomazelle INS1. Zunächst wurde getestet, welche Isoformen des IP3-Rezeptors in der INS1-Zelle konser-

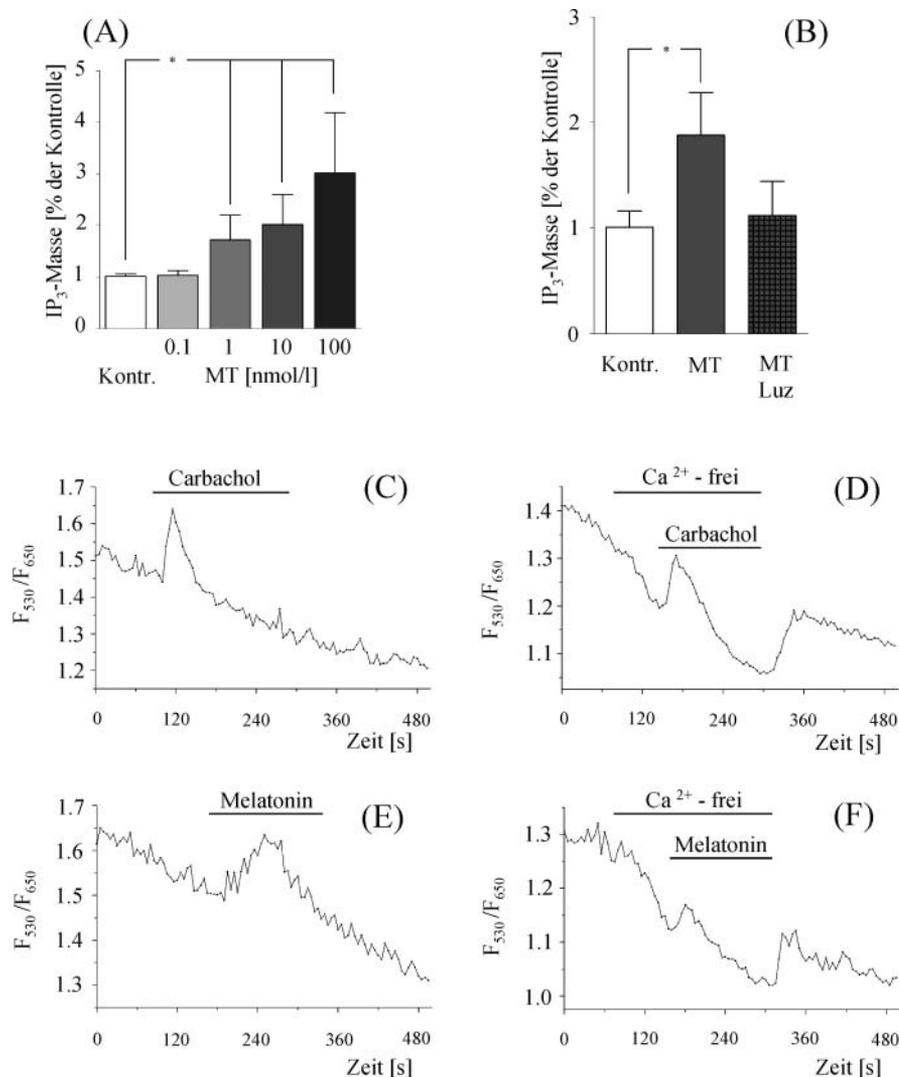


Abb. 6: (A) Einfluss unterschiedlicher Melatonin-Konzentrationen auf den intrazellulären IP₃-Gehalt von INS1-Zellen in Relation zur Kontrolle. Die Säulen repräsentieren Mittelwerte und Standardabweichungen der Mittelwerte (SEM) nach 15-minütiger Inkubation. Bereits nach Applikation von 1 nmol/l Melatonin wird eine signifikante Erhöhung der intrazellulären IP₃-Konzentration erreicht (n = 6). (B) Einfluss des kompetitiven Melatoninrezeptor-Antagonisten Luzindol auf den IP₃-Gehalt in INS1-Zellen. Nach 15-minütiger Behandlung der INS1-Zellen mit 10 nmol/l Melatonin und 30 μ mol/l Luzindol wurde der Melatonineffekt gelöscht (n = 6). Die Teilabbildungen (C-F) zeigen Ergebnisse konfokalmikroskopischer Ca²⁺-Bestimmungen nach Stimulation mit dem IP₃-Stimulator Carbachol (C) und Melatonin (E). In beiden Fällen kommt es zu einer intrazellulären Erhöhung des Ca²⁺-Gehaltes, ebenso wie es zu Erhöhungen der IP₃-Konzentration nach Carbachol und Melatonin gekommen war. Die Teilabbildungen 6D und 6F zeigen, dass die intrazellulären Ca²⁺-Erhöhungen auch im Ca²⁺-freien Medium nachweisbar sind. Daher kann das Ca²⁺ nur aus intrazellulären Kompartimenten stammen (Bach et al., J Pineal Res 2005, 39:316–323).

viert und nachweisbar sind, anschließend der Einfluss von Carbachol auf die IP₃-Freisetzung untersucht. Im Ergebnis konnten durch Einsatz spezifischer *Primer* die Amplifikationsprodukte für IP₃R-1, IP₃R-2 und IP₃R-3 detektiert und der Nachweis erbracht werden, dass Carbachol die IP₃-Freisetzung in der INS1-Zelle erhöht (Dosis-Wirkungs-Beziehung siehe: Bach et al., 2005). Die sich anschließenden Untersuchungen dienten nun der Frage, ob auch Melatonin einen Einfluss auf diesen Signalweg nimmt. Die Ergebnisse waren eindeutig, Melatonin erhöhte dosisabhängig die IP₃-Freisetzung und konsekutiv die Insulinsekretion (Abb. 6A). Dieser Befund konnte zusätzlich durch den Einsatz des kompetitiven Melatoninrezeptor-Antagonisten Luzindol (der auch schon in der Nachweiskette zur Melatoninbedeutung für den AC/cAMP-Weg eine wichtige Rolle gespielt hatte) erhärtet werden. Der IP₃-steigernde Einfluss von Melatonin konnte durch Luzindol aufgehoben werden (Abb. 6B). Zahlreiche Zusatzuntersuchungen, wie beispielsweise kombinierte Gaben von Melatonin und Carbachol, ließen keinen Zweifel, dass Melatonin ebenso wie der „Klassiker“ Carbachol den IP₃-Gehalt erhöht.

Nachdem nun feststand, dass Melatonin auch einen Insulin-steigernden Einfluss auf die INS1-Zelle hat und dass dieser Effekt über eine Aktivierung des IP₃-Systems realisiert wird, erhob sich die Frage, ob tatsächlich der cytosolische Ca²⁺-Gehalt gesteigert wird, woraus sich die Steigerung der Insulinsekretion erklären würde. Zusätzlich musste geklärt werden, ob die mögliche Erhöhung des Ca²⁺-Gehaltes aus intrazellulären Kompartimenten oder aus dem Extrazellulärraum stammt. Die Antwort konnte auf Grund eindeutiger konfokalmikroskopischer Laser-*Scanning*-Befunde gegeben werden. Nach Melatonin-Applikation (Abb. 6E) stieg, ebenso wie nach Carbacholbehandlung (Abb. 6C), der intrazelluläre Ca²⁺-Gehalt an. Dass das Ca²⁺ aus intrazellulären Kompartimenten stammen musste, wurde durch Experimente gesichert, in denen die Melatoningabe den INS1-Zellen im Ca²⁺-freien Medium verabreicht wurde. Immer stieg der intrazelluläre Ca²⁺-Gehalt an, der unter dieser Versuchsanordnung zweifelsfrei nur intrazellulär freigesetzt worden sein konnte (Abb. 6D,F). Damit schließt sich die Nachweiskette: Melatonin erhöht durch Aktivierung des IP₃-Systems den IP₃-Gehalt und konsekutiv die Insulinsekretion (Bach et al., 2005).

Durch die geschilderten Signaltransduktionswege, nämlich den Einfluss von Melatonin auf den Gi/AC/cAMP-Weg mit hemmender Bedeutung und den Gq/PLC/IP₃-Weg mit steigernder Bedeutung für die Insulinsekretion war das Problem entstanden, wie die Einzeleffekte sauber dargestellt werden könnten. Dazu musste der AC/cAMP-Weg gehemmt werden, was durch Blockierung des inhibitorischen G-Proteins (Gi) mittels Pertussistoxin möglich wurde. Es darf daran erinnert werden, dass die hemmenden Effekte des Melatonins auf das Adenylatcyclase-cAMP-System über eine Aktivierung inhibitori-

scher Gi-Proteine mediiert werden, die durch Pertussistoxin blockierbar sind, während der Einfluss auf das PLC/IP₃-System über Gq-Proteine vermittelt wird. Sowohl die Komplexität als auch die „Janusgesichtigkeit“ der bisher untersuchten Signaltransduktionswege in der INS1-Zelle geben Probleme auf, die bislang nur ansatzweise deutbar sind. Warum vermag Melatonin in der β -Zelle auf unterschiedlichen Wegen einander widersprechende Funktionskaskaden zu aktivieren, nämlich auf dem Gi/AC/cAMP-Weg eine Hemmung der Insulinsekretion und dem Gq/PLC/IP₃-Weg eine Steigerung der Insulinsekretion? Bisher wissen wir nur, dass der IP₃-Weg sehr schnell, der cAMP-Weg erst nach mehrstündiger Prä-Applikation von Melatonin zu messbar erfassbaren Ergebnissen führt (Abb. 7).

Weiterführende Untersuchungen und auch die Beantwortung der Frage, ob möglicherweise der cGMP-Weg eine Rolle im Konzert der Signaltransduktionskaskaden spielt, sind Gegenstand derzeitiger Untersuchungen.

Untersuchungen zum Einfluss diabetischer Stoffwechsellstörungen auf Pinealorgan und Melatonin-Synthese bei Ratte und Mensch

Die konsequente Weiterverfolgung der oben skizzierten Befunde an der pankreatischen β -Zelle nach Melatonin-Applikation im Rahmen des Akademieprojektes wurde in der Einbeziehung von Untersuchungen am Pinealorgan nach diabetischer Stoffwechsellstörung (Typ1- und Typ2-Diabetes) gesehen. In dem nun folgenden Kapitel soll zu ersten Ergebnissen auf diesem Gebiet Stellung bezogen werden, um in möglichst umfassender Weise die gegenseitige Beeinflussung von Insulin und Melatonin erfassen und charakterisieren zu können. Die hier darzustellenden Befunde ermöglichen die Übertragbarkeit zahlreicher *in vitro*-Ergebnisse auf das Versuchstier und den Menschen und damit den Brückenschlag zur Klinik, einem zentralen Anliegen des oben genannten Akademie-Forschungsprojektes.

Untersuchungen an stoffwechselgesunden Wistar- und Typ2-diabetischen Goto-Kakizaki(GK)-Ratten

Neben zurückliegenden Untersuchungen und höchst widersprüchlichen Befunden, die sich bis in die Mitte des 20. Jahrhunderts zurückverfolgen lassen (Zusammenfassung siehe Peschke, 2003a,c, 2004), gibt es Beobachtungen, die in überzeugender Weise verdeutlichen, dass eine Erhöhung der Melatonin-Konzentration bei Ratten zu Blutglukoseerhöhung (Benson, 1971) und Insulinerniedrigung führte (Csaba und Barath, 1971; Csaba und Nagy, 1973). Pinealektomie hingegen erniedrigte die Blutglukose und erhöhte die Insulinkonzentration im Serum (Gorray et al., 1979; Quay und Gorray, 1980). Daraus re-

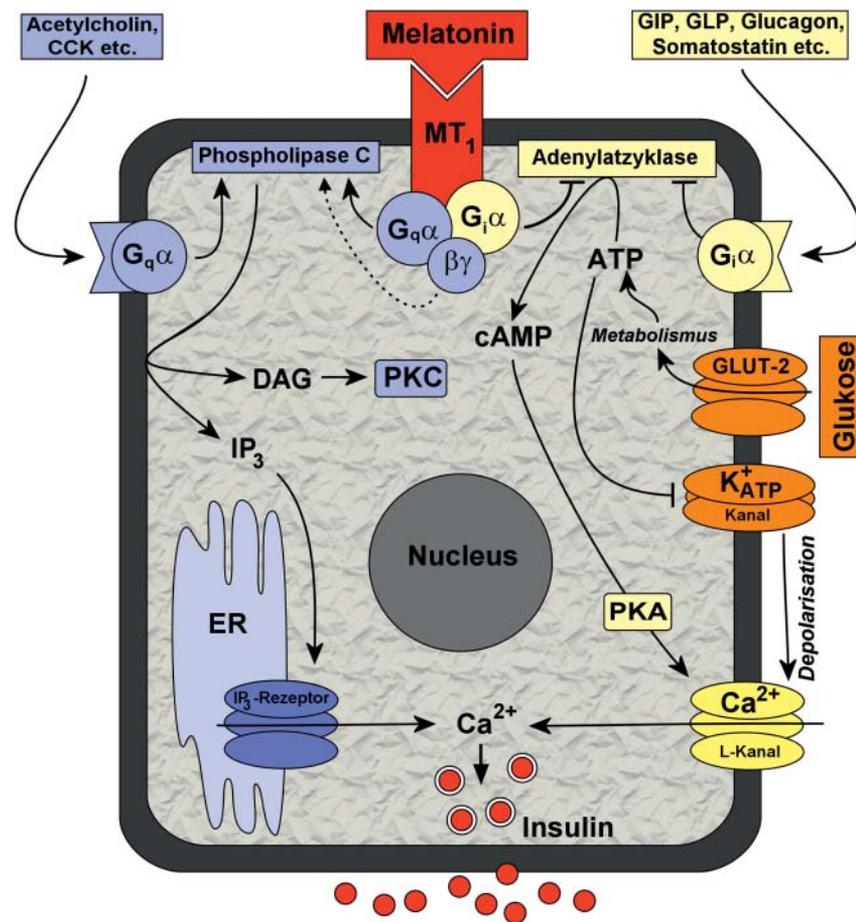


Abb. 7: Modellvorstellungen über den Einfluss von Melatonin auf die β -Zelle. Bisherige Befunde machen wahrscheinlich, dass die Melatoninrezeptoren ihren Einfluss auf die β -Zelle sowohl auf dem $G_{i\alpha}$ -Adenylatcyclase-cAMP-Weg als auch über den $G_{q\alpha}$ -Phospholipase C-IP₃-Weg vermitteln. Dabei führt die Nutzung des ersten Weges zur Hemmung, die des zweiten Weges zur Steigerung der Insulinsekretion. Einerseits koppeln die Melatoninrezeptoren an $G_{i\alpha}$ -Proteine, wodurch die Aktivität der Adenylatcyclase und konsekutiv das cAMP und die Insulinsekretion gehemmt werden, vermittelt über die Proteinkinase A (PKA). In vergleichbarer Weise wird dieser Signalweg von gastrointestinalen Hormonen wie dem Gastrischen inhibitorischen Hormon (GIP), *Glukagon like peptide* (GLP), Glukagon oder Somatostatin genutzt. Dieser Weg ist bestimmend (prädominant) für die Insulinsekretionsbeeinflussung durch Melatonin. Andererseits koppeln die Melatoninrezeptoren an $G_{q\alpha}$ -Proteine oder deren $\beta\gamma$ -Untereinheiten mit dem Ergebnis, dass die Phospholipase C β stimuliert und das IP₃ erhöht werden, was zu einer Zunahme der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration führt. Der Melatoneffekt auf die Insulinsekretion auf diesem Weg ist jedoch im Vergleich zum Acetylcholin und Cholecystokin (CCK), die diesen Weg ebenfalls nutzen, vergleichsweise gering. Ob Melatonin seine Insulin-steigernden Effekte möglicherweise auch auf dem Weg über das Diacylglycerin (DAG) und die Proteinkinase C (PKC) realisiert, ist bislang nicht geklärt (Peschke et al., J Pineal Res 2006b, 40:184–191).

sultierte die nicht ohne Widerspruch gebliebene Überzeugung, dass das Pinealorgan (Melatonin) eine suppressive Bedeutung für die pankreatische β -Zelle haben muss, weil Melatonin die Insulinsekretion beim Menschen (Boden et al., 1996) sowie bei der Ratte (Rasmussen et al., 1999; Wolden-Hanson et al., 2000) reduzierte, verbunden mit einer Verringerung der Glukose-Toleranz (Cagnacci et al., 2001).

Vor dem Hintergrund der geschilderten Literaturangaben und der oben aufgeführten eigenen *in vitro*-Befunde wurden Typ2-diabetische GK-Ratten (Goto und Kakizaki, 1981) und zum Vergleich stoffwechselgesunde Wistar-Ratten im Alter von 6 sowie 42 Wochen untersucht und

Tagesprofile (Messung in 3 Stunden-Intervallen über die 24 Stunden-Periode) unterschiedlicher Merkmale erfasst. Von besonderem Interesse war dabei, ob Melatonin-Tagesprofile bei Typ2-diabetischen GK-Ratten im Vergleich zu stoffwechselunauffälligen Wistar-Ratten verändert sein würden. Die Befunde waren eindeutig. Bei erhöhten Glukose- sowie Insulin-Plasma-Konzentrationen der GK-Ratten waren die Melatonin-Werte, besonders deutlich zu Zeiten normalerweise hoher Melatoninkonzentrationen in der Nacht, gegenüber den Werten der Wistar-Ratten erniedrigt. Dieser Befund konnte sowohl bei 6 Wochen als auch 42 Wochen alten Tieren erfasst werden, wobei die Melatonin-Werte bei den 42 Wochen alten Tieren ins-

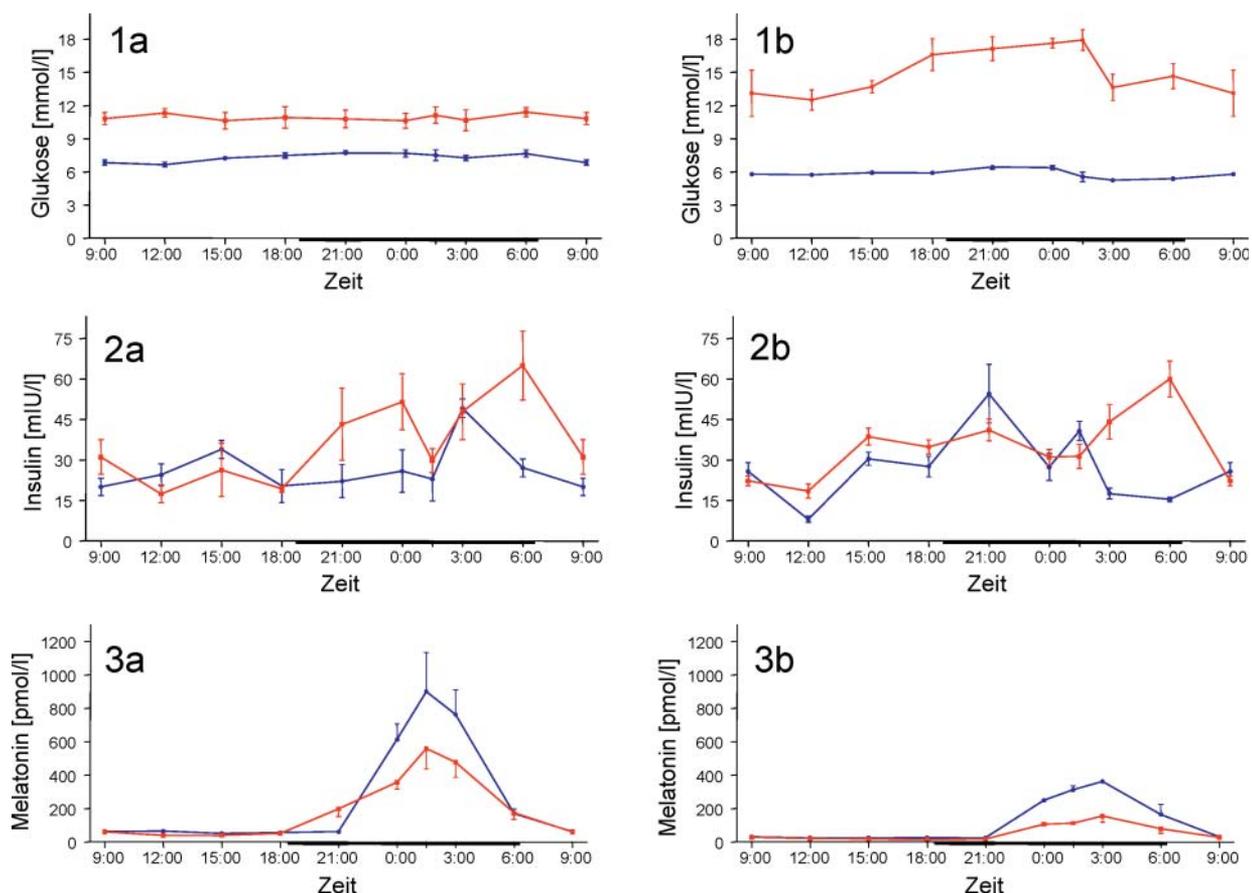
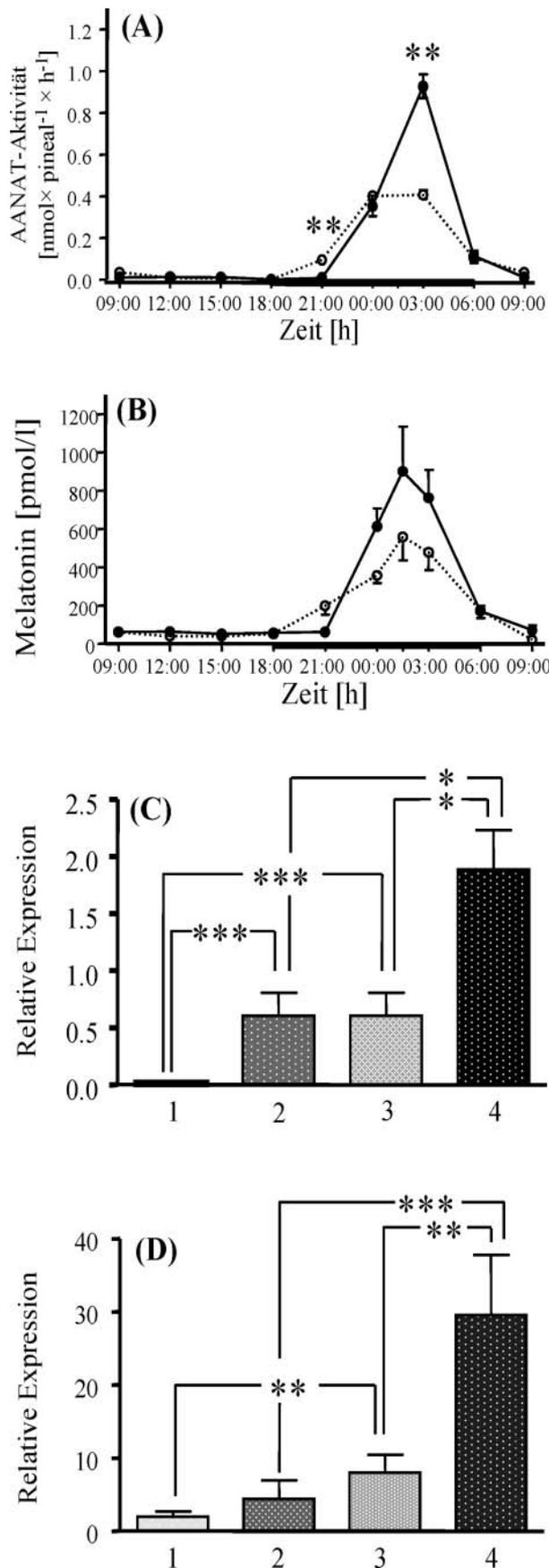


Abb. 8: Tagesprofile von Glukose (1a), Insulin (2a) und Melatonin (3a) 6 Wochen alter Wistar- und Goto-Kakizaki(GK)-Ratten (Tiermodell für Typ2-Diabetes) im Vergleich zu Tagesprofilen von Glukose (1b), Insulin (2b) und Melatonin (3b) 42 Wochen alter Wistar- und GK-Ratten. Die Balken auf der Abszisse geben die Dunkelzeit an. Die blauen Kurven repräsentieren die Kontrolltiere (Wistar-Ratten), die roten Kurven die GK-Ratten. Die Daten belegen, dass höhere Glukose- und Insulin-Konzentrationen ($P < 0,001$) mit niedrigeren Melatonin-Plasmakonzentrationen assoziiert sind ($P < 0,05$). Tageszeitabhängig zeigt die Glukose der 6 Wochen alten Ratten keine auffälligen Schwankungen. Im Gegensatz dazu sind die Insulin-Werte der GK-Ratten in der Dunkelzeit erhöht ($P < 0,05$ um 0:00 sowie 6:00 Uhr), während die Melatonin-Werte erniedrigt sind ($P < 0,05$ um 3:00 Uhr). Die SPEARMANSche Korrelationsanalyse bestätigt einen funktionellen Zusammenhang zwischen Insulin und Melatonin ($P < 0,05$). Unter Beibehaltung der qualitativen Unterschiede ändert sich bei 42 Wochen alten Versuchstieren das Ausmaß der Veränderungen erheblich. Die Glukosekonzentration der GK-Tiere wird noch deutlich erhöht (besonders in der Dunkelzeit), und die Melatonin-Konzentration verringert sich (Peschke et al., J Pineal Res, 2006a, 40:135–143).

gesamt deutlich geringer waren (Abb. 8). Dieser Sachverhalt, der beim Vergleich der Melatoninkonzentrationen diabetischer Kinder mit denen von diabetischen Erwachsenen ebenfalls beobachtet wurde, war erwartet worden, weil bekannterweise Synthese und Ausschüttung von Melatonin mit zunehmendem Alter abnehmen. Es erhob sich nun die bislang nicht befriedigend geklärte Frage, warum die Melatonin-Plasmakonzentrationen unter diabetischen Bedingungen so deutlich herabgesetzt sind. Es darf daran erinnert werden, dass Melatonin die Insulin-Sekretion im *in vitro*-Versuch erniedrigte, und nun wurde ebenfalls festgestellt, dass ein *Status diabeticus* die Melatonin-Plasmawerte bei Ratte und Mensch erniedrigt. Zunächst besteht sicher kein Zweifel darüber, dass die Befunde für einen funktionellen Zusammenhang zwischen Insulin und Melatonin sprechen. Jedoch bleibt die Akzeptanz des Zu-

sammenhanges spekulativ, solange die Kausalität nicht deutlich gemacht werden kann. Das Spektrum der Folgeuntersuchungen, die teilweise noch nicht publiziert sind, bringt uns diesem Anliegen näher. Das bislang immer noch anerkannt limitierende Enzym der Melatonin-Synthese ist die Arylalkylamin-N-acetyltransferase (AANAT), die den Schritt vom Serotonin zum Acetyl-Serotonin katalysiert. Der Einfluss von Insulin auf die AANAT, deren Aktivität circadian oszilliert (Abb. 9A), wird unterschiedlich charakterisiert. Zum einen sollen Insulin-Injektionen sowohl die pineale AANAT-Aktivität als auch die Melatonin-Konzentration erhöhen (Lynch et al., 1973), zum anderen wurde gezeigt, dass Insulin ein potenter Inaktivator der AANAT-Aktivität ist (Nambodiri et al., 1981). Auch die Erzeugung eines experimentellen Typ1-Diabetes mit den klassischen Diabetogenen Alloxan oder Streptozoto-



cin reduzierte die nächtliche Melatonin-Plasmakonzentration, beim Syrischen Hamster stärker als bei der Ratte (Champney et al., 1983, 1986), Befunde, die zumindest für das Streptozotocin von uns nicht bestätigt werden können (Publikation in Vorbereitung). Ob die beschriebenen Effekte sich auf eine diabetische Neuropathie des vegetativen Nervensystems reduzieren lassen (O'Brien et al., 1986), kann derzeit noch nicht beantwortet werden.

Die eigenen Befunde können jedoch bestätigen, dass Typ2-diabetische GK-Ratten in Einheit mit erniedrigten Melatonin-Plasmawerten (Abb. 9B) eine erniedrigte AANAT-Aktivität aufweisen (Abb. 9A). Sie paart sich mit einer erhöhten Expression der AANAT-mRNA, wie durch quantitative *real-time* RT-PCR-Befunde gesichert werden konnte (Abb. 9C). Möglicherweise wird die AANAT-mRNA kompensatorisch erhöht. Zusatzuntersuchungen haben nachweisen können, dass die Katecholamin-Konzentrationen bei diabetischen Ratten erniedrigt sind (Abb. 10). Daraus ließe sich die bereits erniedrigte AANAT- und Melatonin-Synthese erklären, weil Norepinephrin die Melatonin-Synthese entscheidend über β 1-, aber auch über α 1-Adrenozeptoren – immer während der Nacht (Dunkelheit) – besonders stark steigert.

Zwei wichtige Untersuchungsergebnisse sollen noch hinzugefügt werden, weil sie den diskutierten funktionellen Zusammenhang zwischen Insulin und Melatonin stützen. Mittels quantitativer RT-PCR konnte mit statistischer Sicherheit deutlich gemacht werden, dass bei diabetischen Ratten die Expression der Insulin-Rezeptor-mRNA der Epiphyse herabreguliert wird (nicht gezeigt), während die Expression der Melatonin(MT1)-Rezeptor-mRNA des Pankreas hochreguliert wird (Abb. 9D).

Abb. 9: (A) Die Enzymaktivitäten der Arylkylamin-N-Acetyltransferase (AANAT) in den Pinealorganen von GK-Ratten sind erniedrigt ($P < 0,001$). (B) In Übereinstimmung damit liegen erniedrigte Melatonin-Konzentrationen der GK-Ratten gegenüber den stoffwechselgesunden Wistar-Ratten vor. Zu den Zeitpunkten 21:00 Uhr und Mitte Dunkelzeit (3:00 Uhr) bestehen signifikante Unterschiede der AANAT-Aktivität zwischen GK- und Wistar-Ratten (** $P < 0,01$). (C) Die mRNA für die AANAT der GK-Ratten war – möglicherweise kompensatorisch – statistisch signifikant hochreguliert. (D) In vergleichbarer Weise erfolgt eine Hochregulation der mRNA der pankreatischen MT1-Rezeptor-Expression bei GK-Ratten (1: Wistar-Ratte Mitte Lichtzeit, 2: Wistar-Ratte Mitte Dunkelzeit, 3: GK-Ratte Mitte Lichtzeit, 4: GK-Ratte Mitte Dunkelzeit; * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$). Die Balken auf der Abszisse geben die Dunkelzeit an (Peschke et al., J Pineal Res, 2006a, 40:135–143).

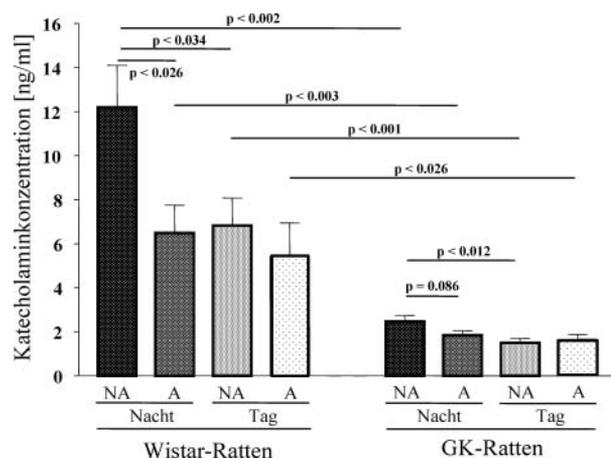


Abb. 10: Katecholaminkonzentrationen (Noradrenalin und Adrenalin) im Plasma von 42 Wochen alten stoffwechselgesunden Wistar- und Typ2-diabetischen GK-Ratten Mitte Licht- und Dunkelzeit. Generell sind die Katecholaminwerte in der Nacht (Dunkelzeit) höher als am Tag (Lichtzeit). Beim Vergleich der beiden Tiermodelle zeigt sich, dass GK-Ratten insgesamt deutlich niedrigere Katecholaminwerte aufweisen. Dieser Sachverhalt erklärt möglicherweise die erniedrigte AANAT-Enzymaktivität und Melatonin-Konzentration (Abb. 9), da Noradrenalin bekannterweise für die Melatonin-Synthese unverzichtbar ist. Bis auf geringe quantitative Unterschiede verhalten sich die Katecholaminkonzentrationen bei den 6 Wochen alten Tieren vergleichbar (nicht gezeigt, Publikation in Vorbereitung).

Plasma- und Pankreas-Untersuchungen an stoffwechselgesunden und Typ2-diabetischen Patienten

Die alles entscheidende Frage war die nach der Übertragbarkeit der geschilderten *in vitro*- und *in vivo*- bzw. *ex vivo*-Befunde auf den Menschen. Dass sich hier experimentelle Grenzen stellen, ist unschwer nachvollziehbar. Besonders eindrucksvoll waren die Plasma-Tagesprofile unterschiedlichster Merkmale von Typ1-diabetischen Kindern und Typ2-diabetischen erwachsenen Patienten, die statistisch signifikante Senkungen der Melatonin-Konzentrationen im Tagesgang aufwiesen (Peschke et al., 2006a). Ebenso überzeugend war, dass die Absenkung der Melatonin-Plasmakonzentrationen bei den Typ1-diabetischen Kindern vergleichsweise stark war und zur Nachtzeit überhaupt kein Gipfel mehr auftrat. Allein durch diese Befunde wird deutlich, dass sich die tierexperimentellen Ergebnisse auf den Menschen übertragen lassen. Hinzu kommen Befunde, die bereits oben im Kapitel „Melatonin-Rezeptoren“ aufgeführt wurden. Auch hier konnte bereits nachgewiesen werden, dass analog zum Beispiel des MT1-Rezeptors der diabetischen GK-Ratte auch das humane Pankreasgewebe von Typ2-diabetischen Patienten erhöhte Expressionen sowohl der MT1- als auch MT2-Rezeptor-mRNA aufweist. Allerdings ist die Expression des MT2-Rezeptors gegenüber der des MT1-Rezeptors insgesamt geringer. Die oben geschilderten Befunde beschränkten sich jedoch nicht ausschließ-

lich auf die bekannten Membranrezeptoren. Auch die Expression der mRNA nucleärer Orphan-Rezeptoren (ROR α , RZR β , ROR γ) war bei diabetischen Patienten erhöht, wie oben bereits erwähnt worden ist (Peschke et al., 2007).

Zielstellungen und Ausblick

Die bisherigen Aussagen stützen sich überwiegend auf das Typ2-diabetische Tiermodell GK-Ratte. Untersuchungen an Typ1-diabetischen Modellen fehlen. Das ist nicht verwunderlich, weil Typ1-diabetische Tiermodelle nicht nur besondere Anforderungen an den Experimentator stellen, sondern bei mit Alloxan oder Streptozotocin behandelten Tiermodellen zusätzliche, schwer kalkulierbare Lateraleffekte unvermeidbar sind. Dennoch wurden von uns erste Versuche durchgeführt, bei denen sowohl 6 als auch 42 Wochen alte Wistar-Ratten mit Streptozotocin behandelt wurden, um Veränderungen von Melatonin-Konzentration sowie MT1- und MT2-Rezeptor-Expression in der β -Zelle und Insulinrezeptor-Expression in der Epiphyse zu analysieren. Präliminäre Ergebnisse lassen erkennen, dass bei stark erniedrigten Insulinkonzentrationen der mit Streptozotocin behandelten Ratten die Melatoninwerte erhöht waren (bei Typ2-diabetischen GK-Ratten waren in Umkehrung die Insulinkonzentrationen erhöht und die Melatoninwerte erniedrigt!). Es stellt sich die Frage, ob Konzentrationsveränderungen von Insulin für die von Melatonin verantwortlich sind? Die Beantwortung dieser Frage muss durch weiterführende Untersuchungen geklärt werden und wird die Herausforderung für entsprechende, bereits geplante und teilweise in Angriff genommene Experimente sein.

Danksagung

Die vorliegende Zusammenfassung von wissenschaftlichen Ergebnissen der zurückliegenden Jahre konnte nur unter Beteiligung von den Mitarbeitern und Doktoranden der Arbeitsgruppe entstehen, wobei Frau Prof. Dr. Dorothee Peschke besonders hervorzuheben ist. Zu den Ergebnissen haben weiterhin beigetragen: Dr. Andreas Bach, Dr. Ivonne Bazwinsky, Dr. Erik Chankiewitz, Thomas Frese, Dr. Liudmila Litvak, Dipl. troph. Ina Stumpf, Dr. Sabine Wolgast sowie die technischen Assistentinnen Frau Uta Engelhardt, Frau Annika Jordan sowie Frau Candy Rothgänger. Förderung und finanzielle Unterstützung wurden uns durch die Sächsische Akademie der Wissenschaften zu Leipzig, die DFG, den Bund, das Land Sachsen-Anhalt und Sponsoren aus der Industrie in der BRD und den USA zuteil.

Die folgenden Abbildungen wurden mit freundlicher Genehmigung des Verlages Blackwell Publishing Ltd. wiedergegeben. Im Einzelnen entstammen sie den Publikationen:

Abb. 1–3: Peschke et al. (2007) *JPR* 42:350–358; Abb. 4: Bach et al. (2005) *JPR* 39:316–323; Abb. 5–7: Peschke et al. (2006) *JPR* 40:135–143; Abb. 9: Peschke et al. (2006) *JPR* 40:184–191.

Literatur

- Bach AG, Wolgast S, Mühlbauer E, Peschke E. 2005. Melatonin stimulates inositol-1,4,5-trisphosphate and Ca^{2+} release from INS1 insulinoma cells. *J Pineal Res* 39:316–323.
- Benson B, Miller CW, Sorrentino S. 1971. Effects of blinding on blood glucose and serum insulin-like activity in rats. *Texas Rep Biol Med* 29:513–525.
- Boden G, Ruiz J, Urbain JL, Chen X. 1996. Evidence for a circadian rhythm of insulin secretion. *Am J Physiol* 271:E246–E252.
- Brömme HJ, Peschke E. 2003. Molekulare Mechanismen der Alloxan-Toxizität sowie der radikalfangenden und anti-diabetogenen Bedeutung von Melatonin. In: Peschke E (ed.) *Endokrinologie, Vorträge im Rahmen des Projektes „Zeitstrukturen endokriner Systeme“*. Abh Sächs Akad Wiss, Math-nat Kl 60/1. Stuttgart/Leipzig: S. Hirzel. S. 137–162.
- Brundege JM, Diao L, Proctor WR, Dunwiddie TV. 1997. The role of cyclic AMP as a precursor of extracellular adenosine in the rat hippocampus. *Neuropharmacology* 36:1201–1210.
- Brunton LL, Buss JE. 1980. Export of cyclic AMP by mammalian reticulocytes. *J Cyclic Nucleotide Res* 6:369–377.
- Brunton LL, Mayer SE. 1979. Extrusion of cyclic AMP from pig erythrocytes. *J Biol Chem* 254:9714–9720.
- Cagnacci A, Arangino S, Renzi A, Paoletti AM, Melis GB, Cagnacci P, Volpe A. 2001. Influence of melatonin administration on glucose tolerance and insulin sensitivity of postmenopausal women. *Clin Endocrinol (Oxf)* 54:339–346.
- Carlberg C, Wiesenberg I. 1995. The orphan receptor family RZR/ROR, melatonin and 5-lipoxygenase: an unexpected relationship. *J Pineal Res* 18:171–178.
- Champney TH, Brainard GC, Richardson BA, Reiter RJ. 1983. Experimentally-induced diabetes reduces nocturnal pineal melatonin content in the Syrian hamster. *Comp Biochem Physiol* 76A:199–201.
- Champney TH, Holtorf AP, Craft CM, Reiter RJ. 1986. Hormonal modulation of pineal melatonin synthesis in rats and Syrian hamsters: effects of streptozotocin-induced diabetes and insulin injections. *Comp Biochem Physiol* 83A:391–395.
- Chen ZS, Lee K, Kruh GD. 2001. Transport of cyclic nucleotides and estradiol 17- β -D-glucuronide by multidrug resistance protein 4. *J Biol Chem* 276:33747–33754.
- Costa EJ, Lopes RH, Lamy-Freund MT. 1995. Permeability of pure lipid bilayers to melatonin. *J Pineal Res* 19:123–126.
- Csaba G, Barath P. 1971. Are Langerhans's islets influenced by the pineal body? *Experientia* 27:962.
- Csaba G, Nagy SU. 1973. The regulatory role of the pineal gland on the thyroid gland adrenal medulla and the islets of Langerhans. *Acta Biol Med Germ* 31:617–619.
- Csernus VJ, Hammer T, Peschke D, Peschke E. 1998. Dynamic insulin secretion from perfused rat pancreatic islets. *Cell Mol Life Sci* 54:733–743.
- Fehr TF, Dickinson ES, Goldman SJ, Slakey LL. 1990. Cyclic AMP efflux is regulated by occupancy of the adenosine receptor in pig aortic smooth muscle cells. *J Biol Chem* 265:10974–10980.
- Finnegan RB, Carey GB. 1998. Characterization of cyclic AMP efflux from swine adipocytes in vitro. *Obes Res* 6:292–298.
- Garcia-Perganeda A, Guerrero JM, Rafii-el-Idrissi M, Paz Romero M, Pozo D, Calvo JR. 1999. Characterization of membrane melatonin receptor in mouse peritoneal macrophages: inhibition of adenylyl cyclase by a pertussis toxin-sensitive G protein. *J Neuroimmunol* 95:85–94.
- Gillespie J, Roy D, Cui H, Belsham D. 2004. Repression of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) gene expression by melatonin may involve transcription factors COUP-TFI and C/EBP beta binding at the GnRH enhancer. *Neuroendocrinology* 79:63–72.
- Glass CK. 1994. Differential recognition of target genes by nuclear receptor monomers, dimers, and heterodimers. *Endocr Rev* 15:391–407.
- Gorray KC, Quay WB, Ewart RBL. 1979. Effects of pinealectomy and pineal incubation medium and sonicates on insulin release by isolated pancreatic islets in vitro. *Horm Metab Res* 11:432–436.
- Goto Y, Kakizaki M. 1981. The spontaneous-diabetes rat: a model of noninsulin dependent diabetes mellitus. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci* 57:381–384.
- Hardeland R. 2005. Melatonin, eine ubiquitäre Substanz. Vorkommen, Wirkungen und Metabolismus außerhalb seiner klassischen Rolle. In: Peschke E (ed.) *Endokrinologie II, Vorträge im Rahmen des Projektes „Zeitstrukturen endokriner Systeme“*. Abh Sächs Akad Wiss, Math-nat Kl 63/2. Stuttgart/Leipzig: S. Hirzel. S. 75–106.
- Jedlitschky G, Burchell B, Keppler D. 2000. The multidrug resistance protein 5 functions as an ATP-dependent export pump for cyclic nucleotides. *J Biol Chem* 275:30069–30074.
- Jetten AM. 2004. Recent advances in the mechanisms of action and physiological functions of the retinoid-related orphan receptors (RORs). *Curr Drug Targets Inflamm Allergy* 3:395–412.
- Jin X, von Gall C, Pieschl RL, Gribkoff VK, Stehle JH, Reppert SM, Weaver DR. 2003. Targeted disruption of the mouse Mel(1b) melatonin receptor. *Mol Cell Biol* 23:1054–1060.
- Kang HS, Beak JY, Kim YS, Petrovich RM, Collins JB, Grissom SF, Jetten AM. 2006. NABP1, a novel RORgamma-regulated gene encoding a single-stranded nucleic-acid-binding protein. *Biochem J* 397:89–99.
- Kemp DM, Ubeda M, Habener JF. 2002. Identification and functional characterization of melatonin Mel 1a receptors in pancreatic beta cells: potential role in incretin-mediated cell function by sensitization of cAMP signaling. *Mol Cell Endocrinol* 191:157–166.
- Kiefer TL, Lai L, Yuan L, Dong C, Burrow ME, Hill SM. 2005. Differential regulation of estrogen receptor alpha, glucocorticoid receptor and retinoic acid receptor alpha transcriptional activity by melatonin is mediated via different G proteins. *J Pineal Res* 38:231–239.
- Kondrashin A, Nesterova M, Cho-Chung YS. 1999. Cyclic adenosine 3':5'-monophosphate-dependent protein kinase on the external surface of LS-174T human colon carcinoma cells. *Biochemistry* 38:172–179.
- Liu C, Weaver DR, Jin X, Shearman LP, Pieschl RL, Gribkoff VK, Reppert SM. 1997. Molecular dissection of two distinct actions of melatonin on the suprachiasmatic circadian clock. *Neuron* 19:91–102.
- Lynch HJ, Eng JP, Wurtman RJ. 1973. Control of pineal indole biosynthesis by changes in sympathetic tone caused by factors

- other than environmental lighting. *Proc Natl Acad Sci USA* 70:1704–1707.
- MacKenzie RS, Melan MA, Passey DK, Witt-Enderby PA. 2002. Dual coupling of MT(1) and MT(2) melatonin receptors to cyclic AMP and phosphoinositide signal transduction cascades and their regulation following melatonin exposure. *Biochem Pharmacol* 63:587–595.
- Menéndez-Peláez A, Poeggeler B, Reiter RJ, Barlow-Walden L, Pablos MI, Tan DX. 1993. Nuclear localization of melatonin in different mammalian tissues: immunocytochemical and radioimmunoassay evidence. *J Cell Biochem* 53:373–382.
- Menéndez-Peláez A, Reiter RJ. 1993. Distribution of melatonin in mammalian tissues: the relative importance of nuclear versus cytosolic localization. *J Pineal Res* 15:59–69.
- Morgan PJ, Barrett P, Hazlerigg DG, Milligan G, Lawson W, MacLean A, Davidson G. 1995. Melatonin receptors couple through a cholera toxin-sensitive mechanism to inhibit cyclic AMP in the ovine pituitary. *J Neuroendocrinol* 7:361–369.
- Mühlbauer E, Peschke E. 2005. Uhrengene und ihre Bedeutung für die pankreatische Insel. In: Peschke E (ed.) *Endokrinologie II, Vorträge im Rahmen des Projektes „Zeitstrukturen endokriner Systeme“*. Abh Sächs Akad Wiss, Math-nat Kl 63/2. Stuttgart/Leipzig: S. Hirzel. S. 33–45.
- 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 β -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.
- Nash MS, Osborne NN. 1995. Pertussis toxin-sensitive melatonin receptors negatively coupled to adenylate cyclase associated with cultured human and rat retinal pigment epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 36:95–102.
- Nambodiri MAA, Favilla JT, Klein DC. 1981. Pineal N-acetyltransferase is inactivated by disulfide-containing peptides: insulin is the most potent. *Science* 213:571–573.
- O'Brien IA, Lewin IG, O'Hare JP, Arendt J, Corral RJ. 1986. Abnormal circadian rhythm of melatonin in diabetic autonomic neuropathy. *Clin Endocrinol (Oxf)* 24:359–364.
- Orlov SN, Maksimova NV. 1999. Efflux of cyclic adenosine monophosphate from cells: mechanisms and physiological implications. *Biochemistry (Mosc.)* 64:127–135.
- Peschke E. 2001. Vorhaben Zeitstrukturen endokriner Systeme. *Jb Sächs Akad Wiss* 1999/2000, S. 207–217.
- Peschke E. 2003a. Zum Einfluss von Melatonin auf Insulinsekretion, Signaltransduktion und Sekretionsrhythmik pankreatischer B-Zellen *in vitro*. In: Peschke E (ed.) *Endokrinologie, Vorträge im Rahmen des Projektes „Zeitstrukturen endokriner Systeme“*. Abh Sächs Akad Wiss, Math-nat Kl 60/1. Stuttgart/Leipzig: S. Hirzel. S. 135–160.
- Peschke E. 2003b. (ed.) *Endokrinologie, Vorträge im Rahmen des Projektes „Zeitstrukturen endokriner Systeme“*. Abh Sächs Akad Wiss, Math-nat Kl 60/1. Stuttgart/Leipzig: S. Hirzel. 167 Seiten, 73 Abbildungen.
- Peschke E. 2003c. Vorhaben Zeitstrukturen endokriner Systeme. *Jb Sächs Akad Wiss* 2001/2002, S. 278–298.
- Peschke E. 2004. Über den phylogenetischen Funktionswandel des Pinealorgans und seine Bedeutung für die Insulinsekretion bei Mammalia. *Sitzungsber Sächs Akad Wiss, Math-nat Kl* 129/3. Stuttgart/Leipzig: S. Hirzel. 34 Seiten, 22 Abbildungen.
- Peschke E. 2005. (ed.) *Endokrinologie II, Vorträge im Rahmen des Projektes „Zeitstrukturen endokriner Systeme“*. Abh Sächs Akad Wiss, Math-nat Kl 63/2. Stuttgart/Leipzig: S. Hirzel. 126 Seiten, 38 Abbildungen, 5 Tabellen.
- Peschke E. 2006. Neue Aspekte der Bedeutung von Melatonin für die Insulinsekretion. *Jahrb. 2005 der Deutschen Akademie der Naturforscher Leopoldina (Halle/Saale), LEOPOLDINA (R. 3)* 51, S. 345–354.
- Peschke E, Bach AG, Mühlbauer E. 2006b. Parallel signaling pathways of melatonin in the pancreatic beta-cell. *J Pineal Res* 40:184–191.
- Peschke E, Fauteck JD, Mußhoff U, Schmidt F, Beckmann A, Peschke D. 2000. Evidence for a melatonin receptor within pancreatic islets of neonate rats: functional, autoradiographic, and molecular investigations. *J Pineal Res* 28:156–164.
- Peschke E, Frese T, Chankiewitz E, Peschke D, Preiss U, Schneyer U, Spessert R, Mühlbauer E. 2006a. Diabetic Goto Kakizaki rats as well as type 2 diabetic patients show a decreased diurnal serum melatonin level and an increased pancreatic melatonin-receptor status. *J Pineal Res* 40:135–143.
- Peschke E, Mühlbauer E, Mußhoff U, Csernus V, Chankiewitz 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, Peschke D, Hammer T, Csernus VJ. 1997. Influence of melatonin and serotonin on glucose-stimulated insulin release from perfused rat pancreatic islets *in vitro*. *J Pineal Res* 23:156–163.
- Peschke E, Stumpf I, Bazwinsky I, Litvak L, Dralle H, Mühlbauer E. 2007. Melatonin and type 2 diabetes – a possible link? *J Pineal Res* 42:350–358.
- Picinato MC, Haber EP, Carpinelli AR, Cipolla-Neto J. 2002a. Daily rhythm of glucose-induced insulin secretion by isolated islets from intact and pinealectomized rat. *J Pineal Res* 33:172–177.
- Picinato MC, Haber EP, Cipolla-Neto J, Curi R, de Oliveira Carvalho CR, Carpinelli AR. 2002b. Melatonin inhibits insulin secretion and decreases PKA levels without interfering with glucose metabolism in rat pancreatic islets. *J Pineal Res* 33:156–160.
- Poeggeler B. 2005. Melatonin, aging, and age-related diseases: perspectives for prevention, intervention and therapy. *Endocrine* 27:201–212.
- Popova JS, Dubocovich ML. 1995. Melatonin receptor-mediated stimulation of phosphoinositide breakdown in chick brain slices. *J Neurochem* 64:130–138.
- Quay WB, Gorry KC. 1980. Pineal effects on metabolism and glucose homeostasis: evidence for lines of humoral mediation of pineal influences on tumor growth. *J Neural Transm* 47:107–120.
- Rafii-el-Idrissi M, Calvo JR, Harmouch A, Garcia-Maurino S, Guerrero JM. 1998. Specific binding of melatonin by purified cell nuclei from spleen and thymus of the rat. *J Neuroimmunol* 86:190–197.
- Rasmussen DD, Boldt BM, Wilkinson CW, Yellon SM, Matsuoto AM. 1999. Daily melatonin administration at middle age suppresses male rat visceral fat plasma leptin and plasma insulin to youthful levels. *Endocrinology* 140:1009–1012.

- Reiter RJ. 2003. Melatonin: its role in limiting macromolecular toxicity due to partially reduced oxygen metabolites. In: Peschke E (ed.) *Endokrinologie, Vorträge im Rahmen des Projektes „Zeitstrukturen endokriner Systeme“*. Abh Sächs Akad Wiss, Math-nat Kl 60/1. Stuttgart/Leipzig: S. Hirzel. S. 121–136.
- Reiter RJ, Tan DX, Burkhardt S. 2002. Reactive oxygen and nitrogen species and cellular and organismal decline: amelioration with melatonin. *Mech Ageing Dev* 123:1007–1019.
- Reppert SM, Godson C, Mahle CD, Weaver DR, Slaugenhaupt SA, Gusella JG. 1995a. Molecular characterization of a second melatonin receptor expressed in human retina and brain: The Mel_{1b} melatonin receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 92:8734–8738.
- Reppert SM, Weaver DR, Cassone VM, Godson C, Kolakowski Jr. LF. 1995b. Melatonin receptors are for the birds: molecular analysis of two receptor subtypes differentially expressed in chick brain. *Neuron* 15:1003–1015.
- Reppert SM, Weaver DR, Ebisawa T. 1994. Cloning and characterization of a mammalian melatonin receptor that mediates reproductive and circadian responses. *Neuron* 13:1177–1185.
- Rindler MJ, Bashor MM, Spitzer N, Saier Jr. MH. 1978. Regulation of adenosine 3':5'-monophosphate efflux from animal cells. *J Biol Chem* 253:5431–5436.
- Rosenberg PA, Knowles R, Knowles KP, Li Y. 1994. Beta-adrenergic receptor-mediated regulation of extracellular adenosine in cerebral cortex in culture. *J Neurosci* 14:2953–2965.
- Shiu SY, Li L, Siu SW, Xi SC, Fong SW, Pang SF. 2000. Biological basis and possible physiological implications of melatonin receptor-mediated signaling in the rat epididymis. *Biol Signals Recept* 9:172–187.
- Song Y, Pang CS, Ayre EA, Brown GM, Pang SF. 1996. Melatonin receptors in the chicken kidney are up-regulated by pinealectomy and linked to adenylate cyclase. *Eur J Endocrinol* 135:128–133.
- Steffgen J, Rohrbach S, Beery E, Ersoy D, Jarry H, Metten M, Bornstein SR, Müller GA, Burckhardt G. 1999. Demonstration of a probenecid-inhibitable anion exchanger involved in the release of cortisol and cAMP and in the uptake of p-aminohippurate in bovine adrenocortical cells. *Cell Physiol Biochem* 9:72–80.
- Vanecek J. 1998. Cellular mechanisms of melatonin action. *Physiol Rev* 78:687–721.
- Vanecek J, Klein DC. 1995. Mechanism of melatonin signal transduction in the neonatal rat pituitary. *Neurochem Int* 27:273–278.
- Wang H, Chu W, Das SK, Zheng Z, Hasstedt SJ, Elbein SC. 2003. Molecular screening and association studies of retinoid-related orphan receptor gamma (RORC): a positional and functional candidate for type 2 diabetes. *Mol Genet Metab* 79:176–182.
- Wolden-Hanson T, Mitton DR, McCants RL, Yellon SM, Wilkinson CW, Matsumoto AM, Rasmussen DD. 2000. Daily melatonin administration to middle-aged male rats suppresses body weight, intraabdominal adiposity and plasma leptin and insulin independent of food intake and total body fat. *Endocrinology* 141:487–497.